

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**



TESIS DOCTORAL

**Avances en el conocimiento de la patogenicidad de
Clostridioides difficile**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniela Vanessa Tercero Guerrero

DIRIGIDA POR

**Marta Eulalia García Sánchez
José Luis Blanco Cancelo
Inmaculada Moreno Iruela**

Madrid

© Daniela Vanessa Tercero Guerrero, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Avances en el conocimiento de la patogenicidad de *Clostridioides difficile*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Daniela Vanessa Tercero Guerrero

DIRECTORES

Marta Eulalia García Sánchez
José Luis Blanco Cancelo
Inmaculada Moreno Iruela

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Avances en el conocimiento de la patogenicidad de *Clostridioides difficile*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Daniela Vanessa Tercero Guerrero

Directores

Marta Eulalia García Sánchez
José Luis Blanco Cancelo
Inmaculada Moreno Iruela

Este trabajo ha sido financiado gracias a la siguiente institución:



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES

PID2019-108071RR-C22 “Characterization of Clostridia implicated in porcine and ruminant neonatal diarrhoea: synergy of the associated gut microbiota and role of toxins”.

A mi familia

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, han contribuido a la realización de esta tesis. En primer lugar, a mis directores de tesis:

- A Inma, por su dedicación en cada etapa del desarrollo de esta tesis. Su instrucción oportuna y retroalimentación han sido esenciales para culminar este proyecto.
- A José Luis, por haber supervisado este trabajo a lo largo de estos años, por el tiempo dedicado a las reuniones y a la orientación brindada durante el proceso.
- A Marta, por sus consejos y su esfuerzo en asegurar el cumplimiento de los plazos y garantizar el avance en cada etapa sin contratiempos.

Así mismo, agradezco a todo el equipo del Instituto Carlos III, por su calidez y apoyo incondicional a lo largo de este camino. Gracias a todos por enseñarme con dedicación, por motivarme a dar siempre lo mejor de mí y por hacerme sentir parte de un entorno donde el compañerismo es una constante:

- En especial, a Merche, por su compromiso con la investigación, su mirada crítica y su tiempo, siempre dispuesta a enseñarme algo nuevo.
- A Ana, por su amabilidad, su constante disposición a ayudar y por ser una guía en muchos momentos.
- A Javi, por sus valiosas aportaciones para la redacción de la tesis.
- A Sole, por su disposición a enseñar y colaborar siempre que fue necesario.
- A Leydis, por su sentido del humor y sus sabios consejos.
- A David, por su ayuda para capturar imágenes de calidad.
- Y a Irene, por su contribución en este proceso.

También, expreso mi agradecimiento a los coautores del artículo científico publicado a partir de los resultados de esta tesis:

- A Julio, Laura y Marta por su ayuda en el procesamiento de los datos de bioinformática y la respuesta a los revisores.

Además, agradezco a la Universidad Complutense de Madrid, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación. Y al Ministerio de ciencia e innovación por el financiamiento PID2019-108071RR-C22 que hizo posible la realización de este proyecto.

Doy gracias a Dios por darme salud, fortaleza para superar cada desafío y constancia para finalizar este proyecto.

Mi más profundo agradecimiento a mi familia:

- A mis padres, Roberto y Jenny, por ser mi apoyo incondicional, por creer en mí y por ser pilares fundamentales en mi vida. Su amor, paciencia y confianza me han dado la fuerza para seguir adelante en cada desafío.
- A Rafa, por su cariño, por estar siempre a mi lado, escuchándome, apoyándome y alentándome a seguir incluso en los momentos más difíciles y a su familia, por su comprensión y cariño.
- A mis queridas hermanas, Martha y Roberta, por escucharme, animarme y ser esas personas en las que puedo confiar plenamente.
- A mi cuñado, Adolfo, por su generosidad y disponibilidad para ayudar.

Finalmente, agradezco a mis amigos Marthita, Bonoso, Jessenia, Emma y Grethel, por estar siempre ahí. Su amistad ha sido un refugio en este camino.

ÍNDICE

Índice de Figuras	1
Índice de tablas	5
Resumen	7
Summary	11
Listado de abreviaturas	15
1. Introducción	19
1.1. <i>Clostridioides difficile</i>	21
1.1.1. Reclasificación de <i>Clostridium difficile</i> a <i>Clostridioides difficile</i>	21
1.1.2. Características de <i>C. difficile</i>	21
1.2. Patogenia de la enfermedad	23
1.2.1. Síntomas de la CDI	24
1.3. Factores de patogenicidad de <i>C. difficile</i>	25
1.3.1. Factores de adhesión	26
1.3.2. Exoenzimas	26
1.3.3. Toxinas	26
1.4. Diagnóstico de la infección por <i>C. difficile</i>	31
1.4.1. Cultivo toxigénico	34
1.4.2. Glutamato deshidrogenasa	34
1.4.3. Métodos moleculares	35
1.4.4. Ensayos inmunoenzimáticos	35
1.4.5. Ensayo de neutralización de citotoxicidad celular	37
1.5. Principales técnicas de tipado de <i>C. difficile</i>	38
1.5.1. Ribotipado	38
1.5.2. Toxinotipado	40
1.5.3. Secuenciación del genoma completo	41

1.6.	Epidemiología	42
1.7.	Enfoque “One health” aplicado a la CDI	43
1.8.	Tratamiento	45
1.8.1.	Humanos	45
1.8.2.	Veterinaria	48
1.9.	Resistencia a antibióticos	48
1.9.1.	Mecanismos de resistencia a los antibióticos de <i>C. difficile</i>	49
1.9.2.	Resistencia a múltiples fármacos	50
2.	Justificación y objetivos	53
2.1.	Objetivo general	57
2.2.	Objetivos específicos	57
3.	Material y métodos	59
3.1.	Material biológico	61
3.1.1.	Animales	61
3.1.2.	Líneas celulares	61
3.1.3.	Cepas	61
3.2.	Productos y equipos	63
3.2.1.	Productos	63
3.2.2.	Equipos	65
3.3.	Secuenciación del genoma completo de cepas de <i>C. difficile</i>	66
3.3.1.	Cultivo microbiológico	66
3.3.2.	Extracción de ADN bacteriano	66
3.3.3.	Secuenciación y análisis de datos	67
3.4.	Desarrollo de un ELISA sándwich para detección de TcdB de <i>C. difficile</i>	69
3.4.1.	Producción de antígenos	69
3.4.2.	Obtención de anticuerpos frente a la TcdB de <i>C. difficile</i>	76

3.4.3.	Desarrollo del ELISA Sándwich para la detección de TcdB de <i>C. difficile</i>	82
3.5.	Puesta a punto de un ensayo de neutralización de citotoxicidad celular	85
3.5.1.	Toxinas y antitoxinas empleadas	85
3.5.2.	Células Vero	85
3.5.3.	Ensayo de citotoxicidad	85
3.5.4.	Ensayo de neutralización de citotoxicidad celular	87
4.	Resultados y Discusión	91
4.1.	Secuenciación del genoma de aislados de <i>C. difficile</i>	93
4.1.1.	Identificación taxonómica	93
4.1.2.	Genes de resistencia antimicrobiana	95
4.1.3.	Genes de factores de patogenicidad	97
4.2.	Desarrollo de inmunoensayos que permitan la cuantificación de TcdB en cepas de <i>C. difficile</i> .	101
4.2.1.	Producción del toxoide y AcP N° 1	101
4.2.2.	Producción de la proteína recombinante B-Tcd y el AcP N° 2	103
4.2.3.	Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales	106
4.2.4.	Desarrollo de ELISA tipo Sándwich	109
4.2.5.	Cuantificación de TcdB en cepas de <i>C. difficile</i>	115
4.3.	Evaluación de la capacidad de neutralización de la citotoxicidad de TcdB en células Vero del AcP N°2	121
4.3.1.	Puesta a punto del ensayo de neutralización de citotoxicidad celular	121
4.3.2.	Comparación de la eficacia de neutralización entre el AcP N° 2 y la antitoxina de TechLab	128
5.	Conclusiones	133
5.	<i>Conclusions</i>	137
6.	Bibliografía	139
7.	Anexos	173

Anexo 1. Material suplementario	175
Anexo 2. Aportaciones científicas derivadas de la tesis	180

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>C. difficile</i>	22
Figura 2. Características de <i>C. difficile</i>	23
Figura 3. Patogenia de la CDI	24
Figura 4. PaLoc de <i>C. difficile</i>	27
Figura 5. Estructura de la TcdA y TcdB de <i>C. difficile</i>	28
Figura 6. Estructura de la CDT	30
Figura 7. Algoritmos recomendados para diagnóstico de CDI según la ESCMID	31
Figura 8. Esquematización de los ELISA	36
Figura 9. Distribución geográfica de los ribotipos de <i>C. difficile</i> en Europa	39
Figura 10. Variaciones en la región del PaLoc que codifica las toxinas de <i>C. difficile</i>	41
Figura 11. Transmisión de <i>C. difficile</i>	44
Figura 12. Análisis bibliométrico por palabras claves- Exploración nodo “humans”	55
Figura 13. Análisis bibliométrico por palabras claves - Exploración nodo “animal”	56
Figura 14. Fragmento de TcdB elegido para el diseño de la B-Tcd	70
Figura 15. Secuencia de nucleótidos de la TcdB	71
Figura 16. Mapa del vector de expresión pET-28(+)	71
Figura 17. Purificación de la B-Tcd	72
Figura 18. Cuantificación de la concentración de la TcdB por densitometría de bandas	73
Figura 19. Cobertura de la B-Tcd sobre la TcdB de <i>C. difficile</i>	74
Figura 20. Esquema del proceso de obtención de anticuerpos monoclonales	76
Figura 21. Esquema del proceso de obtención de anticuerpos policlonales	80
Figura 22. Diseño de placa de 96 pocillos para calcular la toxicidad de toxinas de <i>C. difficile</i> en células Vero	86
Figura 23. Optimización del ensayo de neutralización de citotoxicidad celular	88
Figura 24. Diseño de placa de 96 pocillos para calcular la neutralización de citotoxicidad de toxinas de <i>C. difficile</i> en células Vero	89

Figura 25. Relación filogenética de 61 aislamientos de <i>C. difficile</i>	94
Figura 26. Resultados de WGS de las cepas de <i>C. difficile</i>	100
Figura 27. Citotoxicidad del toxoide de <i>C. difficile</i>	101
Figura 28. Reactividad del AcP N° 1 ante la toxina B de <i>C. difficile</i>	102
Figura 29. Reactividad del AcP N° 2 ante la B-Tcd de <i>C. difficile</i>	104
Figura 30. Elución del AcP purificado por columna HiTrap Protein A HP	106
Figura 31. Elución del AcP N°2 purificado por afinidad al antígeno	106
Figura 32. Reactividad por Western Blot de los AcM frente a B-Tcd de <i>C. difficile</i>	107
Figura 33. Reactividad por Western Blot de AcM y AcP N° 2 frente TcdB de <i>C. difficile</i>	108
Figura 34. Elución del AcM SIM 542.20.2.2 purificado por columna HiTrap Protein G HP	108
Figura 35. Curva patrón obtenida en el ELISA sándwich AcM SIM 542 18.1.2 /AcP N°1 para detección de B-Tcd	110
Figura 36. Curva patrón obtenida en el ELISA sándwich AcM SIM 542 20.2.2 /AcP N°1 para detección de B-Tcd	111
Figura 37. Curva patrón obtenida en el ELISA sándwich AcM SIM 542 22.1.1 /AcP N°1 para detección de B-Tcd	111
Figura 38. Selección del Anticuerpo de captura	113
Figura 39. Esquema del ELISA sándwich	113
Figura 40. Curva patrón ELISA Sándwich- AcP/AcP	114
Figura 41. Determinación de TcdB de las cepas de <i>C. difficile</i>	118
Figura 42. Análisis por Western blot de toxinas de <i>C. difficile</i>	119
Figura 43. Control de células Vero	121
Figura 44. Acción citotóxica de <i>C. difficile</i> en células Vero	122
Figura 45. Formación de cristales de formazán al agregar MTT a las células viables	122
Figura 46. Evaluación de la temperatura para el almacenamiento de las toxinas	124
Figura 47. Valores medios de end-point de las cepas de <i>C. difficile</i>	127
Figura 48. Neutralización de la citotoxicidad de <i>C. difficile</i> en células Vero	129

Figura 49. Neutralización de la actividad de la toxina TechLab empleando antitoxina TechLab (A1) y el AcP N°2 (A2)	130
Figura 50. Neutralización de la actividad de la toxina CD21 empleando la antitoxina TechLab (A1) y el AcP N°2 (A2)	131

Índice de tablas

Tabla 1. Mecanismo de acción de la TcdB de <i>C. difficile</i>	29
Tabla 2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos de <i>C. difficile</i>	52
Tabla 3. Descripción de las muestras	62
Tabla 4. Descripción de toxinas y antitoxinas	85
Tabla 5. Genes de resistencia a los antibióticos detectados en aislados de <i>C. difficile</i>	95
Tabla 6. Detección de genes de factores de virulencia en aislados de <i>C. difficile</i>	98
Tabla 7. Reactividad AcP frente a la B-Tcd y toxoide de <i>C. difficile</i>	104
Tabla 8. Reactividad de AcM frente a la B-Tcd de <i>C. difficile</i>	107
Tabla 9. Parámetros cinéticos de los AcM de captura / AcP N°1	110
Tabla 10. Parámetros cinéticos del ELISA sándwich desarrollado empleando los anticuerpos SIM 542 20.2.2 / AcP N°2	111
Tabla 11. Resultados de la cuantificación de la TcdB de <i>C. difficile</i> mediante ELISA Sándwich	116
Tabla 12. <i>End-point</i> de la actividad citolítica de las cepas cultivadas de <i>C. difficile</i>	125

Resumen

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es una bacteria grampositiva, anaeróbica estricta, capaz de formar esporos. Su acción patógena se debe a la producción de las toxinas A, B y, en cepas hipervirulentas, de la toxina binaria (CDT). *C. difficile* es un patógeno entérico relevante en diversas especies animales y en humanos. Asimismo, se considera la principal causa de diarrea asociada al uso de antibióticos y a infecciones nosocomiales en humanos. Su creciente importancia como patógeno zoonótico representa una amenaza para la salud pública, debido al aumento en las resistencias a antibióticos y a la aparición de cepas hipervirulentas asociadas con infecciones graves, altas tasas de recurrencias y mortalidad. En España, el gasto anual por infecciones por *C. difficile* en humanos asciende a aproximadamente 41,8 millones de euros. Los cambios epidemiológicos de esta enfermedad subrayan la necesidad de estudiar la relación entre las cepas aisladas en humanos y animales y caracterizar cepas de origen animal, ya que a pesar de la importancia de la infección por *C. difficile* en animales, no se han publicado directrices sobre la detección y el control de este patógeno. Por este motivo, nos propusimos profundizar en la comprensión de la patogenicidad de *C. difficile* mediante la caracterización de cepas de distintos ribotipos y toxinotipos.

Para abordar el objetivo de esta investigación, se recuperaron un total de 23 aislados de la colección de cepas de *C. difficile* del grupo de investigación COVEMI del departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM. Los aislamientos provinieron de animales (n=12) y de muestras ambientales (n=11). Estas cepas pertenecían a los ribotipos (toxinotipos): RT078 (A+B+CDT+), RT126 (A+B+CDT+), RT014 (A+B+CDT-), RT 110 (A+B+CDT-) y RT 010 (A-B-CDT-).

Primeramente, estas cepas se analizaron mediante secuenciación del genoma completo, detectándose un 86,95% de cepas multirresistentes. Los patrones de multirresistencia predominantes incluyeron resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y β -lactámicos. Sin embargo, una cepa también presentaba un gen asociado con resistencia a lincosamida, macrólidos, estreptogramina a y b, pleuromutilina, oxazolidinona y anfencilol. Entre los factores de patogenicidad, en todos los aislados se detectó el gen *de tcdB*, pero el gen *tcdA* a pesar de que había sido detectado por PCR en análisis previos, no pudo ser confirmada su presencia. Los genes de la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*) se detectaron en cepas que pertenecen a ST2 y ST19; sin embargo, no fueron

identificados en los aislados caracterizados como RT078 y RT126, pertenecientes al ST11, lo que sugiere que la toxina binaria del ST11 está codificada por una variante distinta a la de ST19 y ST2.

Además, observamos discrepancias entre toxinotipos y ribotipos detectados en análisis previos y las *Sequence type* que se determinaron mediante secuenciación del genoma completo en este estudio. Por ejemplo, la cepa CD18, previamente descrita como RT010, contiene los genes *tcdB* y *tcdA*. Asimismo, la tipificación por MLST permitió reclasificar dos cepas identificadas como RT078 (CD15 y CD16) dentro del ST2, mientras que a otra cepa del RT078 (CD19) se clasificó como ST19. Igualmente, MLST clasificó las cepas CD13 y CD14, previamente identificadas como RT014, dentro del ST11. Estos resultados destacan la necesidad de desarrollar y estandarizar técnicas de clasificación taxonómica más precisas que garanticen una mayor eficiencia y reproducibilidad entre distintos laboratorios.

Para establecer la relación genética entre los aislados se realizó un análisis filogenético por SNPs, incluyendo tanto las cepas de este estudio como aislados externos de diversas fuentes y países. Las lecturas de las cepas (n= 61) se mapearon contra el genoma de referencia *C. difficile* M120 NC_017174.1 (ST11) utilizando BWA. El análisis de SNPs reveló dos clados principales (A y B), con el clado B subdividido en B1 y B2, ambos predominantemente compuestos por cepas ST11. El subclado B1 incluyó aislados de humano, animal y ambiental, con una divergencia entre 9- 1.149 SNPs, mientras que el subclado B2, conformado mayormente por aislados de origen animal y ambiental, mostró una variabilidad genética <29 SNPs. Estos resultados evidencian una alta relación genética entre las cepas ambientales, animales y humanas, sugiriendo una vía de transmisión interconectada y resaltando la relevancia del ST11 en la epidemiología de *C. difficile* y la necesidad de abordar esta enfermedad bajo un enfoque *One Health*.

Además, se desarrolló un ELISA tipo sándwich para la cuantificación de la toxina B utilizando un anticuerpo policlonal de conejo, producido en nuestro laboratorio, como anticuerpo de captura y de revelado. La sensibilidad del ensayo fue evaluada mediante una curva patrón con la toxina B recombinante (B-Tcd), determinándose un límite de detección de 0,033 ng/mL y un límite de cuantificación de 0,92 ng/mL. Los resultados mostraron que el 40% de las cepas analizadas fueron positivas para la producción de TcdB, de las cuales el 90% presentó concentraciones entre 20 y 60 ng/mL, mientras que

una cepa alcanzó niveles superiores a 500 ng/mL. Cabe destacar que todas las cepas productoras de TcdB pertenecían al ST11, que incluye al ribotipo hipervirulento RT078, asociado tanto a infecciones en animales como a infecciones comunitarias en humanos. En contraste, el 60% restante de las cepas produjo niveles de TcdB por debajo del límite de detección, por lo que fueron clasificadas como negativas.

Finalmente, se evaluó la actividad citotóxica de la toxina B en células Vero empleando el ensayo de viabilidad con MTT. Los resultados demostraron que el almacenamiento de las toxinas a -20°C afecta negativamente su actividad citotóxica, mientras que el almacenamiento a -80°C permite su adecuada conservación. También, se comprobó que el anticuerpo policlonal de conejo producido en esta tesis neutraliza la toxina B de *C. difficile* y funciona como antitoxina en un ensayo de neutralización de citotoxicidad celular. Estos resultados indican que la proteína recombinante diseñada para este trabajo estimula la producción de anticuerpos neutralizantes por lo que se podría postular como un candidato para el diseño de una vacuna de subunidades. Asimismo, la eficacia nuestra antitoxina fue comparada con la de un kit comercial, mostrando una considerable capacidad neutralizante, lo que sugiere su potencial para aplicaciones diagnósticas, en pruebas dirigidas exclusivamente a TcdB.

Summary

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a Gram-positive, strictly anaerobic, spore-forming bacterium. Its pathogenic action is attributed to the production of toxins A and B, and, in hypervirulent strains, binary toxin (CDT). *C. difficile* is a relevant enteric pathogen in various animal species and humans. Moreover, it is considered the leading cause of antibiotic-associated diarrhea and nosocomial infections in humans. Its growing significance as a zoonotic pathogen poses a public health threat due to increasing antibiotic resistance and the emergence of hypervirulent strains associated with severe infections, high recurrence rates, and mortality. In Spain, the annual cost of *C. difficile* infections in humans is estimated at approximately €41.8 million. The epidemiological shifts of this disease underscore the need to investigate the relationship between strains isolated from humans and animals and to characterize animal-origin strains. Despite the importance of *C. difficile* infections in animals, no official guidelines have been published regarding the detection and control of this pathogen. Therefore, this study aimed to further understand the pathogenicity of *C. difficile* by characterizing strains from different ribotypes and toxinotypes.

To achieve this objective, a total of 23 isolates were recovered from the *C. difficile* strain collection of the COVEMI research group, Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, UCM. The isolates originated from animals (n=12) and environmental samples (n=11). These strains belonged to the following ribotypes (toxinotypes): RT078 (A+B+CDT+), RT126 (A+B+CDT+), RT014 (A+B+CDT-), RT110 (A+B+CDT-), and RT010 (A-B-CDT-).

Initially, these strains were analyzed by whole-genome sequencing, revealing that 86.95% were multidrug-resistant. The predominant multidrug resistance patterns included resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclines, and β -lactams. However, one strain also carried a gene associated with resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins A and B, pleuromutilins, oxazolidinones, and phenicols. Regarding pathogenicity factors, the *tcdB* gene was detected in all isolates; however, the presence of the *tcdA* gene, despite being previously identified by PCR, could not be confirmed. The binary toxin genes (*cdtA* and *cdtB*) were detected in strains belonging to ST2 and ST19; however, they were not identified in isolates characterized as RT078 and

RT126, which belong to ST11. This suggests that the binary toxin of ST11 is encoded by a variant different from that of ST19 and ST2.

Furthermore, discrepancies were observed between previously determined toxinotypes and ribotypes and the sequence types identified through whole-genome sequencing in this study. For example, strain CD18, previously described as RT010, was found to carry the *tcdB* and *tcdA* genes. Likewise, MLST analysis reclassified two strains initially identified as RT078 (CD15 and CD16) into ST2, while another RT078 strain (CD19) was classified as ST19. Similarly, MLST classified strains CD13 and CD14, previously identified as RT014, into ST11. These findings highlight the necessity of developing and standardizing more precise taxonomic classification techniques to ensure greater efficiency and reproducibility across laboratories.

To establish the genetic relationship among isolates, a phylogenetic analysis based on SNPs was performed, including both the strains from this study and external isolates from various sources and countries. The sequencing reads of the isolates (n=61) were mapped against the reference genome *C. difficile* M120 NC_017174.1 (ST11) using BWA. SNP analysis revealed two main clades (A and B), with clade B further subdivided into B1 and B2, both predominantly composed of ST11 strains. Subclade B1 included human, animal, and environmental isolates, showing a divergence of 9–1,149 SNPs, whereas subclade B2, primarily composed of animal and environmental isolates, exhibited genetic variability of <29 SNPs. These findings demonstrate a strong genetic relationship among environmental, animal, and human strains, suggesting an interconnected transmission pathway and emphasizing the significance of ST11 in the epidemiology of *C. difficile*. This underscores the need to address this disease from a One Health perspective.

Additionally, a sandwich ELISA was developed for the quantification of toxin B using a rabbit polyclonal antibody—produced in our laboratory—as both the capture and detection antibody. The assay sensitivity was evaluated using a standard curve with recombinant B-Tcd toxin, determining a detection limit of 0.033 ng/mL and a quantification limit of 0.92 ng/mL. Results showed that 40% of the analyzed strains were positive for TcdB production, with 90% of them presenting concentrations between 20 and 60 ng/mL, while one strain exceeded 500 ng/mL. Notably, all TcdB-producing strains belonged to ST11, which includes the hypervirulent ribotype RT078, associated with infections in animals and community-acquired infections in humans. In contrast, the

remaining 60% of the strains produced TcdB levels below the detection limit and were classified as negative.

Finally, the cytotoxic activity of toxin B was evaluated in Vero cells using an MTT viability assay. The results demonstrated that storing toxins at -20°C negatively affected their cytotoxic activity, whereas storage at -80°C preserved their potency. Additionally, it was confirmed that the rabbit polyclonal antibody produced in this study neutralized *C. difficile* toxin B and functioned as an antitoxin in a cell cytotoxicity neutralization assay. These findings suggest that the recombinant protein designed in this study effectively stimulates the production of neutralizing antibodies and could be considered a potential candidate for the development of a subunit vaccine. Furthermore, the efficacy of our antitoxin was compared to that of a commercial kit, demonstrating significant neutralizing capacity, which suggests its potential application in diagnostic assays specifically targeting TcdB.

Listado de abreviaturas

AcM: Anticuerpo monoclonal

AcP: Anticuerpo policlonal

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ACF: Adyuvante completo de Freund

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

APD: Dominio autocatalítico de cisteína proteasa

BHI: Infusión cerebro corazón

BSP: Programa de Estandarización Biológica

B-Tcd: Toxina B recombinante de *C. difficile*

C. difficile: *Clostridioides difficile*

CDI: Infección por *Clostridioides difficile*

CA-CDI: CDI comunitario

CCNA: Ensayo de neutralización de citotoxicidad celular

CDT: Toxina binaria

CROPs: Dominio de translocación y oligopéptidos repetitivos combinados

CST: Toxina binaria de *Clostridium spiroforme*

DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

D.O: Densidad óptica

DRBD: Dominio central de unión al receptor

E. coli: *Escherichia coli*

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades

EC50: Concentración efectiva al 50%

ELISAI: ELISA indirecto

ESCMID: Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FCDI: Colitis fulminante por CDI

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FMT: Trasplante de microbiota fecal

GTD: Dominio N-terminal de glucosiltransferasa

HA-CDI: CDI asociado a la asistencia sanitaria

HillSlope: Pendiente de la curva

HRP: Peroxidasa de rábano picante

Ig: Inmunoglobulina
InsP6: Hexakisfosfato de inositol
IMAC: Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
ISR: Región espaciadora intergénica
LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle
LOD: Límite de detección
LOQ: Límite de Cuantificación
MDR: Resistencia a múltiples fármacos
MGEs: Elementos genéticos móviles
MLST: Tipificación de secuencias Multilocus
MLVA: Análisis de repetición en tándem de número variable en múltiples loci
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MWM: Marcador de peso molecular
NAP1: Campo pulsado norteamericano tipo 1
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal
PaLoc: Locus de Patogenicidad de *C. difficile*
pb: Pares de bases
PBS: Disolución salina tamponada con fosfato
PBS-T: PBS suplementado con 0,05% de Tween 20
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado
PVDF: Difluoruro de polivinilideno
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
QRDR: Región determinante de la resistencia a las quinolonas
REA: Análisis de endonucleasas de restricción
RNAP: ARN polimerasa.
RT: Ribotipo
rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico
SNC: Suero normal de conejo
SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido
SNR: Suero normal de ratón
ST: *Sequence Type*
TC: Cultivo toxigénico

TcdA: Toxina A de *C. difficile*

tcdA: Gen de la toxina A de *C. difficile*

TcdB: Toxina B de *C. difficile*

tcdB: Gen de la toxina B de *C. difficile*

TcnA: α -toxina de *Clostridium novyi*

TcsH: Toxina hemorrágica de *Paeniclostridium (Clostridium) sordellii*

TcsL: Toxina letal de *Paeniclostridium (Clostridium) sordellii*

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF - α : Factor de necrosis tumoral alfa

TpeL: Toxina citotoxina grande de *Clostridium perfringens*

VFDB: Base de datos de factores de virulencia

WGS: Secuenciación del genoma completo

Introducción

1. Introducción

1.1. *Clostridioides difficile*

1.1.1. Reclasificación de *Clostridium difficile* a *Clostridioides difficile*

Clostridium difficile fue identificado por primera vez por Hall & O'Toole en 1935, como parte de la microbiota intestinal de recién nacidos. En ese momento, lo llamaron *Bacillus difficilis* debido a la dificultad que presentaba su aislamiento. No fue hasta tres años después, en 1938, que Prévot lo renombró como *Clostridium difficile*. Sin embargo, con el uso de métodos moleculares, Collins et al. (1994) propusieron una revisión del género *Clostridium* basada en la secuencia del gen 16S rRNA. Esta revisión, junto con la propuesta de Lawson & Rainey (2016) de restringir el género *Clostridium* a *Clostridium butyricum* y especies relacionadas, excluyó a *Clostridium difficile*, que está filogenéticamente distante del clúster I del rRNA (Collins et al., 1994). De esta manera, *Clostridium difficile* fue reclasificado como *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) (Lawson et al., 2016).

Taxonomía de *C. difficile* según NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Dominio: Bacteria

Filo: Bacillota

Clase: Clostridia

Orden: Peptostreptococcales

Familia: Peptostreptococcaceae

Género: *Clostridioides*

Especie: *Clostridioides difficile*

1.1.2. Características de *C. difficile*

C. difficile es una bacteria grampositiva y anaeróbica estricta, que posee la capacidad de formar esporos (Figura 1), permitiéndole sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Lawson et al., 2016); llegando a sobrevivir hasta 5 meses en superficies inanimadas del medio ambiente (Claro et al., 2014; Kachrimanidou et al., 2019). Los esporos son ovalados, subterminales (raramente terminales) y distienden la célula (Lawson et al., 2016).

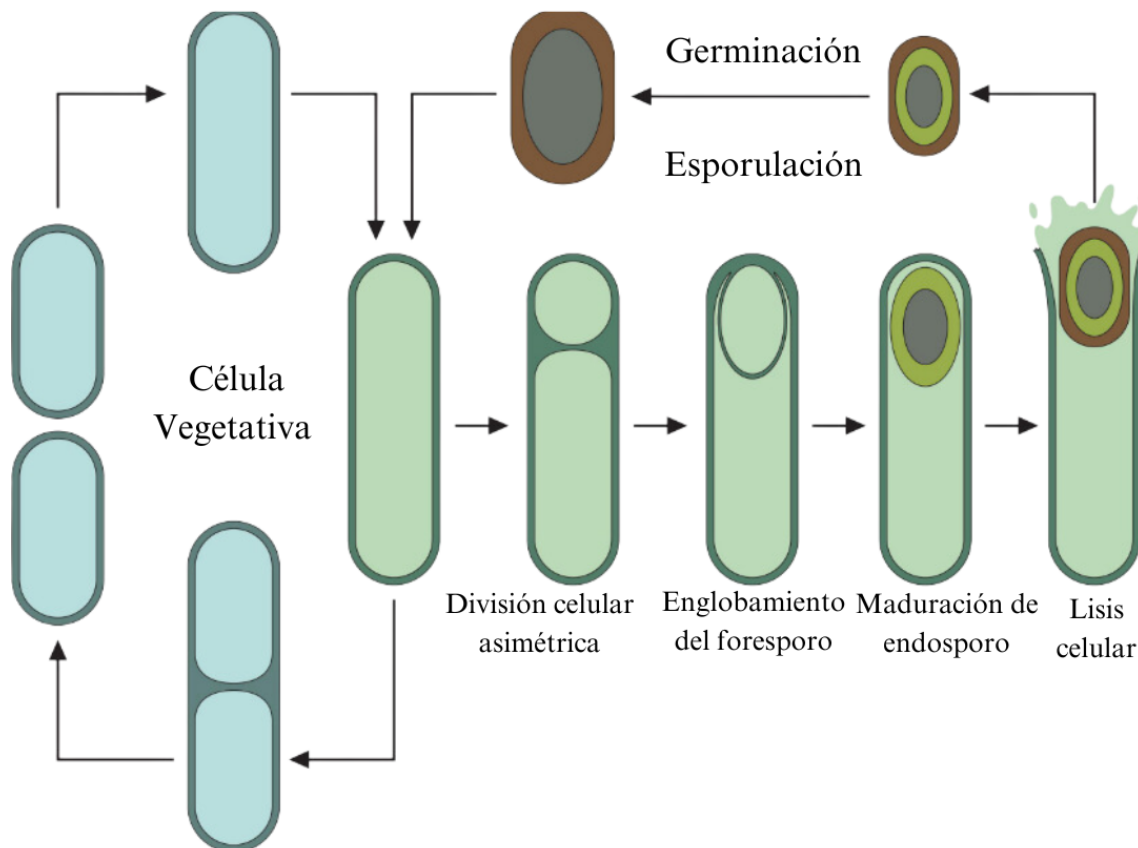


Figura 1: Ciclo de vida de *C. difficile*. Cuando las condiciones son favorables, el bacilo se divide por fisión binaria. Sin embargo, en condiciones ambientales desfavorables la célula esporula. La esporulación comienza con una septación asimétrica que separa una célula madre de un compartimento de esporo más pequeño. La célula madre engloba el esporo, formando un preesporo inmaduro de doble membrana dentro de su citoplasma. Después, se sintetiza una capa gruesa de peptidoglicano cortical entre las dos membranas del esporo y se ensamblan capas de revestimiento proteico en su superficie externa. Finalmente, el esporo maduro es liberado tras la lisis de la célula madre. Adaptado de Buddle & Fagan (2023).

Las colonias superficiales de *C. difficile* en agar sangre son de 2-5 mm, circulares, ocasionalmente rizoides, planas o convexas bajas, opacas, grisáceas o blanquecinas (Figura 2A), con una superficie de mate a brillante. En la tinción Gram se puede observar que algunas cepas producen cadenas que constan de dos a seis bacilos alineados de un extremo a otro (Lawson et al., 2016) Figura 2B.

Este patógeno es la principal causa de diarrea asociada a antibióticos y nosocomial en humanos y, además, es un patógeno entérico significativo en muchas especies animales, incluidos los animales de abasto, tales como cerdos, vacas, ovejas y cabras; así como en caballos y mascotas como perros y gatos (Redding et al., 2022).

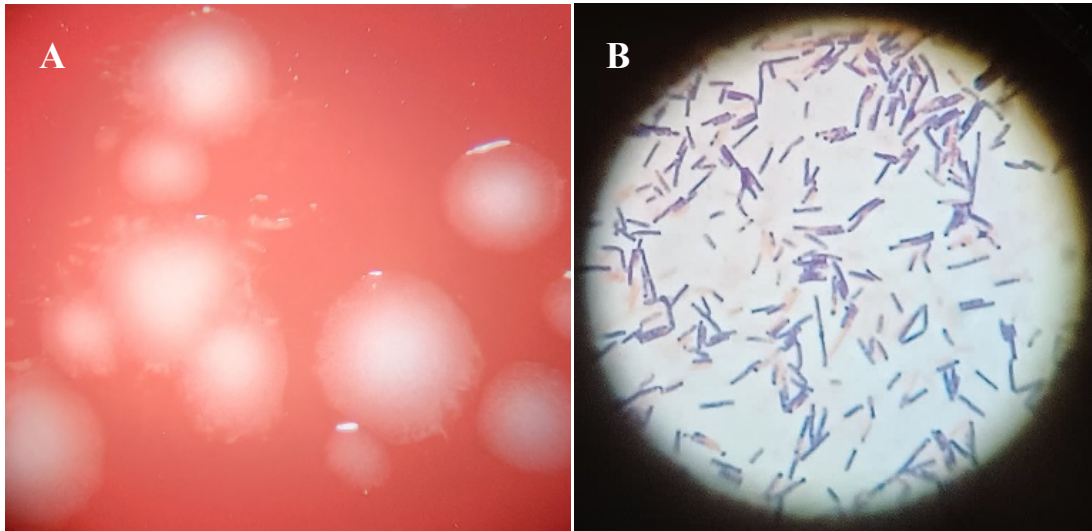


Figura 2. Características de *C. difficile*. A. Cultivo microbiológico de *C. difficile* en Agar sangre. Se pueden observar colonias circulares, rizoides, un poco convexas y blanquecinas. Observados desde una lupa binocular. B. Tinción Gram del cultivo de *C. difficile* a 100X. Se observan los bacilos Gram positivos.

1.2. Patogenia de la enfermedad

Existen dos vías para desarrollar la infección por *C. difficile* (CDI): la primera es a partir de la alteración de la microbiota intestinal, usualmente después de recibir terapia antimicrobiana, lo que provoca disbiosis y favorece la proliferación de *C. difficile*; la segunda es el contagio a través de fuentes exógenas mediante la vía fecal-oral (Buffie & Pamer, 2013; Nishida et al., 2022; Smits et al., 2016).

La patogenia de la enfermedad se desarrolla en el intestino del hospedador (Figura 3). Los esporos después de ser ingeridos sobreviven fácilmente al bajo pH del estómago y, al pasar al duodeno, comienzan a germinar en células vegetativas, que colonizan y proliferan en el colon. La germinación se inicia en respuesta al metabolismo de los ácidos biliares (Buddle & Fagan, 2023). Este requisito de germinación refleja la estrategia adaptativa de *C. difficile* para proliferar en el tracto gastrointestinal de los mamíferos (Gil et al., 2017). La acción de los ácidos biliares induce a las células vegetativas a su primera división celular en aproximadamente 90-180 minutos (Dembek et al., 2013). Esta etapa de colonización se caracteriza por la proliferación de las células vegetativas en el colon y se acompaña por varios mecanismos de patogenicidad, como la adherencia a la mucosa epitelial del hospedador, a menudo mediadas por componentes superficiales de la bacteria y la producción de toxinas y exoenzimas (Janoir, 2016).

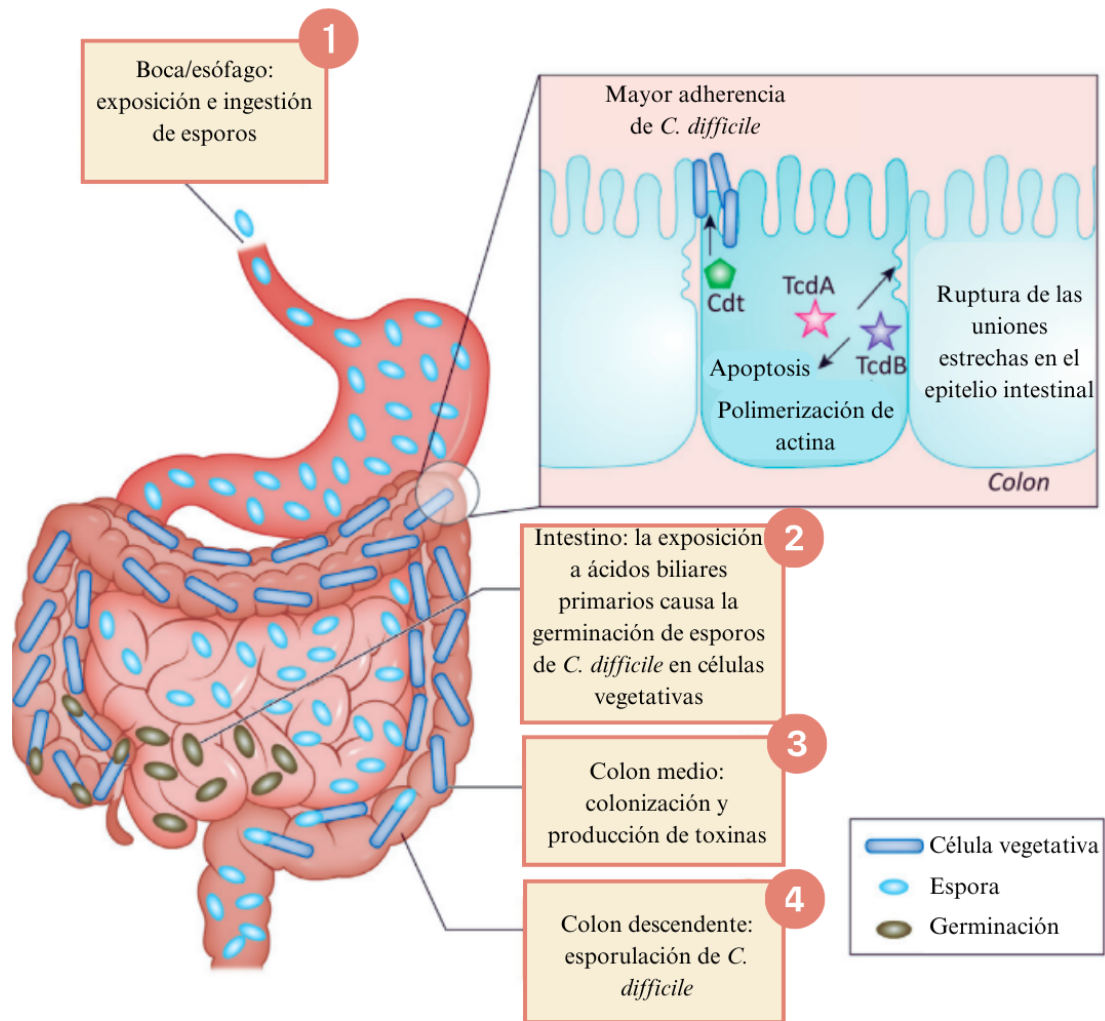


Figura 3. Patogenicidad de la CDI. Adaptado de Sandhu & McBride (2018).

Ciclos posteriores de esporulación generan una subpoblación de esporos que aseguran la transmisión a nuevos hospedadores (Deakin et al., 2012). Estos esporos también pueden ser un reservorio para infecciones recurrentes, después de terminar el tratamiento con antibióticos (Lawley et al., 2009; Buddle & Fagan, 2023).

1.2.1. Síntomas de la CDI

La acción patógena de *C. difficile* se debe a la producción de la toxina A (TcdA), toxina B (TcdB) y, en cepas hipervirulentas también se produce la toxina binaria (CDT), expresada a partir de los operones del componente enzimático (*cdtA*) y del componente de unión (*cdtB*) (Janezic et al., 2020; Persson et al., 2008). A pesar de que la CDT claramente contribuye a la virulencia de *C. difficile*, la TcdA y la TcdB siguen siendo reconocidas como los principales factores de patogenicidad (Gerding et al., 2014; Kuehne et al., 2014; Rupnik & Janezic, 2016).

La producción de toxinas por las células vegetativas conduce a los síntomas de la CDI a partir de un proceso gradual, mediante la unión de las toxinas a las células diana, continuando con la endocitosis del complejo toxina-receptor y la translocación de la toxina a través de las membranas endosómicas hacia el citosol, hasta liberar la fracción de toxina biológicamente activa, la cual modifica proteínas GTPasas de la familia Rho de las células huésped (Aktories et al., 2017), lo que resulta en muerte celular y pérdida de la función de la barrera intestinal (Burke & Lamont, 2014; Etienne-Manneville & Hall, 2002).

El cuadro clínico de la CDI es muy diverso, en lechones puede producir muerte súbita, con o sin diarrea evidente. En animales con sintomatología leve, la enfermedad cursa con diarrea, distensión abdominal, disminución del apetito y crecimiento deficiente (Weese, 2020); en los perros se ha observado una asociación significativa entre la presencia de toxinas de *C. difficile* y el síndrome diarreico hemorrágico agudo (Cave et al., 2002; Keessen et al., 2011); en los caballos, la sintomatología puede variar desde una diarrea leve y autolimitada hasta una enterocolitis hemorrágica hiperaguda rápidamente mortal, no obstante, lo común es que se manifieste con diarrea, toxemia y dolor abdominal (Weese, 2020); y en humanos abarca desde el estado de portador asintomático, diarrea leve o moderada, colitis pseudomembranosa, hasta colitis fulminante potencialmente mortal (FCDI) (Jacek et al., 2019; Lawson et al., 2016).

Estos síntomas se ven exacerbados por la respuesta inmune del huésped, debido a una respuesta inflamatoria intestinal aguda e infiltración de neutrófilos, dañando aún más los epitelios (Kelly & Kyne, 2011).

Por tanto, al evaluar a un paciente con sospecha de *C. difficile*, es importante centrar la historia clínica en identificar tratamientos recientes con antibióticos y las características del paciente de alto riesgo, como la edad avanzada en humanos y edades tempranas en animales (Baker & Chu, 2020; Sinnathamby et al., 2023).

1.3. Factores de patogenicidad de *C. difficile*

La presentación clínica de la CDI está influenciada por una variedad de factores de virulencia, incluidos la producción de factores de adhesión, exoenzimas y diversas toxinas.

1.3.1. Factores de adhesión

C. difficile muestra en su superficie una amplia gama de proteínas que actúan como factores de adhesión, que están involucrados en la interacción con la célula huésped (Janoir, 2016). Entre estos podemos enumerar:

- a. Adhesina de unión a colágeno anclada a SrtB (*CD2831*), facilita la formación de biofilm y mejora la evasión inmunitaria (Arato et al., 2019).
- b. Adhesina putativa (*CD3246*), que en conjunto con la *CD2831* dependen de la actividad de la sortasa para su fijación a la pared celular y son liberadas a través de la actividad de la proteasa altamente específica y única *PPEP-1* (*Zmp1/CD2830*) (Hensbergen et al., 2015; Kirk et al., 2017).
- c. Adhesina de unión al colágeno (*cbpA*) promueve la interacción con el colágeno y la adherencia a la matriz extracelular (Buddle & Fagan, 2023; Tulli et al., 2013);
- d. Proteína fijadora de fibronectina (*Fbp68*) codifica la capacidad de unirse a la fibronectina soluble (Janoir, 2016).
- e. Proteína de unión a sustrato del transportador ABC (*CD0873*), es considerada la principal adhesina de *C. difficile*, debido al papel en la adhesión a células entéricas (Kirk et al., 2017; Kovacs-Simon et al., 2014).
- f. Chaperonina (*GroEL*), mejora la adhesión de *C. difficile* a los enterocitos cuando se expone a choque térmico, pH ácido o niveles bajos de hierro (Brown & Wilson, 2018; Kirk et al., 2017).

1.3.2. Exoenzimas

Entre las exoenzimas que produce *C. difficile* se incluyen proteasas, como:

- a. Metaloproteasa de zinc (*zmp1*), que es capaz de escindir proteínas del huésped (Janoir, 2016).
- b. Cisteína proteasa de unión a la pared celular (*cwp84*), que es altamente inmunogénica (Wright et al., 2008) y se estimula con ampicilina y clindamicina (Denève et al., 2008; Smits et al., 2016).

1.3.3. Toxinas

Las toxinas son el factor de virulencia más significativo de *C. difficile* y su estudio, particularmente el de la TcdB, es fundamental para el desarrollo de esta tesis.

1.3.3.1. Regulación de la producción de toxinas

La TcdA y TcdB están codificadas en el Locus de Patogenicidad (PaLoc) por los genes *tcdA* y *tcdB* respectivamente (Figura 4). En cepas no toxigénicas, que no son capaces de producir toxinas, la región PaLoc suele sustituirse por una secuencia de 115 pb (pares de bases) (Aktories et al., 2017). Este locus además posee tres genes adicionales que participan en la regulación positiva (*tcdR*) y negativa (*tcdC*) de la expresión de las toxinas y el gen responsable de la secreción de las toxinas (*tcdE*) (Rupnik & Janezic, 2016).



Figura 4. PaLoc de *C. difficile*. Región que contiene los genes responsables de la producción de las dos toxinas principales implicadas en la patogenicidad de esta bacteria: TcdA (enterotoxina) y TcdB (citotoxina). Además, posee *tcdC*: un gen regulador negativo que modula la expresión de las toxinas, posiblemente inhibiendo su producción; *tcdR*: un regulador positivo que activa la expresión de *tcdA* y *tcdB* y *tcdE*: un gen involucrado en la secreción de las toxinas fuera de la célula. Adaptado de Orrell & Melnyk (2021).

La expresión de las toxinas en *C. difficile* está influenciada bidireccionalmente por diversos factores ambientales:

- La presencia de glucosa, butanol, biotina y aminoácidos como por ejemplo la prolina y cisteína producen la inhibición de la expresión de las toxinas.
- La presencia de ácidos grasos de cadena corta, como el butirato y las altas temperaturas (37° C) estimulan la producción de toxinas (Aktories et al., 2017; Bouillaut et al., 2015; Karlsson et al., 1999; Karlsson et al., 2000).

a. TcdA

Esta toxina posee una masa molecular de 308 kDa y está compuesta por 2,710 aminoácidos. La TcdA es denominada como enterotoxina debido a que los estudios iniciales en hámsteres y conejos demostraron que esta toxina produce un mayor daño de las mucosas y un aumento de la secreción e inflamación que la TcdB (Aktories et al., 2017; Lima et al., 1988; Mitchell et al., 1986; Triadafilopoulos et al., 1987).

La TcdA posee actividades proinflamatorias mediante la inducción de la producción de interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en los monocitos humanos, así como IL-6 e IL-8 en las células epiteliales intestinales humanas (Kachrimanidou et al., 2019; Sun et al., 2010).

b. TcdB

Esta toxina posee una masa molecular de 270 kDa y está compuesta por 2,366 aminoácidos. La TcdB se clasifica como citotoxina debido a que es hasta 64 veces más tóxica para la línea celular HeLa que la TcdA (Aktories et al., 2017; Donta et al., 1982; Voth & Ballard, 2005), lo que sugiere que juega un papel predominante en la CDI (Ver tabla 1).

- **Estructura de la TcdB**

Tanto la TcdA, como la TcdB pertenecen a la familia de toxinas glucosilantes clostridiales, que también incluye la toxina hemorrágica (TcsH) y la toxina letal (TcsL) de *Paenoclostridium (Clostridium) sordellii*, la α -toxina (TcnA) de *Clostridium novyi* y la TpeL de *Clostridium perfringens* (Aktories et al., 2017). La TcdA y TcdB poseen cuatro dominios estructurales (Figura 5): dominio N-terminal de glucosiltransferasa (GTD), dominio autocatalítico de cisteína proteasa (APD), dominio central de unión al receptor o dominio de translocación (DRBD) y el dominio de oligopéptidos repetitivos combinados (CROPs) (Aktories et al., 2017; P. Chen et al., 2019).

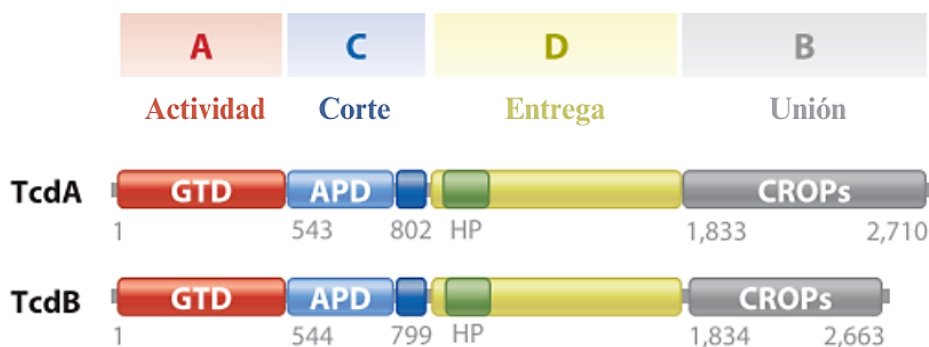


Figura 5. Estructura de la TcdA y TcdB de *C. difficile*. Dominio CROPs: participa en la unión al receptor. Dominio DRBD: participa en la unión a las células huésped y también posee una secuencia hidrofóbica (HP) (aminoácidos 956–1128) que probablemente desempeña un papel en la translocación de toxinas. Dominio APD: es una autoproteasa que está conectada al dominio DRBD mediante un haz de tres hélices (azul oscuro). Dominio GTD: posee actividad glucosiltransferasa que modifica las proteínas Rho. Adaptado de Aktories et al. (2017).

Tabla 1. Mecanismo de acción de la TcdB de *C. difficile*

Dominio	Mecanismo de acción	Alteraciones en la célula	Referencias
CROPs	La toxina se une a los receptores de la superficie celular a través del DRBD y los CROPs y entra en las células a través de un mecanismo de endocitosis. Los CROPs previenen la escisión autoproteolítica prematura de la toxina mediante la estabilización de la conformación	Media un primer contacto entre la toxina y la célula diana.	(Aktories et al., 2017; P. Chen et al., 2018, 2019; Greco et al., 2006; Ho et al., 2005; Yuan et al., 2015).
DRBD	La acidificación en el endosoma desencadena cambios conformacionales en las toxinas que hacen que el DRBD forme un poro y permite el traspaso de los dominios GTD y el APD a través de la membrana endosómica hacia el citosol	La actividad formadora de poros de TcdB contribuye a la necrosis celular observada <i>in vitro</i> .	(P. Chen et al., 2019; Genisyurek et al., 2011; S. Li et al., 2015; Qa'dan et al., 2000; Zhang et al., 2014)
APD	El APD es activado en el citosol de las células huésped por hexakisfosfato de inositol (InsP6) específico de eucariotas y, después, se somete a autoproteólisis para liberar GTD	Es un regulador interno de la actividad proinflamatoria.	(P. Chen et al., 2019; Egerer et al., 2007; Hofmann et al., 1997; Just et al., 1995; Reineke et al., 2007; Sehr et al., 1998).
GTD	El GTD glucosila pequeñas GTPasas de la familia Rho, incluidas Rho, Rac y Cdc42, e inhibe sus funciones	Ruptura del citoesqueleto y redondeo celular. Disfunción de la barrera epitelial, inducción de apoptosis e inflamación	(Aktories et al., 2017; P. Chen et al., 2019; Egerer et al., 2007; Hofmann et al., 1997; Just et al., 1995; Reineke et al., 2007; Sehr et al., 1998).

c. CDT

La CDT es una toxina binaria (Ver figura 6) que está codificada en el locus Cdt (CdtLoc), que codifica genes para enzimas catalíticas que poseen actividad ADP-ribosiltransferasa (*cdtA*) y proteínas de unión al receptor/translocación (*cdtB*) y una proteína reguladora (*cdtR*) (Aktories et al., 2017; Carter et al., 2007). El componente enzimático de CDTa consta de 463 aminoácidos y tiene una masa molecular de ~53 kDa (Petosa et al., 1997; Stubbs et al., 2000). Tras la escisión de una secuencia señal de 43 aminoácidos (Stubbs et al., 2000), el componente maduro CDTa presenta una masa molecular de ~48 kDa. CDTb, el componente de unión de la toxina tiene 876 aminoácidos y masa molecular de 99 kDa (Gerding et al., 2014). CdtLoc está presente en una versión completa o truncada, mientras que en cepas que carecen del CdtLoc, se encuentra insertada una secuencia única de 68 pb en esta ubicación genómica (Carter et al., 2007; Janezic et al., 2020; Stare et al., 2007).

La CDT pertenece a la familia de toxinas actina-ADP-ribosilantes. Esta toxina provoca la despolimerización de la actina, induciendo así la formación de protuberancias basadas en microtúbulos. En esta familia también incluye la toxina C2 de *Clostridium botulinum*, la toxina iota de *Clostridium perfringens* y la toxina binaria de *Clostridium spiroforme* (CST) (Barth et al., 2004). Esta toxina se encuentra en un 5-30% de las cepas de *C. difficile* y está adquiriendo mayor atención debido a que es producida por las denominadas cepas hipervirulentas, como los RT027 y RT078, que causan una mayor morbilidad y mortalidad (Aktories et al., 2017; Gerding et al., 2014).

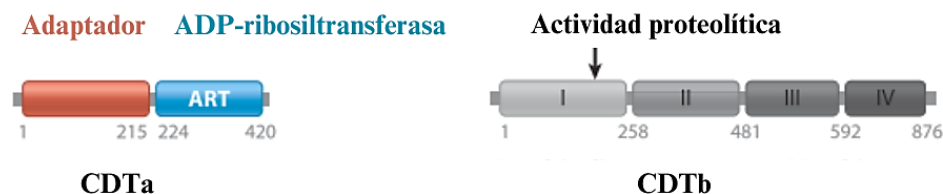


Figura 6. Estructura de la CDT. CDT consta de dos componentes: 1. CDTa es una ADP-ribosiltransferasa que modifica la actina y consta de dos dominios, el dominio N-terminal actúa como un adaptador e interactúa con el componente de unión, mientras que el dominio C-terminal posee actividad ADP-ribosiltransferasa. 2. CDTb es el componente de unión y consta de cuatro dominios, el dominio I se activa mediante escisión proteolítica y luego forma heptámeros. La estructura del componente de unión heptamérico de CDT se deduce de la estructura de la toxina C2 de *Clostridium botulinum* (PDB 2J42). Adaptado de Aktories et al. (2017).

1.4. Diagnóstico de la infección por *C. difficile*

- **Recogida de la muestra**

Las muestras adecuadas para el diagnóstico de laboratorio de la diarrea producida por *C. difficile* son heces acuosas o semisólidas.

- **Transporte y conservación de la muestra**

Las muestras de heces o hisopos rectales deben transportarse en recipientes estériles, de cierre hermético. Los hisopados se pueden enviar sin medio de transporte en casos excepcionales, tal es el caso si las muestras se congelan inmediatamente o si la llegada al laboratorio se produce en un tiempo máximo de 2 horas. De lo contrario, se enviarán en recipientes con medio de transporte como, por ejemplo:

- Medio de Cary-Blair, uno de los medios más utilizados para transporte de muestras fecales y rectales. Mantiene la viabilidad de *C. difficile*.
- Medio Amies, frecuentemente utilizado para hisopados rectales y preserva microorganismos anaerobios, incluidos *C. difficile*.
- Medio Port-A-Cul®, especializado para la viabilidad de bacterias anaerobias estrictas, como *C. difficile*.
- Sigma Transport System™, Medio con inhibidores de proteasas para evitar degradación enzimática de toxinas.

Las muestras deben ser transportadas lo antes posible hacia el laboratorio. Si las muestras no se van a procesar dentro de las 18 horas posteriores a su recolección se deben congelar a -20°C para aislamiento bacteriano o a -80°C para conservar las toxinas para análisis mediante métodos inmunológicos o de citotoxicidad.

El diagnóstico de la CDI suele basarse en, al menos, 2 criterios:

- a. La detección de la toxina y/o aislamiento de *C. difficile* toxigénico en heces en ausencia de otra causa para la diarrea y, además, en humanos mediante la evidencia colonoscópica o histopatológica de colitis pseudomembranosa.
- b. La presencia de diarrea (≥ 3 deposiciones no formes en 24 horas) o la existencia de íleo o megacolon tóxico (Alcalá-Hernández et al., 2016).

Actualmente, no hay ninguna técnica diagnóstica que sea lo suficientemente coste-eficaz, por sí misma, para ser utilizada en el diagnóstico rápido de la CDI. Por lo tanto, se han desarrollado varios algoritmos diagnósticos que combinan las mejores características de cada una de estas técnicas (Alcalá-Hernández et al., 2016).

Estos algoritmos se deben utilizar para el diagnóstico de la CDI debido a que los resultados de las pruebas de inmunoensayo enzimático para la glutamato deshidrogenasa (GDH EIA) y de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) no se correlacionan directamente con los síntomas clínicos, lo que podría conducir a un sobrediagnóstico de la enfermedad. Además, aunque existen pruebas muy específicas, como los inmunoensayos para toxinas A/B, ninguna de estas pruebas es lo suficientemente específica como para ser utilizadas como una prueba independiente (Crobach et al. 2016, 2018).

En la encuesta europea sobre las prácticas actuales de vigilancia, directrices de gestión, vías de tratamiento y heterogeneidad de las pruebas de *C. difficile* 2018-2019, se encontró que el 95% de los sitios hospitalarios en Europa cumplen con la guía de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) de 2016, que establece usar más de una prueba para diagnosticar CDI. Ver Figura 7 (Crobach et al., 2016; Viprey et al., 2023).

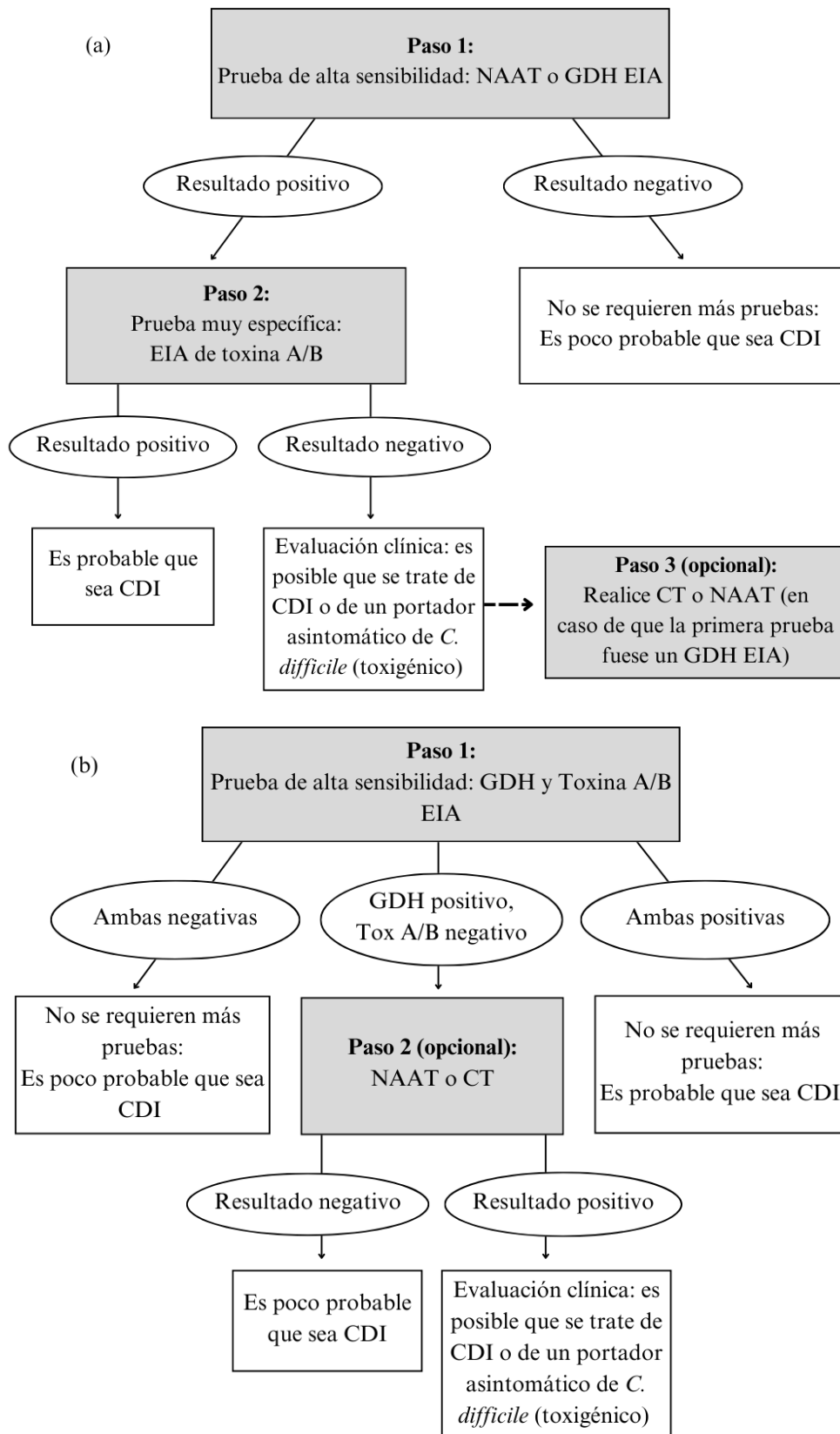


Figura 7. Algoritmos recomendados para diagnóstico de CDI según la ESCMID. (a) Algoritmo GDH o NAAT Tox A/B. (b) Algoritmo GDH y Tox A/B NAAT/CT. GDH: glutamato deshidrogenasa; NAAT: prueba de amplificación de ácidos nucleicos; CT: cultivo toxigénico; Tox A/B: toxina A/B; EIA: inmunoensayo enzimático. Adaptado de Crobach et al. (2016).

A continuación, se abordarán las pruebas diagnósticas de la CDI:

1.4.1. Cultivo toxigénico

El cultivo toxigénico (CT) es un cultivo fecal seguido por la identificación de aislados toxigénicos (Keessen et al., 2011). Requiere demasiado tiempo, lo que dificulta el diagnóstico en un laboratorio clínico. Sin embargo, es bastante útil para recuperar aislados para investigación de brotes epidemiológicos, estudios de resistencia a los antibióticos y como método de referencia para la evaluación de otras pruebas diagnósticas. El procedimiento empleado en nuestro laboratorio se describe a continuación:

Recoger la muestra de heces con hisopo. En caso de heces diarreicas, se tomarán 100 µl mínimo. Introducir el hisopo o 100 µl (heces diarreicas, si hay cantidad suficiente) en un eppendorf con 1 ml de etanol al 70% y agitar. Mantener durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tomar 200 µl de la mezcla e introducirlo en un tubo de 10 ml con 5 ml de medio de enriquecimiento *C. difficile*. Incubar estos tubos en condiciones anaeróbicas durante 7 días a 37°C. Mezclar en un tubo 2 ml del cultivo y 2 ml de etanol absoluto. Agitar en vórtex e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, bajo agitación. Después, centrifugar la mezcla a 1.520 x g durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados resultantes se recogen con hisopos estériles, se siembran en placas de Agar selectivo *C. difficile* y se incuban las placas durante 72 horas a 37°C en condiciones anaeróbicas. Los aislamientos bacterianos se identifican como *C. difficile* a partir de la morfología de las colonias, el olor típico de este microorganismo y una reacción positiva en un inmunoensayo que simultáneamente detecta la bacteria y las toxinas TcdA y TcdB (Blanco et al., 2013).

1.4.2. Glutamato deshidrogenasa

La detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) es una alternativa diagnóstica, debido a que es una proteína producida de forma constitutiva y en grandes cantidades por la mayoría de las cepas de *C. difficile* (Shetty et al., 2011). La sensibilidad de su detección es elevada, con valores cercanos al 90% cuando se compara con el CT; sin embargo, posee una especificidad y un valor predictivo positivo relativamente bajos debido a que detecta tanto cepas productoras como no productoras de toxinas (Alcalá-Hernández et al., 2016). Para mejorar el valor predictivo positivo, se han desarrollado pruebas rápidas que incluyen la detección del antígeno GDH en conjunto con las toxinas A y B, por ejemplo: C. DiffQuik Chek Complete; TechLab Inc. Los ensayos

inmunoenzimáticos de GDH son un 94% y 98% más específicos que el ensayo de neutralización de citotoxicidad celular (CCNA) y CT, respectivamente. Además, posee una sensibilidad del 96% y 95% si lo comparamos con CCNA y CT respectivamente (Crobach et al.2016, 2018).

1.4.3. Métodos moleculares

Estos ensayos detectan regiones conservadas dentro de los genes de las toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) y binaria (*cdtA* y *cdtB*) de *C. difficile* (Crobach et al., 2016). Los métodos moleculares más empleados para el diagnóstico de *C. difficile* son las denominadas NAAT, que incluyen ensayos como:

- la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en sus diversas variantes como la PCR convencional, en tiempo real (qPCR) y multiplex,
- amplificación dependiente de helicasa,
- amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

1.4.4. Ensayos inmunoenzimáticos

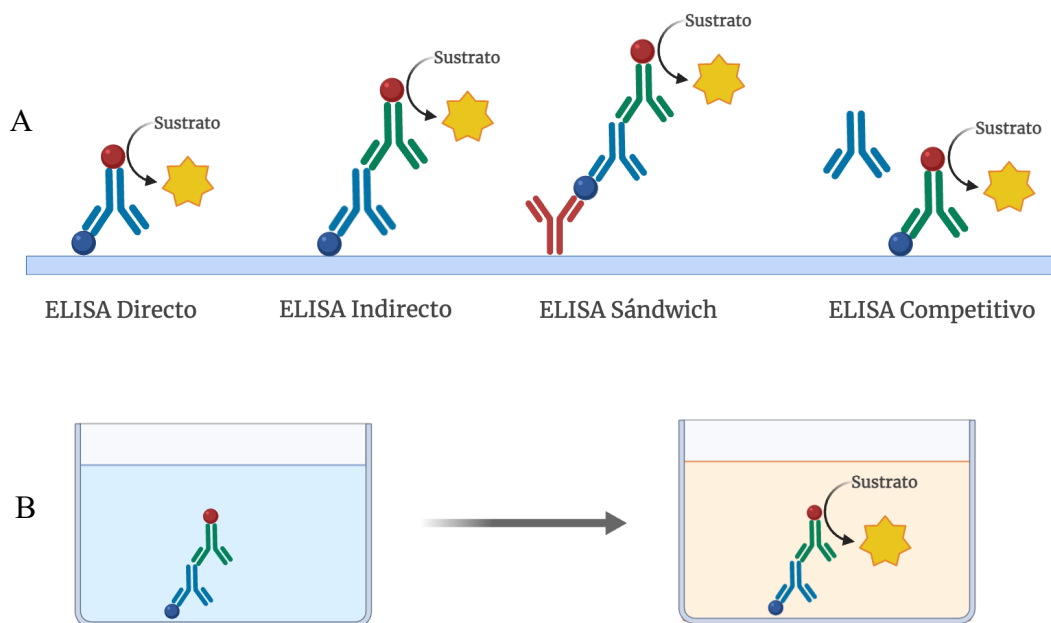
Los ensayos inmunoenzimáticos (EIAs) son técnicas en las que la interacción antígeno-anticuerpo se pone de manifiesto mediante el empleo de enzimas, por lo que son ampliamente utilizadas para detectar y cuantificar antígenos o anticuerpos en muestras biológicas. Dentro de los EIAs, existen varias técnicas, que incluyen:

1.4.4.1. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) permite la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos que median una respuesta inmune. Su principio se basa en el empleo de anticuerpos conjugados con una enzima, como la peroxidasa. Esta enzima cataliza reacciones bisustrato de carácter redox utilizando un peróxido (generalmente el agua oxigenada) como agente oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. Esta oxidación genera una señal detectable. Existen cuatro formatos de ELISA (ver Figura 8):

- a) **Directo:** Un antígeno se adhiere a la superficie de un soporte sólido (placa de microtitulación) y se detecta directamente mediante un anticuerpo conjugado con una enzima.

- b) **Indirecto (ELISAi):** Es el formato más empleado en la detección de anticuerpos. Un antígeno tapiza la placa, sobre el cual se añade la muestra problema que contiene o no anticuerpos específicos (anticuerpo primario), tras el cual, se incuba con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima.
- c) **Sándwich:** Es el formato más empleado en la detección de antígenos. Dos anticuerpos específicos del antígeno de interés son utilizados: uno inmovilizado en la placa de microtitulación (anticuerpo de captura) y otro conjugado con la enzima (anticuerpo de revelado).
- d) **Competitivo:** El antígeno en la muestra compite con un antígeno marcado (conjugado con enzima) por la unión a un anticuerpo específico o bien un anticuerpo problema compite con un anticuerpo marcado por unirse al antígeno que está inmovilizado a la placa. Se emplea en la detección de moléculas pequeñas, que a menudo limitan otros métodos de detección.



Created in **BioRender.com**

Figura 8. Esquematización de los ELISA. A: Formatos ELISA. B: Reacción colorimétrica al agregar el sustrato en una prueba positiva. Adaptado de una plantilla de BioRender.com.

1.4.4.2. Western blot

Esta es una técnica de laboratorio utilizada para detectar, caracterizar y semicuantificar proteínas específicas en una muestra compleja, como un extracto de células o tejidos. Se

basa en la separación mediante electroforesis en gel de acrilamida de las distintas proteínas de una muestra atendiendo a la carga y al tamaño de estas. A continuación, se lleva a cabo una transferencia de las proteínas desde el gel a un soporte sólido, que puede ser una membrana de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y, por último, la visualización de las proteínas se hace empleando anticuerpos. La unión antígeno-anticuerpo se pone de manifiesto empleando actividad enzimática o fluorescencia (Kim et al., 2017). En el caso de ser empleado para la detección de anticuerpos, el protocolo sería similar al ELISAi, pero en este caso el soporte del antígeno en lugar de ser la placa de ELISA es una membrana.

1.4.4.3. Ensayos inmunocromatográficos

Conocidos como pruebas de flujo lateral o pruebas rápidas, son métodos de diagnóstico basados en la interacción antígeno - anticuerpo donde la muestra fluye lateralmente lo que permite la detección rápida y cualitativa o semicuantitativa de antígenos o anticuerpos en una muestra. Para el diagnóstico de *C. difficile*, se han desarrollado pruebas rápidas de 30 minutos que detecten solamente la GDH o las toxinas, así como también se han desarrollado pruebas que combinan la detección de GDH y toxinas A y B en un solo ensayo.

En resumen, los EIA Tox A/B detectan directamente toxinas libres en las heces, por lo tanto, se cree que existe correlación con los síntomas clínicos (Polage et al., 2015). Estos ensayos son baratos y fáciles de usar. Sin embargo, presentan una sensibilidad baja, del 83% y 57%, en comparación con CCNA y CT. No obstante, la especificidad es alta, hasta un 99%, en comparación tanto con CCNA como con CT (Crobach et al.2016, 2018).

1.4.5. Ensayo de neutralización de citotoxicidad celular

El ensayo de citotoxicidad de cultivos celulares detecta la toxina B en heces mediante la detección de su actividad citolítica sobre cultivo celular. La neutralización de la actividad citotóxica por la antitoxina de *C. difficile* confirma la presencia de la toxina de *C. difficile*. Aunque en los algoritmos de la ESCMID no mencionan el CCNA, esta prueba ha sido considerada durante muchos años la técnica de referencia para el diagnóstico de la CDI (Bouza et al., 2013). La principal ventaja de esta técnica es su excelente especificidad, cercana al 100%, pero su desventaja es la necesidad de mantener líneas celulares (MRC-

5, CHO, Vero, HEp2, HeLa, etc.) y su demora diagnóstica entre 18-72 horas (Alcalá-Hernández et al., 2016).

1.5. Principales técnicas de tipado de *C. difficile*

Existen varios métodos de tipificación para *C. difficile*, entre los que podemos enumerar: análisis de endonucleasas de restricción (REA), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tipificación de secuencias multilocus (MLST), tipificación por PCR de elementos repetitivos, toxinotipado y ribotipado por PCR, así como análisis de repetición en tándem de número variable en múltiples loci (MLVA) y recientemente mediante secuenciación del genoma completo (WGS) (Huber et al., 2013).

A continuación, se detallarán las técnicas de tipificación más relevantes para la comprensión de esta tesis:

1.5.1. Ribotipado

PCR-ribotipado es un método de tipificación basado en el análisis de los genes del RNA ribosomal, utilizado desde la década de 1990 para definir linajes y monitorear la propagación de infecciones por *C. difficile* (Seth-Smith et al., 2021). Este método se basa en el polimorfismo de la región espaciadora intergénica (ISR)16S-23S (Bidet et al., 1999), una secuencia localizada entre los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 16S y 23S en bacterias (Bidet et al., 1999). La PCR a través de la ISR genera fragmentos de diferentes longitudes, cuyos tamaños pueden resolverse mediante electroforesis en gel o capilar (Bidet et al., 1999; Fawley et al., 2015; Stubbs et al., 1999). Estos tamaños de bandas se pueden comparar con una base de datos de aislados con ribotipos (RT) conocidos (Indra et al., 2008). Aunque el ribotipado proporciona una mayor discriminación que otras técnicas de tipificación (Stubbs et al., 1999), este método no es completamente reproducible entre laboratorios (Seth-Smith et al., 2021).

El ribotipado es ampliamente utilizado en Europa y Australia como método de referencia para la tipificación de *C. difficile* (Janezic & Rupnik, 2010; Kuijper et al., 2009; Sadeghifard et al., 2006), aunque también se emplea en Estados Unidos (Huber et al., 2013; Walk et al., 2012). En la Figura 9 se observa la prevalencia de ribotipos aislados en humanos en Europa, con el RT027 como el más frecuente. Además, se destacan ribotipos de interés veterinario como el RT078 y el RT014/020, debido a su relevancia zoonótica.

El clado 1 contiene los patógenos humanos más comunes en la mayoría de las regiones (RT001, RT012 y RT014). El clado 2 contiene el RT027, una cepa hipervirulenta asociada con enfermedades generalizadas en humanos a nivel internacional. El clado 3 es poco común y contiene un único ribotipo (RT023). El clado 4 contiene la variante de toxina TcdA–/TcdB+ (RT017) y cepas relacionadas, que son causas importantes de enfermedades en humanos en algunas regiones. La mayoría de estos ribotipos también se pueden encontrar en animales; sin embargo, la principal preocupación en animales son las cepas del clado 5 asociadas al ganado, particularmente el RT078 (Stabler et al., 2006; Weese, 2020).

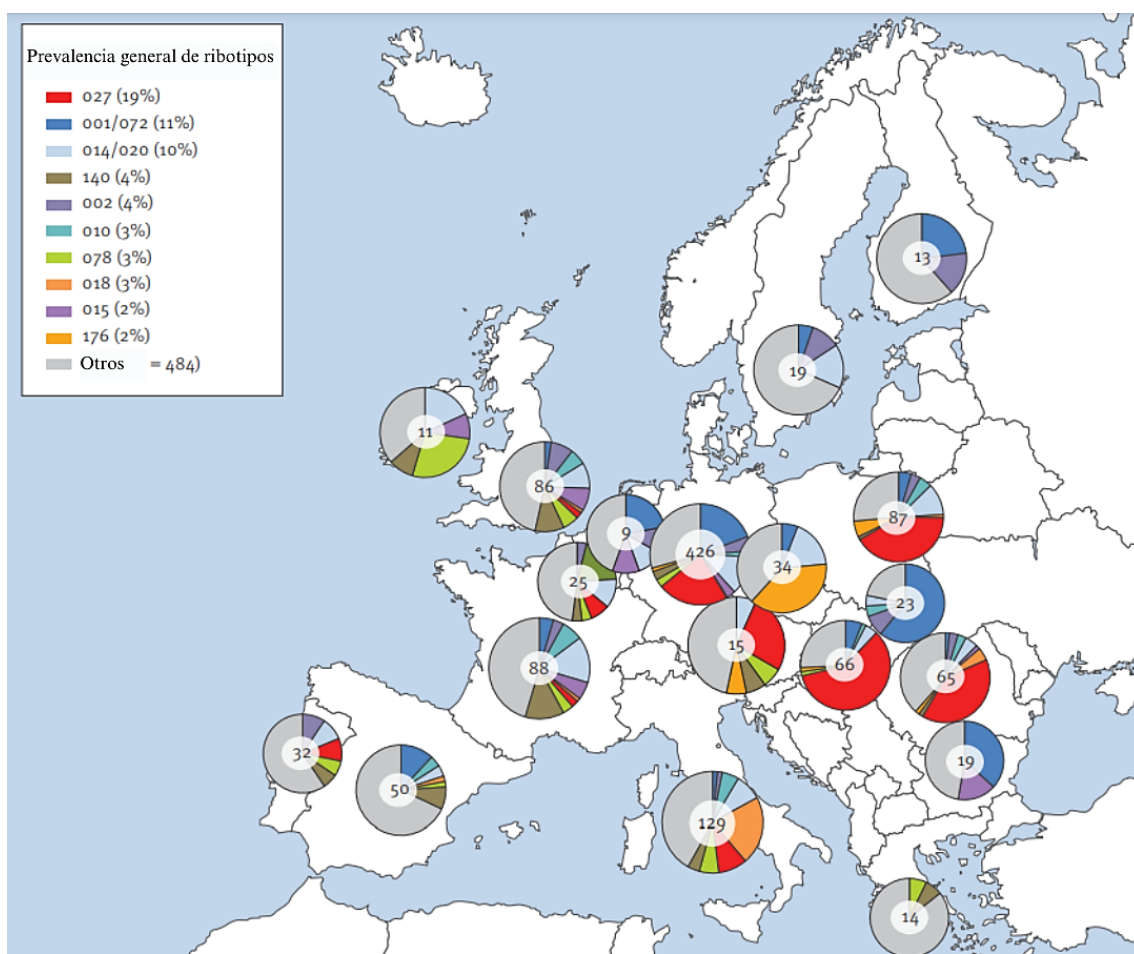


Figura 9. Distribución geográfica de los ribotipos de *C. difficile* en Europa. Estudio europeo, multicéntrico, prospectivo, bianual, de prevalencia puntual de CDI en pacientes hospitalizados con diarrea (EUCLID), 2012- 2013 (n = 1,196). Adaptado de Davies et al. (2016).

A pesar de que existen más de 800 ribotipos de *C. difficile*, los RT027 (también conocido como el campo pulsado norteamericano tipo 1 [NAP1]) y RT078 están asociados con una

mayor virulencia y son la causa más frecuente de CDI (Azimirad et al., 2020, Dayananda & Wilcox, 2019, Neely et al., 2017, Stein et al., 2017; Vedantam et al., 2012).

La patogenicidad del RT027 se debe a que tiene una mutación en el gen *tcdC* que promueve un aumento en la producción de TcdA y TcdB. Además, las cepas que pertenecen a este ribotipo producen la toxina binaria y poseen resistencia a las fluoroquinolonas (Hookman & Barkin, 2009, Kuijper et al., 2006), factor fundamental para la mayor gravedad de este ribotipo, ya que esta cepa generalmente infecta a pacientes hospitalizados de edad avanzada que reciben tratamiento con fluoroquinolonas (Bolton & Marcos, 2023; Czepiel et al., 2019).

Así mismo, el RT078 sobreproduce toxinas TcdA y TcdB debido a que tiene una delección de 39 pb en el gen *tcdC*, además de producir la toxina binaria. A diferencia del RT027, que se contrae principalmente en el entorno hospitalario, el RT078 es más frecuente en personas y animales jóvenes y generalmente se asocia con transmisión comunitaria (Jones et al., 2013). Las cepas RT078 son resistentes a las fluoroquinolonas y la eritromicina, lo que ha contribuido a su mayor prevalencia (Baldan et al., 2015; Bolton & Marcos, 2023).

1.5.2. Toxinotipado

El toxinotipado es un método basado en Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para diferenciar las cepas de *C. difficile* de acuerdo con los cambios en el PaLoc (Figura 10). Se realiza mediante amplificación por PCR y posterior digestión con enzimas de restricción de 10 regiones del PaLoc. El toxinotipado tiene una reproducibilidad muy alta y aunque no posee un poder discriminatorio tan bueno como el ribotipado, permite conocer la capacidad de las cepas de *C. difficile* para producir las TcdA y TcdB (Huber et al., 2013; Kuijper et al., 2009).

Los toxinotipos son importantes en el desarrollo de pruebas diagnósticas moleculares y vacunas y han sido considerados una buena base para estudios filogenéticos. Los RFLP son más comunes en el gen *tcdB*, mientras que las delecciones e inserciones son más comunes en el gen *tcdA*. El toxinotipo se define en función del alcance de los cambios, en comparación con el toxinotipo no variante 0, clasificando las cepas en toxinotipos menores y mayores. Los toxinotipos menores tienen cambios limitados a solo una parte del gen de la toxina. Los toxinotipos mayores tienen cambios en ambos genes en comparación con la cepa de referencia del toxinotipo 0 (Rupnik & Janezic, 2016).

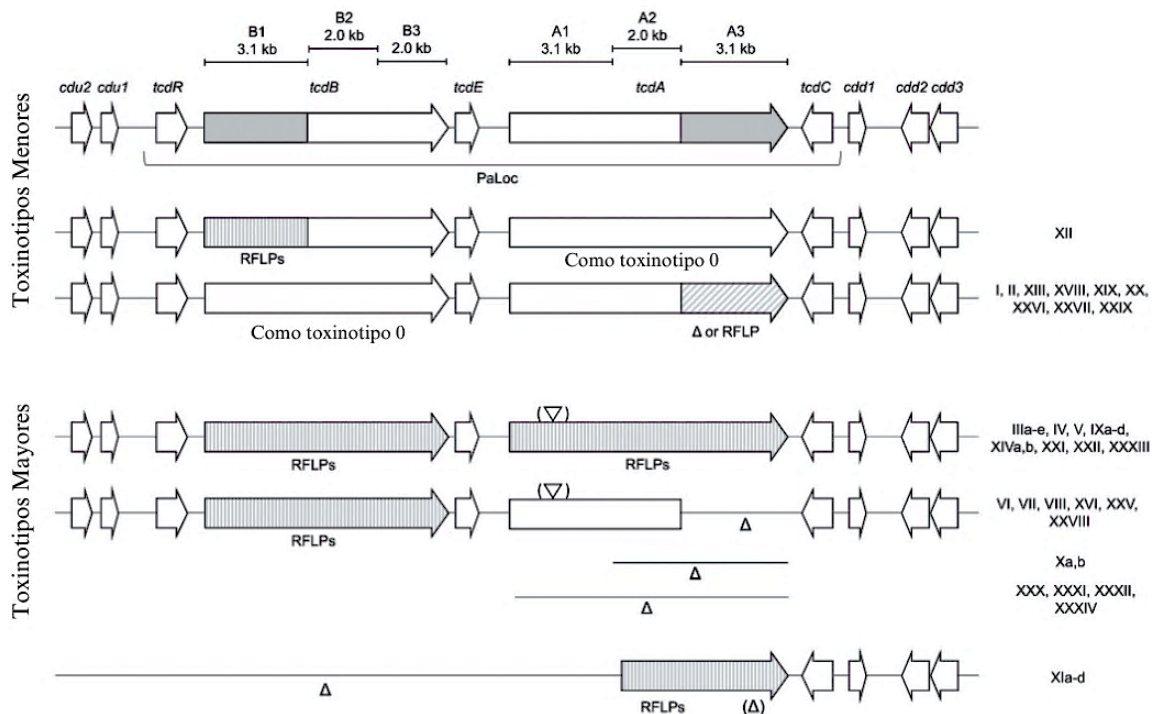


Figura 10. Variaciones en la región del PaLoc que codifica las toxinas de *C. difficile*. Los cambios en los toxinotipos pueden ser polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), vistos como RFLP (mostrados con rayas verticales) y deleciones o inserciones (mostradas con rayas diagonales o símbolos gráficos). Adaptado de Rupnik & Janezic (2016).

La correlación entre ribotipos y toxinotipos no es absoluta, pero ribotipos específicos suelen asociarse con toxinotipos particulares. Por ejemplo, el RT027 se asocia con el toxinotipo III, el RT078/126 con el toxinotipo V, el RT017 corresponde al toxinotipo VIII, el RT014/020 se asocian con el toxinotipo XVIII (Rupnik & Janezic, 2016).

1.5.3. Secuenciación del genoma completo

La técnica de WGS permite analizar el genoma completo de *C. difficile* para realizar estudios de epidemiología molecular y dinámica de transmisión. También permite identificar el perfil de MLST e incluso distinguir entre cepas estrechamente relacionadas, a partir del cambio de un nucleótido, mediante estudios basados en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), lo que mejora mucho el poder de discriminación (Alcalá-Hernández et al., 2016). Además, mediante WGS se pueden identificar genes de resistencia a antibióticos y factores de patogenicidad.

La tipificación por MLST mediante WGS es una técnica utilizada para la caracterización genética de organismos basada en el análisis de la secuencia de nucleótidos de varios loci

housekeeping (genes esenciales que evolucionan lentamente). En el caso de *C. difficile*, se seleccionan 7 genes housekeeping, como *adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* y *tpi*, para generar un perfil genético único (Baktash et al., 2022; Griffiths et al., 2010). Como resultado del MLST se obtiene un ST (*Sequence Type*), que corresponde a un número asignado según la combinación específica de alelos encontrados en esos loci. Los ST permiten clasificar y comparar cepas de *C. difficile* de diferentes orígenes geográficos, brotes o especies huésped. De los ST descritos para *C. difficile*, el ST11 está bien establecido en las poblaciones de animales de producción en todo el mundo y contribuye considerablemente a la carga global de CDI en humanos. La creciente evidencia de ascendencia compartida y superposición genética del RT078, la sublínea ST11 más común, entre las poblaciones humanas y animales sugiere que la CDI podría ser una zoonosis (Knight et al., 2019).

1.6. Epidemiología

C. difficile es una bacteria con una alta prevalencia en porcinos, principalmente en los primeros meses de vida del animal. La CDI se ha propuesto como la causa más común de diarrea y afecta predominantemente a lechones <15 días de edad, con una tasa de mortalidad de hasta el 50% (Rodríguez et al., 2016; Songer et al., 2000). El ribotipo predominante en porcinos es el RT078.

Se ha observado una prevalencia más baja en ovejas y corderos que en cerdos. Esto puede estar asociado con un mayor uso de antibióticos en la producción porcina que en ovejas (Knight & Riley, 2013; Rodríguez et al., 2016).

En potros sanos, se han descrito tasas de colonización por *C. difficile* de 0 - 29% (Båverud et al., 2003; Schoster et al., 2015; Weese, 2001a), mientras que en potros tratados con antibióticos ha alcanzado hasta un 44% (Båverud et al., 2003). En caballos hospitalizados las tasas varían entre un 4.9 - 8.4% (Kecerova et al., 2019; Medina-Torres et al., 2011) y entre 0 - 7.6% en caballos adultos sanos (Båverud et al., 2003; Medina-Torres et al., 2011; Thean et al., 2011; Weese, 2020; Weese, 2001a).

En perros, se ha detectado la presencia de cepas toxigénicas de *C. difficile* en animales asintomáticos (Marks et al., 2011; Weese, 2001b) y se ha aislado hasta en un 57% de los perros sanos sin diarrea (Schneeberg et al., 2012). Sin embargo, diversos estudios han reportado una asociación entre la presencia de toxinas de *C. difficile* en las heces de

animales con diarrea (Andrés-Lasheras et al., 2018; Berry & Levett, 1986; Marks et al., 2002; Weese, 2001b; Weese & Armstrong, 2003).

En humanos, *C. difficile* se considera bacteria comensal, detectándose en aproximadamente el 5% de los adultos y en más del 80% de los lactantes menores de 2 años sin síntomas gastrointestinales (Kamiya, 2023). La prevalencia de la colonización es varias veces mayor en pacientes hospitalizados o personas en residencias geriátricas (Czepiel et al., 2019; Leffler & Lamont, 2015).

En 2022 se publicó un estudio de la epidemiología de CDI en pacientes hospitalizados en España, en una revisión de ocho años de 2012 a 2019. Entre sus resultados encontraron que la prevalencia de CDI en los hospitales españoles ha crecido exponencialmente desde el 14,1% en 2012 hasta el 35,9% en 2019 (casos/10.000 pacientes hospitalizados) y la densidad de incidencia de 1,8-4,7 casos por 10.000 pacientes-día en 2019 (Asensio et al., 2022). No hay cifras actuales del coste por infección de *C. difficile* en España, el último estudio se realizó en 2012, en el que se calculó un Gasto anual de 32,15 millones de euros, que actualmente equivaldría a 41,8 millones de euros (Asensio & Monge, 2012).

Datos de la última encuesta de prevalencia puntual del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) realizada en 2016-2017 estimó que 189.526 pacientes desarrollaron anualmente CDI asociada a la asistencia sanitaria (HA-CDI) en la UE/EEE (Suetens et al., 2018), lo que sugiere que hubo 7.864 casos mortales de HA-CDI (ECDC, 2022).

1.7. Enfoque “One health” aplicado a la CDI

Históricamente, la CDI humana ha sido considerada como una infección HA-CDI, causada por la exposición a antibióticos, ya sea de manera profiláctica o como tratamiento durante la hospitalización (Smits et al., 2016). Sin embargo, en los últimos años, la epidemiología de la *C. difficile* ha cambiado y ahora se reconoce como un patógeno emergente tanto en humanos como en animales (Andrés-Lasheras et al., 2018) y cada vez está siendo más reconocido como causa de CDI asociada a la comunidad (CA-CDI). Se ha encontrado que los ribotipos de cepas aisladas de pacientes con CA-CDI tienen una gran superposición con cepas de pacientes con HA-CDI en un entorno endémico, lo que sugiere una fuente común de infección (Smits et al., 2016).

La caracterización de aislamientos de *C. difficile* provenientes tanto de humanos como de porcinos, realizada a través de MLVA o WGS, ha revelado que estos son indistinguibles (Debast et al., 2009; Keessen et al., 2013; Knetsch et al., 2014), lo que aumenta las preocupaciones sobre el riesgo de zoonosis y la transmisión por alimentos (Weese, 2020). Los reservorios potenciales de *C. difficile* incluyen portadores asintomáticos, pacientes con CDI, el ambiente contaminado y heces de animales, por ejemplo: caninos, felinos, porcinos, aves, entre otros (Kamiya, 2023). La Figura 11 ilustra las vías de transmisión de *C. difficile*, a partir de un ciclo, mostrando las principales vías de transmisión entre humanos, animales y el medio ambiente.

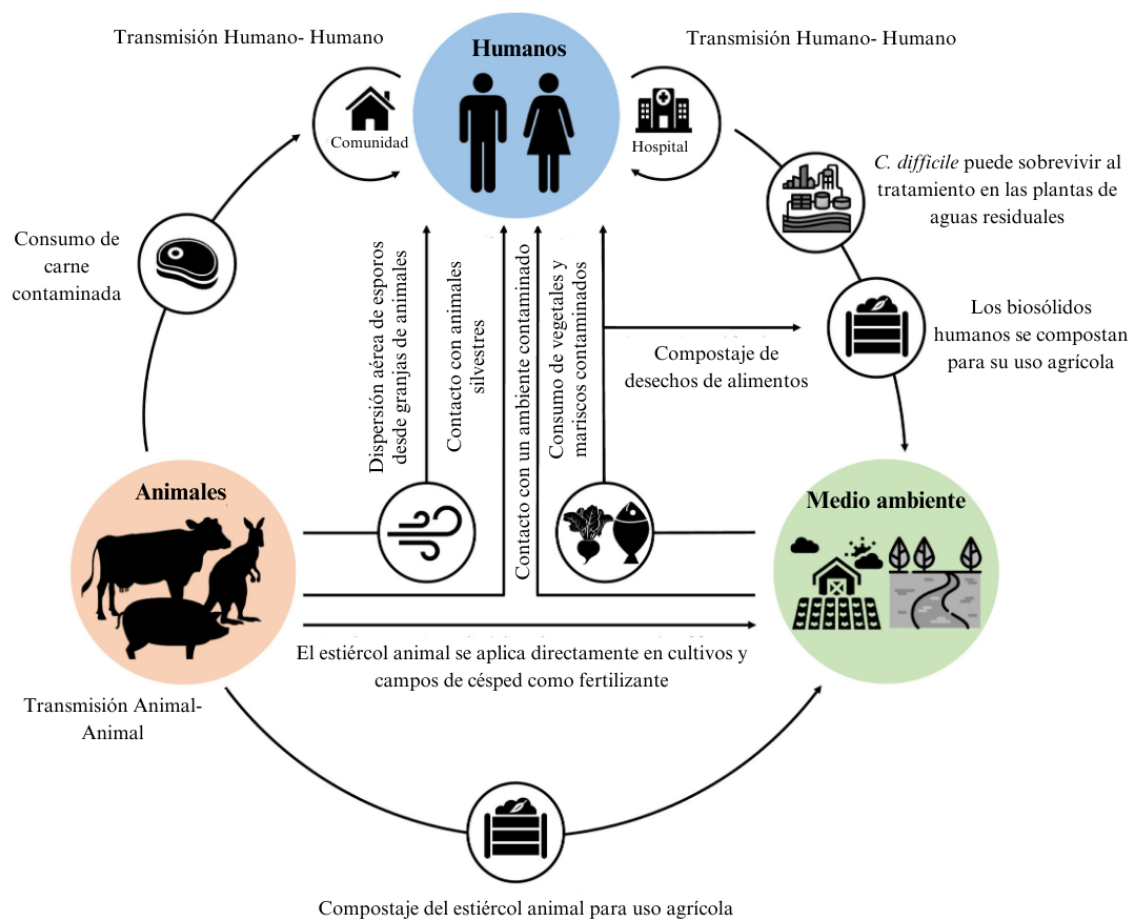


Figura 11. Transmisión de *C. difficile*. La figura destaca la interacción humanos, animales y el medio ambiente para la transmisión de *C. difficile*. Se observan algunas rutas específicas de transmisión: Vía fecal-oral, contacto con un ambiente contaminado, dispersión de esporos desde granjas hacia el entorno. Adaptado de Lim et al. (2020).

En humanos, las infecciones pueden propagarse de persona a persona tanto en la comunidad como en hospitales. El entorno juega un papel crucial, ya que los esporos de

C. difficile pueden sobrevivir a procesos de tratamiento de aguas residuales y pueden estar presentes en biosólidos aplicados como fertilizantes agrícolas. Además, se puede transmitir a partir del consumo de alimentos vegetales y de origen animal contaminados. En el ámbito animal, el contacto con alimentos o agua contaminados y la dispersión aérea de esporos desde granjas representan las rutas más importantes de transmisión. En este contexto, se pueden observar las conexiones entre los tres sistemas que componen el enfoque One Health, que considera a la salud humana, animal y ambiental como interdependientes.

1.8. Tratamiento

1.8.1. Humanos

El tratamiento de la CDI en humanos abarca diversas estrategias terapéuticas, incluyendo el uso de antibióticos, el trasplante de microbiota fecal y la administración de anticuerpos monoclonales. A continuación, describimos cada uno de ellos:

a) Antibióticos

La relación entre el uso de antibióticos y la CDI es compleja. El uso de antibióticos ha sido identificado como el factor de riesgo más significativo para el desarrollo de CDI. Por un lado, el uso de antibióticos de amplio espectro como las cefalosporinas, la clindamicina y las fluoroquinolonas altera la microbiota intestinal, lo que facilita la colonización del tracto gastrointestinal por *C. difficile* y el establecimiento de la CDI; por otro lado, los antibióticos son la principal opción terapéutica disponible para la CDI. Actualmente, solo unos pocos antibióticos se consideran efectivos para tratar la CDI (Buddle & Fagan, 2023; Farooq et al., 2015; Wickramage et al., 2021).

La interrupción continua de la microflora colónica normal por ciclos repetidos de terapia con antibióticos utilizados para tratar CDI recurrente perpetúa el riesgo de recidivas (Kelly, 2012). Este círculo vicioso de infección-reinfección impide la recuperación, lo que exacerba la carga de CDI. Se ha informado que el 35% de los pacientes desarrollan CDI recurrente; de estos, el 59% desarrolla una segunda recurrencia y de los que tuvieron dos recurrencias, el 58% presenta una tercera (Feuerstadt et al., 2023; (Nelson et al., 2021).

Históricamente, se ha utilizado el metronidazol para tratar la CDI leve a moderada, mientras que la vancomicina se utilizaba en casos más graves (Surawicz et al., 2013). Cuando estos eran ineficaces, la fidaxomicina se consideraba como una alternativa (Chaparro-Rojas & Mullane, 2013; Louie et al., 2011), ya que había demostrado ser eficaz en la prevención de la infección recurrente (Bolton & Marcos, 2023; Oldfield IV et al., 2014).

La actualización de la guía de manejo de la ESCMID para la CDI en 2021 ha cambiado el enfoque de la antibioterapia. Este documento describe las opciones de tratamiento para una variedad de escenarios clínicos de CDI, incluyendo el manejo no antimicrobiano, como por ejemplo el trasplante de microbiota fecal (FMT). Uno de los principales cambios es que el metronidazol ya no se recomienda como tratamiento de primera línea para la CDI. En su lugar, se prefiere la fidaxomicina sobre la base de tasas reducidas de recurrencia, con la vancomicina como una alternativa aceptable. Además, en los casos de CDI recurrente, ahora incluyen bezlotoxumab, así como FMT (Fitzpatrick et al., 2024).

b) Trasplante de microbiota fecal

Es un procedimiento en el que la materia fecal recolectada de un donante se mezcla con solución salina, se filtra y luego se administra en un paciente mediante colonoscopia, enema, cápsulas orales, o sondas naso-duodenales, dependiendo de la situación clínica del paciente. Según datos de la Comunidad de Madrid (s.f.), en el servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón desde el año 2014 está disponible el trasplante de microbiota fecal mediante cápsulas liofilizadas. En el año 2018 el Hospital Universitario de Bellvitge creó el primer banco de muestras de heces congeladas de España para facilitar y potenciar los trasplantes de microbiota fecal en este centro en pacientes con colitis recurrentes (ABC, 2018) y, a finales de 2023, el Hospital Universitario de Bellvitge y el Clínic se aliaron y crearon el Banco de Microbiota de Catalunya, el primero que existe en España, es público y uno de los pocos que hay de momento en Europa (Sáez, 2024).

En 2022 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó REBYOTA (Ferring Pharmaceuticals Inc., Saint-Prex, Suiza), un novedoso bioterapéutico vivo de microbiota que se administra en forma de enema. Y en 2023 aprobó Vowst (Seres Therapeutics, Inc.), que se administra por vial oral. Ambos productos están recomendados

para la prevención de la recurrencia de la CDI en personas de 18 años o más después del tratamiento con antibióticos de la CDI (FDA, s.f.; Sinnathamby et al., 2023)

Las virtudes del FMT están bien establecidas, tanto como terapia independiente como en combinación: un ensayo sugirió que la resolución clínica tras el FMT fue del 92% (Quraishi et al., 2017), mientras que otro encontró que el FMT con vancomicina proporcionó una resolución clínica del 81% de la CDI, en comparación con solo el 31% para la vancomicina sola (Buddle & Fagan, 2023; van Nood et al., 2013).

c) Anticuerpos monoclonales

En 2016, la FDA aprobó Bezlotoxumab, un anticuerpo monoclonal frente a la toxina B, indicado para prevenir la recurrencia de *C. difficile* en pacientes adultos que han recibido un tratamiento con antibióticos para la CDI (Sinnathamby et al., 2023). En esta misma línea de investigación, el grupo de enfermedades infecciosas y microbiología clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón ha colaborado en un estudio internacional y multicéntrico sobre el tratamiento de la CDI con bezlotoxumab (Wilcox et al., 2017). Este y otro estudio han demostrado una reducción relativa del 40% en la CDI recurrente cuando se administra Bezlotoxumab (Chapin et al., 2017; Wilcox et al., 2017). Sin embargo, este anticuerpo no tiene un efecto aparente en el tratamiento de un episodio inicial de CDI. El mayor beneficio se ha demostrado en pacientes de alto riesgo (Chapin et al., 2017).

1.8.1.1. Prevención de la CDI en humanos

La prevención primaria se basa en la administración adecuada de antibióticos y medidas de control sanitario como higiene de manos, limpieza y desinfección de superficies y equipos médicos, aislamiento de pacientes infectados, etc. La prevención secundaria depende de la detección temprana y destaca el uso de tratamientos con anticuerpos monoclonales, ya que pueden ayudar a prevenir la gravedad, la recurrencia y la propagación de la CDI.

1.8.2. Veterinaria

En lugar de tratamiento, la estrategia en animales suele enfocarse en la prevención, mediante el manejo adecuado de antibióticos, bioseguridad y prácticas de higiene para evitar brotes de CDI, especialmente en explotaciones ganaderas. Además, se ha desarrollado una vacuna para porcinos:

- **Vacuna SUISENG DIFF/A HIPRA**

Como sustancias activas contiene toxoide A (TcdA) y B (TcdB) de *C. difficile* y α -toxoide de *Clostridium perfringens* Tipo A. Se utiliza para la inmunización pasiva de lechones recién nacidos mediante la inmunización activa de cerdas reproductoras adultas y nulíparas. Los anticuerpos protectores neutralizantes transferidos a los lechones por medio del calostro están presentes al menos hasta 28 días después del nacimiento en la mayoría de los lechones.

En un estudio de campo realizado por el fabricante de la vacuna se ha demostrado una reducción significativa en la incidencia de CDI en los lechones de cerdas gestantes vacunadas en comparación con los del grupo de control. Los resultados mostraron que el desafío con *C. difficile* indujo un 100% de mortalidad en los lechones del grupo de control, mientras que no se registró mortalidad en los lechones de los grupos vacunados. Además, los signos clínicos y las lesiones macroscópicas se redujeron significativamente en los grupos vacunados en comparación con el grupo de control (Canal et al., s.f.).

1.9. Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos representa una amenaza importante para la salud pública mundial que exige una acción urgente mediante un enfoque One Health. Este desafío involucra a actores clave, como el sector sanitario, donde profesionales de la salud humana y veterinaria desempeñan un papel crucial en la prescripción de antibióticos. Asimismo, la industria farmacéutica debe contribuir al desarrollo de nuevos antibióticos y alternativas terapéuticas, mientras que el sector agropecuario y alimentario debe implementar prácticas prudentes en el uso de estos fármacos en animales y cultivos. Además, organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) coordinan esfuerzos globales para la prevención del desarrollo de resistencia a los antibióticos. Y

conjuntamente, la comunidad científica aporta investigación y vigilancia de la resistencia a los antibióticos para generar soluciones innovadoras. Por último, los propios consumidores también desempeñan un rol fundamental a través del uso consciente y adecuado de los antibióticos.

En la CDI, la resistencia a los antibióticos contribuye de forma decisiva en la propagación de algunas cepas de *C. difficile*, por ejemplo, las cepas resistentes a las fluoroquinolonas. Por otra parte, estas cepas también pueden ser un reservorio de genes de resistencia a los antibióticos que podrían transferirse potencialmente a otros patógenos (O'Grady et al., 2021). Además, la resistencia a los antibióticos dificulta el tratamiento de la CDI, lo que conduce al fracaso terapéutico y al aumento de los casos de recurrencia.

Una preocupación particular es el desarrollo de resistencia a los medicamentos recomendados para el tratamiento. Desde la eliminación del metronidazol como tratamiento de primera línea recomendado en América del Norte y Europa, la vancomicina y la fidaxomicina ahora se recomiendan tanto para casos leves como graves de CDI (McDonald et al., 2018; Rao & Malani, 2020) y, aunque es raro, se ha informado de resistencia o fracaso del tratamiento para ambos (O'Grady et al., 2021; Saha et al., 2019).

Por supuesto, ser resistente a una gran cantidad de antibióticos plantea dos desafíos: (i) la resistencia extensa exhibida reduce significativamente las opciones de tratamiento para la CDI, lo que justifica el estatus de *C. difficile* como una amenaza urgente; y (ii) dichas opciones de tratamiento probablemente se verán aún más limitadas debido al alto grado de adaptación y flexibilidad en el genoma de *C. difficile* (Buddle & Fagan, 2023).

1.9.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos de *C. difficile*

Se han identificado varios mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos en *C. difficile*, incluyendo genes de resistencia cromosómicos, elementos genéticos móviles (MGEs), alteraciones en sitio de unión de los antibióticos y/o en las vías metabólicas y la formación de biopelículas (Spigaglia et al., 2018).

La conjugación, transducción y/o transformación de MGEs, especialmente transposones, entre cepas de *C. difficile* y/o entre *C. difficile* y otras especies bacterianas, son mecanismos importantes para que este microorganismo adquiera genes de resistencia

antimicrobiana (Spigaglia, 2016). Tanto es así, que aproximadamente el 11% del genoma de *C. difficile* está compuesta por MGEs (Peng et al., 2017).

Múltiples cepas de *C. difficile* forman una biopelícula estructurada compuesta por una matriz gruesa que contiene proteínas, ADN y polisacáridos (Thapa et al., 2013). La formación de esta biopelícula de *C. difficile* está impulsada principalmente por mecanismos intrínsecos, como *Cwp84*, flagelos y LuxS, pero también se ha demostrado que la presión selectiva causada por la exposición a antibióticos en el medio ambiente estimula la formación de biopelículas (Peng et al., 2017; Thapa et al., 2013; Vuotto et al., 2016).

Además, evidencias recientes respaldan que la resistencia de *C. difficile* a algunos antibióticos puede ser compleja y multifactorial (Spigaglia et al., 2018). En la Tabla 2 se muestra un resumen de los mecanismos mediante los cuales la bacteria desarrolla resistencia a los antibióticos.

1.9.2. Resistencia a múltiples fármacos

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) en *C. difficile* se define como la resistencia a tres o más clases de antibióticos: generalmente clindamicina, eritromicina, fluoroquinolonas y cefalosporinas (Lew et al., 2020; O'Grady et al., 2021; Spigaglia et al., 2018). Muchos de los RTs epidémicos más comunes, incluidos los altamente virulentos RT027 y RT078, están asociados con la MDR (Spigaglia et al., 2018).

El impacto clínico de la MDR se traduce en opciones terapéuticas limitadas, particularmente en casos severos o recurrentes. Este desafío subraya la importancia de implementar estrategias de vigilancia activa, limitar el uso inapropiado de antibióticos y explorar nuevas alternativas terapéuticas frente a cepas de *C. difficile* multirresistentes.

Tabla 2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos de *C. difficile*

Antibiótico /Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Referencia
<p>Metronidazol Rotura del ADN bacteriano y citotoxicidad.</p>	<p>Inhibición de la activación reductiva del metronidazol mediante la alteración de las vías metabólicas oxidoreductivas y mediante plásmido pCD-METRO: mecanismo exacto desconocido.</p>	<p>(Wickramage et al., 2021).</p>
<p>Vancomicina Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse al extremo C-terminal del precursor tardío del peptidoglicano.</p>	<p>Alteración del sitio de unión de la vancomicina en los precursores del peptidoglicano. Mediado por mutaciones en las enzimas del operón vanGCD: Ser313Phe y Thr349Ile en VanSCD y Thr115Ala en VanRCD.</p>	<p>(Wickramage et al., 2021).</p>
<p>Fidaxomicina Inhibe la transcripción al unirse al dominio de sujeción de la ARN polimerasa.</p>	<p>Las mutaciones en la subunidad β de la ARN polimerasa (RNAP).</p>	<p>(Dureja et al., 2022; Kuehne et al., 2018; Schwanbeck et al., 2019).</p>
<p>Betalactámicos Inactivar las enzimas de síntesis de la pared celular.</p>	<p>Destrucción enzimática del antibiótico mediante beta-lactamasas o mediante diana alterada, por ejemplo, proteínas de unión a penicilina (PBPs).</p>	<p>(Imwattana, Knight, et al., 2020; O’Grady et al., 2021; Toth et al., 2018).</p>
<p>Fluoroquinolonas Dirigir las enzimas de replicación del ADN para generar rupturas de ADN de doble cadena en el cromosoma.</p>	<p>Mutaciones en GyrA/B, principalmente dentro de la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR).</p>	<p>(Baines & Wilcox, 2015; Imwattana, Kiratisin, et al., 2020; O’Grady et al., 2021; Oliphant et al., 2002; Spigaglia, 2016; Spigaglia et al., 2011).</p>

Antibiótico/Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Referencia
<p>Tetraciclina</p> <p>Inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosomal 30S.</p>	<p>Protección de los ribosomas. Asociado con los transposones Tn5397, Tn916 o la familia Tn916-like y Tn6164.</p>	<p>(Dureja et al., 2022; Peng et al., 2017).</p>
<p>Macrólidos-Lincosamida-Estreptogramina B (MLSB)</p> <p>Dirigir la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, previniendo la elongación de péptidos y, por lo tanto, inhibiendo la síntesis de proteínas</p>	<p>Protección de los ribosomas mediante metilación, genes a menudo transportados en transposones, mutaciones en el ARNr 23S y en la proteína ribosomal 3, cfrC. Asociado con transposones Tn5398, Tn6194 y Tn6215.</p>	<p>(Imwattana, Kiratisin, et al., 2020; O’Grady et al., 2021; Peng et al., 2017; Spigaglia et al., 2018).</p>
<p>Anfenicol</p> <p>Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad ribosomal 50S en los residuos A2451 y A2452 y previene la unión del ARNt al sitio P de la subunidad ribosomal mayor, impidiendo así la elongación de la cadena polipeptídica.</p>	<p>Modificación e inactivación de antibióticos mediada por enzimas: reubicación de un grupo acetilo desde acetyl-CoA al grupo hidroxilo primario del cloranfenicol por la enzima cloranfenicol acetiltransferasa codificada por catD, en las regiones móviles de los transposones Tn4453a y Tn4453b.</p>	<p>(Leslie et al., 1988; Lyras et al., 1998; Wickramage et al., 2021).</p>

Justificación y objetivos

2. Justificación y objetivos

C. difficile ha sido identificado como un patógeno emergente que afecta tanto a humanos como a diversas especies de animales. Sin embargo, según un análisis bibliométrico por palabras claves realizado mediante VOSviewer, se observó que se ha puesto mayor énfasis en la investigación de la CDI en humanos (Figura 12) que en animales (Figura 13).

A pesar de la importancia de la CDI en animales, no se han publicado directrices sobre la detección de este patógeno, por ejemplo, todas las pruebas disponibles comercialmente están estandarizadas para muestras de heces humanas y existe una variación significativa según la especie animal (Carvalho et al., 2022; Chouicha & Marks, 2006; Keessen, Hopman, et al., 2011; Ramos et al., 2020, 2021).

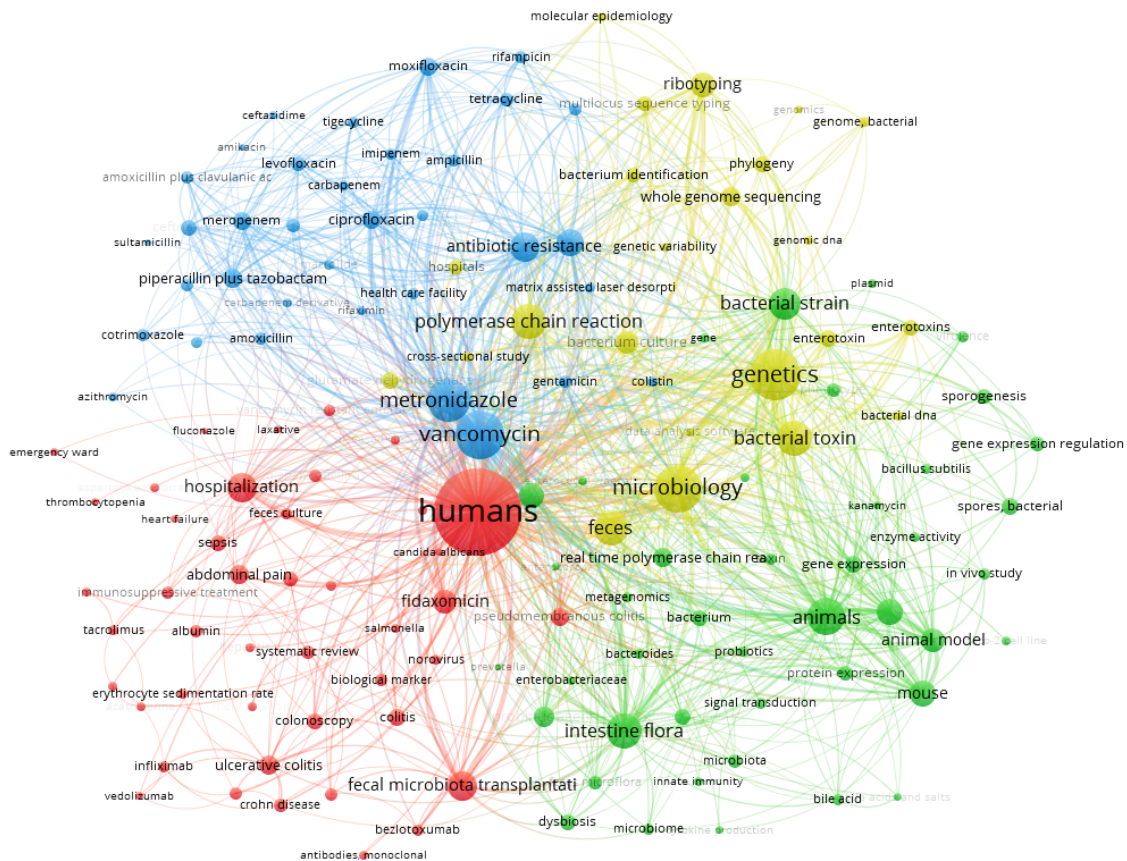


Figura 12. Análisis bibliométrico por palabras claves- Exploración nodo “humans”. Se puede observar que el nodo central y más grande es el de los humanos, debido a que es el tema más estudiado o bien que se encuentra con mayor frecuencia y muestra conexiones con el resto de los nodos más pequeños. Cada categoría muestra los nodos de diferentes colores: rojo (humanos), verde (animales), dorado (genética), azul (antibióticos: metronidazol y vancomicina).

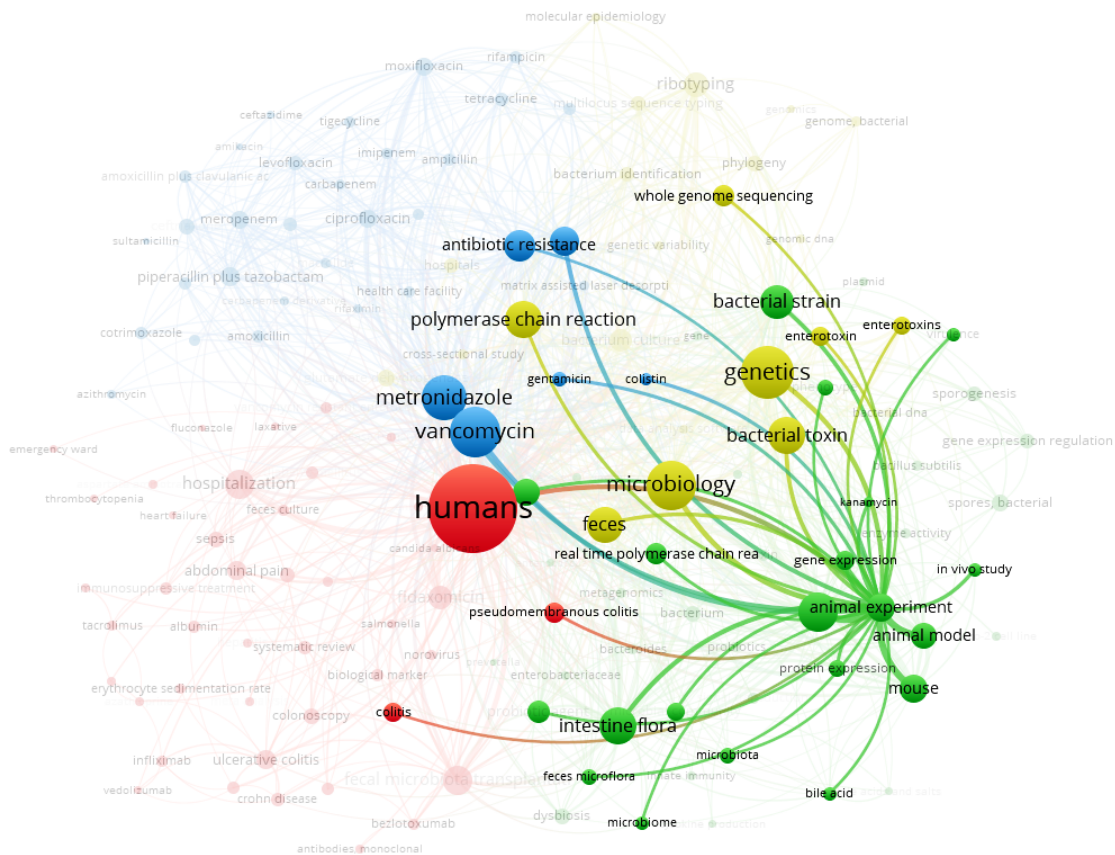


Figura 13. Análisis bibliométrico por palabras claves - Exploración nodo “animal”. Para tomar la captura de esta figura, se colocó el puntero en el nodo de “animal” con el objetivo de evidenciar la diferencia de tamaño entre los nodos que corresponden a humanos y animales, las conexiones que presentan entre sí, así como los temas estudiados relacionados con *C. difficile* en animales. Se observa que en los estudios de *C. difficile* en animales hay poca tendencia a analizar temas que sí se abordan en humanos, como la resistencia a antibióticos, métodos de diagnóstico y tratamiento.

Estas limitaciones en los métodos existentes dificultan el diagnóstico preciso y el manejo adecuado de la enfermedad en animales. Por lo tanto, existe una necesidad de realizar la caracterización de cepas de origen animal, así como desarrollar métodos diagnósticos que sean específicos y estén validados para la detección de las toxinas TcdA y TcdB en muestras que provienen de animales.

Debido a los antecedentes descritos, se decidió enfocar la tesis doctoral en la investigación de la patogenicidad de *C. difficile* en animales, a partir del cepario que poseía nuestro grupo de investigación.

2.1. Objetivo general

Desde el enfoque *One Health* y promoviendo una visión holística de la salud humana, animal y ambiental, este trabajo tuvo como objetivo principal profundizar en la comprensión de la patogenicidad de *Clostridioides difficile* mediante la caracterización de cepas de distintos ribotipos y toxinotipos, aisladas tanto de muestras animales como ambientales.

2.2. Objetivos específicos

Para la consecución de este objetivo general se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- 2.1.1.** Identificar genes de resistencia antimicrobiana y genes de producción de toxinas mediante la secuenciación del genoma completo en aislados de *C. difficile*.
- 2.1.2.** Desarrollar un inmunoensayo que permita la cuantificación de la toxina TcdB en cepas de *C. difficile*.
- 2.1.3.** Producir una antitoxina frente a TcdB para la puesta a punto de un ensayo de neutralización de cultivos celulares que permita determinar la citotoxicidad en cepas de *C. difficile*.

Material y métodos

3. Material y métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Animales

Conejos New Zealand (procedentes del animalario del ISCIII, Majadahonda)

Ratones BALB/c (procedentes del animalario del ISCIII, Majadahonda)

3.1.2. Líneas celulares

Línea celular de mieloma de ratón SP2/O-Ag14, ATCC (Middlesex, UK)

Línea celular Vero Clone E6

3.1.3. Cepas

Se recuperaron un total de 23 aislados de la colección de cepas de *C. difficile* del grupo de investigación COVEMI del departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Los aislamientos provinieron de animales (n=12) y de muestras ambientales (n=11). De los aislamientos animales, 5 provinieron de muestras fecales obtenidas de cerdos (Álvarez-Pérez et al., 2017), 5 de canales de cerdo en diferentes etapas, como preescaldado y contenido cecal (Álvarez-Pérez et al., 2018) y 2 de perros con trastornos digestivos (Orden et al., 2017). De las muestras ambientales, 9 fueron obtenidas de un matadero y planta procesadora ubicado en el sur de España (Álvarez-Pérez et al., 2018) y 2 de areneros para perros ubicados en parques públicos de la región de Madrid (Orden et al., 2018).

Estos aislados fueron elegidos entre las cepas previamente identificadas como RT078 y RT126 consideradas hipervirulentas con un toxinotipo A+B+CDT+, RT014 implicado en enfermedades humanas con un toxinotipo A+B+CDT- y otros ribotipos como RT110 con un toxinotipo A+B+CDT- y RT010 con un toxinotipo A-B-CDT- (Álvarez-Pérez et al., 2017, 2018; Orden et al., 2017, 2018).

Tabla 3. Descripción de las muestras

Nº Cepa	Código interno COVEMI	Fecha de recogida	Origen de la muestra	Fuente de aislamiento	RT	Referencia *
CD1	C3/028d1	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD2	C3/025d1	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD3	CB-33	2013	Porcino	Muestras fecales	078	[2]
CD4	CB-62	2013	Porcino	Muestras fecales	078	[2]
CD5	C3/021d1	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD6	CB-44	2013	Porcino	Muestras fecales	078	[2]
CD7	C4/111d2	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD8	C3/048d1	2016	Porcino	Esponjas de muestreo de canal	078	[1]
CD9	C3/041d1	2016	Porcino	Esponjas de muestreo de canal	078	[1]
CD10	C3/041d2	2016	Porcino	Esponjas de muestreo de canal	078	[1]
CD11	C4/029d1	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	126	[1]
CD12	P50S	2013	Canino	Hisopo rectal	078	[3]
CD13	V-P-1	2015	Cajas de arena	Arena	014	[4]
CD14	V-P-2	2015	Cajas de arena	Arena	014	[4]
CD15	CB-41	2013	Porcino	Muestras fecales	078	[2]
CD16	P51S	2013	Canino	Hisopo rectal	078	[3]
CD17	C3/005d3	2016	Porcino	Contenido cecal	110	[1]
CD18	C3/024d3	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	010	[1]
CD19	C3/027d1	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD20	C3/029d1	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD21	C3/038d2	2016	Ambiental	Esponjas de muestreo de superficies	078	[1]
CD22	EZD19	2007	Porcino	Muestras fecales	078	[2]
CD23	C3/041d3	2016	Porcino	Esponjas de muestreo de canal	078	[1]

Referencia* [1]: (Álvarez-Pérez et al., 2018), [2]: (Álvarez-Pérez et al., 2017), [3]: (Orden et al., 2017) y [4]: (Orden et al., 2018).

3.2. Productos y equipos

3.2.1. Productos

- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
- Adyuvante completo Freund (ACF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)
- Adyuvante incompleto Freund (AIF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)
- Anaer indicator (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)
- Antisuero de cabra frente a IgG de ratón sin marcar (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EE. UU.)
- Antisuero de cabra frente a IgG de ratón marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EE. UU.)
- Antisuero de cabra frente a IgG de conejo marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EE. UU.)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para cadenas $\gamma 1$ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para cadenas $\gamma 2a$ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para cadenas $\gamma 2b$ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para cadenas $\gamma 3$ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para cadenas κ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para cadenas λ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Anticuerpo de conejo frente a inmunoglobulinas de oveja marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)
- Borohidruro de sodio (NaBH₄) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Clonacell HY Medium E (STEMCELL, Grenoble, Francia)

- Color Gram 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)
- Columnas de cromatografía de afinidad, HiTrap™ Protein A HP (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia)
- Columnas de cromatografía de afinidad, HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)
- 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
- Extracto de levadura (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Filtros de centrifuga Amicon Ultra -4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Filtros de jeringa de acetato celulosa 0,45µm 25 mm estéril (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemania)
- Geles mini- PROTEAN TGX de gradiente 4-20% (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)
- GENbox Anaer (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)
- GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Glucosa (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Alemania)
- High density GLYOXAL 4 rapid run (Agarose Bead Technologies (ABT), España)
- Kit de toxina/antitoxina para la detección de la toxina de *C. difficile* en muestras clínicas Referencia T5000 (TechLab, Blacksburg, EE. UU.)
- Lisozima 20 mg/mL (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Alemania)
- Membranas de Nitrocelulosa Amersham Protran 0,45 µm NC (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia)
- Mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Placas de agar Columbia con sangre de oveja (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Placas ELISA de 96 pocillos, Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca)
- RPMI 1640 (Lonza, Vervies, Bélgica)
- SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)
- Suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)

- Tampón fosfato salino (PBS) Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM pH 7,2 (Lonza, Vervies, Bélgica)
- Tiras indicadoras de anaerobiosis (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)
- Toxina A de *Clostridium difficile* purificada. Referencia SML1154-2UG (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Alemania)
- Toxina B de *Clostridium difficile* purificada. Referencia SML1153-2UG (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Alemania)
- Triptona (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)

3.2.2. Equipos

- Centrífuga 5425 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- Centrífuga Universal 320 R (Hettich, Tuttlingen, Alemania)
- Centrífuga RC 6+ Sorvall (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Espectrofotómetro ANTHOS 2020 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)
- Espectrofotómetro Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Incubador SteriCycle i-160 37°C/CO₂ (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.)
- Microscopio invertido BH-2 (OLYMPUS, Tokio, Japón)
- Microscopio óptico TMS (NIKON, Tokio, Japón)
- Fuente de electroforesis Biorad (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)
- Sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)

3.3. Secuenciación del genoma completo de cepas de *C. difficile*

3.3.1. Cultivo microbiológico

Las cepas de *C. difficile* se cultivaron por duplicado en placas de agar Columbia con sangre de oveja durante 48 horas a 37°C en una caja de anaerobiosis, utilizando sobres generadores de atmósfera anaeróbica GENbox Anaer y tiras indicadoras de control para verificar la presencia de condiciones anaeróbicas.

3.3.2. Extracción de ADN bacteriano

A partir del cultivo microbiológico, se realizó tinción Gram para verificar que los bacilos no estuvieran esporulados para facilitar la extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de purificación de ADN genómico de bacterias grampositivas del kit GeneJET Genomic DNA Purification.

Extracción de ADN genómico de bacterias grampositivas

Se agregaron 2×10^9 células bacterianas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 x g y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 180 µL de lisis buffer para bacterias Grampositivas (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, Tritón X-100 al 1,2 % y lisozima 20 mg/mL) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37°C. Después, se añadieron 200 µL de solución de lisis y 20 µL de Proteinasa K y se homogenizó mediante vórtex para obtener una suspensión uniforme. Las muestras se incubaron a 56 °C, mezclando ocasionalmente mediante vórtex, hasta que las células estaban completamente lisadas (aproximadamente 30 minutos) y se añadieron 20 µL de solución de RNasa A, se mezcló mediante vórtex y se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Cada lisado preparado se transfirió a una columna de purificación de ADN genómico GeneJET insertada en un tubo de recolección y se centrifugaron las columnas durante 1 minuto a 6.000 x g. Los tubos de recolección que contienen los sobrenadantes fueron descartados y se colocó la columna de purificación de ADN genómico GeneJET en un nuevo tubo de 2 mL.

A continuación, se preparó el tampón de lavado I, añadiendo 30mL de etanol absoluto (≥ 99.8 %) al frasco de tampón de lavado I concentrado, para tener un volumen total de 40 mL. Posteriormente se añadieron 500 µL de tampón de lavado I (con etanol añadido), se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 8.000 x g y se descartó el sobrenadante, colocando la columna de purificación nuevamente en el tubo de recolección. Se preparó

el tampón de lavado II, añadiendo 30mL etanol absoluto ($\geq 99.8\%$) al frasco de tampón de lavado II concentrado, para tener un volumen total de 40 mL. Posteriormente se añadieron 500 μL de tampón de lavado II (con etanol añadido) a la columna de purificación de ADN genómico GeneJET y se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a máxima velocidad ($\geq 12.000 \times g$). Finalmente, se descartaron los tubos de recolección que contienen los sobrenadantes y se transfirió cada columna de purificación de ADN genómico GeneJET a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL, previamente rotulado.

Para eluir el ADN genómico, se agregaron 50 μL de tampón de Elución al centro de la membrana de la Columna de Purificación de ADN Genómico GeneJET y se incubaron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 1 minuto a $8.000 \times g$. Se descartaron las columnas de purificación y se almacenaron las extracciones de ADN a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3. Secuenciación y análisis de datos

Los genomas fueron secuenciados mediante tecnología Illumina en la unidad de genómica del Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid. Primero, el ADN se cuantificó utilizando un Fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y posteriormente se analizó el ADN mediante secuenciación de NextSeq 1.000/2.000. La calidad de las lecturas se evaluó utilizando fastqc_v0.12.0 (Andrews, s. f.) y los datos se analizaron con TORMES, un sistema automatizado para el análisis del genoma bacteriano completo (Quijada et al., 2019).

Este *pipeline* se basa en muchos paquetes de software y bases de datos diferentes: con Prinseq se evaluó el filtrado de calidad de la secuencia (Schmieder & Edwards, 2011), el ensamblaje se realizó usando SPAdes (Bankevich et al., 2012), Quast se usó para evaluar la calidad de los ensamblajes (Gurevich et al., 2013), la anotación se realizó usando Prokka (Seemann, 2014), la identificación taxonómica se realizó mediante Kraken2 (Wang et al., 2007), se utilizó el software MLST para escribir mediante el escaneo de archivos contig frente a los esquemas de escritura tradicionales de PubMLST (Jolley & Maiden, 2010; Seemann, s.f.-b), el análisis del pangenoma y del genoma central se realizó utilizando Roary (Jolley & Maiden, 2010), los genes de resistencia a los antibióticos se identificaron mediante el análisis de los genomas en las bases de datos Resfinder (Zankari et al., 2012), CARD (McArthur et al., 2013) y ARG-ANNOT (S. K. Gupta et al., 2014)

mediante el uso de Abricate (Seemann, s.f.-a) y los genes de virulencia se identificaron usando la Base de datos de factores de Virulencia (VFDB) (L. Chen et al., 2005) utilizando Abricate (Seemann, s.f.-a). Cualquier coincidencia con una cobertura y/o identidad inferior al 90 % se eliminó para los genes de resistencia a los antibióticos y los genes de virulencia.

Análisis filogenético

Treinta y dos cepas descritas en estudios previos (Alves, 2023; Frentrup et al., 2020; García-Fernández et al., 2019; Knetsch et al., 2014, 2018; Knight et al., 2019; Marcos et al., 2022) y seis cepas disponibles en Enterobase (Julio de 2024) fueron seleccionadas para incluir aislados de diferentes regiones y fuentes europeas. Las lecturas de las cepas aisladas en este estudio (n=23) y las de las cepas mencionadas anteriormente (n=38) se mapearon y compararon con el genoma de referencia seleccionado, la cepa *C. difficile* M120 (ST11) (número de acceso Genbank NC_017174.1) utilizando BWA (H. Li & Durbin, 2009), aplicando la opción 'mem' con parámetros predeterminados. Se utilizaron SAMtools (H. Li et al., 2009) para ordenar y comprimir los archivos SAM resultantes en archivos BAM. BCFtools (Danecek et al., 2021) se utilizó para realizar la identificación de variantes, aplicando las opciones 'mpileup' y 'call' y excluyendo SNPs con una calidad de base <30 y una calidad de mapeo <30. Las secuencias de consenso se generaron a partir del archivo VCF (formato de llamada de variantes) correspondiente mediante BCFtools.

Se creó una alineación multi-fasta con las secuencias de consenso concatenadas para filtrar las regiones recombinantes putativas mediante Gubbins v3.1.4 (Croucher et al., 2015). El archivo de alineación multi-fasta se utilizó para generar un árbol filogenético de máxima verosimilitud con RAxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014). El árbol se construyó utilizando el modelo evolutivo de sustitución reversible en el tiempo general con corrección gamma y 1.000 réplicas *bootstrap*. Luego, el árbol se enraizó con uno de los aislados externos (número de acceso ERR3473771) como grupo externo y se visualizó con el editor iTOL (Letunic & Bork, 2021).

3.4. Desarrollo de un ELISA sándwich para detección de TcdB de *C. difficile*

3.4.1. Producción de antígenos

3.4.1.1. Toxoide de *C. difficile*

Para producir el toxoide se utilizó la cepa CD16. Esta cepa pertenece al RT078 de *C. difficile*, fue aislada a partir de un hisopado rectal de una perra de raza Bóxer en el año 2013. Mediante WGS se identificó que esta cepa presentaba los genes de toxina *de tcdB*, *cdtA* y *cdtB* y se comprobó mediante citotoxicidad celular en células Vero la acción de sus toxinas. Fue seleccionada por su facilidad de crecimiento en Agar Sangre, alto título de citotoxicidad en células Vero (1:5.120) y su relevancia clínica al ser aislada de un paciente con síntomas clínicos de diarrea y vómitos.

El cultivo microbiológico se realizó como se describió anteriormente, con la diferencia que se incubó durante 72 horas. A continuación, se preparó un precultivo, incubando las bacterias en 10 mL de medio líquido de Infusión cerebro-corazón (BHI) en condiciones anaeróbicas durante 24 horas. Este precultivo se volvió a inocular en BHI a una dilución de 1:10 y se incubó en condiciones anaeróbicas durante 72 horas. El producto fin de fermentación se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos, se filtró a 0,45 µm y precipitó con sulfato de amonio al 75% a como se describe en (Rolfe & Finegold, 1979). Durante la precipitación, el pH se mantuvo en 7,0 mediante la adición de NaOH 1 N. El precipitado se recogió mediante centrifugación a 15.000 x g durante 30 minutos, se resuspendió en tampón de fosfato potásico 50 mM a pH 7,0 y se dializó contra el mismo tampón. Posteriormente, el precipitado proteico se concentró utilizando filtros de centrifuga Amicon Ultra-4 50 KDa y se midió la concentración de proteínas empleando Bio-Rad DC Protein Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para finalizar la preparación del toxoide, el cultivo se inactivó a 56°C durante 6 minutos y se comprobó la pérdida de actividad de la toxina mediante ensayo de citotoxicidad en células Vero (Sullivan et al., 1982).

3.4.1.2. Proteína recombinante de la TcdB de *C. difficile*

Para el diseño de la proteína recombinante de la TcdB de *C. difficile*, se realizó una revisión bibliográfica en PUBMED sobre la estructura de la toxina, las funciones de los dominios y las regiones de la TcdB utilizadas para la producción de anticuerpos neutralizantes. Para confirmar que el dominio de los CROPs de la TcdB podía inducir la

producción de anticuerpos, se realizó una búsqueda de los epítomos descritos para *C. difficile* en la base de datos de epítomos inmunitarios (IEDB, <https://www.iedb.org/>) y se enfrentaron las secuencias de epítomos con la secuencia de aminoácidos del Dominio CROP, fragmento seleccionado para la producción de la TcdB recombinante (B-Tcd). Una vez seleccionado el fragmento de la TcdB a producir, se envió la secuencia a la Empresa PROALT para su producción (Ver Figura 14).

```

      10           20           30           40           50           60
MGLIYINDSL YYFKPPVNNL ITGFVTVGDD KYFNPINGG AASIGETIID DKNYYFNQSG

      70           80           90           100          110          120
VLQGTGVFSTE DGFKYFAPAN TLDENLEGEA IDFTGKLIID ENIYYFDDNY RGAWEVKELD

      130          140          150          160          170          180
GEMHYFSPET GKAFKGLNQI GDYKYFNSD GVMQKGFVSI NDNKHYFDD S GVMKVGYTEI

      190          200          210          220          230          240
DGKHFYFAEN GEMQIGVFNT EDGFKYFAHH NEDLGNEEGE EISYSGILNF NNKIYYFDDS

      250          260          270          280          290          300
FTAVVGWKDL EDGSKYYFDE DTAEAYIGLS LINDGQYYFN DDGIMQVGFV TINDKVFYFS

      310          320          330          340          350          360
DSGIIESGVQ NIDDNYFYID DNGIVQIGVF DTSDGYKYFA PANTVNDNIY GQAVEYSGLV

      370          380          390          400          410          420
RVGEDVYVYFG EYTIETGWI YDMENESDKY YFNPETKKAC KGINLIDDIK YYFDEKGIMR

      430          440          450          460          470          480
TGLISFENN YFENGEMQ FGYINIEDKM FYFGEDGVMQ IGVFNTPDGF KYFAHQNTLD

      490          500          510          520          530          540
ENFEGESINY TGWLDLDEKR YYFTDEYIAA TGSVIIDGEE YYFDPDTAQL VISEHHHHHH

```

Figura 14. Fragmento de TcdB elegido para el diseño de la B-Tcd. Dominio CROPs. Aminoácidos 1834-2366 de la TcdB Uniprot Número de acceso: P18177.

El procedimiento empleado para la producción de la B-Tcd inició con la optimización de codones y la síntesis ADNc (1635 pb). La secuencia de nucleótidos de la TcdB fue optimizada para su expresión en *Escherichia coli* (*E. coli*) y su posterior síntesis *in vitro* (Ver Figura 15).

NcoI (CCATGG)
XhoI (CTCGAG)

CCATGGTCTGATCTACATTAACGACAGCCTGTACTATTTCAAGCCGCCGGTGAACAACCTGATCACCGGTTTCG
TGACCGTTGGCGACGATAAATACTATTTTAAACCCGATTAACGGTGGCGCGGCGAGCATTGGTGAACCATCATCG
ACGATAAGAACTACTACTTCAACCAGAGCGGTGTGCTGCAAACCCGGCGTTTTTCAGCACCGAGGACGGTTTCAAAT
ACTTTGGCGCGCGGAACACCCCTGGATGAAAACCTGGAGGGCGAAGCGATTGACTTTACCGGCAAGCTGATCATTTG
ATGAAAACATCTACTATTTTCGACGATAACTACCGTGGCGCGGTGGAGTGGAAAGAACTGGACGGCGAGATGCACT
ATTTAGCCCGGAAACCGGCAAGGCGTTTAAAGGCTGAACCAGATTGGTGACTACAAGTACTATTTCAACAGCG
ATGGCGTGATGCAAAAGGGTTTTGTTAGCATCAACGACAACAAACACTACTTTCGACGATAGCGCGGTGATGAAGG
TTGGTTACACCGAGATTGATGGCAAACACTTCTATTTTGGCGGAGAACGGCGAAATGCAGATCGGTGTTTTCAATA
CCGAAAGACGGTTTTCAAGTACTTTGCGCACCACAACGAAGATCTGGGTAACGAGGAAGGCGAGAAATTAGCTATA
GCGGTATCCTGAACCTCAACAACAAGATCTACTACTTTCGACGATAGCTTTACCGCGGTGGTTGGCTGGAAGGACC
TGGAGGATGGTAGCAAATACTATTTTCGACGAGGATACCGCGGAAGCGTACATTGGCCTGAGCCTGATCAACGACG
GCCAGTACTATTTTAAACGACGATGGCATTATGCAAGTGGGTTTCGTTACCATCAACGACAAGGTGTTCTACTTTA
CGGATAGCGGCATCATTGAAAGCGGTGTTTCAGAACATCGACGATAACTACTTCTACATCGACGATAACGGCATCG
TGCAAATTTGGTGTTCGACACCCAGCGATGGCTACAATAATTTTCGCGCGCGGCAATACCGTGAACGACAATCT
ACGGTCAGGCGGTTGAGTATAGCGCCCTGGTGCCTGTTGGTGAAGATGTTTACTATTTTCGCGGAGACCTACACCA
TTGAAACCGGTTGGATCTATGACATGGAGAACGAAAGCGATAAGTACTATTTTAAACCCGAAACCAAGAAAGCGT
GCAAAGGTATCAACCTGATTGACGATATCAAGTACTATTTTCGACGAGAAAGGCATTATGCGTACCGGTCTGATCA
GCTTCGAAAACAACAATACTATTTTAAACGAGAACGGCGAAATGCAATTCGGTTACATCAACATGAGGACAAGA
TGTTCTATTTTGGTGAAGATGGCGTGATGCAGATTGGCGTTTTTAAACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCGC
ACAAAACACCTGGATGAGAATTCGAGGGCGAAAGCATTAACTACACCGGTTGGCTGGACCTGGATGAGAAC
GTTACTATTTTACCGCGAATATATCGCGCGACCGGCAGCGTGATCATTGATGGCGAGGAATACTATTTTCGACC
CGGATACCGCGCAACTGGTTATCAGCGAACACCACCACCACCACCTAACTCGAG

Figura 15. Secuencia de nucleótidos de la TcdB. Se destacan en color los sitios flanqueantes de clonaje NcoI/XhoI.

Para el clonaje se utilizó el vector de expresión pET-28a (+) de Novagen, el gen de resistencia a Kanamicina y el promotor T7lac, con sitios de clonaje de los dos genes sintéticos: *NcoI/XhoI* (Figura 16) y se insertó en la cepa bacteriana: *E. coli* cepa BL21(DE3) de Life Technologies, genotipo: *F- omp T hsdSB* (rB- mB-) *gal dcm* (DE3).

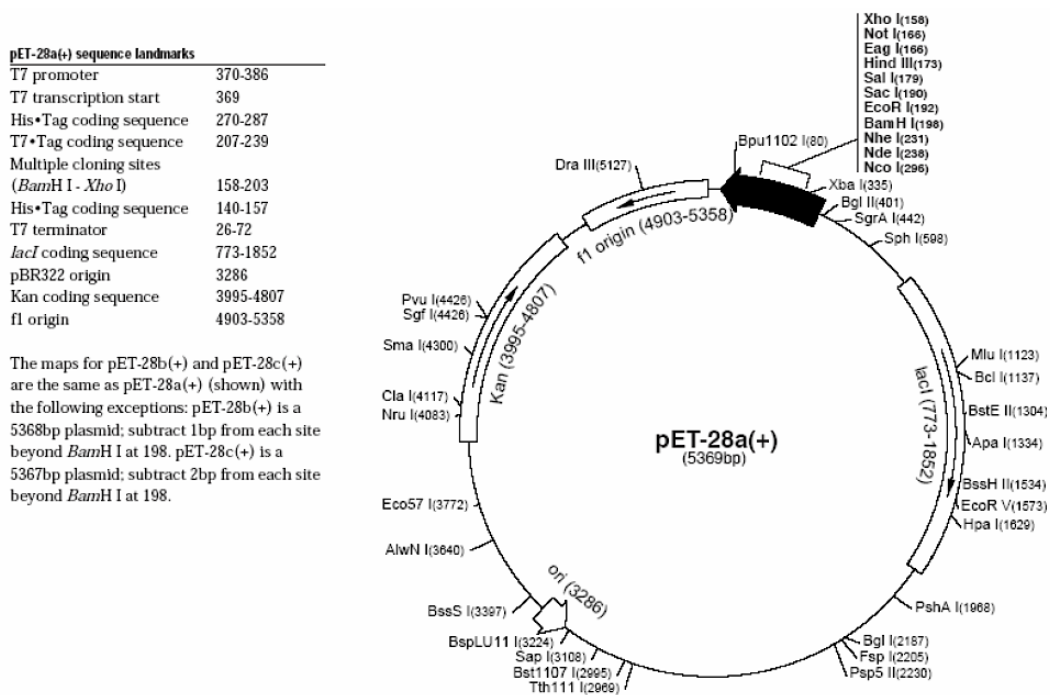


Figura 16. Mapa del vector de expresión pET-28(+)

Posteriormente, se realizó el ensayo de expresión de la proteína recombinante en cultivos de 50 mL en tres condiciones de inducción diferentes: 16°C durante 48 horas, 25°C durante 24 horas y 37°C durante 4 horas, todas ellas a la misma concentración de agente inductor (0.8mM IPTG). Tras la inducción se recogieron las células por centrifugación, se lisaron los pellets celulares mediante sonicación y se analizó la expresión de la proteína de interés en las fracciones soluble e insoluble mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) teñidos con Azul de Coomassie (Figura 17) y por Western-Blot con un anticuerpo monoclonal anti-histidinas. En todas las condiciones ensayadas se detectó sobreexpresión de la proteína de interés en la fracción soluble.

Para la producción a escala se emplearon las siguientes condiciones:

- Medio de cultivo: Luria Broth (LB)+ Kanamicina; Inductor: IPTG 0.8mM
- Temperatura y tiempo de expresión: 16°C durante 48 horas

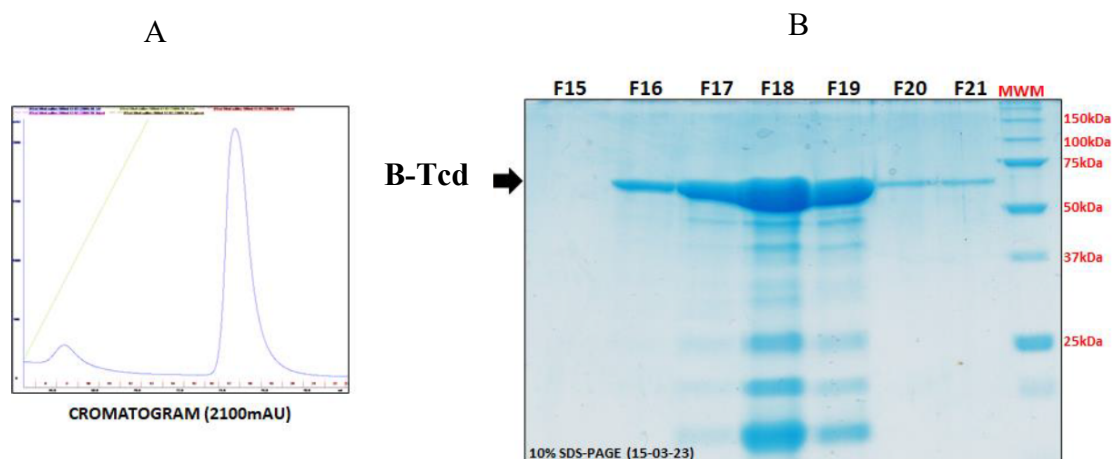


Figura 17. Purificación de la B-Tcd. A. Cromatograma: Se observan las fracciones que incluyen la B-Tcd purificada. B. Electroforesis en gel 10% SDS-PAGE de las fracciones resultantes de la purificación de la fracción soluble por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). El carril MWM corresponde al marcador de peso molecular. “F” es la fracción de proteína purificada en la carrera cromatográfica. Se confirma que la banda principal es de 62 kDa.

Después de la establecer las condiciones de cultivo, se realizó la producción a gran escala, en la que se purificaron 500 mL de cultivo por cromatografía IMAC. Se juntaron las fracciones de proteína purificada con el fin de obtener una única preparación y se cuantificó la concentración por densitometría de bandas (Figura 18).

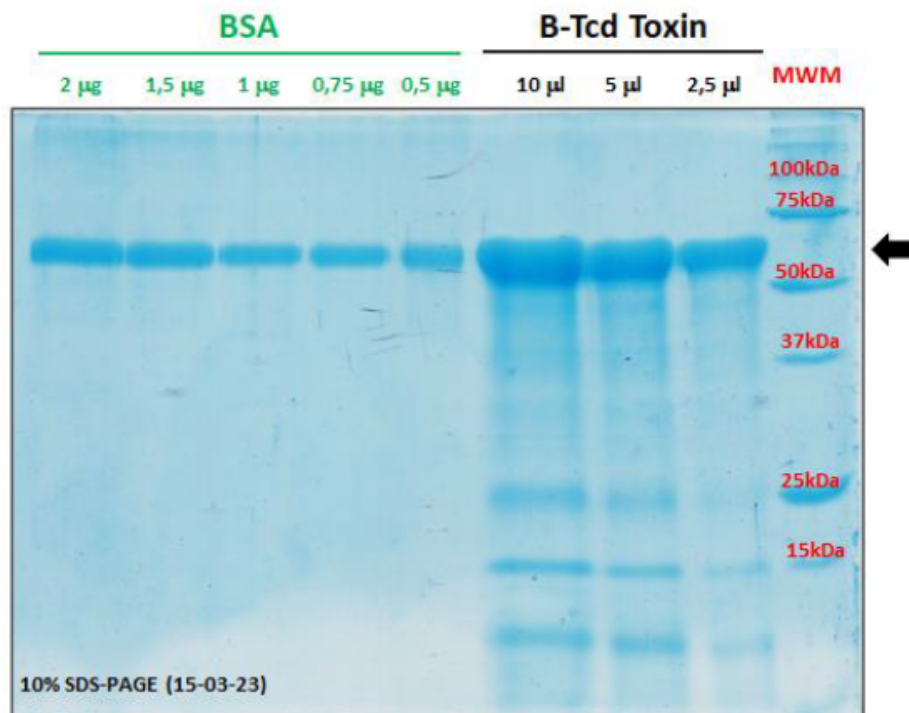


Figura 18. Cuantificación de la concentración de la TcdB por densitometría de bandas frente a estándares de BSA, haciendo uso del software Image J.

Con el objetivo de confirmar la identidad de la proteína recombinante, se tomó una alícuota de la misma, para analizarla por Cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS), utilizando un Espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 240 y el Software de análisis Mascot-Proteome Discoverer. Este ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones: primero se realizó la digestión trípica en columnas S-Trap, después se realizó un análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas Orbitrap Exploris 240 y, por último, se analizaron los péptidos en base de datos de datos de *Clostridium difficile* con el motor de búsqueda MASCOT.

La espectrofotometría de masas confirmó que la proteína recombinante producida coincide con la Toxina B de *Clostridioides difficile* (Figura 19), identificador taxonómico: 1496, gen *tcdB*, con un score de 97,431.

1	MSLVNRKQLE	KMANVRFRTQ	EDEYVAILDA	LEEYHNMSEN	TVVEKYLKLK	
51	DINSLTDIYI	DTYKKSGRNK	ALKKFKEYLV	TEVLELKNNN	LTPVEKNLHF	
101	VWIGGQINDT	AINYINQWKD	VNSDYNVNVF	YDSNAFLINT	LKKTVVESAI	
151	NDTLESFREN	LNDPRFDYNK	FFRKRMEIYY	DKQKNFINYY	KAQREENPEL	
201	IIDDIVKTYL	SNEYSKEIDE	LNTYIEESLN	KITQNSGNDV	RNFEEFKNGE	
251	SFNLYEQELV	ERWNLAAAASD	ILRISALKEI	GGMYLDVDML	PGIQPDLFES	
301	IEKSSSVTVD	FWEMTKLEAI	MKYKEYIPEY	TSEHFDMLDE	EVQSSFESVL	
351	ASKSDKSEIF	SSLGDMESP	LEVKIAFNSK	GIINQGLISV	KDSYCSNLIV	
401	KQIENRYKIL	NNSLNPASE	DNDFNTTNT	FIDSIMAEAN	ADNGRFMMEL	
451	GKYLRVGFPP	DVKTTINLSG	PEAYAAAYQD	LLMFKEGSMN	IHLIEADLRN	
501	FEISKTNISQ	STEQEMASLW	SFDDARAKAQ	FEEYKRNYFE	GSLGEDDNL	
551	FSQNIIVVDE	YLLEKISSLA	RSSERGYIHY	IVQLQGDKIS	YEAACNLFAK	
601	TPYDSVLFQK	NIEDSEIAYY	YNPGDGEIQE	IDKYKIPSII	SDRPKIKLTF	
651	IGHGKDEFNT	DIFAGFDVDS	LSTEIEAAID	LAKEDISPKS	IEINLLGCM	
701	FSYSINVEET	YPGKLLKVK	DKISELMPSI	SQDSIIVSAN	QYEVRLNSEG	
751	RRELLDHSGE	WINKEESI	DISKEYISF	NPKENKITVK	SKNLPELSTL	
801	LQEIENNSNS	SDIELEEKVM	LTECEINVIS	NIDTQIVEER	IEEAKNLTS	
851	SINYIKDEFK	LIESISDALC	DLKQONELED	SHFISFEDIS	ETDEGFSIRF	
901	INKETGESIF	VETEKTI	YANHITTEIS	KIKGTIFD	TVNGKLVKVN	
951	DTTHEVNTLN	AAFFIQSLIE	YNSSKESLSN	LSVAMKVQVY	AQLFSTGLNT	
1001	ITDAAKVVEL	VSTALDETID	LLPTLSEGLP	IIATIIDGVS	LGAAIKELSE	
1051	TSDPLLQEI	EAKIGIMAVN	LTTATTAIIT	SSLGIASGFS	ILLVPLAGIS	
1101	AGIPLVNNNE	LVLRDKATKV	VDYFKHVS	LVETE	GVFTLLDDKIMPPQDDL	
1151	VISEIDFN	NSIVL	GKCEIWRMEGGSGHTV	TDDIDHFFSA	PSITYREPHL	
1201	SIYDVLEVQK	EELDLSKDL	MVLPNAPNRV	AWETGWT	PGLRSLENDGTKL	
1251	LDRIRDNYEG	EFYWR	YFAFIADALITTLKP	RYEDTNIRIN	LDSNTRSFIV	
1301	PIITTEYIRE	KLSYSFYGSG	GTIALSLSQY	NMGINIELSE	SDVWIIDVDN	
1351	VVRDVTIESD	KIKKGD	LIEGILSTLSIEEN	KIILNSHEIN	FSGEVNGSNG	
1401	FVSLTF	SILEGINAIEVDL	LSKSYKLLIS	GELKILMLNS	NHIQQKIDYI	
1451	GFNS	ELQKNIPYSFV	DSEGGKENG	FINGSTKEGLFV	SELDPVVLISKVYMD	
1501	DSKPSFGYYS	NNLKDV	KVITKDNVNIL	TGYLKD	DIKISLSLTLQDEKTI	
1551	KLNSVHLDES	GVAEIL	KFMNRKGN	TNTSDSLMSF	LESMNIKSIFVNF	LQS
1601	NIKFILDANF	IISG	TTSIGQFEFIC	DENDNIQPYFIK	FNTLETNYTLYVG	
1651	NRQNMIVEPN	YDLDDSGDIS	STVINFSQKY	LYGIDSCVNK	VVISPNYTD	
1701	EINITPVYET	NNTYPEVIVL	DANYINEKIN	VNINDLSIRY	VWSNDGNDFI	
1751	LMSTSEENKV	SQVKIRFVNV	FKDKTLANKL	SFNFS	DKQDVPVSEIILSFT	
1801	PSYEDGLIG	YDLGLVSLYN	EKFYIN	NFGMMVSGLIY	INDSLYYFK	PPVN
1851	NLITGFVTVG	DDKYFNPIN	GGAASIGETI	IDDKNYFFNQ	SGVLQ	TGVFS
1901	TEDGFKYFAP	ANTLDENLEG	EADFTGKLI	IDENIYFFDD	NYRGAVEWKE	
1951	LDGEMHYFSP	ETGKAFKGLN	QIGDYKYFFN	SDGVMQKGFV	SINDNKHYFD	
2001	DSGVMKVGYT	EIDGKH	FYFAENGEMQIGVF	NTEDGFKYFA	HHNEDLGNEE	
2051	GEEISYSGIL	NFNK	IYFFDSFTAVVGWK	DLEDGSKYFF	DEDTAEAYIG	
2101	LSLINDGQYY	FND	DGIMQVGFVTINDKVFY	FSDSGIIESG	VQNIDDNYFY	
2151	IDDNGIVQIG	VFD	TS	DGYKYFAPANTVNDN	IYQAVEYSGLVRVGEDVYY	
2201	FGETYTIETG	WIYDMENESD	KYFNPETKK	ACKGINLIDD	IKYFDEKGI	
2251	MRTGLISFEN	NNYFNENGE	MQFGYINIED	KMFYFGEDGV	MQIGVFNTPD	
2301	GFKYFAHQNT	LDENFEGESI	NYTGWLDLDE	KRYFTDEYI	AATGSVIIDG	
2351	EEYFDP	PDTAQLVISE				

Figura 19. Cobertura de la B-Tcd sobre la TcdB de *C. difficile*. Los péptidos coincidentes con la secuencia de referencia se muestran en rojo, lo que permite visualizar qué fragmentos fueron detectados en el análisis. Se ha cubierto un 20% de la secuencia total de la proteína con los péptidos detectados en el experimento, que corresponden al Dominio CROPs de la TcdB.

3.4.1.3. Producción de toxinas

La producción de las toxinas fue realizada según el procedimiento descrito en Aminzadeh & Jørgensen (2021), adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio.

Preparación del medio de cultivo líquido

El medio de cultivo contenía 30 g/L de triptona, 20 g/L de extracto de levadura, ZnCl_2 5 mM y glucosa 10 mM en tampón de PBS 100 mM (pH 7,5). Para disolver los reactivos, el medio se mantuvo en agitación durante al menos 1 hora antes de autoclararlo. Posteriormente, se dispensó en tubos y/o botellas de Pyrex de 100 mL estériles y se autoclavó durante 25 minutos a 121°C. Los medios se incubaron en cajas de anaerobiosis con atmósfera controlada por GENbox Anaer a 37°C durante al menos 24 horas antes de la inoculación con las cepas de *C. difficile*, con objeto de proceder a su prereducción.

Inoculo 1

Se descongelaron las cepas de *C. difficile* y se sembraron en Agar columbia con sangre de oveja. Después, se incubaron durante 72 horas a 37°C en una caja de anaerobiosis con sobres GENbox Anaer y la tira de control indicadora de anaerobiosis. Posteriormente se inocularon las bacterias en 15 mL de medio de cultivo líquido previamente incubado en condiciones anaeróbicas durante al menos 24 horas antes de la inoculación con las cepas de *C. difficile*.

Inoculo 2

Se inocularon 0,5 mL de cultivo de inoculo 1 en 50 mL de medio de cultivo previamente incubado en condiciones anaeróbicas y se incubaron los cultivos sin agitación durante 24 horas a 37°C en condiciones anaeróbicas.

Cultivo

Se inocularon 0,5 mL de cultivo de inoculo 2 en 50 mL de medio de cultivo previamente incubado en condiciones anaeróbicas (1%, v/v), posteriormente los cultivos se incubaron sin agitación en condiciones anaeróbicas durante 3 días a 37°C. Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4° C y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0,45 μm , manteniendo la cadena de frío. Después, los sobrenadantes se alicuotaron y se congelaron a -80°C.

3.4.2. Obtención de anticuerpos frente a la TcdB de *C. difficile*

3.4.2.1. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales

Como donantes de esplenocitos para la obtención de AcM frente a la TcdB de *C. difficile* se emplearon ratones BALB/c. Los animales recibieron dos dosis de B-Tcd por vía intraperitoneal. La primera de ellas contenía 50 µg de proteína emulsionada en Adyuvante completo de Freund (ACF) y, a los 15 días, se les administró una nueva dosis de 25 µg emulsionada en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). A los 7 días de esta última inmunización, los animales se sangraron y se determinó el título de anticuerpos frente a B-Tcd mediante ELISAI. El ratón cuyo suero presentó una mayor reactividad recibió una última dosis antigénica por vía intraperitoneal y fue sacrificado a las 96 horas. Las células del bazo se fusionaron en presencia de polietilenglicol con la línea celular de mieloma de ratón SP2/O-Ag 14 (Figura 20), según los métodos descritos por Goding (1980, 2004), Galfrè y Milstein (1981) Para identificar los hibridomas productores de anticuerpos específicos se realizó un primer cribado por ELISAI frente a la B-Tcd y posteriormente, se realizó un segundo cribado por ELISAI frente al toxoide de *C. difficile*.

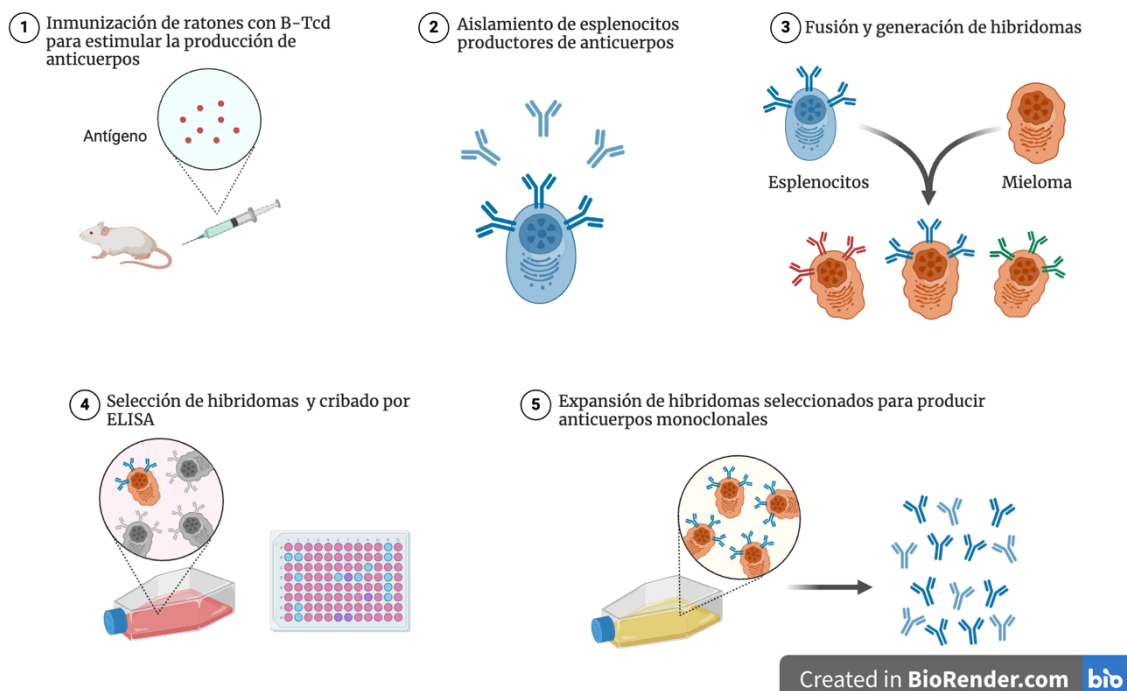


Figura 20. Esquema del proceso de obtención de anticuerpos monoclonales. Los AcM se obtuvieron tras la fusión de esplenocitos del ratón inmunizado con las células de un mieloma. Este proceso generó líneas celulares híbridas (hibridomas) capaces de producir un único tipo de anticuerpo dirigido contra un epítipo específico. Adaptado de una plantilla de BioRender.com basada en datos de *Sigma-Aldrich (s. f.)*.

La selección de los hibridomas productores de AcM se llevó a cabo empleando los siguientes inmunoensayos:

ELISA indirecto:

Se emplearon placas de 96 pocillos tapizadas con 50 μ L de B-Tcd (5 μ g/mL) o del toxoide de *C. difficile* (1:50) diluidos en Tampón 10mM Carbonato-Bicarbonato pH 9,8. Las placas se tapizaron durante 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C tras lo cual se bloquearon con 75 μ L de BSA al 2% en PBS durante media hora a 37°C y, a continuación, se lavaron tres veces con el tampón PBS suplementado con 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Posteriormente, se añadieron 50 μ L del sobrenadante de cultivo de hibridomas durante 2 horas a 37°C. Cuando el ELISAi se empleó para determinar el título de anticuerpos de los ratones inmunizados, se añadieron 50 μ L del suero de ratón diluido 1:100, se realizaron 8 diluciones seriadas de $\frac{1}{2}$ y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Finalizada la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 50 μ L de anticuerpo policlonal (AcP) de cabra frente a IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución de 1:2.000 durante media hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se revelaron utilizando 100 μ L de OPD disuelto en el tampón citrato-fosfato pH 4,89 a una concentración de 1 mg/mL y suplementado con H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. Tras 5 minutos de incubación la reacción se paró añadiendo 50 μ L H₂SO₄ 3 N y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro ANTHOS 2020.

Los hibridomas productores de anticuerpos que presentaron mayor reactividad frente a B-Tcd y al toxoide de *C. difficile* se clonaron dos veces en medio líquido por dilución límite, comprobándose que tras cada clonaje se mantenía la reactividad frente a los antígenos de selección.

ELISA indirecto para determinación de isotipos:

La caracterización de los AcM incluyó la determinación del isotipo de cadena pesada y del tipo de cadena ligera mediante ELISA tipo sándwich. Los pocillos se tapizaron con 50 μ L de un AcP de cabra frente a IgG (H + L) de ratón a una concentración de 3 μ g/mL durante toda la noche a 4°C. A continuación, se bloquearon con 75 μ L de BSA al 2% durante media hora a 37°C. Después de tres lavados con PBS-T, se añadieron 50 μ L de sobrenadante de los hibridomas y se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrida la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 50 μ L AcP de cabra

específico frente a IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, cadenas kappa o lambda de ratón conjugadas con HRP (1:2.000) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se revelaron utilizando 100 μ L de OPD disuelto en el tampón citrato-fosfato pH 4,89 a una concentración de 1 mg/mL suplementado con H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. Tras 5 minutos de incubación se paró la reacción añadiendo 50 μ L H₂SO₄ 3 N y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro ANTHOS 2020.

Western-blot:

Para caracterizar la reactividad de los AcM mediante Western blot se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Ossipow et al., 1993). Se utilizaron geles de acrilamida/ bisacrilamida al 10% para B-Tcd (62 kDa) y geles Mini- PROTEAN TGX de gradiente entre 4-20% para la toxina nativa y el toxoide (TcdB: 270kDa). Las muestras se diluyeron en el tampón de carga (Tris-HCL 62,2 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 2 % SDS y 0,02 % de azul de bromofenol) en condiciones reductoras. Aquellos geles empleados para la visualización de las proteínas tras la electroforesis se fijaron en una solución de 40% de metanol y 10% de ácido acético durante 15 minutos y se tiñeron empleando azul de coomasie R-250 durante toda la noche. Finalizado este proceso, para eliminar la tinción inespecífica, el gel se lavó tres veces con agua destilada. Para realizar el western blot, tras la electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa empleando el equipo de Trans-Blot Turbo de Biorad. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche desnatada diluida al 5% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación y, tras un lavado con PBS-T, se añadieron los sobrenadantes del cultivo de hibridomas sin diluir o los AcP a una dilución 1:200 en leche desnatada y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Finalizada la incubación, la membrana se lavó tres veces con PBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante una hora. Para los AcM se empleó el AcP de cabra frente a IgG de ratón marcado con HRP a una dilución 1:2.000, para los AcP de conejo se agregó un antisuero de cabra frente a IgG de conejo marcado con HRP a una dilución 1:2.000 y cuando se empleó como anticuerpo primario la antitoxina del kit de TechLab se utilizó como anticuerpo de revelado un policlonal de conejo marcado con HRP frente a inmunoglobulina de oveja a una dilución 1:2.000 que reconoce también las inmunoglobulinas de cabra. Tras dos lavados con PBS-T y uno con PBS se procedió al revelado del western blot empleando como cromóforo DAB a una

concentración 1 mg/mL suplementado con H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. La reacción se paró añadiendo agua destilada.

Purificación de AcM

Los AcM se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo de los hibridomas empleando la columna HiTrap Protein G HP 1mL. Esta columna tiene proteína G purificada acoplada a perlas de agarosa altamente entrecruzadas mediante el método de activación de N-hidroxisuccinimida. Este método de acoplamiento proporciona alta capacidad de retención. La purificación de los AcM se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Como tampón de elución se empleó NH₄OH 1M. Se recogieron fracciones de 0,5 mL y se midió la D.O. a 280 nm en un Nanodrop. Las fracciones que presentaban mayor D.O. se mezclaron y se dializaron frente a PBS. La concentración aproximada de anticuerpos se determinó empleando como coeficiente de extinción porcentual 1,4 mg/mL. Los anticuerpos purificados se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.4.2.2. Obtención de anticuerpos policlonales

Los conejos hiperinmunizados utilizados para la obtención de AcP frente a la TcdB de *C. difficile* fueron de la raza New Zealand. Para el desarrollo del presente proyecto se han obtenidos dos AcP (Figura 21).

Anticuerpo policlonal N° 1

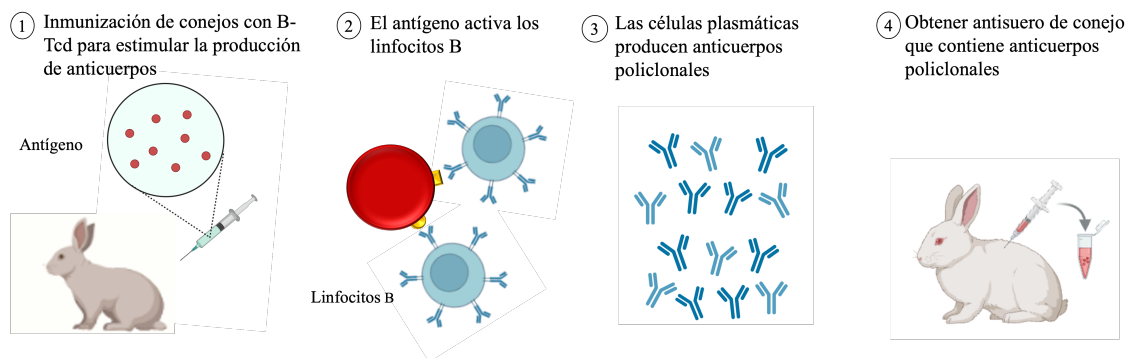
Se obtuvo empleando con antígeno de inmunización el toxoide obtenido según las indicaciones del apartado 3.4.1.1. El animal recibió al menos tres dosis de antígeno por vía intramuscular y subcutánea. La primera dosis contenía 250 µg de toxoide emulsionado en ACF, las siguientes contuvieron 125 µg de antígeno emulsionado en AIF, en intervalos de mínimo de 21 días.

Anticuerpo policlonal N° 2

Como inmunógeno se empleó B Tcd. La pauta de inmunización fue similar a la del AcP N° 1.

A los 7 días de la tercera inmunización, los animales se sangraron y se analizó el título de anticuerpos que presentaban frente al antígeno de inmunización mediante ELISAi.

Transcurridos 15 días, el animal N°2 recibió una última dosis antigénica de 125 µg B-Tcd y se sacrificó a los 7 días. El animal N° 1 recibió dos dosis antigénicas de 125 µg B-Tcd y se sacrificó a los 7 días de esta última. El título de anticuerpos de los conejos se analizó mediante ELISA similar el descrito en el apartado anterior con ligeras modificaciones. En este caso se analizó el suero de conejo desde una dilución 1:100 y se realizaron 12 diluciones seriadas con factor de dilución ½. Como anticuerpo secundario se empleó un AcP de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo marcado con HRP. La reacción colorimétrica se puso de manifiesto en este caso empleando como cromógeno 100 µL de TMB durante 10 minutos y como solución de parada se emplearon 100 µL H₂SO₄ 1 N. La densidad óptica (D.O.) se determinó en un espectrofotómetro Varioskan Lux a 450 nm.



Created in BioRender.com

Figura 21. Esquema del proceso de obtención de anticuerpos policlonales. Los AcP se obtuvieron inmunizando conejos con un antígeno seleccionado. Esto estimula la diferenciación de distintos clones de linfocitos B que producen anticuerpos dirigidos contra múltiples epítopos de B-Tcd. Creado en BioRender.com

Purificación de AcP

Los anticuerpos del suero se purificaron empleando una columna HiTrap Protein A HP 1mL siguiendo las indicaciones del fabricante. Esta columna tiene proteína A de *Staphylococcus aureus* purificada y acoplada a perlas de agarosa altamente entrecruzadas mediante el método de activación de N-hidroxisuccinimida.

Para eluir los anticuerpos retenidos en la columna, se empleó como buffer de elución Ácido cítrico 0,1 M, pH 3–6. Se recogieron fracciones de 0,5 mL en tubos de recolección que contenían 150 µl de Tris-HCl 1 M pH 9,0 para contrarrestar el pH ácido del tampón

de elución y se midió la D.O. a 280 nm en un Nanodrop. Las fracciones que presentaban mayor D.O. se mezclaron y se dializaron frente a PBS. La concentración aproximada de anticuerpos se determinó empleando como coeficiente de extinción porcentual de 1,6 mg/mL. Los anticuerpos purificados se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Posteriormente se realizó una segunda purificación del AcP mediante columna de afinidad de antígeno. Para ello se preparó una matriz de agarosa (High density GLYOXAL 4 rapid run) acoplada a B-Tcd, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello 1 mL de matriz de glyoxal previamente lavada y resuspendida en tampón Bicarbonato de sodio 0,1M pH 10,0 se incubó con 9 mL de B-Tcd a 1 mg/mL con agitación suave durante 4 horas. Para verificar el acoplamiento de la proteína a la matriz, se analizó la absorbancia a 280 nm antes y después de la incubación. Para estabilizar el acoplamiento, cuando la absorbancia de la suspensión llegó a ser constante, se agregaron 10 mg de borohidruro de sodio y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un recipiente abierto dentro de una campana extractora de gases. Para finalizar, se lavó la suspensión con tampón fosfato 25 mM pH 7,0 utilizando un filtro de vacío para eliminar el exceso de borohidruro. La matriz de agarosa acoplada al ligando se almacenó a 4°C en PBS.

El AcP previamente purificado mediante la columna HiTrap Protein A HP y a una concentración de 2 mg/mL, se incubó con las bolas de agarosa glyoxal durante 2 horas en agitación, pasado el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 280nm para verificar que el AcP se había unido al ligando, se realizaron lavados con PBS hasta que la D.O. a 280 nm era igual a 0 y se procedió a separar el anticuerpo unido agregando 500 µL de NH₄OH 1M a la columna. Se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos, se recogió la fracción purificada y se midió la absorbancia a 280 nm, se repitió este proceso hasta que no se detectaran proteínas en la fracción eluida. Las fracciones que contenían mayor concentración de anticuerpos se dializaron con tampón PBS, se cuantificó la concentración de proteínas y se midió la especificidad y sensibilidad mediante un ELISAi y Western blot.

3.4.3. Desarrollo del ELISA Sándwich para la detección de TcdB de *C. difficile*

En esta sección se detallan los procedimientos realizados para el desarrollo del ELISA sándwich, centrados en la elección de anticuerpos de captura y revelado, con el objetivo de incrementar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo.

Con los reactivos obtenidos se desarrollaron dos inmunoensayos:

a. ELISA Sándwich- AcM/AcP

Anticuerpo de captura: AcM SIM 542.20.2.2

Anticuerpo de revelado: AcP N°2

Selección del anticuerpo de captura

Para seleccionar el anticuerpo de captura se realizó un ELISA Sándwich tapizando las placas de 96 pocillos con antisuero de cabra frente a IgG de ratón sin marcar a 3 µg/mL durante toda la noche a 4°C para fijar los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de los AcM producidos. Después se agregaron 50 µL de sobrenadantes de los AcM y se incubaron durante 1 hora. A continuación, los pocillos se bloquearon con 75 µL de BSA al 2% durante media hora a 37° C y tras tres lavados con PBS-T se añadieron 50 µL de B-Tcd a una concentración de 10 µg/mL en 12 diluciones seriadas (factor de dilución 1:2) en PBS suplementado con BSA 2% y PBS-T para hacer la recta patrón. Tras incubar una hora a 37° C, los pocillos se lavaron tres veces y se añadieron 50 µL de AcP de conejo N°1 diluido 1:2.000 en PBS y se incubaron 1 hora a 37° C. Después, se realizaron tres lavados con PBS-T y se añadieron 50 µL de anticuerpo de cabra frente a IgG de conejo marcado con HRP diluida a 1:2.000 en PBS y se incubó durante media hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T. Para finalizar, la reacción colorimétrica se produjo agregando 100 µL de TMB. Tras 5 minutos de incubación se paró la reacción añadiendo 100 µL H₂SO₄ 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Varioskan Lux.

Una vez confirmado que el anticuerpo SIM 542.20.2.2 capturaba el antígeno, se ensayó como anticuerpo de revelado el AcP N° 2. Las placas de 96 pocillos se tapizaron con 100 µL de AcM SIM 542.20.2.2 purificado a una concentración de 2,5 µg/mL durante toda la noche a 4°C. A continuación, los pocillos se bloquearon con 100 µL de BSA al 2% durante media hora a 37° C y tras tres lavados con PBS-T se añadieron 100 µL de las toxinas

C. difficile y 100 µL de B-Tcd a una concentración de 1 µg/mL en 12 diluciones seriadas (factor de dilución 1:3) en PBS suplementado con BSA 2% y PBS-T para hacer la recta patrón. Tras incubar una hora a 37° C, los pocillos se lavaron tres veces y se añadieron 100 µL de AcP de conejo anti B-Tcd purificado por afinidad al antígeno a una concentración de 1 µg/mL diluido en PBS y se incubaron 1 hora a 37° C. Después, se realizaron tres lavados con PBS-T y se añadieron 100 µL de anticuerpo de cabra frente a IgG de conejo marcado con HRP diluida a 1:8.000 en PBS y se incubó durante media hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T. Para finalizar, la reacción colorimétrica se produjo agregando 100 µL de TMB. Tras 5 minutos de incubación se paró la reacción añadiendo 100 µL H₂SO₄ 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Varioskan Lux.

b. ELISA Sándwich- AcP/AcP

Anticuerpo de captura: AcP N°2

Anticuerpo de revelado: AcP N°2- HRP

Marcaje de anticuerpo de revelado

Para poder emplear como anticuerpo de captura y de revelado el AcP N°2 anti B-Tcd fue necesario realizar el marcaje de este con HRP. Para ello se empleó Kit LYNX Rapid HRP Antibody Conjugation. Para 250 µg de anticuerpo (1 mg/mL) se añadieron 25 µl del reactivo modificador y se homogeneizó suavemente. A continuación, se pipeteó la mezcla de anticuerpo-modificador directamente sobre el liofilizado de HRP de LYNX y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 3 horas. Después de la incubación, se añadió 25 µl del reactivo neutralizador para finalizar la reacción.

La reactividad del AcP marcado se evaluó mediante un ELISAi. Para ello se emplearon placas de 96 pocillos tapizadas con 50 µL de B-Tcd de *C. difficile*, a una concentración de 5 µg/mL y se incubaron toda la noche a 4°C tras lo cual se bloquearon con 75 µL de BSA al 2% en PBS durante media hora a 37°C y, a continuación, se lavaron tres veces con PBS-T. Posteriormente, se añadieron 50 µL de AcP N°2 marcado con HRP a una dilución inicial 1:500 y se realizaron 12 diluciones seriadas de ½ y, se incubaron durante media hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se revelaron utilizando 100 µL de TMB. Tras 15 minutos de incubación la reacción se paró añadiendo 100 µL H₂SO₄ 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm en un

espectrofotómetro Varioskan Lux. Como control negativo de ensayo se empleó un anticuerpo policlonal de conejo marcado con HRP obtenido frente a otro antígeno de la Unidad.

El protocolo del ELISA sándwich empleando como anticuerpo de captura y de revelado el AcP N° 2 anti TcdB se estableció tapizando las placas de 96 pocillos con el AcP a una concentración de 10 µg/mL durante toda la noche a 4°C. A continuación, los pocillos se bloquearon con 100 µL de BSA al 2% durante media hora a 37° C y tras tres lavados con PBS-T se añadieron 100 µL de las toxinas *C. difficile* y 100 µL de B-Tcd a una concentración de 1 µg/mL en 7 diluciones seriadas (factor de dilución 1:3) en PBS suplementado con BSA 2% y PBS-T para hacer la recta patrón. Tras incubar una hora a 37° C, los pocillos se lavaron tres veces y se añadieron 100 µL de AcP de conejo anti TcdB N° 2 marcado con HRP a una concentración de 1:500 diluido en PBS y se incubaron 30 minutos a 37° C. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T. Para finalizar, la reacción colorimétrica se produjo agregando 100 µL de TMB. Tras 5 minutos de incubación se paró la reacción añadiendo 100 µL H₂SO₄ 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Varioskan Lux.

3.5. Puesta a punto de un ensayo de neutralización de citotoxicidad celular

3.5.1. Toxinas y antitoxinas empleadas

Tabla 4. Descripción de toxinas y antitoxinas

Toxinas	Observaciones
Toxina de <i>C. difficile</i>	Kit de toxina/antitoxina TechLab
Muestras de <i>C. difficile</i>	Toxina nativa de <i>C. difficile</i>
Antitoxinas	Observaciones
Antitoxina de <i>C. difficile</i> obtenida en cabra	Kit de toxina/antitoxina TechLab
AcP N°2 obtenido en conejo	Producido para el desarrollo de la tesis.

3.5.2. Células Vero

Las células Vero se cultivaron en Medio completo (MC): RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal, penicilina-estreptomicina (100U/mL -100 µg/mL) y glutamina 2mM a 37°C, atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad. Estas células son adherentes, crecen en monocapa hasta alcanzar la confluencia, tras ello y después de 24-48 horas las células son utilizadas para los estudios de toxicidad o como inóculo para el mantenimiento de la línea celular. Los cultivos se subcultivaron una o dos veces por semana en frascos de 75cm³ obteniendo un rendimiento entre 3-5 x 10⁷ células por frasco.

Para el desarrollo del ensayo, se retiró el medio de cultivo del frasco con células confluentes mediante aspiración. A continuación, las células se lavaron con 20 mL de RPMI, con el objeto de eliminar el SBF. Inmediatamente después del último lavado se añadieron 5 mL de Tripsina-EDTA en un frasco de 75cm³ con células confluentes y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Trascorrido el tiempo de incubación, las células se despegaron con ligeros golpecillos y se añadieron 15 mL de MC. Se recogieron 10 mL y se contaron, ajustándolas a una concentración de 0,2 x 10⁶ células/mL con MC. De esta suspensión añadimos 50 µL por pocillo o lo que es lo mismo 10.000 células por pocillo.

3.5.3. Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la toxicidad de una muestra, sobre la suspensión de células se añadió la toxina en diluciones siguiendo el esquema de la Figura 22 y se incubaron a 37°C 48 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control blanco											
B	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	C-	C-
C	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	C-	C-
D	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	C-	C-
E	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	C-	C-
F	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	C-	C-
G	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	C-	C-
H	C+											

Figura 22. Diseño de placa de 96 pocillos para calcular la toxicidad de toxinas de *C. difficile* en células Vero. El control blanco corresponde a 100 μ L de MC, el control negativo (C-) se refiere al control de viabilidad: 50 μ L de suspensión celular en 50 μ L de MC y el control positivo (C+) corresponde a 50 μ L de suspensión celular y 50 μ L de la toxina de TechLab a diluciones 10^{-1} - 10^{-10} . En verde claro aparecen los pocillos de la prueba de citotoxicidad, donde se añaden 50 μ L de toxina y después se realizan diluciones 1:2 en MC y 50 μ L de suspensión celular.

Transcurrido el tiempo de incubación se observó en el microscopio el redondeo de las células que se habían incubado en presencia de la toxina de *C. difficile* y la monocapa en el control negativo (C-).

Para poder cuantificar la potencia de las toxinas de *C. difficile* se empleó un ensayo colorimétrico de viabilidad celular basado en la determinación de la actividad metabólica de las células Vero expuestas a distintas concentraciones de toxina. Para ello se añadieron 100 μ L/pocillo de solución MTT a una concentración de 1 mg/mL en MC. Las placas se incubaron 4 horas a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se retiró todo el contenido de la placa por decantación y se disolvieron los cristales de formazán generados a partir de la oxidación del MTT añadiendo 100 μ L/pocillo de DMSO y colocándola en agitación de la placa durante 1-2 minutos (Figura 23 A).

Para finalizar, se midió la D.O. en el espectrofotómetro Varioskan Lux a una longitud de onda 595 nm (pico de absorbancia a 570 nm). Los criterios de validación del ensayo se establecieron bajo lo descrito en el proyecto BSP130 “Estudio colaborativo para evaluar métodos alternativos basados en células Vero a las pruebas actuales en ratones utilizadas durante la producción de vacunas de clostridios”, dentro del Programa de Estandarización Biológica (BSP), coordinado por la Asociación Europea para Enfoques Alternativos a la Experimentación con Animales (EPAA). Este proyecto fue auspiciado por el Directorio Europeo para la Calidad de los Medicamentos y la Atención Sanitaria (EDQM), contando con el apoyo de la Asociación Europea para Enfoques Alternativos a la Experimentación en Animales (EPAA) y el Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación Animal (EURL-ECVAM) (Daas et al., 2020).

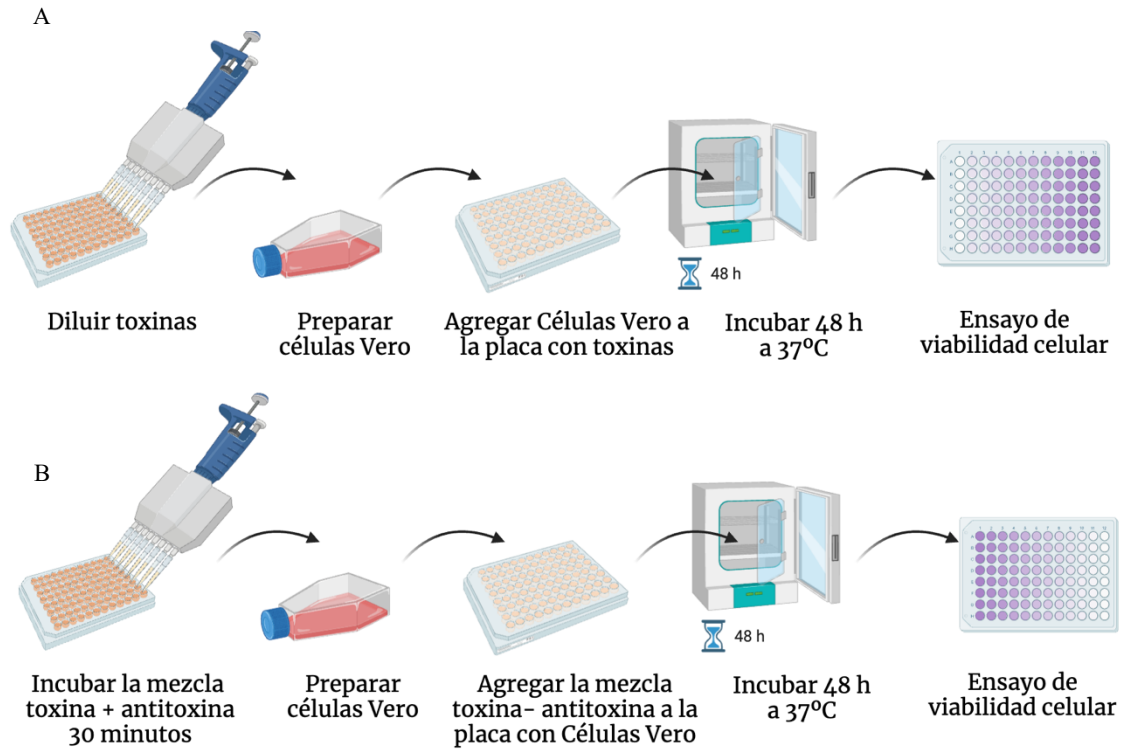
En caso de no cumplirse uno de los criterios de validación para cada placa debe repetirse el ensayo:

- Coeficiente de variación del control negativo < 20%
- Réplicas en la misma placa no deben diferir más de un título de dilución
- Réplicas en distinta placa: entre las últimas diluciones que mantienen toxicidad o *end-point* no deben diferir más de dos títulos de dilución.
- Punto de corte: 50% de la mediana de los controles negativos. Por ejemplo:
Mediana C- = 0,804 O.D.
Punto de corte = 0,402 O.D.
- Último punto con toxicidad, punto final o *end-point*: la máxima dilución de la toxina que tiene una O.D. por debajo del punto de corte.

3.5.4. Ensayo de neutralización de citotoxicidad celular

Después de verificar la citotoxicidad de las cepas de *C. difficile* se realizaron las pruebas de neutralización de citotoxicidad celular (Figura 23 B) empleando la antitoxina de TechLab y el AcP N°2 obtenido frente a B-Tcd. Para poner a punto el ensayo se utilizó la toxina de TechLab y la cepa CD21. Esta cepa pertenece al RT078 de *C. difficile*, fue aislada en un muestreo ambiental a partir de esponjas de superficies de matadero y planta procesadora en el año 2016. Mediante WGS se identificó que esta cepa presentaba los genes de las toxinas *tcdA* y *tcdB* y se comprobó mediante citotoxicidad celular en células Vero la acción de sus toxinas. Fue seleccionada porque presentaba un título de citotoxicidad en células Vero de 1:800, un valor intermedio dentro del rango de diluciones

evaluadas. Esta concentración permite obtener una curva de respuesta bien definida, facilitando la interpretación de los resultados y la validación del ensayo de neutralización celular.



Created in **BioRender.com** **bio**

Figura 23. Optimización del ensayo de neutralización de citotoxicidad celular. A: Ensayo de citotoxicidad. B: Ensayo de de neutralización de citotoxicidad celular. Creado en BioRender.com

Para determinar la concentración de antitoxina que neutraliza el 50% de la acción citotóxica de la toxina TcdB primero se prepararon una serie de diluciones de la antitoxina de TechLab: iniciando en 1:200 y realizando 12 diluciones seriadas de factor 2 y se incubaron durante 30 minutos con las toxinas a su dilución *end-point*. Para la toxina de TechLab se empleó una dilución 10^{-6} y con la cepa CD21 una dilución 1:800. Con el AcP N°2 se realizó el mismo experimento partiendo de la dilución 1:2 y realizando 12 diluciones seriadas de factor 2. Tras añadir las células Vero, la mezcla de reacción se incubó durante 48 horas y se evaluó la viabilidad utilizando MTT.

Una vez que se había establecido la concentración de la antitoxina TechLab y AcP N°2 a emplear, se procedió a validar las condiciones finales del ensayo de CCNA. Para neutralizar la actividad de TcdB se depositaron 25 µL del sobrenadante de la cepa CD21 o de la toxina de TechLab en placas de cultivo de 96 pocillos en diluciones seriadas de factor 2 a partir de 1:50 y en diluciones decimales desde 1:10, respectivamente, siguiendo el esquema de la Figura 24. Las toxinas se depositaron por duplicado y en el mismo ensayo se midió la capacidad neutralizante de la antitoxina TechLab y del AcP N°2. Dos filas se destinaron al control de potencia de la toxinas. A las dos filas siguientes que contenían toxina, se les agregó 25 µL de la antitoxina de TechLab a una dilución 1:20.000 para la toxina TechLab y 1:100.000 para la cepa CD21. A las últimas dos filas, se les agregó 25 µL de AcP N° 2 a una dilución 1:4 en MC para la toxina TechLab y 1:10 para la cepa CD21, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control blanco											
B	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
D	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A
E	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A	T+A
F	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2
G	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2	T+A2
H	C-											

Figura 24. Diseño de placa de 96 pocillos para calcular la neutralización de citotoxicidad de toxinas de *C. difficile* en células Vero. Control blanco: 100 µL de MC. **C-:** control de viabilidad 50 µL de suspensión celular en 50 µL de medio. **T:** 50µL de suspensión celular y 50µL de la toxina TechLab desde 1:10 diluciones decimales o sobrenadante de cultivo de CD21 desde 1:50 en diluciones de factor 2. **T+A:** Mezcla de 25 µL toxina a las concentraciones descritas anteriormente más 25 µL antitoxina TechLab a una concentración de 1:20.000 para la toxina TechLab y 1:100.000 para la cepa CD21, dispensados sobre 50µL de suspensión celular. **T+A2:** Mezcla de 25 µL toxina a las concentraciones descritas anteriormente más 25 µL AcP N° 2 a una concentración de 1:4 para la toxina TechLab y 1:10 para la cepa CD21, dispensados sobre 50µL de suspensión celular.

Transcurrido los 30 minutos de incubación, a la mezcla de reacción toxina-antitoxina se les agregaron 10.000 células Vero por pocillo. Las placas de cultivo se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se realizó el ensayo de viabilidad descrito en el apartado 3.5.3 y se siguieron los mismos criterios de validación del ensayo mencionados en el ensayo de citotoxicidad.

Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión

4.1. Secuenciación del genoma de aislados de *C. difficile*

Parte de los resultados presentados en este apartado han sido publicados en Tercero-Guerrero et al. (2024).

4.1.1. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica confirmó que todas las cepas pertenecían a la familia Peptostreptococcaceae, género *Clostridioides* y especie *C. difficile* (especie TAXID: 1496), con valores porcentuales de similitud de lecturas del 90,98-97,07% de cada muestra cubierta por el clado arraigado en este taxón. Los aislados se clasificaron en tres ST, según sus secuencias multilocus (MLST): 20 (87%) cepas pertenecen al ST11, 2 (9%) cepas al ST2 y 1 (4%) al ST19 (Figura 25).

El análisis del pangenoma reveló un total de 10.599 genes, de los cuales 1.841 (17,4%) eran core genes, comunes a todas las muestras, estos genes son esenciales y conservados en todos los genomas; y entre los genes accesorios: 144 (1,4%) eran soft core genes, estos genes se encontraron en el 95% de los genomas; 2.804 (26,5%) eran shell genes, presentes en el 15% al 95% de los genomas, representando funciones que no son necesarias para todas las cepas; y 5.810 (54,8%) eran cloud genes, encontrados en menos del 15% de los genomas; a menudo indicativos de adaptaciones al nicho o rasgos adquiridos como resistencia a antibióticos o involucrados en respuestas ambientales específicas.

El enfoque basado en SNPs utilizado para establecer la relación genética entre los aislados, incluidos los aislados externos (total n=61), identificó dos clados principales (A y B) separados por 65.707-91.175 SNPs (Figura 25). El clado A incluía los tres aislados de este estudio pertenecientes a ST2 (CD15 y CD16) y ST19 (CD19), así como aislados externos de diferentes países y fuentes y estaban separados por <9.841 SNPs.

El clado B se dividió en dos subclados diferentes (B1 y B2) separados por <1.013 SNPs. El subclado B1 incluía mayormente aislados de CDI humana y del medio ambiente de estudios externos y dos aislados de este estudio (CD23 y CD13), separados por 9-1.149 SNPs (9-1.014 SNPs si solo se consideran cepas de España). Todos los aislados de este subclado para los cuales se disponía del ST (7/19) eran ST11. El subclado B2 (<29 SNPs) estaba formado principalmente por aislados de este estudio (n=18) y aislados externos de España (n=4) e Irlanda (n=1), principalmente de animales y del medio ambiente. Las

cepas de este subclado estaban separadas por <29 SNPs (<25 SNPs considerando solo cepas de España). Todos los aislados en el subclado B2 para los cuales se disponía del ST (18/23) también eran ST11.

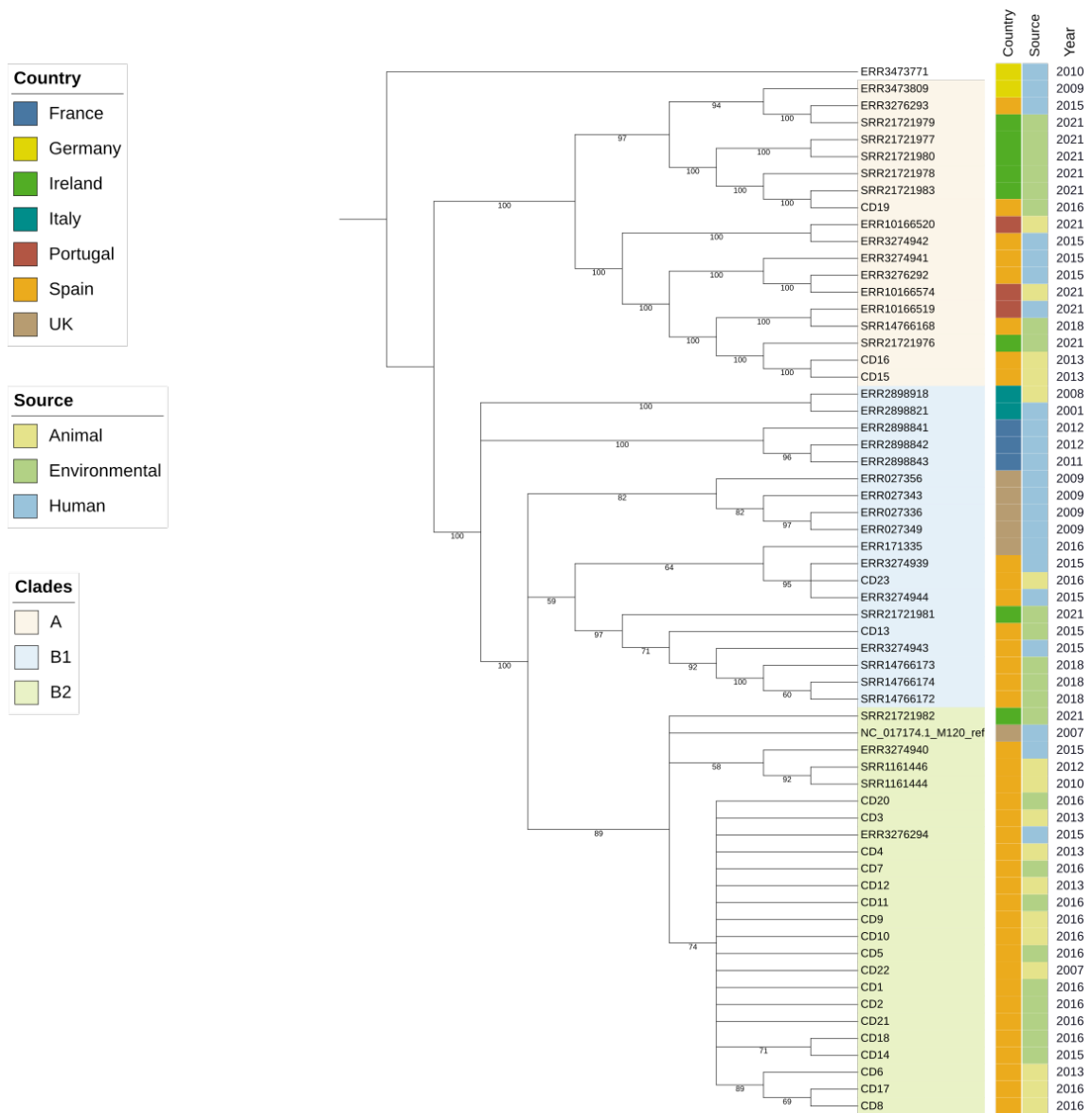


Figura 25. Relación filogenética de 61 aislamientos de *C. difficile*. El árbol filogenético de máxima verosimilitud (ramas con valores de *bootstrap* > 50), basado en el análisis de SNPs del genoma completo, muestra la siguiente información a la izquierda de los aislamientos: país, fuente y año de aislamiento. Las etiquetas de colores indican los tres subclados (A, B1, B2).

A pesar de que las muestras habían sido recolectadas en diferentes años y localizaciones de España, las cepas de *C. difficile* analizadas pertenecientes a ST11 están estrechamente relacionadas. Se ha sugerido una vía de transmisión interconectada en el medio ambiente a través de la cual se propaga *C. difficile* (Lim et al., 2020), lo que subraya la importancia del Enfoque Una Salud (One Health) en el manejo y control de esta bacteria (Knetsch

et al., 2018). Varios estudios han demostrado una transmisión zoonótica frecuente de cepas RT078 a través de fronteras geográficas en numerosos países (Knetsch et al., 2018; O'Grady et al., 2021), revelando una alta similitud genética entre aislados humanos y animales (Dingle et al., 2019).

4.1.2. Genes de resistencia antimicrobiana

Un total de 23 (100%) cepas portaban genes que confieren resistencia contra carbapenémicos (*CDD-1* y *CDD-2*) y fluoroquinolonas (*cdeA*); 21 (91,3%) tenían resistencia a los aminoglucósidos (*ant(6)-Ia_1*, *ant(6)-Ia_2*, *ant(6)-Ia_3*, *ant(6)-Ib_1*, *aac(6)-aph(2'')_1*, (*AGly)aadC* y *aph(3')-III_1*), de los cuales el 34,78% tenía dos tipos de genes de resistencia a aminoglucósidos; 20 (86,95%) tuvieron resistencia a la tetraciclina (*tet(M)_1*, *tet(M)_4*, *tet(M)_8*, *tet(M)_10*, *tet(44)_1* y *tet(40)_1*), el 39,13% de los que tenía dos tipos de genes de resistencia a la tetraciclina; y 1 (4,34%) presentó resistencia al antibiótico nucleósido (*Sat-4*). En una cepa (4,34%) se detectaron dos genes de resistencia: el gen *erm(B)*, que codifica la resistencia a la lincosamida, macrólidos y estreptogramina b; y el gen *cfr(B)*, que codifica la resistencia a lincosamida, estreptogramina a, pleuromutilina, oxazolidinona y anfenicol (Tabla 5).

Se detectó un alto porcentaje de cepas multirresistentes: 21 (86,95%) cepas portaban más de tres genes de resistencia a los antibióticos (Figura 26). Los patrones predominantes de multirresistencia identificados en este estudio incluyeron resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y β -lactámicos, pero una cepa también tenía otros genes de resistencia a los antibióticos que conferían resistencia a lincosamida, macrólidos, estreptogramina a, estreptogramina b, pleuromutilina, oxazolidinona y anfenicol.

El linaje ST11 se ha caracterizado por resistencia fenotípica a tetraciclina, moxifloxacina, clindamicina y eritromicina (Knight et al., 2019). En el RT078, los genes que confieren resistencia contra la tetraciclina y la estreptomina se comparten entre cepas humanas y animales (Knetsch et al., 2014), pero se sugiere que el gen *ermB* está involucrado en un tipo desconocido de presión selectiva en aislados humanos (Knetsch et al., 2018). Varios estudios han detectado el gen *cdeA* en todas las cepas, independientemente de la RT (Knetsch et al., 2018, 2018; Redding et al., 2022; Xu et al., 2021). Por otro lado, los informes sobre la resistencia a los carbapenémicos en cepas de *C. difficile* son discrepantes, con estudios que reportan una resistencia alta (Orden et al., 2018) y otros que indican niveles bajos (Marcos et al., 2022; Putsathit et al., 2021; Tickler et al., 2020).

Tabla 5. Genes de resistencia a los antibióticos detectados en aislados de *C. difficile*

Producto	Gen de resistencia	Numero de acceso	Resistencia
<i>ant(6)-Ia</i>	<i>ant(6)-Ia_1</i>	AF330699	Estreptomicina
	<i>ant(6)-Ia_2</i>	KF421157	Estreptomicina
	<i>ant(6)-Ia_3</i>	KF864551	Estreptomicina
<i>ant(6)-Ib</i>	<i>ant(6)-Ib_1</i>	FN594949	Estreptomicina
<i>aac(6')-aph(2')'</i>	<i>aac(6')-aph(2'')_1</i>	M13771	Estreptomicina, isepamicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, fortimicina, dibekacina, netilmicina, amikacina
<i>aph(3')-III</i>	<i>aph(3')-III_1</i>	M26832	Amikacina, ribostamicina, paromomicina, isepamicina, kanamicina, neomicina, lividomicina, butirosina
<i>(AGly)aadC</i>	<i>(AGly)aadC</i>	V01282	Aminoglucósidos
<i>CDD beta-lactamase</i>	<i>CDD-1</i>	NG_065860.1	Carbapenem
	<i>CDD-2</i>	NG_065861.1	Carbapenem
<i>cdeA</i>	<i>cdeA</i>	AJ574887.1	Fluoroquinolonas y agentes desinfectantes y antisépticos
<i>tet(M)</i>	<i>tet(M)_1</i>	X92947	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina.
	<i>tet(M)_4</i>	X75073	
	<i>tet(M)_8</i>	X04388	
	<i>tet(M)_10</i>	EU182585	
<i>tet(44)</i>	<i>tet(44)_1</i>	NZ_ABDU01000081	
<i>tet(40)</i>	<i>tet(40)_1</i>	FJ158002	Tetraciclina, doxiciclina
<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)_18</i>	X66468	Eritromicina, quinupristina, pristinamicina IA, lincomicina, clindamicina, virginiamicina S
<i>cfr(B)</i>	<i>cfr(B)_1</i>	KM359439	Lincomicina, clindamicina dalfopristina, pristinamicina IIA, virginiamicina M, florfenicol, cloranfenicol, linezolid, tiamulina
<i>sat-4</i>	<i>sat-4</i>	U01945.1	Estreptotricina

Otros estudios han informado diferentes tasas de MDR para *C. difficile*, que van desde el 77,55% (n=49) al 50,4% (n= 268) en China (Gu et al., 2022; Wen et al., 2022); 60% en un metaanálisis sobre Europa (Spigaglia et al., 2018); y 25,4% (n=207) en aislamientos de Australia, Asia, Europa y América del Norte (Knight et al., 2019) y 1,7% (n=1091) en Australia (Putsathit et al., 2021). Los patrones MDR incluyen resistencia a al menos tres de los siguientes antibióticos: clindamicina, eritromicina, moxifloxacina, cefalosporinas, tetraciclina, gentamicina y tedizolid.

Además, comparamos los datos de WGS con los resultados de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* previamente obtenidos (Álvarez-Pérez et al., 2017; Orden et al., 2017, 2018) para el 40% (n=9) de los aislados analizados en este estudio. Se observó la expresión de los genes de resistencia *in vitro*, excepto para una cepa que era resistente a la tetraciclina *in vitro*, pero no albergaba el gen de resistencia a la tetraciclina. Sin embargo, una comparación exhaustiva no es factible porque detectamos más genes de resistencia que el número antibióticos evaluados *in vitro*.

4.1.3. Genes de factores de patogenicidad

Se encontraron una amplia gama de genes de factores de virulencia, como los que codifican factores de adherencia, exoenzimas y toxinas. En la Figura 26 se puede observar un resumen de los datos obtenidos mediante WGS. Entre las exoenzimas, 23 (100%) cepas expresaron el gen *zmp1* y 22 (95,65%) expresaron el gen *cwp84*; en cuanto a los factores de adherencia, 23 (100%) cepas expresaron los genes *CD0873*, *CD2831*, *fbpA/fbp68* y *groEL*; 2 (8,69%) cepas tenían el gen *cbpA*; y 3 (13,04%) cepas tenían el gen *CD3246*. Asimismo, entre las toxinas, respecto al grupo más importante, 23 (100%) cepas tenían el gen *tcdB*, 3 (13,04%) cepas tenían los genes *cdtA* y *cdtB* y 10 (43,47%) cepas tenía el gen *tcdA* (Tabla 6).

Se detectó el gen *tcdB* en todos los aislados de *C. difficile* analizados en este estudio y, aunque las cepas pertenecen a ST y RT diferentes, todas poseían el mismo gen con una identidad del 97-100%. El gen *tcdA* no se encontró en todos los aislados, a pesar de que había sido detectado por PCR- Ribotipado en análisis previos (Álvarez-Pérez et al., 2017, 2018; Orden et al., 2017, 2018). Los genes *cdtA* y *cdtB* se detectaron en 2 cepas que pertenecen a ST2 y 1 cepa del ST19; sin embargo, no fueron identificados en los aislados caracterizados como RT078 y RT126, pertenecientes al linaje ST11, lo que sugiere que la toxina binaria del ST11 está codificada por una variante distinta a la de ST19 y ST2.

Tabla 6. Detección de genes de factores de virulencia en aislados de *C. difficile*

Clasificación	Producto	Genes de virulencia	Numero de acceso
Toxina	Toxina A	<i>tcdA</i>	WP_011860904
	Toxina B	<i>tcdB</i>	WP_009902069
	Toxina binaria	<i>cdtA</i>	WP_004454925
	Toxina binaria	<i>cdtB</i>	WP_021426623
Exoenzima	Metaloproteasa de zinc	<i>zmp1</i>	WP_011861706
	Cisteína proteasa de unión a la pared celular	<i>cwp84</i>	WP_011861680
Adherencia	Adhesina de unión a colágeno	<i>cbpA</i>	WP_011861847
	Proteína de unión a sustrato del transportador ABC	<i>CD0873</i>	WP_011860976
	Adhesina de unión a colágeno anclada a SrtB	<i>CD2831</i>	WP_011861707
	Proteína de superficie formadora de enlaces de tioéster Cys-Gln	<i>CD3246</i>	WP_011861889
	Proteína fijadora de fibronectina	<i>fbpA/fbp68</i>	WP_011861612
	Chaperonina	<i>groEL</i>	WP_003435012

Además, observamos otras variaciones entre toxinotipos y ribotipos detectados en análisis previos (Álvarez-Pérez et al., 2017, 2018; Orden et al., 2017, 2018) y las ST que se determinaron mediante WGS en este estudio. Por ejemplo, el análisis por WGS reveló que la cepa CD18, previamente descrita como RT010 (un ribotipo no toxigénico), contiene los genes *tcdB* y *tcdA*. Asimismo, la tipificación por MLST permitió reclasificar dos cepas identificadas como RT078 (CD15 y CD16) dentro del ST2, mientras que a otra cepa con el mismo ribotipo (CD19) se clasificó como ST19. Del mismo modo, MLST clasificó las cepas CD13 y CD14, previamente identificadas como RT014, dentro del ST11.

Históricamente, el genotipado de *C. difficile* se ha centrado en el ribotipado (Bidet et al., 1999) para investigar la transmisión en brotes sospechosos durante décadas, sin embargo, se ha encontrado que los resultados de este método no coinciden con los datos de WGS (Seth-Smith et al., 2021; Williamson et al., 2019, 2023). Variantes de MLST, ribotipo y

toxintipo no siempre son consistentes entre sí (Blau et al., 2023; Z. Li et al., 2020). Y, los ribotipos no se pueden determinar directamente a partir de datos de secuencias cortas de Illumina, ya que los operones de rRNA que incluyen los fragmentos definitorios de ribotipos colapsan en ensamblajes del genoma (Seth-Smith et al., 2021). No obstante, otros autores han demostrado una fuerte coherencia entre los resultados de la identificación de variantes de toxinas y la MLST (Wen et al., 2022). Estas disparidades entre los resultados de ribotipado y WGS indican problemas con el sistema de ribotipado.

En conclusión, mediante WGS y el estudio filogenético de las muestras se identificó una alta relación genética entre las cepas ST11 aisladas de muestras ambientales y de origen animal, provenientes de diferentes sitios de España. Las cepas de origen humano, obtenidas de bases de datos públicas, mostraron un grado de relación genómica similar. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis del ambiente y los animales como reservorio de CA-CDI, lo que representa una creciente amenaza para la salud pública debido a la presencia de bacterias multirresistentes en cepas toxigénicas de *C. difficile*.

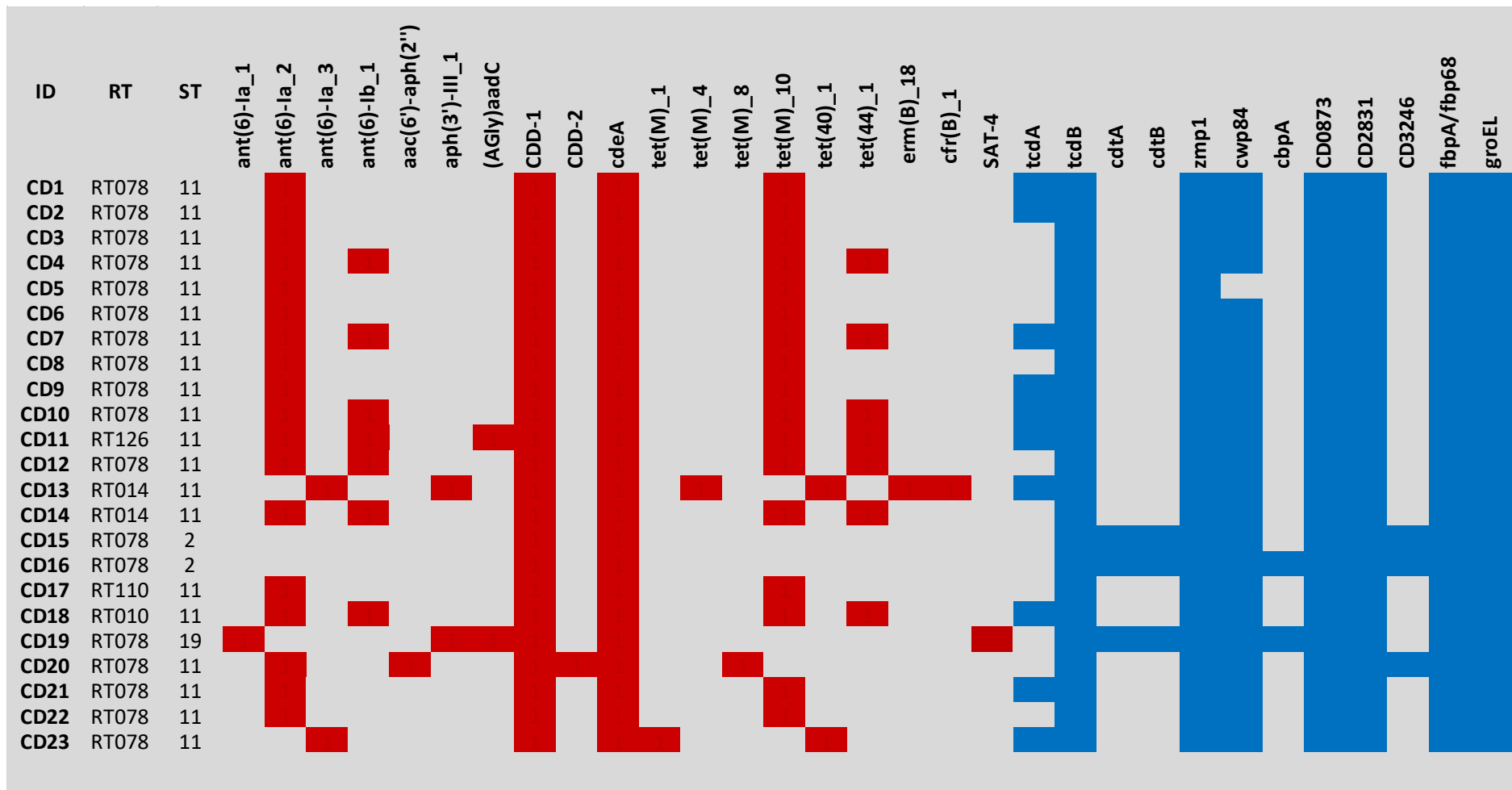


Figura 26. Resultados de WGS de las cepas de *C. difficile*. En color rojo se observa la presencia de genes de resistencia a los antibióticos y en azul los genes de factores de patogenicidad.

4.2. Desarrollo de inmunoensayos que permitan la cuantificación de TcdB en cepas de *C. difficile*.

4.2.1. Producción del toxoide y AcP N° 1

Cuando nos planteamos la producción del inmunoensayo para detección de TcdB la primera aproximación fue obtener anticuerpos para el desarrollo de este empleando como inmunógeno un toxoide obtenido a partir de un cultivo de *C. difficile* (Donald et al., 2013; Elfassy et al., 2021; Karczewski et al., 2014; Kotloff et al., 2001). Para la preparación del toxoide lo primero que realizamos fue, a partir del sobrenadante de cultivo de la cepa CD16, una concentración de las toxinas empleando el método de la precipitación de proteínas con sulfato de amonio y posterior inactivación térmica. Esta técnica ya estaba descrita para caracterizar las estructuras TcdA y TcdB de *C. difficile* (Lyerly et al., 1986; Rolfe & Finegold, 1979) y para el desarrollo de vacunas para la CDI (Karczewski et al., 2014). También, se ha utilizado para la purificación y producción de toxoides en otros clostridios, como *Clostridium botulinum* tipo E (Hatheway, 1976), *Clostridium perfringens* (Sugimoto et al., 1985) y *Clostridium tetani* (Brgles et al., 2016). El producto resultante es un toxoide *C. difficile* con una concentración de proteínas de 0,4 mg/mL en el cual comprobamos su inocuidad mediante ensayo de citotoxicidad (Figura 27).

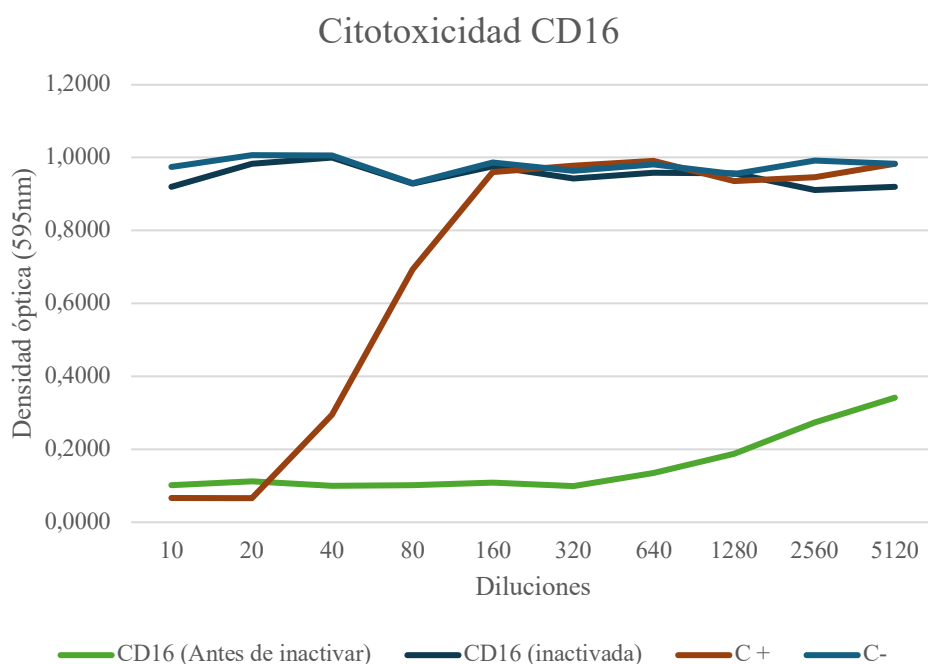


Figura 27. Citotoxicidad del toxoide de *C. difficile*. Se observa que el toxoide ha perdido su acción citolítica. C+: Toxoide de *C. septicum*. C-: Control de viabilidad de células Vero.

La administración de este toxoide en conejos es una estrategia segura para la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra las toxinas de *C. difficile*, debido a que los toxoides son formas inactivadas de toxinas que mantienen su capacidad antigénica, pero carecen de toxicidad. No obstante, en nuestro caso, la respuesta inmunológica del conejo no fue la esperada (Figura 28).

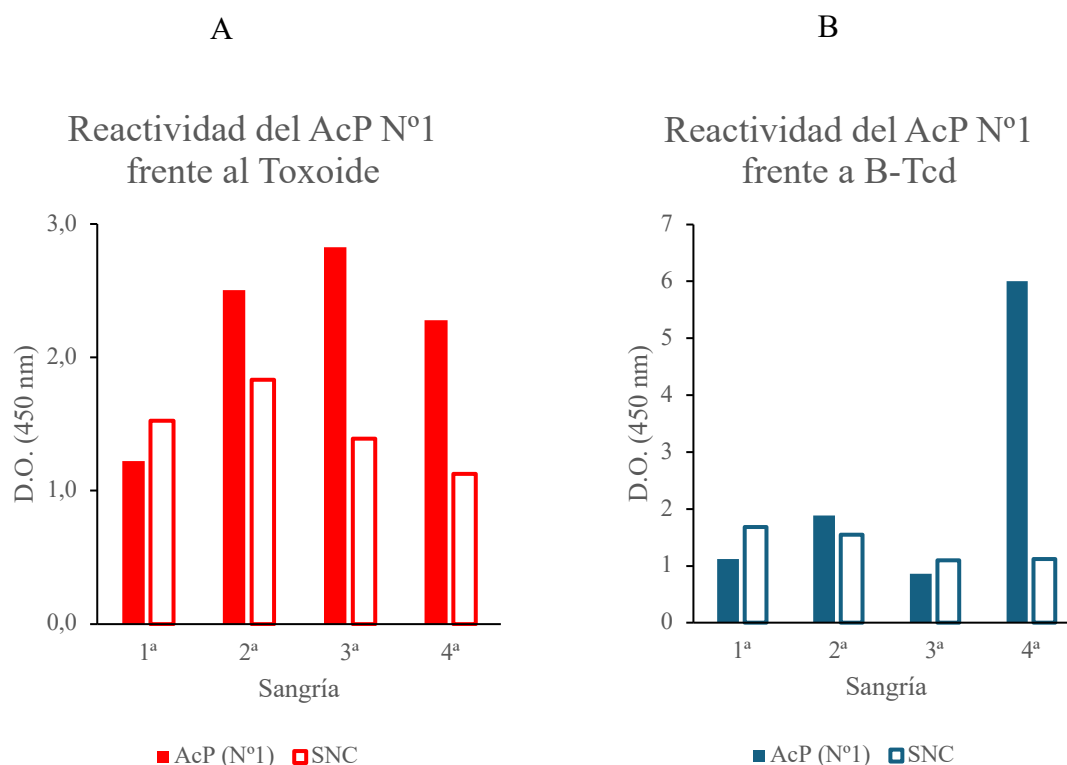


Figura 28. Reactividad del AcP N° 1 ante la toxina B de *C. difficile*. A: Reactividad frente a toxoide de *C. difficile*. B: Reactividad frente a B-Tcd de *C. difficile*

Como se muestra en la Figura 28A, a una dilución de suero 1:100, empezamos a observar cierta reactividad frente al antígeno de inmunización tras recibir 4 inoculaciones (2ª sangría), la cual mejoró, pero ligeramente al aumentar el número de dosis. Cuando mediamos los anticuerpos específicos frente a B-Tcd observamos el mismo patrón y únicamente tras emplear proteína recombinante como inmunógeno (4ª y 5ª dosis) fuimos capaces de observar una respuesta inmune frente a ella (4ª sangría).

Esta baja respuesta inmunológica sugiere que la inmunogenicidad de antígeno seleccionado es muy baja y además que la cantidad de TcdB que hay en el toxoide es insuficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria robusta. Esto podría deberse a la presencia de péptidos y proteínas bacterianas en la preparación, las cuales fueron

cuantificadas junto con el toxoide, subestimando así la concentración real TcdB en el antígeno administrado. La administración la B-Tcd permitió superar estas limitaciones.

4.2.2. Producción de la proteína recombinante B-Tcd y el AcP N° 2

Dado que al emplear el toxoide como inmunógeno no obtuvimos los resultados esperados, se decidió cambiar el planteamiento experimental y diseñar un nuevo antígeno para que pudiera ser empleado como inmunógeno y como patrón para la estandarización de los inmunoensayos. La TcdB de *C. difficile* es una proteína de 270kDa y, a pesar de que la producción de una recombinante con una cobertura del 100% de la toxina nativa proporciona una fuente relativamente pura de la proteína, las proteínas grandes como esta pueden ser difíciles de expresar en sistemas comunes (*E. coli*, etc.) debido a que puede haber problemas con el plegamiento adecuado, agregación en cuerpos de inclusión y menor rendimiento en la expresión.

Por este motivo, se decidió analizar la estructura y funciones de los dominios de la toxina, para seleccionar el fragmento que constituiría la proteína recombinante. Se encontró que varios estudios han demostrado la capacidad de alguno de los dominios de la toxina para inducir una inmunidad robusta contra el desafío letal con *C. difficile* (Romano et al., 2014).

En la revisión bibliográfica también encontramos que el dominio CROPs posee importancia diagnóstica y terapéutica para la CDI, debido a que media el primer contacto entre la toxina y la célula diana y esta región de la proteína se ha empleado en múltiples ensayos para la obtención de anticuerpos neutralizantes frente a la TcdB de *C. difficile* (Fühner et al., 2018; Orth et al., 2014). Además, se ha demostrado que el Bezlotoxumab, un anticuerpo aprobado por la FDA como terapia de la CDI, se une parcialmente dentro de las tres primeras repeticiones cortas de los CROPs (Hernández et al., 2015), evitando la unión de TcdB al receptor celular CSPG4 (P. Gupta et al., 2017). Asimismo, los CROPs se han empleado para la producción de una vacuna recombinante que generó altas respuestas de anticuerpos anti-TcdB y brindó a los ratones inmunizados protección total contra la dosis letal de exposición a esporos de *C. difficile* (Liu et al., 2017). Debido a la evidencia de la capacidad del dominio CROPs para generar anticuerpos neutralizantes frente a la TcdB de *C. difficile* seleccionamos este dominio para la producción de la proteína recombinante.

Se eligió la secuencia proteica P18177.3 registrada en la base de datos de UniProt, debido a que presenta una secuencia que ha sido revisada, posee una alta calidad de anotación, está respaldada por datos experimentales tanto a nivel de secuencia como de función y es una referencia para estudios relacionados con *C. difficile*. Los epítomos que se han descrito en la Base de datos IEDB en el Dominio CROPs de esta proteína se detallan la Tabla A1. Epítomos descritos en el Dominio CROPs de la TcdB de *C. difficile* (Anexos).

La producción de la B-Tcd fue encargada a la empresa PRO- ALT la cual nos suministró 4,44 mg de proteína recombinante a una concentración de 1,2 mg/mL. La B-Tcd tiene 540 aminoácidos, un peso molecular de 62.256 Da y un punto isoeléctrico de 4,14.

Esta proteína fue empleada como antígeno de inmunización para la producción del AcP N° 2 y de los anticuerpos monoclonales. En la Figura 29 mostramos la reactividad que presentaba el animal tras recibir tres dosis antigénicas. En este caso la respuesta inmune fue considerablemente mejor a la obtenida al utilizar como antígeno de inmunización el toxoide inactivado.

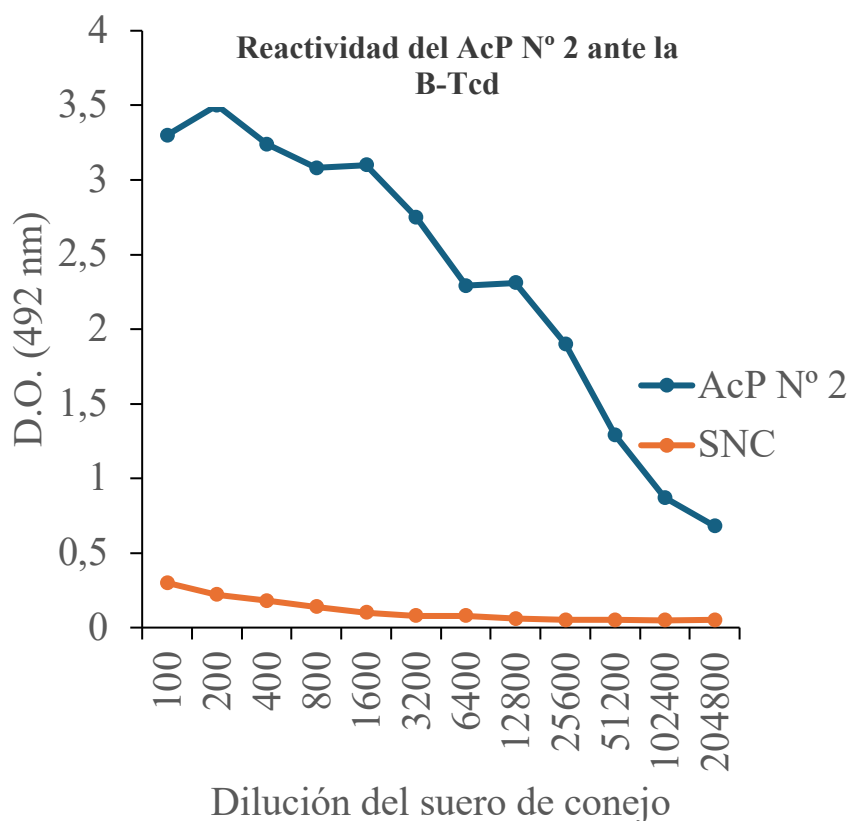


Figura 29. Reactividad del AcP N° 2 ante la B-Tcd de *C. difficile*. Se observa la alta reactividad del AcP N°2 ante el inmunógeno. SNC: Suero normal de conejo.

4.2.2.1. Purificación y marcaje de anticuerpos policlonales

Se obtuvieron dos AcP, uno a partir de la inoculación del toxoide de *C. difficile* y la recombinante (AcP N°1) y otro inmunizado solamente con la proteína recombinante (AcP N° 2). En la tabla 7 se puede observar la reactividad del suero policlonal frente a la B-Tcd y toxoide de *C. difficile*:

Tabla 7. Reactividad AcP frente a la B-Tcd y toxoide de *C. difficile*

Anticuerpos	DO ELISAI B-Tcd	DO ELISAI Toxoide
AcP N°1	2,1	0,8
AcP N°2	4	1,9
SNC	0,3	0,3

En esta tesis se decidió emplear el AcP N° 2 debido a que presentaba una mayor reactividad en todos los inmunoensayos analizados y fue producido por la inoculación de la B-Tcd de *C. difficile*, lo que confiere mayor especificidad y una amplia reactividad frente a diferentes regiones antigénicas de la toxina B de *C. difficile*. En la Figura 33 se puede observar la reactividad de este anticuerpo con la toxina nativa de *C. difficile*.

Con el propósito de optimizar su empleo, se llevó a cabo la purificación del anticuerpo en dos fases. En primer lugar, se procedió a la purificación de la fracción de inmunoglobulinas totales del suero de conejo mediante una columna HiTrap Protein A HP de 1 mL. En la figura 30 se presenta el perfil de elución de las proteínas retenidas, utilizando como agente eluyente Ácido cítrico pH 3,0. Las fracciones 2 y 3 fueron recolectadas y sometidas a un proceso de diálisis frente a PBS durante toda la noche. Se purificaron 20 mg de AcP a una concentración final de 2 mg/mL. Finalmente, se procedió a su alicuotado y almacenamiento a -20°C.

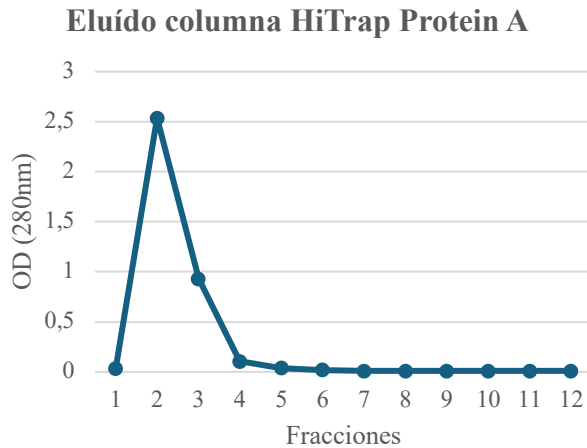


Figura 30. Elución de AcP purificado por columna HiTrap Protein A HP. La figura muestra el perfil de elución de las proteínas del AcP retenidas al pasar por la columna HiTrap Protein A HP 1mL.

En una segunda fase se realizó una purificación, esta vez por afinidad al antígeno (B-Tcd) mediante columna High density GLYOXAL 4 rapid run. Finalizado el proceso se obtuvieron 0,355 mg de AcP a una concentración final de 0,71 mg/mL.

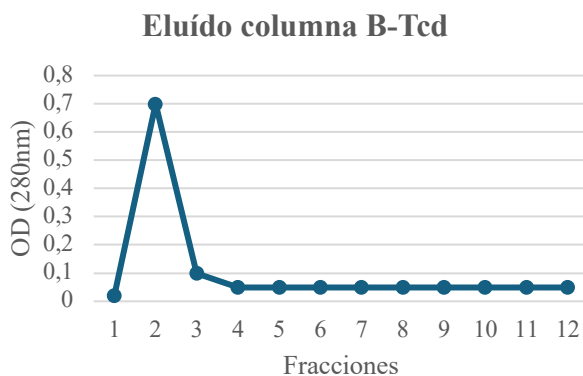


Figura 31. Elución del AcP N°2 purificado por afinidad al antígeno. La figura muestra el perfil de elución de las proteínas del AcP retenidas al pasar por la matriz de GLYOXAL- B-Tcd.

El AcP N° 2 purificado se marcó con peroxidasa de rábano con el kit LYNX Rapid HRP Antibody Conjugation para minimizar interferencias y acortar el tiempo del ensayo. Se evaluó el marcaje del anticuerpo mediante un ELISAi tapizando con toxina recombinante 5µg/mL. Como control negativo se empleó otro AcP marcado con HRP. La dilución de trabajo se estableció en 1:1.000.

4.2.3. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales

Para la obtención de los AcM los esplenocitos del ratón inmunizado y las células de mieloma se fusionaron en presencia del polietilenglicol (un agente de fusión). Esto permite que las membranas celulares se fusionen, formando híbridos denominados hibridomas. De los híbridos obtenidos, inicialmente se seleccionaron 24 hibridomas que

presentaban reactividad frente a B-Tcd por ELISAI. A partir de estos, se realiza el primer clonaje y se evalúa de nuevo la reactividad frente a la B-Tcd y al toxoide de *C. difficile*, seleccionándose 7 clones. Con el fin de finalizar la estabilización del hibridoma se realizó un segundo clonaje y finalmente se seleccionaron 3 clones cuyas reactividades se resumen en la Tabla 8. También se analizó la reactividad de estos AcM frente a la B-Tcd de *C. difficile* mediante Western blot (Figura 32). Cada clon se identificó con un código alfanumérico correspondiente a: SIM (Servicio de Inmunología Microbiana), 542 (número de la fusión), X (pocillo de selección de hibridoma), Y (pocillo de selección primer clonaje), Z (pocillo de selección segundo clonaje). Estos clones se cultivaron a gran escala de los para proceder a la purificación de los AcM.

Tabla 8. Reactividad de AcM frente a la B-Tcd de *C. difficile*

Anticuerpos	DO ELISAI B-Tcd	DO ELISAI Toxoide	Isotipo
SIM 542 18.1.2	1,3	1,0	Ig G1- κ
SIM 542 20.2.2	2,3	1,8	Ig G2b-λ
SIM 542 22.1.1	2,6	0,475	Ig G1-κ
C+ AcP	2,6	2,0	
C- SNR	0,1	0,7	

SNR: Suero normal de ratón

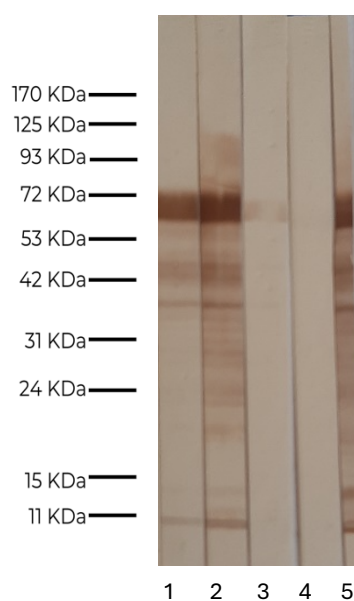


Figura 32. Reactividad por Western Blot de los AcM frente a B-Tcd de *C. difficile*. Tira 1: SIM 542 18.1.2, Tira 2: SIM 542 20.2.2, Tira 3: SIM 542 22.1.1, Tira 4: C- SNR Tira 5: C+ AcP de ratón.

Para finalizar la caracterización de los AcM, se confirmó la reactividad de estos frente a la TcdB nativa de *C. difficile* mediante Western blot, observando que solo el AcM SIM 542 20.2.2 es capaz de reconocer la toxina nativa de *C. difficile*.

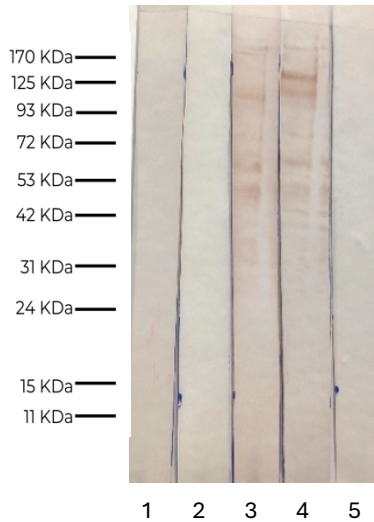


Figura 33. Reactividad por Western Blot de AcM y AcP N° 2 frente TcdB de *C. difficile*. Tira 1: SIM 542 18.1.2, Tira 2: SIM 542 22.1.1, Tira 3: SIM 542 20.2.2 Tira 4: AcP N° 2 (Conejo) Tira 5: C- SNC

Para desarrollar el ELISA sándwich se procedió a la purificación de 200 mL del sobrenadante del AcM por columna HiTrap Protein G HP 1mL. La figura 34 muestra el perfil de elución para el AcM SIM 542-20.2.2 empleando como eluyente NH_4OH 1N. Las fracciones 2, 3 y 4 se recogieron y se dializaron en PBS durante toda la noche a 4° C. Se obtuvieron 6 mg de AcM a una concentración final de 1,2 mg/mL. Posteriormente se alicuotaron y se almacenaron a -20°C.

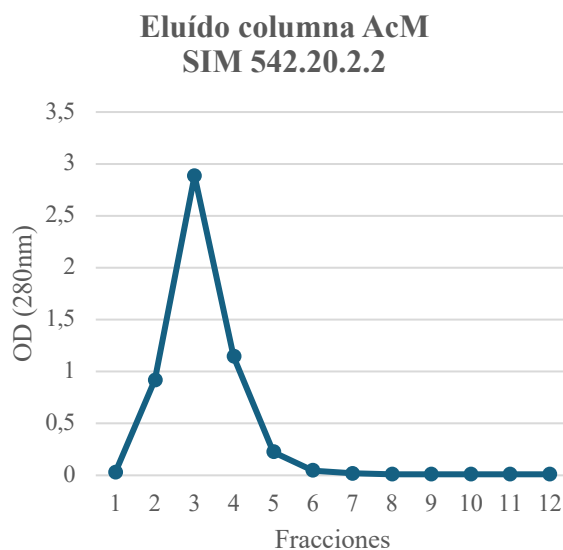


Figura 34. Elución del AcM SIM 542.20.2.2 purificado por columna HiTrap Protein G HP. La figura muestra el perfil de elución de los anticuerpos del SIM 542.20.2.2 retenidas al pasar por la columna HiTrap Protein G HP 1mL.

4.2.4. Desarrollo de ELISA tipo Sándwich

4.2.4.1. ELISA Sándwich- AcM/AcP

a. Selección del anticuerpo de captura

Para poder desarrollar el ELISA sándwich, lo primero que tuvimos que seleccionar fue el anticuerpo que íbamos a emplear como anticuerpo de captura. Cuando se obtienen AcM lo ideal es realizar una selección de los clones mediante ELISA de captura empleando el antígeno de selección marcado con biotina. En nuestro caso, no fue posible porque por la naturaleza de la proteína recombinante ésta estaba disuelta en un tampón 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.3 M imidazol y la presencia de TRIS le hace incompatible con marcajes de grupos amina como es el caso del marcaje con biotina. Por esta razón y dado que en ese momento contábamos únicamente con el AcP N°1, para la selección del anticuerpo de captura empleamos un ELISA tipo sándwich en el utilizábamos como anticuerpo de revelado el AcP N°1 y como antígeno la toxina recombinante B-Tcd. En estas condiciones se realizaron 3 inmunoensayos (Figura 35-37) y aplicando un ajuste "*Four Parameter Logistic Curve*" en SIGMA PLOT calculamos los parámetros cinéticos de los mismos. El resultado se muestra en la Tabla 9. Para evaluar la sensibilidad del ensayo calculamos:

Límite de Detección (LOD)

El LOD es la menor concentración de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada con precisión. Se calcula como:

$$\text{LOD} = B + (3 \times \text{SD}_B)$$

Límite de Cuantificación (LOQ)

El LOQ es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables. Se calcula como:

$$\text{LOQ} = B + (10 \times \text{SD}_B):$$

- B: Media de los valores de absorbancia del blanco
- SD_B : Desviación estándar de las señales del blanco.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de los AcM de captura / AcP N°1

AcM	Min	Max	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>HillSlope</i>	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
SIM 542 18.1.2	0,07	1,5	0,71	0,95	0,024	0,048
SIM 542 20.2.2	0,1	2,07	1,13	1,03	0,03	0,071
SIM 542 22.1.1	0,06	1,47	0,38	0,7	0,06	0,23

EC50: Concentración efectiva al 50%. *HillSlope*: Pendiente de la curva. LOD: Límite de detección. LOQ: Límite de Cuantificación.

Como se observa en la Tabla 9, el AcM que presenta mejor LOD y LOQ es el SIM 542-18.1.2, pero no pudimos confirmar que este anticuerpo reconociese la toxina nativa por western blot por lo que se decidió emplear como anticuerpo de captura el SIM 542-20.2.2, el cual tenía unos valores similares.

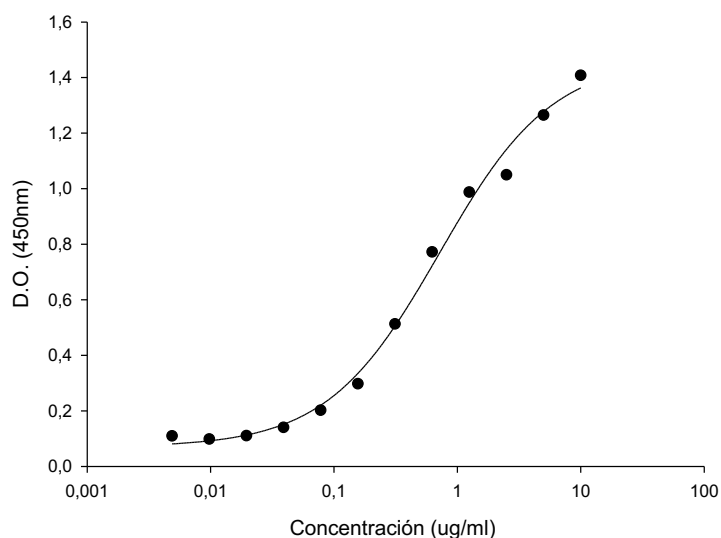


Figura 35. Curva patrón obtenida en el ELISA sándwich AcM SIM 542 18.1.2/AcP N°1 para detección de B-Tcd.

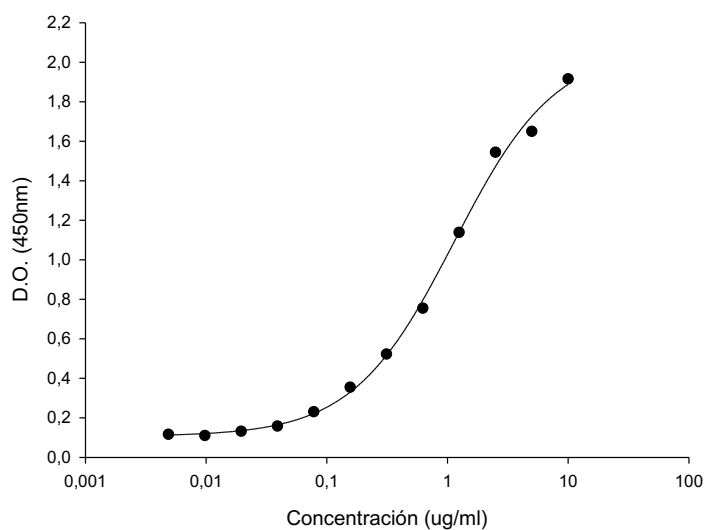


Figura 36. Curva patrón obtenida en el ELISA sándwich AcM SIM 542 20.2.2 /AcP N°1 para detección de B-Tcd.

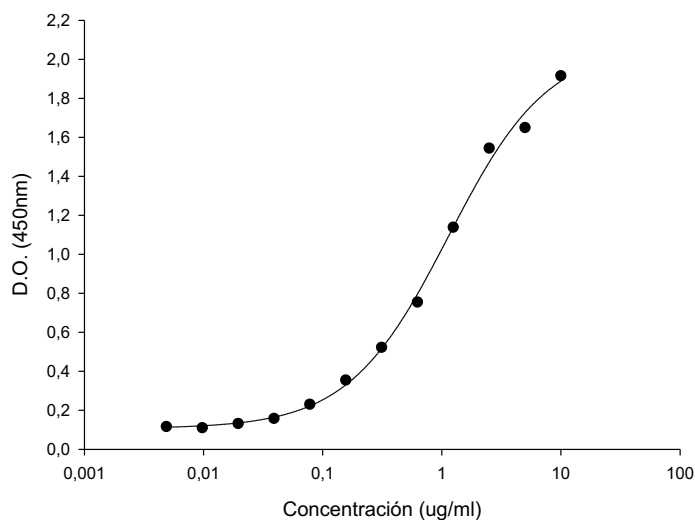


Figura 37. Curva patrón obtenida en el ELISA sándwich AcM SIM 542 22.1.1/AcP N°1 para detección de B-Tcd.

En este punto, ya habíamos obtenido el AcP N° 2, el cual presenta una reactividad mucho mejor que el N° 1, por lo que continuamos con el desarrollo del ELISA sándwich, empleando el AcM SIM 542.20.2.2 como anticuerpo de captura, el AcP N° 2 marcado con HRP como anticuerpo de revelado y como proteína patrón B-Tcd. Los parámetros cinéticos de este inmunoensayo se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros cinéticos del ELISA sándwich desarrollado empleando los anticuerpos SIM 542 20.2.2 / AcP N°2

Anticuerpos	Min	Max	EC50 (ng)	HillSlope	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
SIM 542 20.2.2 / AcP N°2	0,27	2.96	922	1.08	25,6	57,7

EC50: Concentración efectiva al 50%. *HillSlope*: Pendiente de la curva. LOD: Límite de detección. LOQ: Límite de Cuantificación.

Con este inmunoensayo se mejoraron ligeramente los valores de LOD y LOQ con respecto al anterior, pero presentaba aún una baja sensibilidad. De hecho, al analizar las muestras provenientes de cepas de *C. difficile*, los resultados siguieron siendo negativos, probablemente porque la concentración de toxina en las muestras está muy por debajo del LOD del ensayo. Por todo ello nos planteamos el diseño del inmunoensayo empleando únicamente AcPs.

4.2.4.2. ELISA Sándwich- AcP/AcP

a. Selección del Anticuerpo de captura

Para seleccionar el anticuerpo de captura se realizó un ELISA sándwich capturando con AcP N°1 y AcP N°2 anti-Toxina B de *C. difficile* (10 µg/mL) y revelando con AcP N°2 marcado con HRP. Se decidió emplear el AcP N° 2 para capturar la TcdB, a pesar de que la reactividad de estos AcP es similar, debido a que el AcP N°2 es más específico porque se ha obtenido frente a la toxina recombinante B-Tcd (Figura 38).

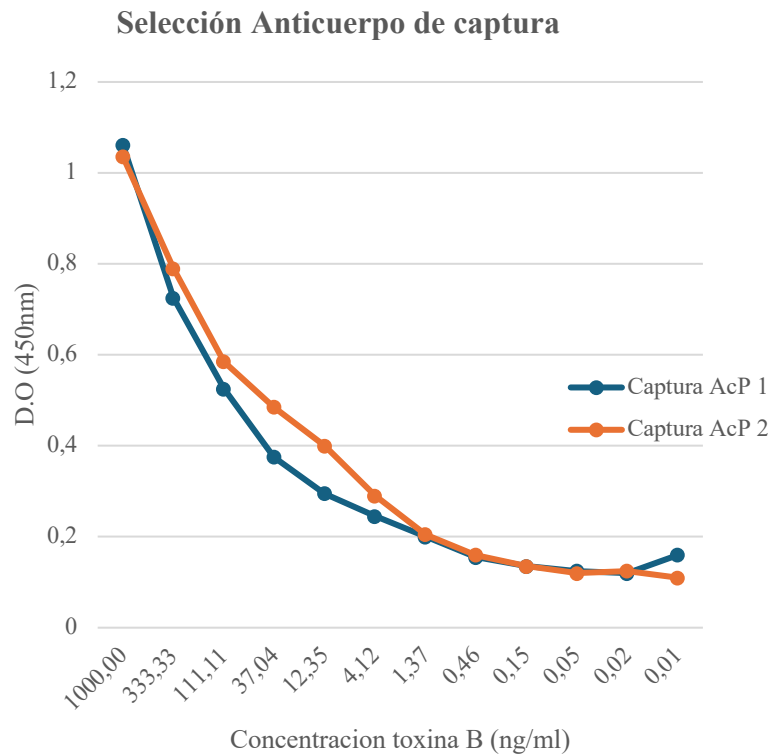


Figura 38. Selección del Anticuerpo de captura. En la figura se observa la cinética de determinación de B-Tcd de *C. difficile* empleando como captura los dos AcPs desarrollados.

Al utilizar el AcP N°2 marcado con HRP, se logró optimizar varios aspectos clave del ensayo. En primer lugar, se reduce significativamente el tiempo total requerido para llevar a cabo el procedimiento y las reactividades inespecíficas, ya que, al estar la enzima directamente asociada al anticuerpo de detección, evitamos el empleo de anticuerpos primarios. El uso de este tipo de conjugado contribuye a minimizar posibles interferencias o reacciones inespecíficas, lo que asegura resultados más confiables y reproducibles. A continuación, se detalla el esquema del ensayo implementado:

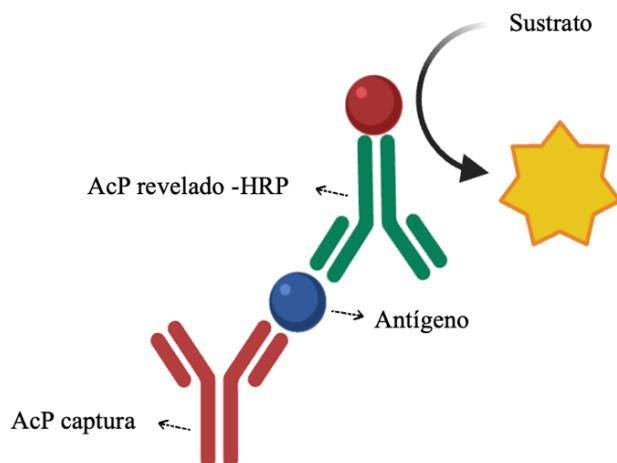


Figura 39. Esquema del ELISA sándwich. Anticuerpo de captura y revelado: AcP de conejo N°2 generado frente a la proteína recombinante (B-Tcd). El anticuerpo de revelado se marcó con HRP.

Después de seleccionar el anticuerpo de captura, se analizó la curva patrón del ELISA sándwich capturando con AcP N°2 anti-Toxina B de *C. difficile* (10µg/mL) y revelando con AcP N° 2 marcado con HRP a una dilución 1:1.000 (Figura 40). La B-Tcd se agregó a una concentración de 1 µg/mL en diluciones 1:3.

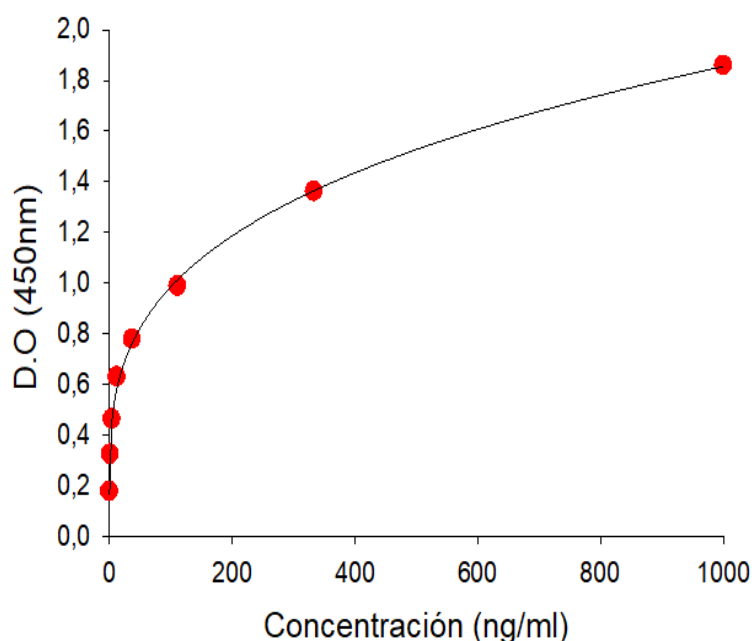


Figura 40. Curva patrón ELISA Sándwich- AcP/AcP. Gráfico generado por SIGMA PLOT.

Los límites de detección y cuantificación del ELISA sándwich se determinaron al realizar la curva patrón con la B-Tcd y fueron de 0,033ng/mL y 0,92 ng/mL respectivamente. Con este nuevo inmunoensayo hemos mejorado la sensibilidad con respecto a los anteriores en una unidad logarítmica. Estos valores son similares o incluso mejores que los que presentan los equipos comerciales, como es el caso del kit ProSpecT™ *C. difficile* Toxin A/B Microplate Assay de Thermo Scientific™ que posee un LOD de TcdB $\geq 0,61$ ng/mL, el Kit Simultaneous detection of *C. difficile* toxins A and B de tgcBIOMICS con un LOD para TcdB: 1,0 ng/mL, el Kit Separate detection of *C. difficile* toxins A and B de tgcBIOMICS con un LOD para TcdB: 0,5 ng/mL, el kit *Clostridium difficile* Toxin A/B de RIDASCREEN con un LOD para TcdB: 1,56 ng/mL y el kit *C. DIFFICILE* TOX A/B II™ de TechLab con un LOD para TcdB $\geq 2,5$ ng/mL.

Existen diversos protocolos descritos para la detección de toxinas de *C. difficile*; sin embargo, la cuantificación de toxinas mediante ELISA a partir de muestras provenientes de ceparios o muestras clínicas ha sido poco explorada.

El inmunoensayo tipo ELISA con mayor sensibilidad descrito en la bibliografía es un ELISA digital que permitió detectar y cuantificar las toxinas TcdA y TcdB en heces, alcanzando LOD de 0,45 pg/mL para TcdA y 1,5 pg/mL para TcdB y estableciendo puntos de corte clínicos en 29,4 pg/mL y 23,3 pg/mL, respectivamente. No obstante, el enfoque principal de este estudio fue validar el ensayo comparando sus resultados con métodos como NAAT, cultivo toxigénico y ensayo de citotoxicidad (Song et al., 2015).

También, se encontró evidencia de una investigación que buscaba optimizar la producción de TcdA y TcdB a partir de la evaluación del efecto de diferentes parámetros en la producción de toxinas y, para cuantificar la TcdB, desarrollaron un ELISA sándwich *in-house*, logrando producir un cultivo en tubos de diálisis de 5 L con una concentración de TcdB de 29,5 µg/mL (Aminzadeh & Jørgensen, 2021). Además, se ha desarrollado un ELISA para la cuantificación de los toxoides A y B de *C. difficile* destinados a la producción de vacunas con un LOD del ensayo para el toxoide A de 4,88 ng/mL y 3,91 ng/mL para el toxoide B (Anwar et al., 2021). Otros estudios han evaluado la sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas de diagnóstico de la CDI, tanto comparando entre métodos como evaluando diferentes kit comerciales (Alcalá et al., 2008; Rüssmann et al., 2007; Senok et al., 2017). Asimismo, se han realizado investigaciones enfocadas específicamente en la detección de toxinas (Fu et al., 2004; Liang et al., 2022; W. Chen et al., 2015).

4.2.5. Cuantificación de TcdB en cepas de *C. difficile*

La cuantificación de la TcdB en aislados de *C. difficile* se realizó mediante un ELISA sándwich AcP/AcP, utilizando como anticuerpo de captura y revelado un anticuerpo policlonal de conejo (AcP N° 2) generado frente a la B-Tcd. Las muestras se analizaron por triplicado y se realizaron dos repeticiones en días diferentes (Tabla 11). Atendiendo al límite de cuantificación del inmunoensayo establecimos que las muestras con concentraciones de TcdB por debajo de 1 ng/mL se considerarían negativas, entre 1 y 2 ng/mL dudosas y por encima de 2 ng/mL positivas. Para calcular concentraciones de TcdB en las muestras, se ajustó una "*Four Parameter Logistic Curve*" en SIGMA PLOT.

Tabla 11. Resultados de la cuantificación de la TcdB de *C. difficile* mediante ELISA Sándwich

Código de muestra	Ribotipo/ ST	Media (ng/mL)	RESULTADO
CD1	RT078/ST11	36,51	Positiva
CD2	RT078/ST11	0,15	Negativa
CD3	RT078/ST11	31,92	Positiva
CD4	RT078/ST11	0,19	Negativa
CD5	RT078/ST11	47,34	Positiva
CD6	RT078/ST11	0,62	Negativa
CD7	RT078/ST11	514,76	Positiva
CD8	RT078/ST11	0,44	Negativa
CD9	RT078/ST11	60,54	Positiva
CD10	RT078/ST11	38,02	Positiva
CD11	RT126/ST11	0,13	Negativa
CD12	RT078/ST11	63,30	Positiva
CD13	RT014/ST11	34,56	Positiva
CD14	RT014/ST11	21,47	Positiva
CD15	RT078/ST2	0,77	Negativa
CD16	RT078/ST2	1,07	Dudosa
CD17	RT110/ST11	0,01	Negativa
CD18	RT010/ST11	0,22	Negativa
CD19	RT078/ST19	0,17	Negativa
CD20	RT078/ST11	0,09	Negativa
CD21	RT078/ST11	0,25	Negativa
CD22	RT078/ST11	0,26	Negativa
CD23	RT078/ST11	0,90	Negativa

El 40% de las cepas analizadas produjeron la TcdB. Dentro de este grupo, se observó que en el 90% de las cepas, la concentración de TcdB estaba comprendida entre 20-60 ng/mL y únicamente en la cepa CD7 se determinó una concentración de TcdB por encima de 500 ng/mL. La cepa CD7 pertenece al RT078 de *C. difficile*, fue aislada en un muestreo

ambiental a partir de una muestra de agua utilizada en el proceso de escaldado de los cerdos en un matadero y planta procesadora en el año 2016. Esta muestra tiene relevancia epidemiológica y desde el enfoque *One health* debido a que en el árbol filogenético muestra estrecha relación con cepas procedentes de España aisladas en cerdos en el año 2013 (CD4, CD12) y humanos en el año 2015 (ERR3276294), lo que sugiere una posible conexión entre el ambiente, los cerdos y los humanos y refuerza la idea de *C. difficile* como un patógeno zoonótico emergente. Además, la presencia de una cepa hipervirulenta en el agua de escaldado podría indicar que el proceso de escaldado no está eliminando la bacteria de manera efectiva y, en cambio, puede estar contribuyendo a su diseminación en la línea de producción. La alta producción de TcdB en esta cepa es preocupante, ya que cepas con esta patogenicidad pueden estar entrando en la cadena alimentaria.

Para comparar los resultados de secuenciación con los del ELISA sándwich se analizaron los datos obtenidos y se representaron gráficamente (Figura 41). Primero se comparó la concentración de la TcdB respecto de si se había detectado o no el gen *tcdA*, obteniendo como resultado que las cepas *tcdA+* / *tcdB+* producen significativamente más TcdB que las *tcdA-* / *tcdB+*. Esta diferencia es estadísticamente significativa, lo que indica que la presencia del gen *tcdA* podría estar relacionada con una mayor expresión de la TcdB. Este hallazgo concuerda con las características descritas para el RT078, que sobreproduce las toxinas TcdA y TcdB debido a que tiene una delección en el gen *tcdC* (Bolton & Marcos, 2023; Jones et al., 2013). Mientras que las cepas *tcdA-* / *tcdB+* pueden tener mutaciones en el PaLoc que afectan su expresión, como los toxinotipos VI, VII, VIII, XVI, XXV y XXVIII (Rupnik & Janezic, 2016).

También se comparó la concentración de la TcdB respecto de si las muestras fueron aisladas de origen animal o ambiental y se observó que las cepas ambientales producen significativamente más TcdB que las cepas de origen animal. Además, se observó una muestra de origen ambiental (CD7) con un valor fuera del rango, como se mencionó anteriormente. Hasta la fecha, no se han reportado estudios que indiquen que las cepas ambientales de *C. difficile* produzcan más TcdB como respuesta adaptativa. Sin embargo, es importante considerar que las muestras categorizadas como ambientales derivan de fuentes contaminadas por animales o humanos. En este contexto, la comparación entre la producción de TcdB y el origen del aislamiento podría ser una aproximación para evaluar si existen diferencias en la virulencia de las cepas según su persistencia en distintos nichos.

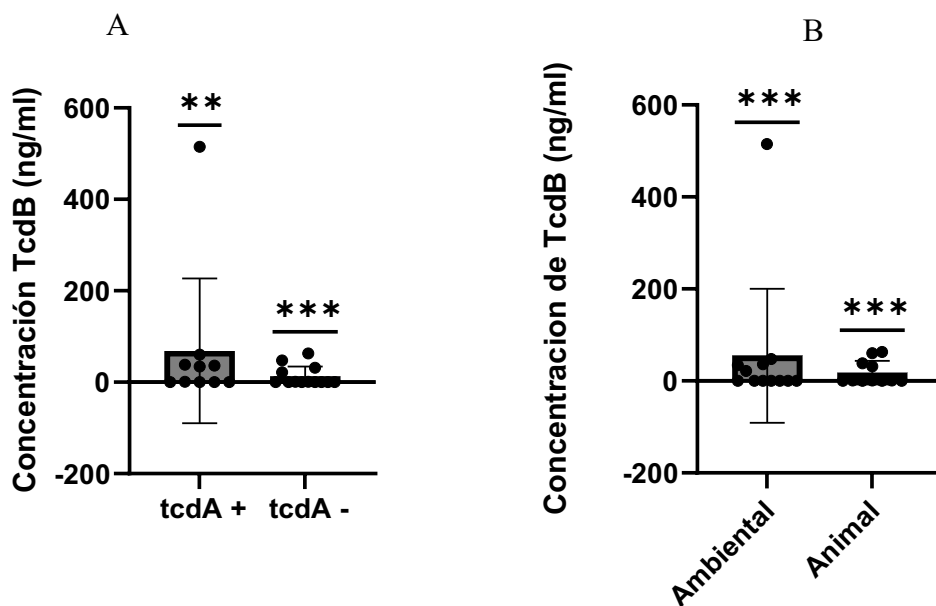


Figura 41. Determinación de TcdB de las cepas de *C. difficile* representado en función de (A) la presencia del gen *tcdA* o únicamente el gen *tcdB* y (B) si fueron aisladas de muestras ambientales o de origen animal.

Hay que destacar que todas las cepas en las que se detectó la TcdB pertenecían al ST11, en el que se encuentra el RT078, caracterizado por ser un ribotipo hipervirulento, asociado a CDI en animales y CDI comunitario en humanos. Dentro de este ST también se clasificaron dos cepas pertenecientes al RT14, un ribotipo implicado en enfermedades humanas, en las cuales también se detectó la TcdB de *C. difficile*.

Por otro lado, el 60% restante de las cepas produjo niveles muy bajos de TcdB, por debajo del punto de corte, por lo que se han clasificado como negativas para la producción de esta toxina. Esta baja concentración de TcdB en las muestras podría también influir en las diferencias observadas en el funcionamiento del ensayo según el anticuerpo de captura empleado (policlonal y/o monoclonal), ya que los niveles de toxina podrían estar por debajo del LOD del ELISA.

Los ELISAs tipo sándwich pueden tener problemas con proteínas de gran tamaño si se usa un anticuerpo monoclonal como anticuerpo de captura ya que puede haber problemas de accesibilidad del epítipo. Las proteínas grandes pueden plegarse de manera que el epítipo reconocido por el anticuerpo de captura quede oculto o no sea accesible, reduciendo la eficiencia de la captura. Por esta razón en estos casos está indicado el empleo de AcP ya que pueden reconocer múltiples epítipos y aumentar la probabilidad

de captura. Por tanto, con el ELISA sándwich desarrollado empleando como anticuerpo de captura y de revelado un AcP podemos determinar la TcdB en muestras de cultivo de cepas de *C. difficile*.

Para finalizar la caracterización de la TcdB nativa de *C. difficile* presente en estas cepas, realizamos un análisis mediante Western blot de la cepa CD7, por ser en la que mayor concentración de TcdB detectamos, y de la cepa CD5 como representativa de una cepa en la que cuantificamos valores intermedios de toxina. Este análisis le llevamos a cabo empleando el AcM 542.20.2.2, el AcP N°2 y la antitoxina de TechLab (Figura 42).

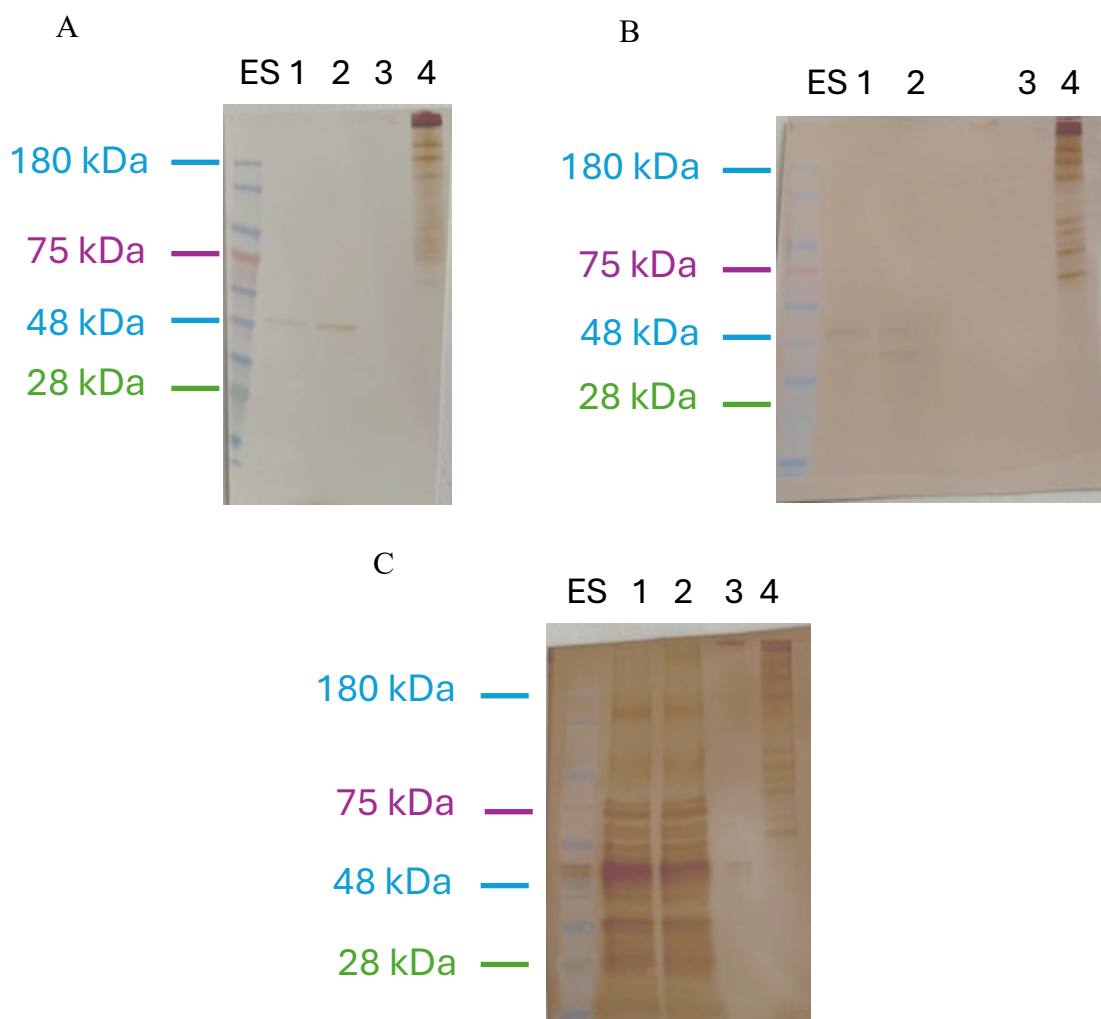


Figura 42. Análisis por Western blot de toxinas de *C. difficile*. Calle ES: Estándar de proteínas. Calle 1: Muestra CD5. Calle 2: Muestra CD7. Calle 3: Toxina A purificada. Calle 4: Toxina B purificada. El gel A está revelado con el AcP N°2, el gel B con el AcM SIM 542.20.2.2 y el gel C con la antitoxina de TechLab.

En el western blot revelado con los anticuerpos AcP N°2 y AcM SIM 542.20.2.2 se observa que en las muestras de cultivo TcdB presenta un peso molecular de 50kDa, a diferencia de la TcdB purificada cuyo peso molecular es ≥ 180 kDa. Esto pudiera deberse a que durante el cultivo y/o el almacenamiento la toxina que hemos producido pueda sufrir una escisión proteolítica. En este contexto se ha descrito que la región N-terminal puede ser autoescindida por la cisteína-proteasa presente en la molécula de toxina durante el proceso de activación que puede ocurrir *in vivo* en presencia de Insp6 o *in vitro* en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol o ditioneitol), generando en el western blot dos bandas, una en ~ 210 y otra en ~ 68 kDa (Egerer et al., 2007; Moura et al., 2013). Además, en el extremo C-terminal de TcdB, región a partir de la cual se produjo la B-Tcd, se produce autoproteólisis (Giesemann et al., 2008) a partir de tres posibles motivos DXG en las posiciones 1.665, 2.001 y 2.133 identificados *in silico*. De estas tres posiciones solo el de 1.665 (DSG), ha sido validado experimentalmente como el sitio catalítico responsable de la autólisis de la toxina, siendo el responsable de la actividad autocatalítica de la toxina, lo que contribuye a la citotoxicidad (Reineke et al., 2007). Esto sugiere que la reactividad observada en el Western blot podría deberse al reconocimiento específico del dominio CROPs, que ha sido escindido de la estructura completa de la TcdB.

En la Figura 41 también se puede observar que el AcM SIM 542.20.2.2 y el AcP N°2 reconocen específicamente la TcdB de *C. difficile*, mientras que la antitoxina de TechLab reconoce tanto la TcdA como la TcdB y muchas otras proteínas de las cepas de *C. difficile* (Figura 42C).

En esta tesis, se logró desarrollar un ELISA sándwich para la cuantificación específica de la TcdB de *C. difficile*, utilizando un AcP de conejo anti-TcdB tanto para la captura como para el revelado, generado en nuestro laboratorio a partir de la inmunización con la B-Tcd. Los resultados obtenidos demuestran que el ensayo es específico para la detección de TcdB, lo que respalda su potencial aplicación en el diagnóstico de CDI. No obstante, el principal desafío radica en su optimización con muestras fecales, con el objetivo de validar su aplicabilidad en entornos clínicos y de investigación en sanidad animal.

4.3. Evaluación de la capacidad de neutralización de la citotoxicidad de TcdB en células Vero del AcP N°2

4.3.1. Puesta a punto del ensayo de neutralización de citotoxicidad celular

Para el desarrollo del ensayo se eligieron las células Vero, una línea celular ampliamente utilizada para ensayos de citotoxicidad de *C. difficile* (Banz et al., 2018; Elfassy et al., 2021; Legaria et al., 2018; Schweitzer et al., 2021), debido a que expresan los tres receptores de la proteína TcdB: NECTIN3 (LaFrance et al., 2015), CSPG4 (Yuan et al., 2015) y FZD2 (P. Gupta et al., 2017; Tao et al., 2016).

Lo primero que determinamos fue capacidad toxigénica de las cepas cultivadas en el laboratorio. Para ello realizamos un ensayo de toxicidad como se describe en el apartado 3.5.3. de materiales y métodos. Transcurridas las 48 horas de incubación del ensayo se comprobó la confluencia de células Vero observando en el microscopio invertido los pocillos correspondientes al control negativo (Figura 43), también se observó la actividad citotóxica de *C. difficile* en los pocillos que contenían la mezcla de toxina más células Vero (Figura 44). Para cuantificar la toxicidad empleamos el método de la formación de cristales de formazán (Figura 45).

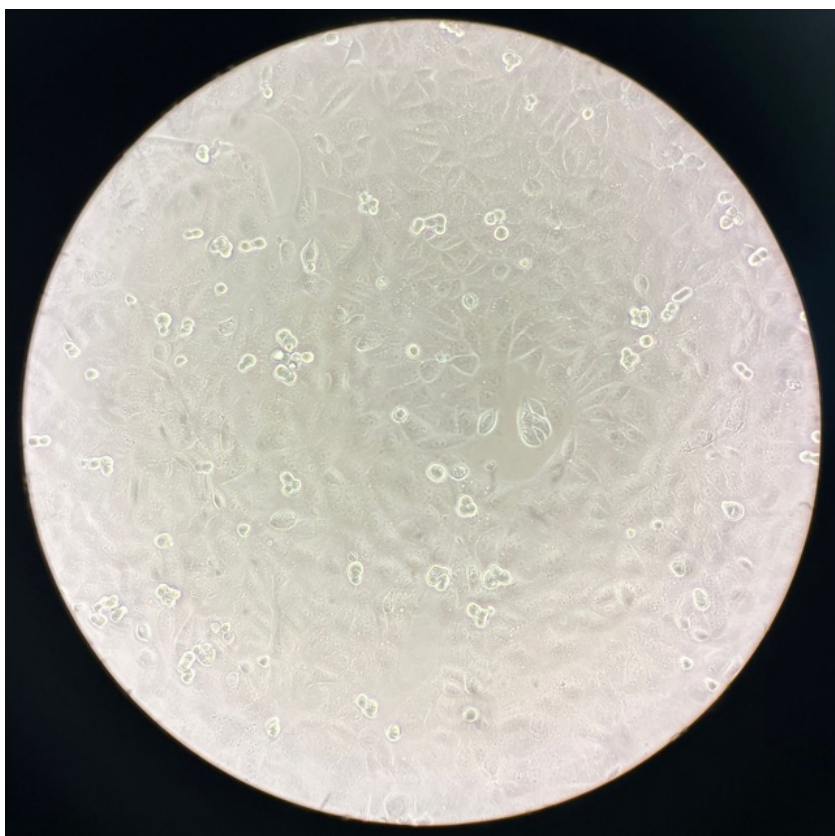


Figura 43. Control de células Vero. Control negativo. Se observan las células viables adheridas a la superficie del pocillo formando una monocapa. Observadas a 20X.

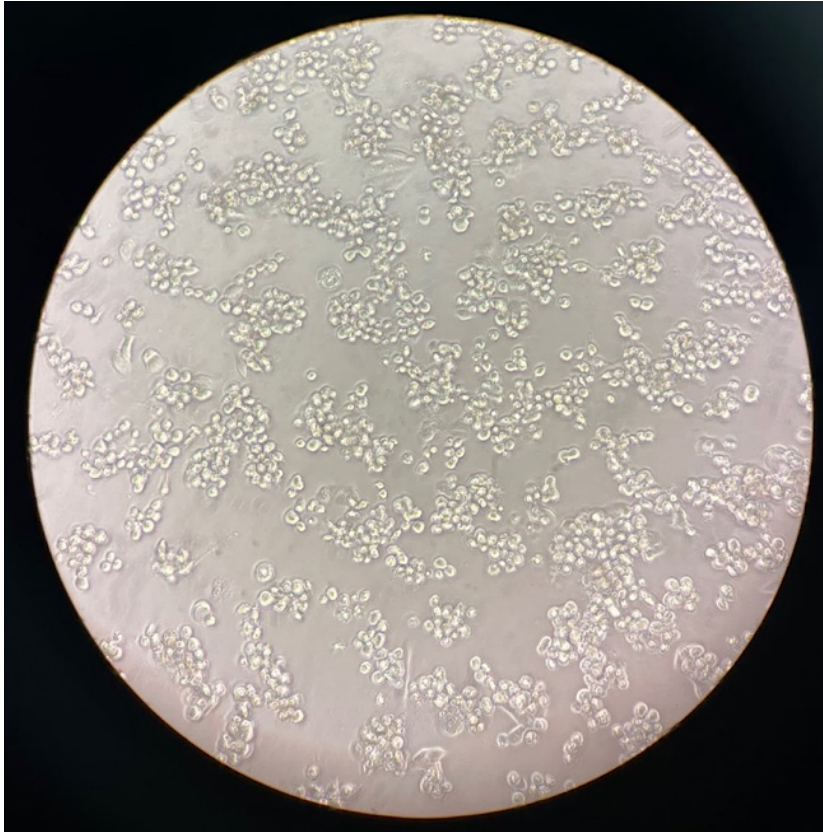


Figura 44. Acción citotóxica de *C. difficile* en células Vero. Se observan las células Vero redondeadas por la acción de las toxinas de *C. difficile*. Observadas a 20X.

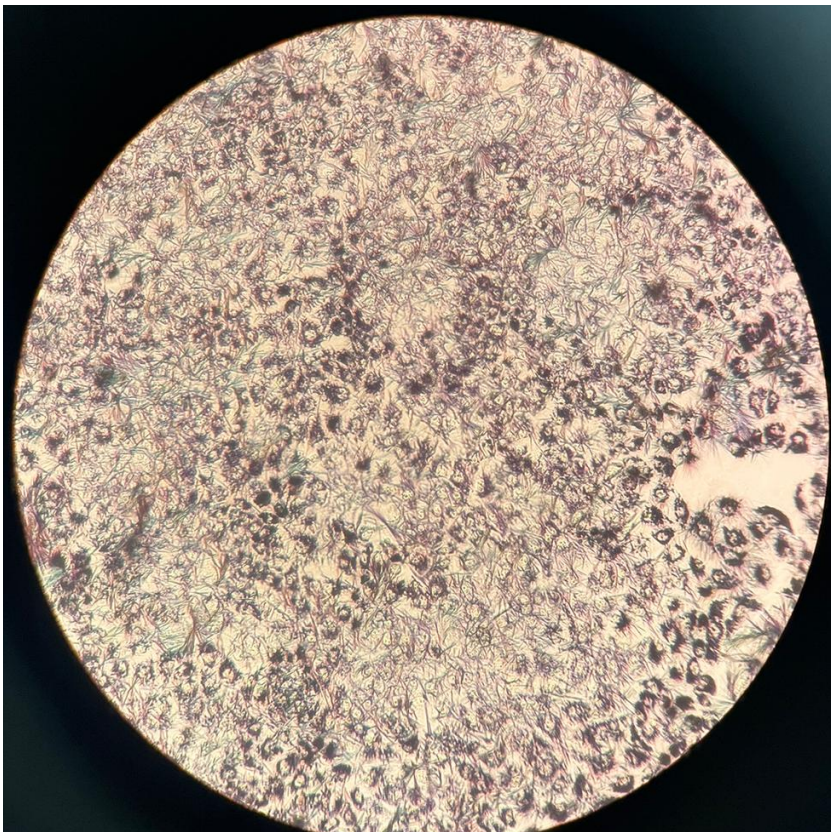


Figura 45. Formación de cristales de formazán al agregar MTT a las células viables. Fotografía de un pocillo de células Vero viables después de 4 horas de incubación con MTT.

Las pruebas de citotoxicidad demostraron que el almacenamiento de las toxinas de *C. difficile* a -20 °C afecta negativamente su actividad citotóxica (Figura 46), en concordancia con lo reportado previamente por Freeman y Wilcox (2003). Para determinar la temperatura de almacenamiento, realizamos pruebas donde se evaluó la toxina el mismo día de su producción a 4°C, congelada a -20°C y descongelada 1 vez, congelada a -20°C y descongelada 2 veces, y una toxina de la misma cepa producida 7 días antes congelada a -20°C, descongelada y almacenada a 4°C durante 3 días. El experimento a -20 °C se repitió a -80°C con la misma toxina. En estos ensayos encontramos que el almacenamiento a -80 °C permite preservar la actividad citotóxica de *C. difficile*. Por esta razón, las toxinas fueron almacenadas en alícuotas de un solo uso a -80° C.

Se ha reportado que la concentración de TcdB no se veía afectada cuando se evalúan tres condiciones de almacenamiento: 4 °C, -30 °C, congelación repetida a -30 °C y descongelación, haciendo mediciones por ELISA a los 1, 2, 7, 14 y 21 días (Grześkowiak et al., 2020). También se ha descrito que no se ha observado un efecto en la estabilidad inmunológica de las citotoxinas de *C. difficile* analizadas mediante EIA, al evaluar el almacenamiento de muestras de heces clínicas sin diluir a temperaturas de refrigeración, -30 °C y -80 °C durante hasta 120 días. Sin embargo, el almacenamiento a -30 °C tiene un efecto perjudicial en la estabilidad de la toxina de *C. difficile* en heces diluidas (Schora et al., 2018). No obstante, estas mediciones se basan en la cuantificación de la toxina y no en la determinación en su efecto citotóxico.

Estos resultados resaltan la importancia de un adecuado almacenamiento de las muestras para garantizar un diagnóstico preciso de la CDI.

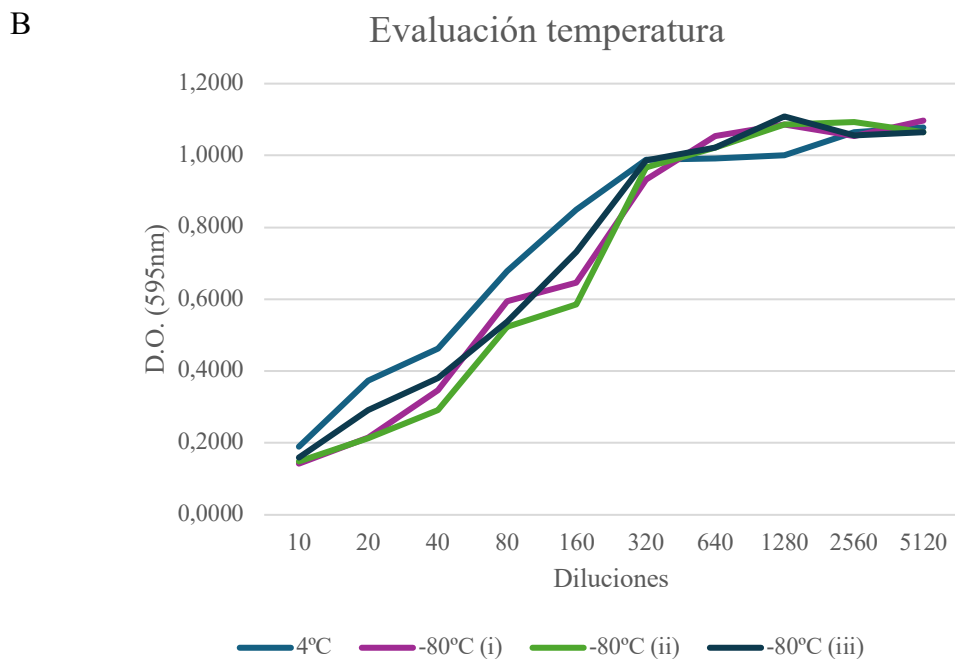
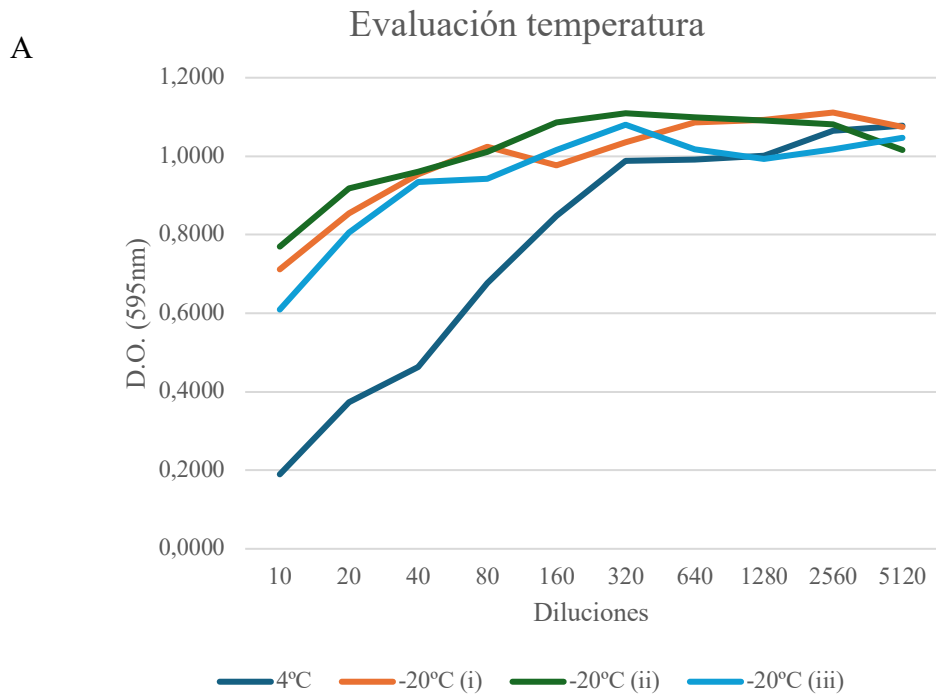


Figura 46. Evaluación de la temperatura para el almacenamiento de las toxinas. El experimento se realizó en ciclos de congelación y descongelación a -20°C y -80°C con la misma toxina. **A:** Experimento a -20°C . **B:** Experimento a -80°C . **4°C:** Se evaluó la toxina el mismo día de su producción a 4°C , **(i)** congelada y descongelada 1 vez, **(ii)** congelada y descongelada 2 veces, y **(iii)** una toxina de la misma cepa producida días antes congelada, descongelada y almacenada a 4°C durante 3 días.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de ensayo y las condiciones de almacenamiento de las muestras, se cuantificó la actividad citolítica de todas las cepas cultivadas de *C. difficile*. Para poder comparar la potencia de una cepa con otra realizamos un experimento en el que medimos la capacidad citotóxica de las 23 cepas en las que habíamos determinado la concentración de TcdB (Tabla 12). Para cada una de ellas determinamos el valor de *end-point* como indicador de la potencia tóxica, siguiendo las directrices del estudio BSP130 para *C. septicum* (Daas et al., 2020).

Tabla 12. Dilución *end-point* de las cepas cultivadas de *C. difficile*

Código de la muestra	Dilución <i>end-point</i>
CD01	100
CD02	200
CD03	400
CD04	800
CD05	1600
CD06	6400
CD07	800
CD08	1600
CD09	100
CD10	0
CD11	800
CD12	200
CD13	400
CD14	200
CD15	200
CD16	100
CD17	200
CD18	800
CD19	400
CD20	200
CD21	800
CD22	800
CD23	100

Cabe destacar que en la cepa CD10, a pesar de haber sido capaz de cuantificar la TcdB por ELISA, no observamos efecto citotóxico. Esto puede ser debido a que como indicamos anteriormente en el inmunoensayo determinamos la presencia de la proteína, pero esta no tiene por qué mantener su actividad (Grześkowiak et al., 2020; Schora et al., 2018). En la cepa CD6 el valor de citotoxicidad fue el más alto de todos, aunque no habíamos detectado por ELISA TcdB. Este efecto citopático podría ser debido a la presencia en el medio de cultivo de la cepa de otras toxinas o productos tóxicos que pudieran provocar la lisis de las células Vero. En el estudio BSP 130 ya se indica que los valores de *end-point* obtenidos en los ensayos de citotoxicidad son muy heterogéneos, debido a la variabilidad en la sensibilidad que presenta la línea celular Vero en función de origen o a la presencia de productos contaminantes que puedan producir la lisis de las células y que esta no sea debido al efecto de las toxinas, por lo que la única manera de confirmar que el efecto citopático que estamos observando es debido a la TcdB es empleando un ensayo de inhibición de la actividad toxina con una antitoxina.

A pesar de esta variabilidad, como estos valores de *end-point* se han calcula en el mismo ensayo empleando las mismas células, si los podemos emplear para realizar una comparación relativa de la toxicidad de las cepas entre ellas mismas. Si realizamos una representación gráfica en la que determinamos el valor medio de *end-point* para las cepas que por secuenciación presentan el gen *tcdA* y las que no, el resultado que observamos es que en aquellas donde únicamente determinamos el gen *tcdB* (*tcdA*-) tiene valores de potencia de toxicidad más elevados (Figura 47). Se ha descrito que las cepas *tcdA*- y *tcdB*+ son hipervirulentas (Bolton & Marcos, 2023) e incluso han ocasionado la muerte de pacientes (Alfa et al., 2000; Voth & Ballard, 2005).

Este hallazgo es controversial debido a que el 80% de las cepas analizadas en esta tesis pertenecen al RT078, que se caracteriza por tener un perfil de toxinotipo A+B+CDT+. Sin embargo, en este trabajo, la secuenciación genómica no permitió detectar el gen *tcdA* en todas la muestras pertenecientes al RT078, ni los genes de la CDT (*cdtA/cdtB*) en ninguna de las cepas pertenecientes al ST11. Además, se identificaron discrepancias entre el ribotipado y el MLST realizado mediante WGS, lo que sugiere una mayor heterogeneidad genética dentro de este ribotipo. Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad revelaron que las cepas *tcdA*- del ST11/RT078 fueron las más citotóxicas, lo que refuerza la hipótesis de que la ausencia de *tcdA* no implica necesariamente una menor virulencia, sino que podría estar compensada por una mayor expresión o actividad

de TcdB. Además, anteriormente también se ha clasificado una cepa del RT078 dentro del toxinotipo XVI (A-B+CDT+) (Rupnik & Janezic, 2016).

También se comparó la citotoxicidad de las cepas respecto de si las muestras fueron aisladas de origen animal o ambiental y se observó que las cepas de origen animal son más citotóxicas que las cepas de origen ambiental, probablemente a causa de que factores regulatorios en la producción de toxina, que se activan en ambientes específicos, dentro del intestino del animal (Aktories et al., 2017; Bouillaut et al., 2015; Buddle & Fagan, 2023; Gil et al., 2017; Karlsson et al., 1999; Karlsson et al., 2000).

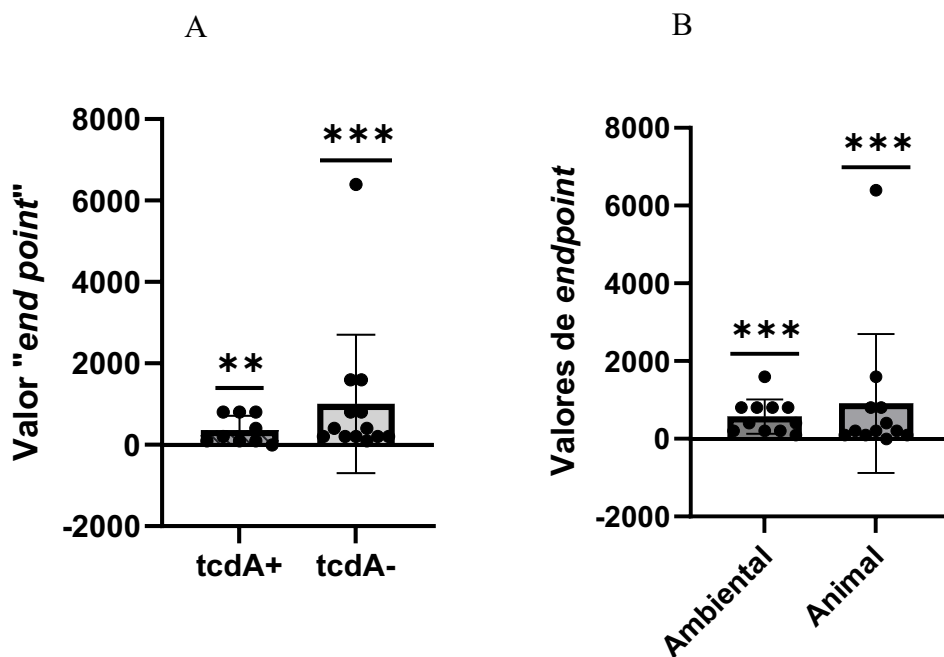


Figura 47. Valores medios de *end-point* de las cepas de *C. difficile* representado en función de (A) la presencia del gen *tcdA* o únicamente el gen *tcdB* y (B) si fueron aisladas de muestreos ambientales o de origen animal

4.3.2. Comparación de la eficacia de neutralización entre el AcP N° 2 y la antitoxina de TechLab

Una vez confirmada la presencia de toxinas en los sobrenadantes de las cepas cultivadas en el laboratorio precedimos optimizar el ensayo de neutralización. Como dijimos anteriormente la única manera de confirmar la presencia de TcdB en un cultivo y su capacidad tóxica es inhibiendo la misma con una antitoxina. Es importante la calidad de esta, ya que a veces las antitoxinas están producidas empleando toxoides inactivados por lo que los anticuerpos que están presentes en la misma no solo van dirigidos frente a la TcdB sino frente a otras toxinas de *C. difficile*. En nuestro caso contamos con el AcP N° 2, el cual está purificado por afinidad al antígeno, asegurando así que reconoce únicamente la TcdB (Figura 42A).

Mediante ensayos de neutralización *in vitro* se determinó la concentración de antitoxina capaz de neutralizar el 50% de la acción citotóxica de la toxina TcdB (Figura 48). Los resultados obtenidos permitieron confirmar la acción inhibitoria de la actividad tóxica de las antitoxinas e identificar la concentración que lograba reducir la citotoxicidad a la mitad, comparada con el control sin antitoxina. Para la antitoxina TechLab se determinó una neutralización del 50% de la toxicidad a una dilución 1:20.000 para la toxina del mismo kit y 1:100.000 para la toxina nativa CD21. Y para la antitoxina producida en nuestro laboratorio se observó el mismo efecto a una dilución 1:4 frente a la toxina del kit comercial y 1:10 frente a la toxina nativa CD21. Esta concentración se consideró óptima para su uso en ensayos posteriores, asegurando una neutralización efectiva de la toxina (Figura 48). Con este ensayo confirmamos que el AcP N°2 desarrollado en nuestro laboratorio puede ser empleado como inhibidor de la actividad de la TcdB (Figura 49 - 50). Ya se había descrito que anticuerpos producidos frente al dominio CROPs de TcdB de *C. difficile* bloquean la unión de la toxina a las células Vero (Kroh et al., 2018; Orth et al., 2014), lo que justifica la acción de neutralización de la actividad toxica.



Figura 48. Neutralización de la citotoxicidad de *C. difficile* en células Vero. Se observa el aproximadamente el 50% de las células Vero viables adheridas a la superficie del pocillo y el 50% de las células muertas están redondeadas flotando. Observadas a 20X.

Las antitoxinas descritas en la bibliografía son muy variadas (Elfassy et al., 2021), (Banz et al., 2018; Legaria et al., 2018), (Schweitzer et al., 2021) y en todos estos casos se han desarrollado empleando toxoides como inmunógenos, por tanto, contienen anticuerpos frente a la molécula completa de TcdB y frente a otras proteínas de las bacteria incluidas otras toxinas como TcdA (figura 42C) esto explica el mayor título de neutralización de la antitoxina TechLab con respecto al AcP N°2.

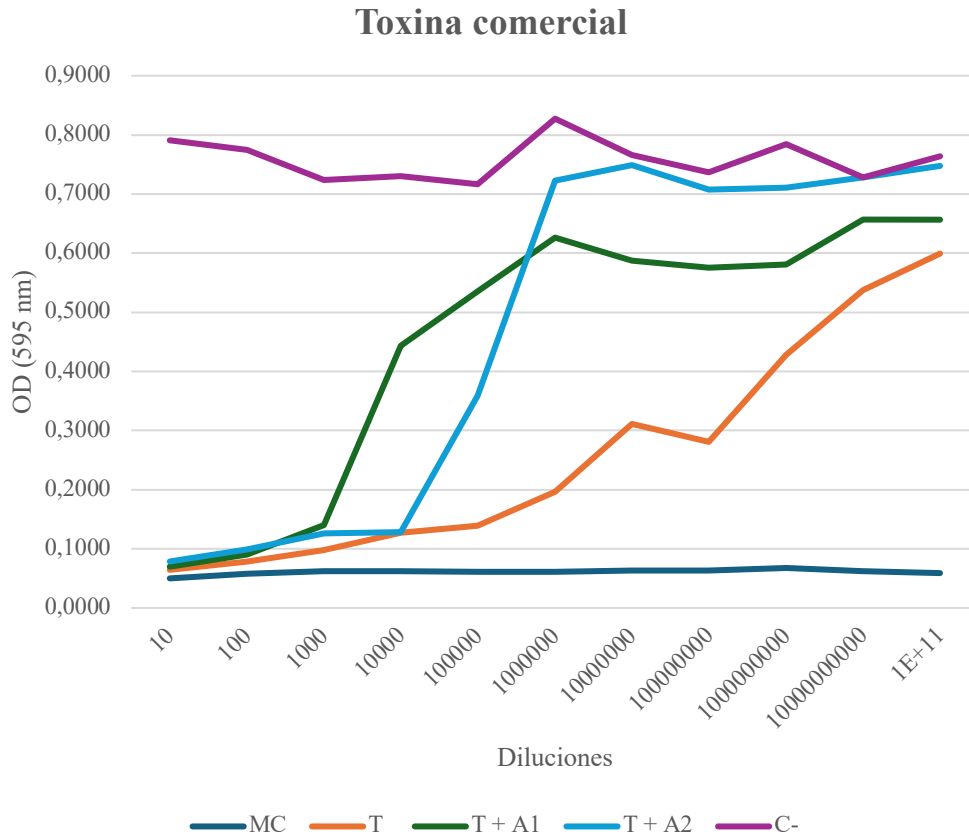


Figura 49. Neutralización de la actividad de la toxina TechLab empleando antitoxina TechLab (A1) y el AcP N°2 (A2). MC: Medio completo o control blanco. C-: Control de células viables. **T:** Toxina TechLab a diluciones 10^{-1} - 10^{-11} . **T + A1:** Mezcla toxina TechLab a diluciones 10^{-1} - 10^{-11} + antitoxina TechLab a 1:20.000. **T + A2:** Mezcla toxina TechLab a diluciones 10^{-1} - 10^{-11} + AcP N°2 a una dilución 1:4.

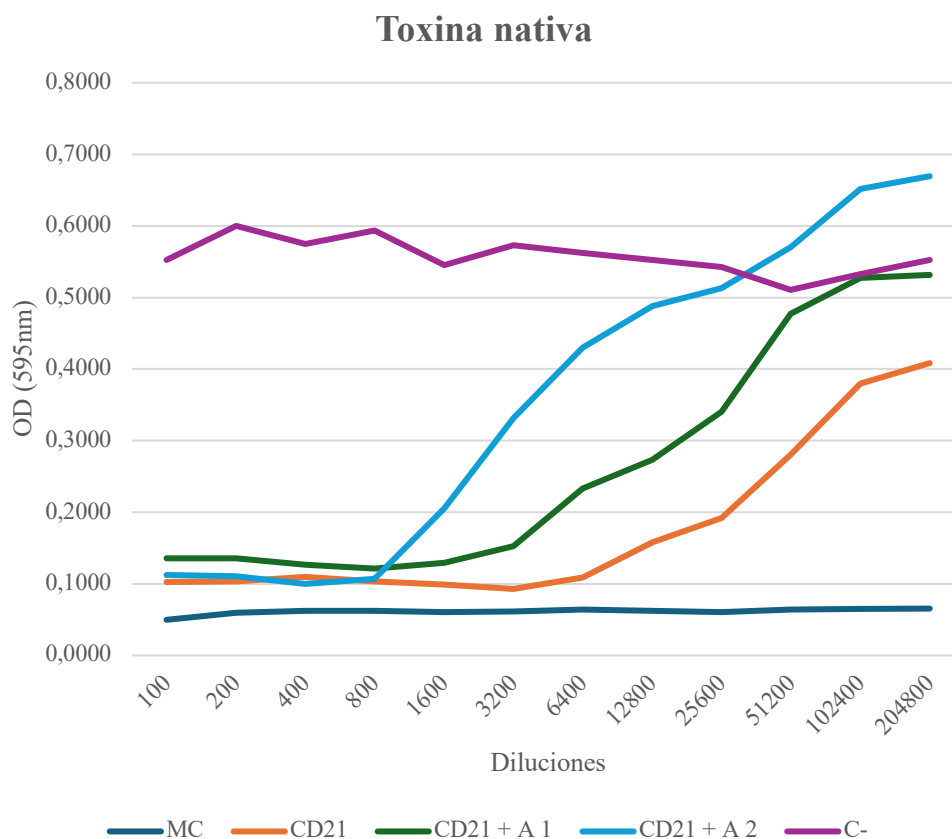


Figura 50. Neutralización de la actividad de la toxina CD21 empleando la antitoxina TechLab (A1) y el AcP N°2 (A2). MC: Medio completo o control blanco. C-: Control de células viables. **CD21:** Toxina nativa 1:50 y diluciones ½. **CD21 + A1:** Mezcla toxina nativa de la cepa CD21 1:50 diluciones ½. + antitoxina TechLab a 1:100.000. **CD21 + A2:** Mezcla toxina nativa de la cepa CD21 1:50 y diluciones ½. + AcP N°2 a una dilución 1:10.

Los resultados de neutralización demuestran que el AcP N°2, desarrollado para esta tesis y específico para TcdB, neutraliza la actividad citotóxica de la toxina TechLab y cepas cultivadas en el laboratorio de *C. difficile*, demostrando además que el ensayo de citotoxicidad es más sensible que el ELISA sándwich desarrollado. La capacidad del AcP N°2 para neutralizar la actividad citotóxica de TcdB permite su aplicación en la detección y cuantificación de esta toxina en muestras biológicas, lo que es fundamental para el diagnóstico y monitoreo de las CDI. Además, la disponibilidad de un anticuerpo eficaz desarrollado *in-house* podría reducir la dependencia de kits comerciales, proporcionando una opción más accesible y adaptable a las necesidades del laboratorio para realizar nuevas investigaciones sobre la citotoxicidad de *C. difficile*. Estos resultados resaltan la importancia del empleo de anticuerpos con alta especificidad para la detección del analito,

especialmente en el desarrollo de ensayos diagnósticos, donde la reactividad cruzada puede afectar la interpretación de los resultados.

También, a futuro se podría evaluar si alguno de los AcM que hemos producido para este trabajo es capaz de neutralizar la actividad de la TcdB de *C. difficile*. Hay anticuerpos que han sido aprobados para neutralizar toxinas en tratamientos clínicos como Raxibacumab y Obiltoxaximab (Neutralizan la toxina del *Bacillus anthracis*) o el mismo Bezlotoxumab para TcdB. Estos anticuerpos han demostrado ser herramientas valiosas tanto en tratamientos terapéuticos como en la prevención de enfermedades mediadas por toxinas.

Conclusiones

5. Conclusiones

1. Se caracterizaron 23 cepas de *C. difficile* de origen ambiental y animal. Los resultados confirmaron que los RTs epidémicos prevalentes en animales presentan altos porcentajes de resistencia a múltiples antibióticos, con patrones predominantes de resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y β -lactámicos.
2. Las altas tasas de resistencia a múltiples antibióticos y las similitudes encontradas entre las cepas del ST11 aisladas de entornos con interacción entre el ambiente, los animales y los humanos, destacan el impacto de la infección por *C. difficile* en animales en la salud pública y refuerzan la necesidad de abordar esta enfermedad ante un enfoque One Health.
3. La detección de una cepa con niveles de TcdB excepcionalmente altos (>500 ng/mL) sugieren la existencia de variantes con un potencial de virulencia elevado, resaltando una heterogeneidad significativa en la expresión de esta toxina.
4. La especificidad observada en los anticuerpos SIM 542.20.2.2 y AcP N°2 respalda su uso en pruebas dirigidas exclusivamente a TcdB, mientras que la reactividad más amplia del kit comercial podría influir en su capacidad para diferenciar entre las toxinas A y B de *C. difficile*.
5. La proteína recombinante diseñada para este trabajo estimula la producción de anticuerpos neutralizantes como ha quedado demostrado con el AcP N°2 por lo que se podría postular como un buen candidato para el diseño de una vacuna de subunidades.
6. Un reto futuro en el ámbito de la investigación científica es la identificación y estandarización de técnicas de clasificación taxonómica que aseguren una mayor eficiencia y reproducibilidad entre distintos laboratorios.

5. *Conclusions*

1. Twenty-three *C. difficile* strains of environmental and animal origin were characterized. The results confirmed that epidemic RTs prevalent in animals exhibit high levels of resistance to multiple antimicrobials, with predominant resistance patterns to aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclines, and β -lactams.
2. The high rates of multidrug resistance and the similarities observed among ST11 strains isolated from environments where animals, humans, and the environment interact highlight the impact of *C. difficile* infection in animals on public health. These findings reinforce the need to address this disease under a One Health approach.
3. The detection of a strain with exceptionally high TcdB levels (>500 ng/mL) suggests the presence of variants with increased virulence potential, emphasizing a significant heterogeneity in the expression of this toxin.
4. The specificity observed in the SIM 542.20.2.2 and AcP No.2 antibodies supports their use in assays exclusively targeting TcdB, whereas the broader reactivity of the commercial kit may influence its ability to differentiate between *C. difficile* toxins A and B.
5. The recombinant protein designed in this study stimulates the production of neutralizing antibodies, as demonstrated with AcP No.2, suggesting its potential as a promising candidate for the development of a subunit vaccine.
6. A future challenge in scientific research is the identification and standardization of taxonomic classification techniques that ensure greater efficiency and reproducibility across different laboratories.

Bibliografía

6. Bibliografía

- ABC. (2018, julio 18). *Crean el primer banco de heces de España para trasplante de microbiota fecal*. https://www.abc.es/espana/catalunya/abci-crean-primer-banco-heces-espana-para-trasplante-microbiota-fecal-201807181638_noticia.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.abc.es%2Fespana%2Fcatalunya%2Fabci-crean-primer-banco-heces-espana-para-trasplante-microbiota-fecal-201807181638_noticia.html
- Aktorics, K., Schwan, C., & Jank, T. (2017). Toxin Biology. *Annual Review of Microbiology*, 71, 281-307. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093458>
- Alcalá, L., Sánchez-Cambronero, L., Catalán, M. P., Sánchez-Somolinos, M., Peláez, M. T., Marín, M., & Bouza, E. (2008). Comparison of three commercial methods for rapid detection of *Clostridium difficile* toxins A and B from fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3833-3835. <https://doi.org/10.1128/JCM.01060-08>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.09.004>
- Alfa, M. J., Kabani, A., Lysterly, D., Moncrief, S., Neville, L. M., Al-Barrak, A., Harding, G. K. H., Dyck, B., Olekson, K., & Embil, J. M. (2000). Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2706-2714. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2706-2714.2000>
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J. L., Astorga, R. J., Gómez-Laguna, J., Barrero-Domínguez, B., Galán-Relaño, A., Harmanus, C., Kuijper, E., & García, M. E. (2018). Distribution and tracking of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in a free-range pig abattoir and processing plant. *Food research international*, 113, 456-464. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.07.040>
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J. L., Harmanus, C., Kuijper, E., & García, M. E. (2017). Subtyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078/126 isolates of human and animal origin. *Veterinary Microbiology*, 199, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.001>

- Alves, F., Castro, R., Pinto, M., Nunes, A., Pomba, C., Oliveira, M., Silveira, L., Gomes, J. P., & Oleastro, M. (2023). Molecular epidemiology of *Clostridioides difficile* in companion animals: Genetic overlap with human strains and public health concerns. *Frontiers in Public Health*, *10*, 1070258. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1070258>
- Aminzadeh, A., & Jørgensen, R. (2021). Systematic Evaluation of Parameters Important for Production of Native Toxin A and Toxin B from *Clostridioides difficile*. *Toxins*, *13*(4), 240. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13040240/S1>
- Andrés-Lasheras, S., Martín-Burriel, I., Mainar-Jaime, R. C., Morales, M., Kuijper, E., Blanco, J. L., Chirino-Trejo, M., & Bolea, R. (2018). Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. *BMC Veterinary Research*, *14*, 77. <https://doi.org/10.1186/S12917-018-1402-7>
- Andrews, S. (s. f.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data* (0.12.0). Babraham Bioinformatics. Recuperado 21 de diciembre de 2023, de <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Anwar, S., Bryan, D., Rigsby, P., Dougall, T., & Rijpkema, S. (2021). Development and verification of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of toxoid A and toxoid B from *Clostridioides difficile*. *Journal of Immunological Methods*, *488*, 112917. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112917>
- Arato, V., Gasperini, G., Giusti, F., Ferlenghi, I., Scarselli, M., & Leuzzi, R. (2019). Dual role of the colonization factor CD2831 in *Clostridium difficile* pathogenesis. *Scientific Reports*, *9*, 5554. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42000-8>
- Asensio, Á., & Monge, D. (2012). Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *30*(6), 333-337. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2011.09.010>
- Asensio, Á., Vallejo-Plaza, A., Parra, L. M., Ortí-Lucas, R., Salcedo, I., Ramos, A., & Cantero, M. (2022). Epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients in Spain: An eight-year review (2012–2019). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *40*, 125-130. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2021.04.006>
- Azimirad, M., Krutova, M., Yadegar, A., Shahrokh, S., Olfatifar, M., Aghdaei, H. A., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., & Zali, M. R. (2020). *Clostridioides difficile* ribotypes 001 and 126 were predominant in Tehran healthcare settings from 2004 to

- 2018: a 14-year-long cross-sectional study. *Emerging Microbes & Infections*, 9, 1432-1443. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780949>
- Baines, S. D., & Wilcox, M. H. (2015). Antimicrobial resistance and reduced susceptibility in *Clostridium difficile*: Potential consequences for induction, treatment, and recurrence of *C. difficile* infection. *Antibiotics*, 4, 267-298. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS4030267>
- Baker, S. J., & Chu, D. I. (2020). Physical, Laboratory, Radiographic, and Endoscopic Workup for *Clostridium difficile* Colitis. *Clinics in colon and rectal surgery*, 33(2), 82-86. <https://doi.org/10.1055/S-0039-3400474>
- Baktash, A., Corver, J., Harmanus, C., Smits, W. K., Fawley, W., Wilcox, M. H., Kumar, N., Eyre, D. W., Indra, A., Mellmann, A., & Kuijper, E. J. (2022). Comparison of whole-genome sequence-based methods and PCR ribotyping for subtyping of *Clostridioides difficile*. *Journal of clinical microbiology*, 60(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.01737-21>
- Baldan, R., Trovato, A., Bianchini, V., Biancardi, A., Cichero, P., Mazzotti, M., Nizzero, P., Moro, M., Ossi, C., Scarpellini, P., & Cirillo, D. M. (2015). *Clostridium difficile* PCR Ribotype 018, a successful epidemic genotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2575-2580. <https://doi.org/10.1128/JCM.00533-15>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Banz, A., Lantz, A., Riou, B., Foussadier, A., Miller, M., Davies, K., & Wilcox, M. (2018). Sensitivity of single-molecule array assays for detection of *Clostridium difficile* toxins in comparison to conventional laboratory testing algorithms. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.00452-18>
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R., & Stiles, B. G. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), 373-402. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004>
- 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.
<https://doi.org/10.2746/042516403775600505>
- Berry, A. P., & Levett, P. N. (1986). Chronic diarrhoea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *The Veterinary record*, 118(4), 102-103.
<https://doi.org/10.1136/VR.118.4.102>
- Bidet, P., Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B., & Petit, J.-C. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters*, 175(2), 261-266.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB13629.X>
- Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., & García, M. E. (2013). Is the prevalence of *Clostridium difficile* in animals underestimated? *The Veterinary Journal*, 197(3), 694-698.
<https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2013.03.053>
- Blau, K., Berger, F. K., Mellmann, A., & Gallert, C. (2023). *Clostridioides difficile* from Fecally Contaminated Environmental Sources: Resistance and Genetic Relatedness from a Molecular Epidemiological Perspective. *Microorganisms*, 11, 2497.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11102497>
- Bolton, D., & Marcos, P. (2023). The Environment, Farm Animals and Foods as Sources of *Clostridioides difficile* Infection in Humans. *Foods*, 12(5), 1094.
<https://doi.org/10.3390/FOODS12051094>
- Bouillaut, L., Dubois, T., Sonenshein, A. L., & Dupuy, B. (2015). Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Research in Microbiology*, 166(4), 375-383. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.002>
- Bouza, E., Marín, M., Peláez, T., & Alcalá, L. (2013). The situation and management of *Clostridium difficile* infection in Spain: an opinion document. *Revista española de quimioterapia*, 26(3), 261-286.
www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile
- Brgles, M., Prebeg, P., Kurtović, T., Ranić, J., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., & Halassy, B. (2016). Optimization of tetanus toxoid ammonium sulfate precipitation process using response surface methodology. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 46(7), 695-703. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135452>
- Brown, A. W. W., & Wilson, R. B. (2018). *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—a narrative review. *Gastroenterology Report*, 6(3), 157-166.
<https://doi.org/10.1093/GASTRO/GOY016>

- Buddle, J. E., & Fagan, R. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, *14*(1), 2150452. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>
- Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *13*(11), 790-801. <https://doi.org/10.1038/NRI3535>
- Canal, M., Taberner, E., Gibert, X., Roca, M., & Sitjà, M. (s. f.). Efficacy of Suiseng® Diff/A vaccine and its associated use with Suiseng® Coli/C against *C. difficile* and *C. perfringens* type A. *HIPRA*. <https://www.hipra.com/en/animal-health/knowledge/efficacy-suiseng-diffa-vaccine-and-its-associated-use-suiseng-colic-against>
- Carter, G. P., Lyras, D., Allen, D. L., Mackin, K. E., Howarth, P. M., O'Connor, J. R., & Rood, J. I. (2007). Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *Journal of bacteriology*, *189*(20), 7290-7301. <https://doi.org/10.1128/JB.00731-07>
- Carvalho, G. M., Ramos, C. P., Lobato, F. C. F., Guedes, R. M. C., Giaretta, P. R., & Silva, R. O. S. (2022). Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. *Anaerobe*, *75*, 102574. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2022.102574>
- Cave, N. J., Marks, S. L., Kass, P. H., Melli, A. C., & Brophy, M. A. (2002). Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *221*(1), 52-59. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.52>
- Chaparro-Rojas, F., & Mullane, K. M. (2013). Emerging therapies for *Clostridium difficile* infection – focus on fidaxomicin. *Infection and Drug Resistance*, *6*, 41-53. <https://doi.org/10.2147/IDR.S24434>
- Chapin, R. W., Lee, T., McCoy, C., Alonso, C. D., & Mahoney, M. V. (2017). Bezlotoxumab: Could This be the Answer for *Clostridium difficile* Recurrence? *The Annals of pharmacotherapy*, *51*(9), 804-810. <https://doi.org/10.1177/1060028017706374>
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, *33*, 325-328. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>

- Chen, P., Lam, K. ho, Liu, Z., Mindlin, F. A., Chen, B., Gutierrez, C. B., Huang, L., Zhang, Y., Hamza, T., Feng, H., Matsui, T., Bowen, M. E., Perry, K., & Jin, R. (2019). Structure of the full-length *Clostridium difficile* toxin B. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(8), 712-719. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0268-0>
- Chen, P., Tao, L., Wang, T., Zhang, J., He, A., Lam, K. ho, Liu, Z., He, X., Perry, K., Dong, M., & Jin, R. (2018). Structural basis for recognition of frizzled proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Science*, 360(6389), 664-669. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1254211>
- Chen, W., Liu, W. E., Li, Y. M., Luo, S., & Zhong, Y. M. (2015). Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies to the receptor binding region of *Clostridium difficile* toxin B. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7712-7720. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.4369>
- Chouicha, N., & Marks, S. L. (2006). Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(2), 182-188. <https://doi.org/10.1177/104063870601800207>
- Claro, T., Daniels, S., & Humphreys, H. (2014). Detecting *Clostridium difficile* spores from inanimate surfaces of the hospital environment: Which method is best? *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3426-3428. <https://doi.org/10.1128/JCM.01011-14>
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. E. (1994). The Phylogeny of the Genus. *Genus*, 44(4), 812-826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- Comunidad de Madrid. (s. f.). *Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas | Hospital General Universitario Gregorio Marañón*. Recuperado 7 de febrero de 2025, de <https://www.comunidad.madrid/hospital/gregoriomaranon/profesionales/relacion-especialidades/microbiologia-clinica-enfermedades-infecciosas>
- Crobach, M. J. T., Baktash, A., Duszenko, N., & Kuijper, E. J. (2018). Diagnostic guidance for *C. difficile* infections. En P. Mastrantonio & M. Rupnik (Eds.), *Updates on Clostridium difficile in Europe* (Vol. 1050, pp 27-44). Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_3
- Crobach, M. J. T., Planche, T., Eckert, C., Barbut, F., Terveer, E. M., Dekkers, O. M., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2016). European Society of Clinical Microbiology

- and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, S63-S81. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010>
- Croucher, N. J., Page, A. J., Connor, T. R., Delaney, A. J., Keane, J. A., Bentley, S. D., Parkhill, J., & Harris, S. R. (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research*, 43(3), e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultańska, D., Garlicki, A., & Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(7), 1211-1221. <https://doi.org/10.1007/S10096-019-03539-6>
- Daas, A., Behr- Gross ME, Bruckner, L., & Redhead, K. (2020). Collaborative study for the validation of cell line assays for in-process toxicity and antigenicity testing of *Clostridium septicum* vaccine antigens – Part 1. *Pharmeuropa bio & scientific notes*, 2020, 53-124. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32589137/>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 10(2), 1-4. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Davies, K. A., Ashwin, H., Longshaw, C. M., Burns, D. A., Davis, G. L., & Wilcox, M. H. (2016). Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Eurosurveillance*, 29(21), pii=30294. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294>
- Dayananda, P., & Wilcox, M. H. (2019). A Review of Mixed Strain *Clostridium difficile* Colonization and Infection. *Frontiers in Microbiology*, 10, 692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00692>
- Deakin, L. J., Clare, S., Fagan, R. P., Dawson, L. F., Pickard, D. J., West, M. R., Wren, B. W., Fairweather, N. F., Dougan, G., & Lawley, T. D. (2012). The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infection and Immunity*, 80(8), 2704-2711. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-12>
- Debast, S. B., Van Leengoed, L. A. M. G., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E. J., & Bergwerff, A. A. (2009). *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found

- in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental Microbiology*, 11(2), 505-511. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01790.X>
- Dembek, M., Stabler, R. A., Witney, A. A., Wren, B. W., & Fairweather, N. F. (2013). Transcriptional Analysis of Temporal Gene Expression in Germinating *Clostridium difficile* 630 Endospores. *PLoS ONE*, 8(5), e64011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064011>
- Denève, C., Deloménie, C., Barc, M.-C., Collignon, A., & Janoir, C. (2008). Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 732-738. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47676-0>
- Dingle, K. E., Didelot, X., Quan, T. P., Eyre, D. W., Stoesser, N., Marwick, C. A., Coia, J., Brown, D., Buchanan, S., Ijaz, U. Z., Goswami, C., Douce, G., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., Peto, T. E. A., Walker, A. S., & Crook, D. W. (2019). A role for tetracycline selection in recent evolution of agriculture-associated *Clostridium difficile* PCR ribotype 078. *mBio*, 10, e02790-18. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02790-18>
- Donald, R. G. K., Flint, M., Kalyan, N., Johnson, E., Witko, S. E., Kotash, C., Zhao, P., Megati, S., Yurgelonis, I., Lee, P. K., Matsuka, Y. V., Severina, E., Deatly, A., Sidhu, M., Jansen, K. U., Minton, N. P., & Anderson, A. S. (2013). A novel approach to generate a recombinant toxoid vaccine against *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 159, 1254-1266. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.066712-0>
- Donta, S. T., Sullivan, N., & Wilkins, T. D. (1982). Differential Effects of *Clostridium difficile* Toxins on Tissue-Cultured Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(6), 1157-1158. [https://doi.org/0095-1137/82/061157-02\\$02.00/0](https://doi.org/0095-1137/82/061157-02$02.00/0)
- Dureja, C., Olaitan, A. O., & Hurdle, J. G. (2022). Mechanisms and impact of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Current Opinion in Microbiology*, 66, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.004>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2022). *Clostridioides difficile* infections: Annual Epidemiological Report for 2016-2017. Stockholm. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/clostridioides-difficile-infections.pdf>
- Egerer, M., Giesemann, T., Jank, T., Fullner Satchell, K. J., & Aktories, K. (2007). Auto-catalytic Cleavage of *Clostridium difficile* Toxins A and B Depends on Cysteine

- Protease Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25314-25321. <https://doi.org/10.1074/JBC.M703062200>
- Elfassy, A., Kalina, W. V., French, R., Nguyen, H., Tan, C., Sebastian, S., Wilcox, M. H., Davies, K., Kutzler, M. A., Jansen, K. U., Anderson, A., & Pride, M. W. (2021). Development and clinical validation of an automated cell cytotoxicity neutralization assay for detecting *Clostridioides difficile* toxins in clinically relevant stools samples. *Anaerobe*, 71, 102415. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2021.102415>
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Letters*, 582(14), 2093-2101. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.039>
- Farooq, P. D., Urrunaga, N. H., Tang, D. M., & von Rosenvinge, E. C. (2015). Pseudomembranous colitis. *Disease-a-month*, 61(5), 181-206. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2015.01.006>
- Fawley, W. N., Knetsch, C. W., MacCannell, D. R., Harmanus, C., Du, T., Mulvey, M. R., Paulick, A., Anderson, L., Kuijper, E. J., & Wilcox, M. H. (2015). Development and Validation of an Internationally-Standardized, High-Resolution Capillary Gel-Based Electrophoresis PCR-Ribotyping Protocol for *Clostridium difficile*. *PLOS ONE*, 10(2), e0118150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118150>
- FDA. (s. f.). *Fecal Microbiota Products*. Recuperado 7 de marzo de 2025, de <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/fecal-microbiota-products>
- Feuerstadt, P., Theriault, N., & Tillotson, G. (2023). The burden of CDI in the United States: a multifactorial challenge. *BMC Infectious Diseases*, 23, 132. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08096-0>
- Fitzpatrick, F., Brennan, R., van Prehn, J., Skally, M., Brady, M., Burns, K., Rooney, C., & Wilcox, M. H. (2024). European Practice for CDI Treatment. *Advances in experimental medicine and biology*, 1435, 57-84. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42108-2_4
- Freeman, J., & Wilcox, M. H. (2003). The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *Journal of clinical pathology*, 56(2), 126-128. <https://doi.org/10.1136/JCP.56.2.126>
- Frentrup, M., Zhou, Z., Steglich, M., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Riedel, T., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., Blaschitz, M., Indra, A., von Müller, L., Kohl, T. A., Niemann, S., Seyboldt, C., Klawonn, F., Kumar, N., Lawley, T. D., García-Fernández, S., ... Nübel, U. (2020). A publicly accessible database for

- Clostridioides difficile* genome sequences supports tracing of transmission chains and epidemics. *Microbial Genomics*, 6(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000410>
- Fu, S.-W. (2004). Development of an ELISA kit using monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A. *World Journal of Gastroenterology*, 10(18), 2747-2749. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i18.2747>
- Fühner, V., Heine, P. A., Helmsing, S., Goy, S., Heidepriem, J., Loeffler, F. F., Dübel, S., Gerhard, R., & Hust, M. (2018). Development of neutralizing and non-neutralizing antibodies targeting known and novel epitopes of TcdB of *Clostridioides difficile*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2908. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02908>
- Galfrè, G., & Milstein, C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Methods in Enzymology*, 73, 3-46. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)73054-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)73054-4)
- García-Fernández, S., Frentrup, M., Steglich, M., Gonzaga, A., Cobo, M., López-Fresneña, N., Cobo, J., Morosini, M.-I., Cantón, R., del Campo, R., & Nübel, U. (2019). Whole-genome sequencing reveals nosocomial *Clostridioides difficile* transmission and a previously unsuspected epidemic scenario. *Scientific Reports*, 9(6959). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43464-4>
- Genisyuerk, S., Papatheodorou, P., Guttenberg, G., Schubert, R., Benz, R., & Aktories, K. (2011). Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1643-1654. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07549.X>
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, 5(1), 15-27. <https://doi.org/10.4161/GMIC.26854>
- Gieseemann, T., Egerer, M., Jank, T., & Aktories, K. (2008). Processing of *Clostridium difficile* toxins. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 690-696. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47742-0>
- Gil, F., Lagos-Moraga, S., Calderón-Romero, P., Pizarro-Guajardo, M., & Paredes-Sabja, D. (2017). Updates on *Clostridium difficile* spore biology. *Anaerobe*, 45, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.018>
- Goding, J. W. (1980). Antibody production by hybridomas. *Journal of immunological methods*, 39(4), 285-308. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90230-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90230-6)
- Goding, J. W. (2004). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. En *Academic Press*.

- Greco, A., Ho, J. G. S., Lin, S. J., Palcic, M. M., Rupnik, M., & Ng, K. K. S. (2006). Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(5), 460-461. <https://doi.org/10.1038/nsmb1084>
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D. W., Fung, R., Golubchik, T., Harding, R. M., Jeffery, K. J. M., Jolley, K. A., Kirton, R., Peto, T. E., Rees, G., Stoesser, N., Vaughan, A., Walker, A. S., Young, B. C., Wilcox, M., & Dingle, K. E. (2010). Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 770-778. <https://doi.org/10.1128/JCM.01796-09>
- Grzeškowiak, Ł., Riedmüller, J., Vahjen, W., & Zentek, J. (2020). Storage procedures and time influence the detectability of *Clostridium difficile* toxin A but not toxin B in porcine fecal specimens. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 32(2), 222-225. <https://doi.org/10.1177/1040638719864383>
- Gu, W., Li, W., Jia, S., Zhou, Y., Yin, J., Wu, Y., & Fu, X. (2022). Antibiotic resistance and genomic features of *Clostridioides difficile* in southwest China. *PeerJ*, 10, e14016. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.14016>
- Gupta, P., Zhang, Z., Sugiman-Marangos, S. N., Tam, J., Raman, S., Julien, J. P., Kroh, H. K., Lacy, D. B., Murgolo, N., Bekkari, K., Therien, A. G., Hernandez, L. D., & Melnyk, R. A. (2017). Functional defects in *Clostridium difficile* TcdB toxin uptake identify CSPG4 receptor-binding determinants. *Journal of Biological Chemistry*, 292(42), 17290-17301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806687>
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212-220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT086>
- Hall, I. C., & O'Toole, E. (1935). Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Diseases of Children*, 49(2), 390-402. <https://doi.org/10.1001/ARCHPEDI.1935.01970020105010>

- Hatheway, C. L. (1976). Toxoid of *Clostridium botulinum* type F: purification and immunogenicity studies. *Applied and environmental microbiology*, 31(2), 234-242. <https://doi.org/10.1128/AEM.31.2.234-242.1976>
- Hensbergen, P. J., Klychnikov, O. I., Bakker, D., Dragan, I., Kelly, M. L., Minton, N. P., Corver, J., Kuijper, E. J., Drijfhout, J. W., & Van Leeuwen, H. C. (2015). *Clostridium difficile* secreted Pro-Pro endopeptidase PPEP-1 (ZMP1/CD2830) modulates adhesion through cleavage of the collagen binding protein CD2831. *FEBS Letters*, 589, 3952-3958. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.10.027>
- Hernández, L. D., Racine, F., Xiao, L., Dinunzio, E., Hairston, N., Sheth, P. R., Murgolo, N. J., & Therien, A. G. (2015). Broad Coverage of Genetically Diverse Strains of *Clostridium difficile* by Actoxumab and Bezlotoxumab Predicted by In Vitro Neutralization and Epitope Modeling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1052-1060. <https://doi.org/10.1128/AAC.04433-14>
- Ho, J. G. S., Greco, A., Rupnik, M., & Ng, K. K. S. (2005). Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18373-18378. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506391102>
- Hofmann, F., Busch, C., Prepens, U., Just, I., & Aktories, K. (1997). Localization of the Glucosyltransferase Activity of *Clostridium difficile* Toxin B to the N-terminal Part of the Holotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11074-11078. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.17.11074>
- Hookman, P., & Barkin, J. S. (2009). *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 15(13), 1554-1580. <https://doi.org/10.3748/WJG.15.1554>
- Huber, C. A., Foster, N. F., Riley, T. V., & Paterson, D. L. (2013). Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2810-2814. <https://doi.org/10.1128/JCM.00143-13>
- Imwattana, K., Kiratisin, P., Riley, T. V., & Knight, D. R. (2020). Genomic basis of antimicrobial resistance in non-toxigenic *Clostridium difficile* in Southeast Asia. *Anaerobe*, 66, 102290. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102290>
- Imwattana, K., Knight, D. R., Kullin, B., Collins, D. A., Putsathit, P., Kiratisin, P., & Riley, T. V. (2020). Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile* ribotype 017. *Expert review of anti-infective therapy*, 18(1), 17-25. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1701436>

- Indra, A., Huhulescu, S., Schneeweis, M., Hasenberger, P., Kembichler, S., Fiedler, A., Wewalka, G., Allerberger, F., & Kuijper, E. J. (2008). Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *Journal of Medical Microbiology*, 57(11), 1377-1382. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47714-0>
- Jacek, C., Drózd, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Goldman, S., Mielimonka, A., Wultańska, D., Garlicki, A., & Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *Emerging Infections* 10, 265-294. <https://doi.org/10.1128/9781555819453.ch15>
- Janezic, S., Dingle, K., Alvin, J., Accetto, T., Didelot, X., Crook, D. W., Borden Lacy, D., & Rupnik, M. (2020). Comparative genomics of *Clostridioides difficile* toxinotypes identifies module-based toxin gene evolution. *Microbial Genomics*, 6(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000449>
- Janezic, S., & Rupnik, M. (2010). Molecular Typing Methods for *Clostridium difficile*: Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR Ribotyping. En P. Mullany & A. P. Roberts (Eds.), *Clostridium difficile*. Methods in Molecular Biology (Vol. 646, pp. 55-65). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-365-7_4
- Janoir, C. (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 37, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11, 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>
- Jones, A. M., Kuijper, E. J., & Wilcox, M. H. (2013). *Clostridium difficile*: A European perspective. *Journal of Infection*, 66(2), 115-128. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.019>
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Eichel-Streiber, C. Von, Mann, M., & Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, 375(6531), 500-503. <https://doi.org/10.1038/375500A0>
- Kachrimanidou, M., Tzika, E., & Filioussis, G. (2019). *Clostridioides (Clostridium) difficile* in food-producing animals, horses and household pets: A comprehensive review. *Microorganisms*, 7(12), 667. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7120667>

- Kamiya, S. (2023). Microbial ecology between *Clostridioides difficile* and gut microbiota. *Bioscience of microbiota, food and health*, 42(4), 229-235. <https://doi.org/10.12938/BMFH.2023-033>
- Karczewski, J., Zorman, J., Wang, S., Mizejewski, M., Xie, J., Soring, K., Petrescu, I., Rogers, I., Thiriou, D. S., Cook, J. C., Chamberlin, M., Xoconostle, R. F., Nahas, D. D., Joyce, J. G., Bodmer, J.-L., Heinrichs, J. H., & Secore, S. (2014). Development of a recombinant toxin fragment vaccine for *Clostridium difficile* infection. *Vaccine*, 32(24), 2812-2818. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.026>
- Karlsson, S., Burman, L. G., & Åkerlund, T. (1999). Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiology*, 145(7), 1683-1693. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1683>
- Karlsson, S., Lindberg, A., Norin, E., Burman, L. G., & Åkerlund, T. (2000). Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 68(10), 5881-5888. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5881-5888.2000>
- Kecerova, Z., Cizek, A., Nyc, O., & Krutova, M. (2019). *Clostridium difficile* isolates derived from Czech horses are resistant to enrofloxacin; cluster to clades 1 and 5 and ribotype 033 predominates. *Anaerobe*, 56, 17-21. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2019.01.005>
- Keessen, E. C., Gaastra, W., & Lipman, L. J. A. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), 205-217. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.03.020>
- Keessen, E. C., Harmanus, C., Dohmen, W., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. A. (2013). *Clostridium difficile* Infection Associated with Pig Farms. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6), 1032-1034. <https://doi.org/10.3201/EID1906.121645>
- Keessen, E. C., Hopman, N. E. M., Van Leengoed, L. A. M. G., Van Asten, A. J. A. M., Hermanus, C., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. A. (2011). Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *Journal of clinical microbiology*, 49(5), 1816-1821. <https://doi.org/10.1128/JCM.00242-11>
- Kelly, C. P. (2012). Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clinical microbiology and infection*, 18(Suppl. 6), 21-27. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12046>

- Kelly, C. P., & Kyne, L. (2011). The host immune response to *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(8), 1070-1079. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030015-0>
- Kim, Y., Yang, M., Goyal, S. M., Cheeran, M. C.-J., & Torremorell, M. (2017). Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus. *BMC Veterinary Research*, 13(89). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1017-4>
- Kirk, J. A., Banerji, O., & Fagan, R. P. (2017). Characteristics of the *Clostridium difficile* cell envelope and its importance in therapeutics. *Microbial Biotechnology*, 10(1), 76-90. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12372>
- Knetsch, C. W., Connor, T. R., Mutreja, A., van Dorp, S. M., Sanders, I. M., Browne, H. P., Harris, D., Lipman, L., Keessen, E. C., Corver, J., Kuijper, E. J., & Lawley, T. D. (2014). Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Eurosurveillance*, 19(45), pii=20954. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.45.20954>
- Knetsch, C. W., Kumar, N., Forster, S. C., Connor, T. R., Browne, H. P., Harmanus, C., Sanders, I. M., Harris, S. R., Turner, L., Morris, T., Perry, M., Miyajima, F., Roberts, P., Pirmohamed, M., Songer, J. G., Weese, J. S., Indra, A., Corver, J., Rupnik, M., ... Lawley, T. D. (2018). Zoonotic transfer of *Clostridium difficile* harboring antimicrobial resistance between farm animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3), e01384-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-17>
- Knight, D. R., Kullin, B., Androga, G. O., Barbut, F., Eckert, C., Johnson, S., Spigaglia, P., Tateda, K., Tsai, P. J., & Riley, T. V. (2019). Evolutionary and genomic insights into *Clostridioides difficile* sequence type 11: A diverse zoonotic and antimicrobial-resistant lineage of global one health importance. *mBio*, 10(2), e00446-19. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00446-19>
- Knight, D. R., & Riley, T. V. (2013). Prevalence of Gastrointestinal *Clostridium difficile* Carriage in Australian Sheep and Lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5689-5692. <https://doi.org/10.1128/AEM.01888-13>
- Kotloff, K. L., Wasserman, S. S., Losonsky, G. A., Thomas W., J., Nichols, R., Edelman, R., Bridwell, M., & Monath, T. P. (2001). Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults.

- Infection and immunity*, 69(2), 988-995. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.988-995.2001>
- Kovacs-Simon, A., Leuzzi, R., Kasendra, M., Minton, N., Titball, R. W., & Michell, S. L. (2014). Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *Journal of Infectious Diseases*, 210(2), 274-284. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu070>
- Kroh, H. K., Chandrasekaran, R., Zhang, Z., Rosenthal, K., Woods, R., Jin, X., Nyborg, A. C., Rainey, G. J., Warrenner, P., Melnyk, R. A., Spiller, B. W., & Lacy, D. B. (2018). A neutralizing antibody that blocks delivery of the enzymatic cargo of *Clostridium difficile* toxin TcdB into host cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293(3), 941-952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813428>
- Kuehne, S. A., Collery, M. M., Kelly, M. L., Cartman, S. T., Cockayne, A., & Minton, N. P. (2014). Importance of Toxin A, Toxin B, and CDT in Virulence of an Epidemic *Clostridium difficile* Strain. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(1), 83-86. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT426>
- Kuehne, S. A., Dempster, A. W., Collery, M. M., Joshi, N., Jowett, J., Kelly, M. L., Cave, R., Longshaw, C. M., & Minton, N. P. (2018). Characterization of the impact of rpoB mutations on the in vitro and in vivo competitive fitness of *Clostridium difficile* and susceptibility to fidaxomicin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4), 973-980. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX486>
- Kuijper, E. J., Coignard, B., Tüll, P., Poxton, I., Brazier, J., Duerden, B., Delmée, M., Mastrantonio, P., Gastmeier, P., Barbut, F., Rupnik, M., Suetens, C., Collignon, A., McDonald, C., Gerding, D. N., Tjallie van der Kooi, I., van den Hof, S., Notermans, D. W., Pearson, A., ... Minton, N. (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical microbiology and infection*, 12(Suppl. 6), 2-18. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2006.01580.X>
- Kuijper, E. J., van den Berg, R. J., & Brazier, J. S. (2009). Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. En D. Caugant (Ed.), *Molecular epidemiology of microorganisms*. Methods in molecular biology (Vol. 551, pp. 159-171). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_13
- LaFrance, M. E., Farrow, M. A., Chandrasekaran, R., Sheng, J., Rubin, D. H., & Lacy, D. B. (2015). Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22), 7073-7078. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1500791112>

- Lawley, T. D., Clare, S., Walker, A. W., Goulding, D., Stabler, R. A., Croucher, N., Mastroeni, P., Scott, P., Raisen, C., Mottram, L., Fairweather, N. F., Wren, B. W., Parkhill, J., & Dougan, G. (2009). Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infection and Immunity*, 77(9), 3661-3669. <https://doi.org/10.1128/IAI.00558-09>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Lawson, P. A., & Rainey, F. A. (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* *prazmowski* to *Clostridium butyricum* and related species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1009-1016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000824>
- Leffler, D. A., & Lamont, J. T. (2015). *Clostridium difficile* infection. *The New England journal of medicine*, 372(16), 1539-1548. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772>
- Legaria, M. C., Rollet, R., Di Martino, A., Castello, L., Barberis, C., Rossetti, M. A., Guardati, M. C., Fernández Canigia, L., Carloni, G., Litterio, M., Rocchi, M., Anchart, E. G., Trejo, F. M., Minnaard, J., Klajn, D., & Predari, S. C. (2018). Detection of toxigenic *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile*: Usefulness of two commercially available enzyme immunoassays and a PCR assay on stool samples and stool isolates. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 36-44. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2017.01.002>
- Leslie, A. G. W., Moody, P. C. E., & Shaw, W. V. (1988). Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4133-4137. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.12.4133>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Lew, T., Putsathit, P., Sohn, K. M., Wu, Y., Ouchi, K., Ishii, Y., Tated, K., Riley, T. V., & Collins, D. A. (2020). Antimicrobial susceptibilities of *Clostridium difficile* isolates from 12 Asia-Pacific countries in 2014 and 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), e00296-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-20>

- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, S., Shi, L., Yang, Z., Zhang, Y., Perez-Cordon, G., Huang, T., Ramsey, J., Oezguen, N., Savidge, T. C., & Feng, H. (2015). Critical Roles of *Clostridium difficile* Toxin B Enzymatic Activities in Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 83(2), 502-513. <https://doi.org/10.1128/IAI.02316-14>
- Li, Z., Lee, K., Rajyaguru, U., Jones, C. H., Janezic, S., Rupnik, M., Anderson, A. S., & Liberator, P. (2020). Ribotype classification of *Clostridioides difficile* Isolates is not predictive of the amino acid sequence diversity of the toxin virulence factors TcdA and TcdB. *Frontiers in microbiology*, 11, 1310. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01310>
- Liang, W., Quan, K., Zhao, Q., Wu, Y., Mu, Y., & Cao, S. (2022). Development of a double-antibody sandwich ELISA targeting the receptor binding domain of TcdB toxin of ST11 type *Clostridium difficile* of porcine origin. *Chinese journal of biotechnology*, 38(1), 185-195. <https://doi.org/10.13345/J.CJB.210363>
- Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 857-863. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.10.023>
- Lima, A. A. M., Lysterly, D. M., Wilkins, T. D., Innes, D. J., & Guerrant, R. L. (1988). Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infection and immunity*, 56(3), 582-588. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.3.582-588.1988>
- Liu, Y. W., Chen, Y. H., Chen, J. W., Tsai, P. J., & Huang, I. H. (2017). Immunization with recombinant TcdB-encapsulated nanocomplex induces protection against *Clostridium difficile* challenge in a mouse model. *Frontiers in microbiology*, 8(1411). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01411>
- Louie, T. J., Miller, M. A., Mullane, K. M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P., & Shue, Y.-K. (2011). Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *The New England journal of medicine*, 364(5), 422-431. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0910812>

- Lyerly, D. M., Phelps, C. J., Toth, J., & Wilkins, T. D. (1986). Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 54(1), 70-76. <https://doi.org/10.1128/iai.54.1.70-76.1986>
- Lyras, D., Storie, C., Huggins, A. S., Crellin, P. K., Bannam, T. L., & Rood, J. I. (1998). Chloramphenicol resistance in *Clostridium difficile* is encoded on Tn4453 transposons that are closely related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(7), 1563-1567. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.7.1563>
- Marcos, P., Whyte, P., Burgess, C., Ekhlās, D., & Bolton, D. (2022). Detection and genomic characterisation of *Clostridioides difficile* from spinach fields. *Pathogens*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11111310>
- Marks, S. L., Kather, E. J., Kass, P. H., & Melli, A. C. (2002). Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(5), 533-540. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02383.x>
- Marks, S. L., Rankin, S. C., Byrne, B. A., & Weese, J. S. (2011). Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(6), 1195-1208. <https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2011.00821.X>
- McArthur, A. G., Wagglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J. V., Spanogiannopoulos, P., ... Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348-3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., Dubberke, E. R., Garey, K. W., Gould, C. V., Kelly, C., Loo, V., Shaklee Sammons, J., Sandora, T. J., & Wilcox, M. H. (2018). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, 66(7), e1-e48. <https://doi.org/10.1093/CID/CIX1085>

- Medina-Torres, C. E., Weese, J. S., & Staempfli, H. R. (2011). Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Veterinary microbiology*, 152(1-2), 212-215. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.04.012>
- Mitchell, T. J., Ketley, J. M., Haslam, S. C., Stephen, J., Burdon, D. W., Candy, D. C., & Daniel, R. (1986). Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut*, 27(1), 78-85. <https://doi.org/10.1136/GUT.27.1.78>
- Moura, H., Terilli, R. R., Woolfitt, A. R., Williamson, Y. M., Wagner, G., Blake, T. A., Solano, M. I., & Barr, J. R. (2013). Proteomic Analysis and Label-Free Quantification of the Large *Clostridium difficile* Toxins. *International Journal of Proteomics*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/293782>
- Neely, F., Lambert, M. L., Van Broeck, J., & Delmée, M. (2017). Clinical and laboratory features of the most common *Clostridium difficile* ribotypes isolated in Belgium. *Journal of Hospital Infection*, 95(4), 394-399. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2016.12.011>
- Nelson, W. W., Scott, T. A., Boules, M., Unni, S., Teigland, C., Parente, A., & Feuerstadt, P. (2021). Health care resource utilization and costs of recurrent *Clostridioides difficile* infection in the elderly: a real-world claims analysis. *Journal of managed care & specialty pharmacy*, 27(7), 828-838. <https://doi.org/10.18553/JMCP.2021.20395>
- Nishida, A., Nishino, K., Ohno, M., Sakai, K., Owaki, Y., Noda, Y., & Imaeda, H. (2022). Update on gut microbiota in gastrointestinal diseases. *World journal of clinical cases*, 10(22), 7653-7664. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V10.I22.7653>
- O'Grady, K., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2021). Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40, 2459-2478. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04311-5>
- Oldfield IV, E., Oldfield III, E., & Johnson, D. (2014). Clinical update for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 5(1), 1-26. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v5.i1.1>
- Oliphant, C. M., Green, G. M., Permanente, K., & Sloan, R. W. (2002). Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, 65(3), 455-465. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2002/0201/p455.html>
- Orden, C., Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Sainz, A., Villaescusa, A., Harmanus, C., Kuijper, E. & García, M. E. (2017). Isolation of *Clostridium difficile* from dogs with digestive disorders, including stable

- metronidazole-resistant strains. *Anaerobe*, 43, 78-81.
<https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2016.12.008>
- Orden, C., Neila, C., Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., Harmanus, C., Kuijper, E. J., & García, M. E. (2018). Recreational sandboxes for children and dogs can be a source of epidemic ribotypes of *Clostridium difficile*. *Zoonoses and public health*, 65(1), 88-95. <https://doi.org/10.1111/ZPH.12374>
- Orrell, K. E., & Melnyk, R. A. (2021). Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiology and molecular biology reviews*, 85(3), e00064-21. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-21>
- Orth, P., Xiao, L., Hernandez, L. D., Reichert, P., Sheth, P. R., Beaumont, M., Yang, X., Murgolo, N., Ermakov, G., Dinunzio, E., Racine, F., Karczewski, J., Secore, S., Ingram, R. N., Mayhood, T., Strickland, C., & Therien, A. G. (2014). Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* Toxin B-neutralizing antibody Bezlotoxumab revealed by X-ray Crystallography. *Journal of Biological Chemistry*, 289(26), 18008-18021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.560748>
- Ossipow, V., Laemmli, U. K., & Schibler, U. (1993). A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 21(25), 6040-6041. <https://doi.org/10.1093/nar/21.25.6040>
- Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y. W., & Suna, X. (2017). Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998-2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.02250-16>
- Persson, S., Torpdahl, M., & Olsen, K. E. P. (2008). New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1057-1064. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2008.02092.X>
- Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H., & Liddington, R. C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, 385(6619), 833-838. <https://doi.org/10.1038/385833A0>
- Polage, C. R., Gyorke, C. E., Kennedy, M. A., Leslie, J. L., Chin, D. L., Wang, S., Nguyen, H. H., Huang, B., Tang, Y. W., Lee, L. W., Kim, K., Taylor, S., Romano, P. S., Panacek, E. A., Goodell, P. B., Solnick, J. V., & Cohen, S. H. (2015). Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. *JAMA*

- internal medicine*, 175(11), 1792-1801.
<https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2015.4114>
- Putsathit, P., Hong, S., George, N., Hemphill, C., Huntington, P. G., Korman, T. M., Kotsanas, D., Lahra, M., McDougall, R., McGlinchey, A., Moore, C. V., Nimmo, G. R., Prendergast, L., Robson, J., Waring, L., Wehrhahn, M. C., Weldhagen, G. F., Wilson, R. M., Riley, T. V., & Knight, D. R. (2021). Antimicrobial resistance surveillance of *Clostridioides difficile* in Australia, 2015-18. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(7), 1815-1821.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkab099>
- Qa'dan, M., Spyles, L. M., & Ballard, J. D. (2000). pH-Induced conformational changes in *Clostridium difficile* Toxin B. *Infection and Immunity*, 68(5), 2470.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2470-2474.2000>
- Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J. M., & Hernández, M. (2019). TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics*, 35(21), 4207-4212. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTZ220>
- Quraishi, M. N., Widlak, M., Bhala, N., Moore, D., Price, M., Sharma, N., & Iqbal, T. H. (2017). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 46(5), 479-493.
<https://doi.org/10.1111/APT.14201>
- Ramos, C. P., Diniz, A. N., Leite, S. M., Lobato, F. C. F., Pereira, S. T., Rennó, M. C., de Oliveira Ferreira, E., & Silva, R. O. S. (2021). Evaluation of an immunochromatographic test for the detection of glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in dogs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2555-2558. <https://doi.org/10.1007/S42770-021-00615-Y>
- Ramos, C. P., Lopes, E. O., Oliveira Júnior, C. A., Diniz, A. N., Lobato, F. C. F., & Silva, R. O. S. (2020). Immunochromatographic test and ELISA for the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and A/B toxins as an alternative for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile*-associated diarrhea in foals and neonatal piglets. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1459-1462.
<https://doi.org/10.1007/S42770-020-00275-4>

- Rao, K., & Malani, P. N. (2020). Diagnosis and treatment of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in adults in 2020. *JAMA*, 323(14), 1403-1404. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2019.3849>
- Redding, L. E., Tu, V., Abbas, A., Alvarez, M., Zackular, J. P., Gu, C., Bushman, F. D., Kelly, D. J., Barnhart, D., Lee, J. J., & Bittinger, K. L. (2022). Genetic and phenotypic characteristics of *Clostridium (Clostridioides) difficile* from canine, bovine, and pediatric populations. *Anaerobe*, 102539. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2022.102539>
- Reineke, J., Tenzer, S., Rupnik, M., Koschinski, A., Hasselmayer, O., Schrattenholz, A., Schild, H., & Von Eichel-Streiber, C. (2007). Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, 446, 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature05622>
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., & Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in food and animals: A comprehensive review. En G. Donelli (Ed.), *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 932, pp. 65-92). Springer. https://doi.org/10.1007/5584_2016_27
- Rolfe, R. D., & Finegold, S. M. (1979). Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin. *Infection and immunity*, 25(1), 191-201. <https://doi.org/10.1128/IAI.25.1.191-201.1979>
- Romano, M., Leuzzi, R., Cappelletti, E., Tontini, M., Nilo, A., Proietti, D., Berti, F., Costantino, P., Adamo, R., & Scarselli, M. (2014). Recombinant *Clostridium difficile* toxin fragments as carrier protein for PSII surface polysaccharide preserve their neutralizing activity. *Toxins*, 6(4), 1385-1396. <https://doi.org/10.3390/toxins6041385>
- Rupnik, M. & Janezic S. (2016). An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 13-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.02083-15>
- Rüssmann, H., Panthel, K., Bader, R.-C., Schmitt, C., & Schaumann, R. (2007). Evaluation of three rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B in stool specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26, 115-119. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0251-7>
- Sadeghifard, N., Gürtler, V., Beer, M., & Seviour, R. J. (2006). The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number

- variation in *Clostridium difficile* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11). <https://doi.org/10.1128/AEM.01179-06>
- Sáez, C. (2024, junio 3). *Cuando un trasplante fecal te salva la vida*. SINC. <https://www.agenciasinc.es/Reportajes/Cuando-un-trasplante-fecal-te-salva-la-vida>
- Saha, S., Kapoor, S., Tariq, R., Schuetz, A. N., Tosh, P. K., Pardi, D. S., & Khanna, S. (2019). Increasing antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe*, 58, 35-46. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2019.102072>
- Sandhu, B. K., & McBride, S. M. (2018). *Clostridioides difficile*. *Trends in microbiology*, 26(12), 1049-1050. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.09.004>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR026>
- Schneeberg, A., Rupnik, M., Neubauer, H., & Seyboldt, C. (2012). Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, 18(5), 484-488. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2012.08.002>
- Schora, D. M., Peterson, L. R., & Usacheva, E. A. (2018). Immunological Stability of *Clostridium difficile* Toxins in Clinical Specimens. *Infection control and hospital epidemiology*, 39(4), 434-438. <https://doi.org/10.1017/ICE.2018.20>
- Schoster, A., Staempfli, H. R., Abrahams, M., Jalali, M., Weese, J. S., & Guardabassi, L. (2015). Effect of a probiotic on prevention of diarrhea and *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* shedding in foals. *Journal of veterinary internal medicine*, 29(3), 925-931. <https://doi.org/10.1111/JVIM.12584>
- Schwanbeck, J., Riedel, T., Laukien, F., Schober, I., Oehmig, I., Zimmermann, O., Overmann, J., Groß, U., Zautner, A. E., & Bohne, W. (2019). Characterization of a clinical *Clostridioides difficile* isolate with markedly reduced fidaxomicin susceptibility and a V1143D mutation in rpoB. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(1), 6-10. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKY375>
- Schweitzer, L., Gervais, P., Paquet-Bolduc, B., Loo, V. G., & Longtin, Y. (2021). Detection of Free Toxin B in the Stool of Asymptomatic *Clostridioides difficile* Carriers by the Cell Cytotoxicity Neutralization Assay. *Open forum infectious diseases*, 8(6). <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAB209>

- Seemann, T. (s. f.-a). *GitHub - tseemann/abricate: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes*. Recuperado 18 de diciembre de 2023, de <https://github.com/tseemann/abricate>
- Seemann, T. (s. f.-b). *GitHub - tseemann/mlst: Scan contig files against PubMLST typing schemes*. Recuperado 21 de diciembre de 2023, de <https://github.com/tseemann/mlst>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153>
- Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E., & Aktories, K. (1998). Glucosylation and ADP ribosylation of Rho proteins: Effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry*, 37(15), 5296-5304. <https://doi.org/10.1021/BI972592C>
- Senok, A. C., Aldosari, K. M., Alowaisheq, R. A., Abid, O. A., Alsuhaibani, K. A., Khan, M. A., & Somily, A. M. (2017). Detection of *Clostridium difficile* antigen and toxin in stool specimens: Comparison of the *C. difficile* quik chek complete enzyme immunoassay and GeneXpert *C. difficile* polymerase chain reaction assay. *Saudi journal of gastroenterology*, 23(4), 259-262. https://doi.org/10.4103/SJG.SJG_80_17
- Seth-Smith, H. M. B., Biggel, M., Roloff, T., Hinic, V., Bodmer, T., Risch, M., Casanova, C., Widmer, A., Sommerstein, R., Marschall, J., Tschudin-Sutter, S., & Egli, A. (2021). Transition from PCR-Ribotyping to Whole genome sequencing based typing of *Clostridioides difficile*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 681518. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.681518>
- Shetty, N., Wren, M. W. D., & Coen, P. G. (2011). The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: A meta-analysis. *Journal of Hospital Infection*, 77(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.07.024>
- Sigma-Aldrich. (s. f.). *Hybridoma Fusion Partners Cell Lines*. Recuperado 7 de marzo de 2025, de <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/hybridoma-fusion>
- Sinnathamby, E. S., Mason, J. W., Flanagan, C. J., Pearl, N. Z., Burroughs, C. R., De Witt, A. J., Wenger, D. M., Klapper, V. G., Ahmadzadeh, S., Varrassi, G., Shekoohi, S., & Kaye, A. (2023). *Clostridioides difficile* Infection: A Clinical Review of Pathogenesis, Clinical Considerations, and Treatment Strategies. *Cureus*, 15(12), e51167. <https://doi.org/10.7759/cureus.51167>

- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
- Song, L., Zhao, M., Duffy, D. C., Hansen, J., Shields, K., Wungjiranirun, M., Chen, X., Xu, H., Leffler, D. A., Sambol, S. P., Gerding, D. N., Kelly, C. P., & Pollock, N. R. (2015). Development and validation of digital enzyme-linked immunosorbent assays for ultrasensitive detection and quantification of *Clostridium difficile* toxins in stool. *Journal of clinical microbiology*, 53(10), 3204-3212. <https://doi.org/10.1128/JCM.01334-15>
- Songer, J. G., Post, K. W., & Larson, D. J. (2000). Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health and Production*, 8 (4), 185-189. <https://old.aasv.org/shap/issues/v8n4/v8n4p185.html>
- Spigaglia, P. (2016). Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 23-42. <https://doi.org/10.1177/2049936115622891>
- Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P., Ackermann, G., Balmelli, C., Barbut, F., Bouza, E., Brazier, J., Delmé, M., Drudy, D., Kuijper, E., Ladas, H., Mastrantonio, P., Nagy, E., Pituch, H., Poxton, I., Rupnik, M., Wullt, M., & Yucesoy, M. (2011). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2227-2234. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR292>
- Spigaglia, P., Mastrantonio, P., & Barbanti, F. (2018). Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. En P., Mastrantonio & M. Rupnik (Eds.), *Updates on Clostridium difficile in Europe*. Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 1050, pp. 137-159). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_9
- Stabler, R. A., Gerding, D. N., Songer, J. G., Drudy, D., Brazier, J. S., Trinh, H. T., Witney, A. A., Hinds, J., & Wren, B. W. (2006). Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *Journal of bacteriology*, 188(20), 7297-7305. <https://doi.org/10.1128/JB.00664-06>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

- Stare, B. G., Delmée, M., & Rupnik, M. (2007). Variant forms of the binary toxin CDT locus and *tdcC* gene in *Clostridium difficile* strains. *Journal of medical microbiology*, 56(3), 329-335. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.46931-0>
- Stein, K., Egan, S., Lynch, H., Harmanus, C., Kyne, L., Herra, C., McDermott, S., Kuijper, E., Fitzpatrick, F., FitzGerald, S., Fenelon, L., & Drudy, D. (2017). PCR-ribotype distribution of *Clostridium difficile* in Irish pigs. *Anaerobe*, 48, 237-241. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2017.10.004>
- Stubbs, S., Brazier, J., O'Neill, G., & Duerden, B. (1999). PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), 461-463. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.2.461-463.1999>
- Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., & Popoff, M. (2000). Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, 186(2), 307-312. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2000.TB09122.X>
- Suetens, C., Latour, K., Kärki, T., Ricchizzi, E., Kinross, P., Moro, M. L., Jans, B., Hopkins, S., Hansen, S., Lyytikäinen, O., Reilly, J., Deptula, A., Zingg, W., Plachouras, D., & Monnet, D. L. (2018). Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*, 23(46), pi= 1800516. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516>
- Sugimoto, N., Ozutsumi, K., & Matsufda, M. (1985). Purification by high performance liquid chromatography of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin prepared from high toxin producers selected by a toxin-antitoxin halo. *European Journal of Epidemiology*, 1(2), 131-138. <https://doi.org/10.1007/BF00141806>
- Sullivan, N. M., Pellett, S., & Wilkins, T. D. (1982). Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 35(3), 1032-1040. <https://doi.org/10.1128/iai.35.3.1032-1040.1982>
- Sun, X., Savidge, T., & Feng, H. (2010). The enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. *Toxins*, 2(7), 1848-1880. <https://doi.org/10.3390/TOXINS2071848>
- Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthkrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., McFarland, L. V., Mellow, M., & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile*

- infections. *The American journal of gastroenterology*, 108(4), 478-498.
<https://doi.org/10.1038/AJG.2013.4>
- Tao, L., Zhang, J., Meraner, P., Tovaglieri, A., Wu, X., Gerhard, R., Zhang, X., Stallcup, W. B., Miao, J., He, X., Hurdle, J. G., Breault, D. T., Brass, A. L., & Dong, M. (2016). Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature*, 538, 350-355. <https://doi.org/10.1038/nature19799>
- Tercero-Guerrero, D., Blanco, J. L., Hernández, M., Torre-Fuentes, L., Álvarez, J., & García, M. E. (2024). Whole-genome sequencing of toxigenic *Clostridioides difficile* reveals multidrug resistance and virulence genes in strains of environmental and animal origin. *BMC Veterinary Research*, 20, 479. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04332-0>
- Thapa, 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). <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>
- Thean, S., Elliott, B., & Riley, T. V. (2011). *Clostridium difficile* in horses in Australia—a preliminary study. *Journal of medical microbiology*, 60(8), 1188-1192. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.030908-0>
- Tickler, I. A., de la Cruz, C. M., Obradovich, A. E., Goering, R. V., Dewell, S., Le, V. M., Tenover, F. C., Anderson, J., Banaei, N., Bankowski, M., Dill, J. L., Harrington, A. T., Henthorne, M. A., Klutts, J. S., Koyamatsu, T., Overcast, R., Rekasius, V. J., & Rojzman, A. (2020). Presence of *Clostridioides difficile* and multidrug-resistant healthcare-associated pathogens in stool specimens from hospitalized patients in the USA. *Journal of Hospital Infection*, 106(1), 179-185. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2020.07.003>
- Toth, M., Stewart, N. K., Smith, C., & Vakulenko, S. B. (2018). Intrinsic Class D β -Lactamases of *Clostridium difficile*. *mBio*, 9(6), e01803-18. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01803-18>
- Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'Brien, M. J., & LaMont, J. T. (1987). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology*, 93(2), 273-279. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)91014-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)91014-6)
- Tulli, L., Marchi, S., Petracca, R., Shaw, H. A., Fairweather, N. F., Scarselli, M., Soriani, M., & Leuzzi, R. (2013). CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium*

- difficile* targeting human collagen. *Cellular Microbiology*, 15(10), 1674-1687.
<https://doi.org/10.1111/CMI.12139>
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Visser, C. E., Kuijper, E. J., Bartelsman, J. F., Tijssen, J. G., Speelman, P., Dijkgraaf, M. G. W., & Keller, J. J. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine*, 368(5), 407-415.
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA1205037>
- Vedantam, G., Clark, A., Chu, M., McQuade, R., Mallozzi, M., & Viswanathan, V. K. (2012). *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut microbes*, 3(2), 121-134. <https://doi.org/10.4161/GMIC.19399>
- Viprey, V. F., Granata, G., Vendrik, K. E. W., Davis, G. L., Petrosillo, N., Kuijper, E. J., Vilken, T., Lammens, C., Schotsman, J. J., Benson, A. D., Cataldo, M. A., van der Kooi, T. I. I., Wilcox, M. H., & Davies, K. A. (2023). European survey on the current surveillance practices, management guidelines, treatment pathways and heterogeneity of testing of *Clostridioides difficile*, 2018–2019: results from The Combatting Bacterial Resistance in Europe CDI (COMBACTE-CDI). *Journal of Hospital Infection*, 131, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.11.011>
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247-263.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
- Vuotto, C., Moura, I., Barbanti, F., Donelli, G., & Spigaglia, P. (2016). Subinhibitory concentrations of metronidazole increase biofilm formation in *Clostridium difficile* strains. *Pathogens and Disease*, 74(2), ftv114.
<https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTV114>
- Walk, S. T., Micic, D., Jain, R., Lo, E. S., Trivedi, I., Liu, E. W., Almassalha, L. M., Ewing, S. A., Ring, C., Galecki, A. T., Rogers, M. A. M., Washer, L., Newton, D. W., Malani, P. N., Young, V. B., & Aronoff, D. M. (2012). *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clinical Infectious Diseases*, 55(12), 1661-1668. <https://doi.org/10.1093/CID/CIS786>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

- Weese, J. S. (2020). *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 213-221. <https://doi.org/10.1177/1040638719899081>
- Weese, J. S., & Armstrong, J. (2003). Outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a small animal veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 813-816. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02519.x>
- Weese, J. S., Staempfli, H. R., & Prescott, J. F. (2001). A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine veterinary journal*, 33(4), 403-409. <https://doi.org/10.2746/042516401776249534>
- Weese, J. S., Staempfli, H. R., Prescott, J. F., Kruth, S. A., Greenwood, S. J., & Weese, H. E. (2001). The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(4), 374-378. <https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2001.TB02332.X>
- Wen, X., Shen, C., Xia, J., Zhong, L.-L., Wu, Z., Ahmed, M. A. E.-G. E.-S., Long, N., Ma, F., Zhang, G., Wu, W., Luo, J., Xia, Y., Dai, M., Zhang, L., Liao, K., Feng, S., Chen, C., Chen, Y., Luo, W., & Tian, G.-B. (2022). Whole-genome sequencing reveals the high nosocomial transmission and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in a single Center in China, a four-year retrospective study. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e01322-21. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01322-21>
- Wickramage, I., Spigaglia, P., & Sun, X. (2021). Mechanisms of antibiotic resistance of *Clostridioides difficile*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(12), 3077-3090. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB231>
- Wilcox, M. H., Gerding, D. N., Poxton, I. R., Kelly, C., Nathan, R., Birch, T., Cornely, O. A., Rahav, G., Bouza, E., Lee, C., Jenkin, G., Jensen, W., Kim, Y.-S., Yoshida, J., Gabryelski, L., Pedley, A., Eves, K., Tipping, R., Guris, D., ... Dorr, M.-B. (2017). Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 376, 305-317. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602615>
- Williamson, C. H. D., Roe, C. C., Terriquez, J., Hornstra, H., Lucero, S., Nunnally, A. E., Vazquez, A. J., Vinocur, J., Plude, C., Nienstadt, L., Stone, N. E., Celona, K. R., Wagner, D. M., Keim, P., & Sahl, J. W. (2023). A local-scale One Health genomic surveillance of *Clostridioides difficile* demonstrates highly related strains from

- humans, canines, and the environment. *Microbial genomics*, 9(6), 001046. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.001046>
- Williamson, C. H. D., Stone, N. E., Nunnally, A. E., Hornstra, H. M., Wagner, D. M., Roe, C. C., Vazquez, A. J., Nandurkar, N., Vinocur, J., Terriquez, J., Gillece, J., Travis, J., Lemmer, D., Keim, P., & Sahl, J. W. (2019). A global to local genomics analysis of *Clostridioides difficile* ST1/RT027 identifies cryptic transmission events in a northern Arizona healthcare network. *Microbial Genomics*, 5(7), e000271. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000271>
- Wright, A., Drudy, D., Kyne, L., Brown, K., & Fairweather, N. F. (2008). Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 750-756. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47532-0>
- Xu, X., Luo, Y., Chen, H., Song, X., Bian, Q., Wang, X., Liang, Q., Zhao, J., Li, C., Song, G., Yang, J., Sun, L., Jiang, J., Wang, H., Zhu, B., Ye, G., Chen, L., Tang, Y.-W., & Jin, D. (2021). Genomic evolution and virulence association of *Clostridioides difficile* sequence type 37 (ribotype 017) in China. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 1331-1345. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1943538>
- Yuan, P., Zhang, H., Cai, C., Zhu, S., Zhou, Y., Yang, X., He, R., Li, C., Guo, S., Li, S., Huang, T., Perez-Cordon, G., Feng, H., & Wei, W. (2015). Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell Research*, 25(2), 157-168. <https://doi.org/10.1038/CR.2014.169>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zhang, Z., Park, M., Tam, J., Auger, A., Beilhartz, G. L., Lacy, D. B., & Melnyk, R. A. (2014). Translocation domain mutations affecting cellular toxicity identify the *Clostridium difficile* toxin B pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), 3721-3726. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1400680111>

Anexos

7. Anexos

Anexo 1. Material suplementario

Tabla A1. Epítomos descritos en el Dominio CROPs de la TcdB de *C. difficile*

N°	ID	Epítomo
1	8043	DEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGE
2	20616	GKLIIDENIYYFDDNYRGAVE
3	23047	GVLQTGVFSTEDGFK
4	29590	IYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETY
5	30194	KDLEDGSKYYFDEDTA
6	30978	KGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLIS
7	42382	MQKGFVSINDNKHYFDDSG
8	58085	SGIIESGVQNIDDNYFY
9	68649	VGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENE
10	74538	YKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
11	193140	AASIGETIID
12	193141	AATGSVIIDG
13	193142	ACKGINLIDD
14	193144	AFKGLNQIGD
15	193145	AHQNTLDENFEGE
16	193147	ASIGETIIDDKNYYFN
17	193148	AVEWKELDGE
18	193149	AVEYSGLVRV
19	193150	AVVGWKDLED
20	193154	DDIKYYFDEK
21	193155	DDNYFYIDDN
22	193156	DDNYRGAVEW
23	193157	DEDTAEAYIG
24	193158	DEKRYYFTDE
25	193160	DGEEYYFDPD
26	193161	DGKHFYFAEN
27	193164	DLDEKRYYFT
28	193165	DLEDGSKYYF
29	193166	DLGNEEGEEI
30	193170	DSFTA VVGWK
31	193173	DSGIIESGVQ
32	193176	DVYYFGETYT
33	193178	EDGSKYYFDE
34	193179	EEGEEISYSG
35	193180	EEYYFDPDTA

36	193181	EIDGKHFYFA
37	193182	EISYSGILNF
38	193186	ENGEMQFGYI
39	193187	ENIYYFDDNY
40	193189	ENNNYYFNEN
41	193190	ETGKAFKGLN
42	193191	ETKKACKGIN
43	193193	ETYTIETGWI
44	193194	EWKELDGEMH
45	193195	EYSGLVRVGE
46	193196	FAENGEMQIG
47	193197	FAHHNEDLGN
48	193198	FDDSFTAVVG
49	193199	FDPDTAQLVI
50	193200	FENNNYYFNENGEMQFGYINI
51	193201	FGETYTIETG
52	193205	FKPPVNNLIT
53	193206	FNENGEMQFG
54	193207	FSDSGIIESG
55	193208	FSTEDGFKYF
56	193209	FTAVVGWKDL
57	193210	FTDEYIAATG
58	193211	FTGKLIIDEN
59	193214	FVSINDNKHY
60	193215	FVTINDKVFY
61	193216	FYFAENGEMQ
62	193217	FYFSDSGIIE
63	193218	FYIDDNGIVQ
64	193221	GDYKYYFNSD
65	193222	GEDVYYFGET
66	193223	GEEISYSGIL
67	193224	GEMHYFSPET
68	193225	GEMQFGYINI
69	193226	GETIIDDKNY
70	193227	GFKYFAHQNT
71	193231	GIESGVQNI
72	193233	GKAFKGLNQI
73	193234	GKLIIDENIY
74	193238	GNEEGEEISY
75	193239	GQAVEYSGLV

76	193240	GSKYYFDEDT
77	193241	GVFSTEDGFK
78	193242	HHNEDLGNEE
79	193243	HYFSPETGKAFK
80	193244	IDDNGIVQIG
81	193245	IDDNYFYIDDNG
82	193246	IDENIYYFDD
83	193247	IDFTGKLIID
84	193248	IESGVQNIDD
85	193249	IETGWIYDME
86	193253	ILNFNNKIYY
87	193256	INLIDDIKYY
88	193261	ITGFVTVGDD
89	193262	IYGQAVEYSG
90	193263	IYYFDDNYRG
91	193264	KELDGEMHYF
92	193265	KGINLIDDIK
93	193266	KGLNQIGDYK
94	193267	KHFYFAENGE
95	193268	KHYFDDSGVMK
96	193269	KIYYFDDSFT
97	193270	KKACKGINLI
98	193273	KRYYFTDEYI
99	193274	KVYFYSDSGI
100	193276	KYFAHHNEDL
101	193277	KYFAHQNTLD
102	193279	KYYFDEDTAE
103	193280	KYYFDEKGIMRT
104	193281	KYYFNPETKK
105	193283	LDGEMHYFSP
106	193285	LIDDIKYYFD
107	193286	LIIDENIYYF
108	193287	LINDGQYYFN
109	193288	LISFENNNYY
110	193289	LIYINDSLYY
111	193292	LNQIGDYKYY
112	193294	LSLINDGQYY
113	193295	LVRVGEDVYY
114	193298	MENESDKYYF
115	193299	MFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFK

116	193300	MHYFSPETGK
117	193301	MQFGYINIED
118	193305	NDGQYYFNDD
119	193306	NDKVFYFSDS
120	193307	NDNKHYFDDS
121	193308	NDSLYYFKPP
122	193309	NEDLGNEEGE
123	193310	NESDKYYFNP
124	193312	NFNKIIYYFD
125	193315	NGEMQIGVFNTEDG
126	193316	NIDDNYFYID
127	193318	NIYYFDDNYRGAVE
128	193320	NLITGFVTVG
129	193321	NNKIYYFDDS
130	193323	NNYYFNENGE
131	193324	NPETKKACKG
132	193326	NTPDGFKYFA
133	193328	NYFYIDDNGI
134	193330	NYRGAVEWKE
135	193331	NYTGWLDLDE
136	193332	PDGFKYFAHQ
137	193333	PDTAQLVISE
138	193335	PPVNNLITGF
139	193338	QIGDYKYYFN
140	193340	QSGVLQTGVFST
141	193341	QTGVFSTEDG
142	193342	QYYFNDDGIMQV
143	193343	RGAVEWKELD
144	193344	RVGEDVYYFG
145	193345	RYVWSNDGND
146	193349	SEILSFTPS
147	193350	SFENNNYYFN
148	193352	SGILNFNNKI
149	193354	SGLVRVGEDV
150	193355	SGVLQTGVFS
151	193356	SGVQNIDDNY
152	193357	SIGETIIDDK
153	193358	SINDNKHYFD
154	193359	SIRYVWSNDG
155	193361	SLYYFKPPVN

156	193363	SPETGKAFKG
157	193364	SQKYLYGIDS
158	193368	SVIIDGEEYYF
159	193369	SYSGILNFNN
160	193370	TEDGFKYFAP
161	193371	TGSVIIDGEE
162	193372	TGWIYDMENE
163	193373	TGWLDLDEKR
164	193374	TIIDDKNYF
165	193375	TINDKVFYFS
166	193377	TVGDDKYFNPING
167	193379	VGWKDLEDGS
168	193380	VGYTEIDGKH
169	193386	VLQTGVFSTE
170	193388	VNNLITGFVT
171	193389	VQNIDDNYFY
172	193392	WIYDMENESD
173	193393	WKDLEDGSKY
174	193394	WKDLEDGSKYYFDEDTAE
175	193395	WLDLDEKRY
176	193397	YDMENESDKY
177	193398	YFDDNYRGAV
178	193399	YFDEDTAEAY
179	193400	YFNPETKKAC
180	193401	YFSPETGKAF
181	193402	YIAATGSVII
182	193403	YINDSLYYFK
183	193407	YTEIDGKHFY
184	193408	YTIETGWIYD
185	193410	YYFDDSFTAV
186	193411	YYFDPDTAQL
187	193412	YYFGETYTIE
188	193413	YYFKPPVNNL
189	193414	YYFNENGEMQ

Anexo 2. Aportaciones científicas derivadas de la tesis

a. Artículo científico

Tercero-Guerrero, D., Blanco, J. L., Hernández, M., Torre-Fuentes, L., Álvarez, J., & García, M. E. (2024). Whole-genome sequencing of toxigenic *Clostridioides difficile* reveals multidrug resistance and virulence genes in strains of environmental and animal origin. *BMC Veterinary Research*, 20, 479. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04332-0>

b. Congresos

1. Participación en la sesión de Póster del XXVII Simposio AVEDILA [13/11/2024 – 14/11/2024]. Cuantificación de toxina B en cepas de *Clostridioides difficile* mediante un ELISA Sándwich. Marta E. García, Daniela Tercero-Guerrero, Mercedes Domínguez, Inmaculada Moreno, José L. Blanco
2. Participación en la sesión de Póster del XXVI Simposio AVEDILA [19/11/2023- 21/11/2023]. Utilización de una toxina recombinante para la detección de toxina B original en cepas de *Clostridioides difficile*. Marta E. García, Daniela Tercero-Guerrero, Mercedes Domínguez, Inmaculada Moreno, Sergio Álvarez-Pérez, José L. Blanco
3. Participación en la sesión de Póster del Congreso Jornadas Vigilancia Sanitaria 2023 Universidad Complutense de Madrid [06/07/2023- 07/07/2023]. Título: Desarrollo de un método ELISA para la cuantificación de toxina B en cepas de *Clostridioides difficile*. Daniela Tercero-Guerrero, Mercedes Domínguez, Inmaculada Moreno, José L. Blanco, Sergio Álvarez-Pérez, Marta E. García
4. Participación en la sesión de Póster del 6th Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians [24/10/2022 – 26/10/2022]. Título: Advances in the knowledge of the mechanisms of pathogenicity of Clostridia. Daniela Tercero-Guerrero, José L. Blanco, Blanca Anega, Sergio Álvarez-Pérez, Marta E. García