

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Diogo Soares Gonçalves Cruz

Perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Clostridioides (Clostridium) difficile* ao metronidazol, vancomicina e moxifloxacina isolados de animais e seres humanos em Minas Gerais, Brasil

Belo Horizonte

2021

Diogo Soares Gonçalves Cruz

Perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Clostridioides (Clostridium) difficile* ao metronidazol, vancomicina e moxifloxacina isolados de animais e seres humanos em Minas Gerais, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientador: Dr. Carlos Augusto de Oliveira Júnior

Belo Horizonte
2021

C957p Cruz, Diogo Soares Gonçalves. 1991-
Perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Clostridioides (Clostridium) difficile* ao metronidazol, vancomicina e moxifloxacina isolados de animais e seres humanos em Minas Gerais, Brasil/ Diogo Soares Gonçalves Cruz. -2021.

76 f.il.

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva
Coorientador: Carlos Augusto de Oliveira Júnior
Dissertação (Mestrado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Bibliografia: f:52-72.

Anexo: f: 76.

Apêndice: f: 73-75.

1. *Clostridium difficile* - Teses – 2. Diarreia em animais -Teses - 3. clostridioses – Teses - I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira – II. Júnior, Carlos Augusto de Oliveira - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

DIOGO SOARES GONÇALVES CRUZ

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva. Aprovado(a) em 25 de janeiro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Dr.(a). Rodrigo Otávio Silveira Silva - Presidente Orientador(a)

Prof(a). Dr.(a). Francisco Carlos Faria Lobato

Prof(a). Dr.(a). Carlos Augusto de Oliveira Junior

Prof(a). Dr.(a). Cecília Leite Costa



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Otávio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior, em 25/01/2021, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Francisco Carlos Faria Lobato, Membro de comissão, em 26/01/2021, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Carlos Augusto de Oliveira Júnior, Usuário Externo, em 26/01/2021, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Cecília Leite Costa, Usuário Externo, em 27/01/2021, às 22:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador 0522490 e o código CRC C2846DA7.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os membros da equipe do Laboratório de Anaeróbios que tive a oportunidade de conhecer desde o período de Iniciação Científica. Obrigado pelo convívio agradável, pelo aprendizado, pelos momentos de descontração e principalmente pela amizade.

Agradeço ao professor Rodrigo Otávio pela orientação e dedicação durante todo o mestrado, estando sempre disponível e presente na execução das atividades.

Agradeço ao Carlos Augusto pelo suporte oferecido durante toda essa jornada, sempre disposto a ajudar.

Agradeço ao professor Francisco Lobato pela oportunidade de ingresso no Laboratório de Anaeróbios, compartilhando sua experiência profissional e oferecendo conselhos fraternos.

Agradeço ao Laboratório Aquacen, especialmente à Fernanda Dorella, pela prestatividade na realização do sequenciamento genético.

Agradeço aos professores (as) que lecionaram disciplinas que tive a oportunidade de me matricular. A competência e o empenho de vocês são admiráveis.

Agradeço aos colegas dos demais laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva que manteve contato durante as disciplinas, nos encontros nos corredores ou na “Copinha” e no tradicional “Café Coletivo”.

Agradeço aos funcionários (as) da Portaria, Segurança, Limpeza, Cantina, Restaurante Universitário, Xerox, Colegiado, Secretaria, Biblioteca, FEPE, Gerência Ambiental e de Biossegurança, Laboratório de Bacteriologia, Laboratório de Vírus, Laboratório das Aves, Laboratório de Uso Coletivo, Laboratório de Cultivo Celular, Setor de Preparo de Materiais e Setor de Informática pela assistência direta e/ou indireta durante esse período.

Agradeço à CAPES pela bolsa e pela disponibilidade de acesso ao Portal de Periódicos.

Agradeço às agências de fomento pelo financiamento das atividades.

Agradeço à Escola de Veterinária por poder usufruir de sua infraestrutura, atividades de ensino e pesquisa e pela oferta do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Agradeço à UFMG pela formação concedida. Tenho enorme gratidão e respeito por essa instituição.

Por fim, agradeço aos meus pais pelo apoio e pelos cuidados de toda a vida. Sem eles nada disso seria possível!

“O conhecimento é uma capacidade disponível em nós, seres humanos, para que processemos de forma mais adequada a nossa vida, com menos riscos e menos perigos. O conhecimento tem o poder de transformar a opacidade da realidade em caminhos “iluminados”, de tal forma que nos permite agir com certeza, segurança e previsão.”

(Cipriano Carlos Luckesi, 1985)

RESUMO

Clostridioides difficile é um enteropatógeno bacteriano que infecta animais e seres humanos, capaz de promover distúrbios intestinais que podem levar o seu hospedeiro ao óbito. A infecção por *C. difficile* (ICD) representa atualmente uma das principais causas de infecção hospitalar, sendo a antibioticoterapia o principal fator predisponente. Na década de 2000, surtos ocasionados por *C. difficile* estiveram intimamente relacionados ao uso indiscriminado de antibióticos da classe das fluoroquinolonas. No Brasil, o tratamento da ICD é baseado no uso do metronidazol e da vancomicina. O uso de antimicrobianos parece ter relação direta com a seleção de determinadas estirpes de *C. difficile*. Nessa perspectiva, estudos epidemiológicos relacionados à resistência antimicrobiana desse patógeno são fundamentais para evitar a emergência de estirpes que podem representar um problema de saúde pública. Entretanto, o teste de sensibilidade antimicrobiana “padrão-ouro” recomendado para *C. difficile* é laborioso e de custo elevado. Dessa forma, o teste de disco difusão torna-se uma opção mais atrativa, uma vez que o método é simples de executar, mais barato e eficaz. O estudo teve como objetivo avaliar o perfil de sensibilidade ao metronidazol, à vancomicina e à moxifloxacina através do método de disco difusão de 120 estirpes de *C. difficile* isoladas de animais e seres humanos no Brasil. De acordo com pontos de corte já estabelecidos em estudos anteriores, as estirpes consideradas resistentes nesse teste foram submetidas ao método *E-test* para confirmação do fenótipo através da concentração inibitória mínima (CIM), mediante os critérios preconizados pelos órgãos de referência. Adicionalmente, três isolados classificados como resistentes à moxifloxacina foram sequenciados (gene *gyrA*) para detectar mutações que poderiam indicar o mecanismo genotípico de resistência à droga. Nenhum isolado foi resistente à vancomicina e somente uma estirpe (0,8%), considerada não toxigênica (RT010, clado 1), apresentou resistência ao metronidazol (CIM > 256 µg/mL). Em relação à moxifloxacina, 14% (n = 17) das estirpes avaliadas foram resistentes, as quais obtiveram CIM > 32 µg/mL. O ribotipo RT126 (clado 5) foi o único a apresentar associação estatística positiva de resistência à moxifloxacina (P < 0,0001), bem como os isolados das espécies equina e suína (P = 0,0139 e P = 0,0228, respectivamente). A mutação do tipo Thr82Ile foi encontrada nos três isolados sequenciados. O estudo revelou uma baixa frequência de resistência ao metronidazol e à vancomicina, enquanto a resistência à moxifloxacina foi superior a trabalhos anteriores realizados no Brasil.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*. Colite pseudomembranosa. Metronidazol. Vancomicina. Moxifloxacina.

ABSTRACT

Clostridioides difficile is a bacterial enteropathogen that infects animals and humans, able to promote intestinal disorders that can lead to its host's death. Infection with *C. difficile* (CDI) currently represents one of the main causes of nosocomial infection, with antibiotic therapy being the main predisposing factor. In the 2000s, outbreaks caused by *C. difficile* were closely related to the indiscriminate use of antibiotics of the fluoroquinolone class. In Brazil, the treatment of CDI is based on the use of metronidazole and vancomycin. The use of antimicrobials seems to have a direct relationship with the selection of certain strains of *C. difficile*. In this perspective, epidemiological studies related to the antimicrobial resistance of this pathogen are essential to avoid the emergence of strains that may represent a public health problem. However, the “gold standard” antimicrobial susceptibility test recommended for *C. difficile* is laborious and expensive. Thus, the diffusion disk test becomes a more attractive option, since the method is simple to perform, cheaper and more effective. The study aimed to evaluate the sensitivity profile to metronidazole, vancomycin and moxifloxacin using the disk diffusion method from 120 strains of *C. difficile* from animals and humans isolated in Brazil. According to cutoff points already established in previous studies, strains considered resistant in this test were submitted to the E-test method to confirm the phenotype through the minimum inhibitory concentration (MIC), according to the criteria recommended by the reference institution. In addition, three isolates classified as resistant to moxifloxacin were sequenced (*gyrA* gene) to detect mutations that could indicate the genotypic mechanism of drug resistance. There was no vancomycin-resistant isolate and one strain (0.8%), non-toxicogenic (RT010, clade 1), was resistant to metronidazole (MIC > 256 µg/mL). Regarding moxifloxacin, 14% (n = 17) of the strains evaluated were resistant, which obtained MIC > 32 µg/mL. The ribotype RT126 (clade 5) was the only one to present a positive statistical association of resistance to moxifloxacin (P < 0.0001), as well as isolates of the equine and swine species (P = 0.0139 and P = 0.0228, respectively). The Thr82Ile mutation was found in the three sequenced isolates. The study revealed a low frequency of resistance to metronidazole and vancomycin, while resistance to moxifloxacin was superior to previous studies carried out in Brazil.

Keywords: *Clostridium difficile*. Pseudomembranous colitis. Metronidazole. Vancomycin. Moxifloxacin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Algoritmo para o diagnóstico da ICD em seres humanos com a suspeita da doença..... | 26 |
| Figura 2 - Fluxograma das etapas realizadas..... | 39 |
| Figura 3 - Teste de sensibilidade antimicrobiana para o metronidazol..... | 40 |
| Figura 4 - Teste de sensibilidade antimicrobiana para a moxifloxacina..... | 42 |
| Gráfico 1 - Distribuição da frequência dos isolados de <i>C. difficile</i> (n = 120) de acordo com o diâmetro do halo obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão para o metronidazol, destacando o ponto de corte de 23 mm (linha tracejada)..... | 41 |
| Gráfico 2 - Distribuição da frequência dos isolados de <i>C. difficile</i> (n = 120) de acordo com o diâmetro do halo obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão para a vancomicina, destacando o ponto de corte de 19 mm (linha tracejada)..... | 41 |
| Gráfico 3 - Distribuição da frequência dos isolados de <i>C. difficile</i> (n = 120) de acordo com o diâmetro do halo obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão para a moxifloxacina, destacando o ponto de corte de 20 mm (linha tracejada)..... | 42 |
| Gráfico 4 - Distribuição da frequência dos hospedeiros de isolados de <i>C. difficile</i> (n = 17) resistentes à moxifloxacina de acordo com o ribotipo..... | 43 |
| Quadro 1 - Divisão de clados de <i>C. difficile</i> | 20 |
| Quadro 2 - Descrição dos primers utilizados para detecção do gene <i>gyrA</i> | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| [] | Concentração |
| °C | Graus Celsius |
| AST | Ágar sangue suplementado com taurocolate |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BBA | <i>Brucella Blood Agar</i> - Ágar Brucella suplementado com sangue ovino, hemina e vitamina K |
| BHI | <i>Brain heart infusion</i> - Infusão de cérebro coração |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| CDT | <i>Clostridium difficile transferase</i> |
| CdtLoc | <i>Locus Cdt</i> |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CO ₂ | Dióxido de carbono (gasoso) |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucleico |
| EIA | <i>Enzyme Immunoassays</i> - Ensaio imunoenzimático |
| ermB | Metilases ribossômicas da eritromicina de classe B |
| E-test | <i>Epsilometer test</i> |
| EUA | Estados Unidos da América |
| EUCAST | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| F | <i>Forward</i> |
| GDH | <i>Glutamate Dehydrogenase</i> |
| H ₂ | Hidrogênio (gasoso) |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana |
| HsmRA | <i>Heme-sensing membrane protein system</i> |
| ICD | Infecção por <i>Clostridioides difficile</i> |
| ICDS | <i>International C. difficile Symposium</i> |
| IJSEM | <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> |
| Kb | Quilobase |
| mA | Miliampere |
| Mb | Megabase |
| MLSB | Macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B |
| MLST | <i>Multilocus Sequence Typing</i> |
| N ₂ | Nitrogênio (gasoso) |

| | |
|----------------|---|
| NAAT | <i>Nucleic Acid Amplification Tests</i> |
| ND | Não disponível |
| NT | Não toxigênica |
| NWT | <i>Non-wild-type</i> |
| O ₂ | Oxigênio (gasoso) |
| OR | <i>Odds-Ratio</i> |
| PaLoc | <i>Locus</i> de patogenicidade |
| pb | Pares de bases |
| pCD-METRO | <i>Plasmid from Clostridioides difficile associated with metronidazole resistance</i> |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| ph | Potencial hidrogeniônico |
| PhLOPSA | Fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e estreptogramina A |
| PubMLST | <i>Public databases for molecular typing and microbial genome diversity</i> |
| PYG | <i>Peptone - yeast extract – glucose</i> |
| R | <i>Reverse</i> |
| rpm | Rotações por minuto |
| rRNA | <i>Ribosomal ribonucleic acid</i> |
| RT | Ribotipo |
| SISGEN | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado |
| T | Toxigênica |
| TC | <i>Toxigenic culture</i> - Cultura toxigênica |
| TcdA | Toxina A |
| TcdB | Toxina B |
| Thr82Ile | Substituição do aminoácido treonina pelo aminoácido isoleucina na posição 82 |
| TMF | Transplante de Microbiota Fecal |
| Tn | Transposon |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| US\$ | Dólar |
| UV | Ultra violeta |
| V | Voltagem |
| WT | <i>Wild-type</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1. Contexto geral..... | 14 |
| 2.2. Caracterização do micro-organismo | 16 |
| 2.3. Patogenia..... | 18 |
| 2.4. Epidemiologia..... | 19 |
| 2.5. Doença em seres humanos | 22 |
| 2.6. Doença em animais domésticos e silvestres | 23 |
| 2.7. Diagnóstico | 25 |
| 2.8. Tratamento | 26 |
| 2.9. Resistência antimicrobiana | 27 |
| 2.10. Testes de sensibilidade antimicrobiana | 31 |
| 2.11. Prevenção e Controle | 32 |
| 3. OBJETIVO | 35 |
| 3.1. Objetivo geral | 35 |
| 3.2. Objetivos específicos | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1. Caracterização dos isolados | 36 |
| 4.2. Sensibilidade antimicrobiana - Disco difusão | 36 |
| 4.3. Sensibilidade antimicrobiana - <i>E-test</i> | 37 |
| 4.4. Sequenciamento | 38 |
| 4.5. Análises estatísticas | 39 |
| 5. RESULTADOS | 40 |
| 5.1. Sensibilidade antimicrobiana | 40 |
| 5.2. Sequenciamento | 43 |
| 6. DISCUSSÃO | 45 |
| 7. CONCLUSÃO | 51 |
| REFERÊNCIAS | 52 |
| APÊNDICE A - Caracterização dos isolados de <i>C. difficile</i> (n = 120) | 73 |
| ANEXO A - Cadastro SISGEN | 76 |

1. INTRODUÇÃO

Clostridioides (Clostridium) difficile é um enteropatógeno bacteriano comumente relacionado a infecções hospitalares e infecções comunitárias em diversos hospedeiros, incluindo seres humanos (Martin *et al.*, 2016). As manifestações clínicas da infecção por *C. difficile* (ICD) variam desde diarreia branda até colite fulminante (Hernández-Rocha *et al.*, 2012). O diagnóstico precoce é um aliado no controle e no tratamento da infecção, que consiste principalmente no uso de antimicrobianos como metronidazol ou vancomicina (Rao e Malani, 2020).

A antibioticoterapia representa o principal fator predisponente para a ICD, algo preocupante diante do uso cada vez mais frequente de antimicrobianos na medicina humana e veterinária. Estima-se que 73% do total de antimicrobianos utilizados no mundo sejam destinados aos sistemas de produção animal, sobretudo como promotores de crescimento. Diante da vocação nacional no setor da pecuária, o Brasil tem sido considerado um *hotspot* recente no uso indiscriminado de antimicrobianos e conseqüentemente na emergência de micro-organismos com um arsenal genético capaz de conferir resistência às drogas (Spigaglia *et al.*, 2018; Van Boeckel *et al.*, 2019). Esse cenário gera condições favoráveis para um aumento na incidência da ICD, promovendo um grande desafio de saúde única, uma vez que *C. difficile* tem sido considerado um potencial agente zoonótico (Silva *et al.*, 2015; Knetsch *et al.*, 2017).

Nos Estados Unidos da América (EUA), *C. difficile* é considerado a principal causa de infecção nosocomial, sendo responsável pelo gasto de US\$ 1,0 bilhão no ano de 2017, com aproximadamente 223.900 pacientes hospitalizados e 12.800 (5,7%) mortes no mesmo período (CDC, 2019). Em animais, a prevalência e efeitos clínicos da doença são bastante variáveis de acordo com a espécie. A doença se destaca principalmente em suínos, cujas perdas econômicas são relacionadas à diminuição do desenvolvimento corporal e conseqüente redução de produtividade (Moono *et al.*, 2016; Weese, 2020).

Nos últimos anos, tem sido cada vez mais frequente a emergência de estirpes com sensibilidade reduzida ou até mesmo resistentes aos antimicrobianos de eleição no tratamento da ICD (metronidazol e vancomicina) (Saha *et al.*, 2019; Freeman *et al.*, 2020). Tal fato reforça a necessidade de aplicação de testes de sensibilidade antimicrobiana que sejam eficazes e baratos. Atualmente, recomenda-se como “padrão-ouro” para *C. difficile* o teste de

diluição em ágar (CLSI, 2020; EUCAST, 2020). Porém, esse método é laborioso e requer profissionais capacitados para realizar o teste de forma adequada (Peng *et al.*, 2017).

Nessa perspectiva, o teste de disco difusão torna-se uma opção atrativa para avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *C. difficile*, visto que o método é barato e de execução mais simples. Além disso, estudos anteriores demonstraram que o teste apresenta elevada concordância com métodos consagrados, detectando estirpes com sensibilidade reduzida ao metronidazol e à vancomicina, por exemplo (Poilane *et al.*, 2007; Erikstrup *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2015). Dessa forma, a aplicação da técnica de disco difusão permite a avaliação da sensibilidade antimicrobiana de *C. difficile* na rotina clínica e em trabalhos de vigilância epidemiológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contexto geral

C. difficile foi descrito pela primeira vez em 1935 após ser isolado de fezes de crianças recém-nascidas. Na época, a bactéria recebeu o nome de *Bacillus difficilis* devido à morfologia e à dificuldade para realizar o seu cultivo e isolamento *in vitro* (Hall e O'Toole, 1935). Naquela mesma década, tal micro-organismo foi renomeado como *Clostridium difficile* (Prévot, 1938, citado por Kamiya e Nakamura, 1993). No entanto, a nomenclatura só foi validada em 1980, após publicação oficial da “*Approved Lists of Bacterial Names*” (Skerman *et al.*, 1980). Já em 2013, mediante a análise comparativa de proteínas ribossomais e de enzimas de replicação entre alguns grupos filogenéticos de bactérias, houve a tentativa de cunhar o nome *Peptoclostridium difficile* (Yutin e Galperin, 2013). Porém, não houve pedido de validação do nome pela lista de editores do “*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*” (IJSEM), revista cuja atribuição consiste na publicação oficial de novos nomes de espécies para procariontes (Oren e Rupnik, 2018).

Recentemente, *C. difficile* foi reclassificado filogeneticamente, baseando-se em análises da sequência genética da porção 16S do RNA ribossômico (*ribosomal ribonucleic acid* - rRNA). Além disso, características fenotípicas e marcadores quimiotaxonômicos como a produção abundante de gás hidrogênio (H₂) quando cultivado em meio de cultura peptona – extrato de levedura – glicose (*peptone - yeast extract - glucose* - PYG); bem como a produção de cadeias lineares e ramificadas de ácidos graxos saturados e insaturados; como também a presença de aminoácidos específicos na composição do peptideoglicano da parede celular promoveram embasamento para estabelecer essa mudança (Lawson *et al.*, 2016). Em consequência disso, o gênero foi alterado de *Clostridium* para *Clostridioides*, de modo a possuir atualmente a seguinte classificação taxonômica: reino, *Bacteria*; filo, *Firmicutes*; classe, *Clostridia*; ordem, *Clostridiales*; família, *Clostridiaceae*; gênero, *Clostridioides*; espécie, *Clostridioides difficile* (Sandhu e McBride, 2018). Entretanto, ambas as nomenclaturas (i.e. *Clostridium difficile* e *Clostridioides difficile*) ainda constam no “*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*” e podem, portanto, ser usadas para fins científicos, clínicos ou comerciais (Oren e Rupnik, 2018).

A partir da segunda metade do século XX, a literatura científica começou a apontar evidências que sugeriam a participação de *C. difficile* como agente etiológico de distúrbios

intestinais (Bartlett, 1994). Observou-se, em trabalhos experimentais e em relatos de casos, que a ICD tinha como fator predisponente o uso de antimicrobianos indicados no tratamento de infecções de causas diversas, uma vez que *C. difficile* coloniza o intestino quase que exclusivamente quando a microbiota desse órgão estiver em disbiose ou em formação (Farrar e Kent, 1965; Green, 1974; Larson *et al.*, 1977). Nessa perspectiva, em um estudo realizado em 1973 nos EUA, 21% (n = 42) dos pacientes hospitalizados que receberam tratamento com clindamicina desenvolveram diarreia e/ou colite pseudomembranosa, sinais clínicos que são sugestivos da doença (Tedesco *et al.*, 1974). Através de isolados de seres humanos, estudos posteriores da ICD *in vivo* e *in vitro* descreveram características clínicas e epidemiológicas da doença e também relacionadas ao patógeno, com destaque para a produção de toxinas e a presença de outros fatores de virulência e de resistência a alguns antimicrobianos (Borriello, 1978; Kamiya e Nakamura, 1993).

Nos últimos anos, *C. difficile* ganhou notoriedade devido ao aumento expressivo da prevalência e da severidade da doença, causando maiores taxas de mortalidade e morbidade (Dalla *et al.*, 2002; Loo, *et al.*, 2005). Atualmente, a ICD é considerada uma das causas mais importantes de infecções nosocomiais, as quais estão associadas à permanência do paciente em ambiente hospitalar (Forster *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2013). Tal fato tem sido atribuído à emergência de estirpes hipervirulentas que apresentam, entre outras características, produção de maior quantidade de toxinas e de esporos (McDonald, *et al.*, 2005; Goorhuis, *et al.*, 2008). A ocorrência dessas estirpes foi mais evidente em países da Europa e da América do Norte, provavelmente em função do uso indiscriminado de antimicrobianos, sobretudo as fluoroquinolonas (Pépin *et al.*, 2004; Muto *et al.*, 2005; Kuijper *et al.*, 2006). Em países da América Latina, a ocorrência da circulação de estirpes hipervirulentas é mais recente (Balassiano *et al.*, 2012; Aguayo *et al.*, 2015). No Brasil, relatos de surtos relacionados à ICD são escassos (Balassiano *et al.*, 2010). Apesar disso, estudos de vigilância sanitária em hospitais brasileiros recentemente indicaram a presença de estirpes hipervirulentas clássicas, bem como de diversas estirpes possivelmente hipervirulentas (Costa *et al.*, 2016; Pires *et al.*, 2018; Diniz *et al.*, 2019).

Além dos seres humanos, os animais também desempenham papel importante na epidemiologia de *C. difficile* (Diaz *et al.*, 2018). Na maioria das espécies animais, a antibioticoterapia também é um fator predisponente para a colonização por *C. difficile*, incluindo o uso de antimicrobianos como promotor de crescimento na dieta (Ronquillo e Hernandez, 2017). Adicionalmente, foi observado que a ICD é uma causa recorrente em

animais recém-nascidos de algumas espécies, como equinos e suínos, por exemplo (Jones *et al.*, 1987; Squire *et al.*, 2013). Esse fato se deve à incapacidade da microbiota intestinal que ainda se encontra em processo de formação nos neonatos de impedir a colonização por *C. difficile* (Britton e Young, 2014).

Diante do relato cada vez mais frequente no número de casos por infecção comunitária, atualmente tem sido discutido aspectos epidemiológicos da ICD que envolvem as fontes de contaminação e as formas de transmissão do patógeno fora do ambiente hospitalar (Ofori *et al.*, 2018). Tem-se observado que mesmo pacientes que não fizeram uso de antimicrobianos e sem histórico de internação hospitalar desenvolvem a doença, alguns casos necessitando inclusive de hospitalização (Kuntz *et al.*, 2011). Curiosamente, a incidência desses casos é maior em mulheres jovens, mas ainda não há evidências bem estabelecidas que justifiquem a maior susceptibilidade desse grupo (Guh *et al.*, 2017; Brown e Wilson, 2018).

Na última década, o potencial zoonótico de *C. difficile* tornou-se alvo de investigação de muitos estudos (Lim *et al.*, 2019). Isso só foi possível com o advento de técnicas de biologia molecular mais sofisticadas que permitem comparar geneticamente estirpes isoladas de seres humanos e de animais (Killgore *et al.*, 2008). Dessa forma, estudos recentes têm indicado a existência de estirpes com alto grau de similaridade genética entre isoladas de seres humanos e de animais domésticos, silvestres e sinantrópicos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2014; Himsforth *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015; Knetsch *et al.*, 2017; Rabold *et al.*, 2018). Tal fato sugere fortemente que há cadeias de transmissão interespecíficas de *C. difficile*. Entretanto, são necessários novos estudos que elucidem com mais clareza a ocorrência desse processo (Weese, 2020).

2.2. Caracterização do micro-organismo

C. difficile é uma bactéria gram-positivo cuja célula é em forma de bastonete, com tamanho de 0,5 µm – 1,9 µm x 3,0 µm – 16,9 µm (Lawson *et al.*, 2016). Devido à presença de peritríquios, estruturas flagelares distribuídas em toda a superfície da célula, as células geralmente são móveis em meios de cultura líquido ou semi-sólido. A bactéria está presente em diversos ambientes, seja no solo, na água, nos alimentos ou até mesmo como comensal do sistema digestivo de seres humanos e animais como répteis, aves e diversos mamíferos (Gould e Limbago, 2010; Keessen *et al.*, 2011a; Janezic *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2019). Tal

micro-organismo desempenha suas atividades metabólicas vitais sem a participação da molécula de oxigênio (O₂) comoceptor final de elétrons, sendo considerado, portanto, um anaeróbio estrito (Edwards *et al.*, 2013). *C. difficile* possui a capacidade de formar esporos, estrutura de resistência metabolicamente dormente que permite à bactéria manter-se viável mesmo em ambientes onde há presença de oxigênio, tornando-se um agente ubiqüitário (Barra-Carrasco e Paredes-Sabja, 2014). Estima-se que *C. difficile* tenha surgido em torno de 1,1 a 85 milhões de anos atrás (He *et al.*, 2010).

Em comparação com outros anaeróbios, *C. difficile* cresce lentamente e muitas vezes pode ser suprimido por outros micro-organismos em meios de cultura *in vitro*, dificultando o seu isolamento. O genoma da bactéria consiste em aproximadamente 4,3 Mb contidas num único cromossomo circular, com proporção em mol de G – C correspondente a 29% (Knight *et al.*, 2015). Cerca de 11% do genoma consiste em transposons (Tn) e profagos. Esses elementos genéticos móveis podem ser transferidos horizontalmente entre diferentes estirpes, atuando como vetores de genes de resistência antimicrobiana, por exemplo (Peng *et al.*, 2017).

Algumas estirpes de *C. difficile* possuem a capacidade de produzir toxinas, cuja ação é responsável pelo dano tecidual no intestino de seus hospedeiros (Jank *et al.*, 2007). As estirpes produtoras de toxinas (toxigênicas) possuem uma região genômica de patogenicidade denominada de *locus* de patogenicidade (PaLoc). Dentre os genes contidos nessa região, destacam-se *tcdA* e *tcdB*, que codificam a enterotoxina TcdA (toxina A - 309 kDa) e a citotoxina TcdB (toxina B - 267 kDa), respectivamente (Hernandez-Rocha *et al.*, 2012). A produção das toxinas A e B é mais proeminente durante a fase estacionária da curva de crescimento bacteriano, de modo que a sua síntese é influenciada pela presença de genes reguladores (positivamente - *tcdR*, negativamente - *tcdC*); fatores ambientais, como concentração de nutrientes (glicose, aminoácidos e biotina, por exemplo); temperatura e presença subinibitória de antimicrobianos (Hundsberger *et al.*, 1997). Em contrapartida, as estirpes não produtoras de toxinas (não toxigênicas) o PaLoc é substituído por uma sequência não codificadora de 75 a 115 nucleotídeos de função desconhecida. Entretanto, essas estirpes podem adquirir o PaLoc de estirpes toxigênicas pela transferência horizontal de genes, resultando na produção de toxinas (Chandrasekaran e Lacy, 2017).

Outra toxina produzida por algumas estirpes de *C. difficile* é a toxina binária (*C. difficile transferase* - CDT). Embora alguns estudos preliminares em modelo animal tenham

avaliado sua contribuição na patogênese da ICD, ainda não há um conhecimento bem estabelecido sobre o papel dessa toxina. Porém, há vários relatos que a produção de CDT juntamente com as toxinas A e B está associada com casos graves da doença, maior mortalidade e risco elevado de recorrência em seres humanos (Stewart *et al.*, 2013). Dessa forma, as estirpes produtoras da toxina binária tendem a apresentar maior virulência. A CDT é formada por duas subunidades, codificadas pelos genes *cdtA* e *cdtB*. Esses genes estão localizados em uma região cromossômica distinta do PaLoc, denominada *locus* Cdt ou CdtLoc. O CdtLoc também contém um terceiro gene (i. e. *cdtR*) que regula positivamente a produção de toxina binária, além de aparentemente aumentar a produção das toxinas A e B nas estirpes hipervirulentas. As estirpes toxigênicas negativas para toxina binária não possuem o CdtLoc (Chandrasekaran e Lacy, 2017).

2.3. Patogenia

A ICD inicia-se a partir da transmissão fecal-oral de esporos eliminados no ambiente por animais e seres humanos infectados ou portadores saudáveis. Mesmo em virtude do potencial hidrogeniônico (pH) ácido do estômago, os esporos passam pelo órgão sem sofrer danos aparentes e germinam no intestino delgado, quando há maior concentração de ácidos biliares primários (Giel *et al.*, 2010). Após germinação, as células vegetativas metabolicamente ativas colonizam o cólon devido à disbiose da microbiota intestinal induzida, principalmente, pelo uso prévio de antimicrobianos, tais como clindamicina, cefalosporinas, fluoroquinolonas e penicilinas de largo espectro (Pereira, 2014; Theriot e Young, 2015).

Ao se aderirem a receptores presentes na porção apical dos enterócitos, estirpes toxigênicas de *C. difficile* produzem as toxinas A e B. A toxina A liga-se à porção apical da célula e ao ser internalizada causa alterações no citoesqueleto. Isso resulta na ruptura de junções compactas (ou zônulas oclusivas) com consequente afrouxamento da barreira epitelial, permitindo que as toxinas A e B atravessem o epitélio. Mediante esse processo, a toxina B liga-se preferencialmente à membrana celular basolateral. Ambas as toxinas são citotóxicas e induzem a liberação de vários mediadores com função imunomodulatória, fagócitos e mastócitos, resultando em inflamação e acúmulo de neutrófilos (Rupnik *et al.*, 2009). Já as estirpes produtoras de toxina binária parecem ter maior facilidade de adesão à mucosa intestinal devido à produção de microtubos e promovem resposta inflamatória exacerbada (Schwan *et al.*, 2014; Cowardin *et al.*, 2016).

Em seres humanos, o período de incubação é, em média, de três dias, embora existam divergências sobre esse dado (Pereira, 2014). A gravidade da doença depende da virulência da estirpe infecciosa e da resposta imune do hospedeiro, podendo ser assintomático. Os casos leves a moderados são caracterizados principalmente por diarreia aquosa várias vezes ao dia – podendo conter muco – febre baixa e leucocitose. Já os casos graves apresentam dor abdominal, hipoalbuminemia e formação de pseudomembranas. Um número menor de pacientes pode ter complicações como perfuração intestinal, megacólon tóxico, sepse, reação inflamatória sistêmica, insuficiência renal, íleo paralítico, isquemia do cólon e até mesmo óbito (Hernández-Rocha *et al.*, 2012). Quando há formação de pseudomembranas, as lesões se apresentam em forma de placas amareladas ou esbranquiçadas, com diâmetro em torno de dois centímetros, aderentes, dispersas pelas mucosas do cólon e do reto, intercaladas com mucosa normal. Em cortes histológicos, os efeitos inflamatórios são bem evidentes e as lesões são descritas informalmente como em formato de vulcão (Rupnik *et al.*, 2009).

Por fim, *C. difficile* esporula novamente na porção final do intestino e é liberado no ambiente através das fezes, podendo contaminar um novo hospedeiro susceptível (Sandhu e McBride, 2018).

2.4. Epidemiologia

Em estudos que se objetiva avaliar o perfil epidemiológico, consagrou-se inicialmente o uso da ribotipagem como método de classificação de *C. difficile* (Bidet *et al.*, 1999). Dessa forma, o ribotipo permite estabelecer inferências sobre as estirpes quanto à distribuição geográfica, à transmissão e aos efeitos clínicos, por exemplo. Para isso, as estirpes são analisadas por um método de tipagem molecular que envolve a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR) da região espaçadora entre os genes 16S e 23S do rRNA. Posteriormente, os produtos da PCR são submetidos à eletroforese de modo que cada padrão de bandas gerado corresponde a um único ribotipo (RT) (Indra *et al.*, 2008).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, também é possível classificar as estirpes em agrupamentos filogenéticos denominados clados, por meio da técnica *multilocus sequence typing* (MLST). Essa técnica possibilita realizar análises com maior poder discriminatório capazes de demonstrar o perfil evolutivo de *C. difficile* (Janezic e Rupnik, 2015). Em alguns casos, quando um isolado pertence a um ribotipo tradicionalmente

conhecido, é possível predizer o clado ao qual essa estirpe pertence. Da mesma forma, também é possível predizer o ribotipo de uma determinada estirpe por meio da classificação de seu *sequence type* (ST) (Bjoersdorff *et al.*, 2021). Atualmente, são descritos seis cladros distintos, cuja composição mantém correspondência com o agrupamento de ribotipos específicos que compartilham entre si características em comum (QUADRO 1).

Quadro 1 - Divisão de cladros de *C. difficile*

| Clado | Ribotipo patogênico comum | Comentários |
|-------|---------------------------|---|
| 1 | 001, 012, 014, 020, 106 | Clado mais diversificado; estirpes toxigênicas e não toxigênicas. |
| 2 | 027, 016, 036, 176 | Contém a linhagem hipervirulenta do ribotipo 027. |
| 3 | 023 | Clado incomum dominado pelo ribotipo 023 CDT ⁺ . |
| 4 | 017 | Estirpes toxigênicas e não toxigênicas; inclui o ribotipo 017 com padrão A ⁻ /B ⁺ . |
| 5 | 078, 126, 033 | Estirpes toxigênicas e não toxigênicas, com perfil evolutivo altamente divergente de outros cladros. |
| 6 | - | Clado recentemente descrito apenas com estirpes não toxigênicas; há considerações se deve representar uma nova espécie. |

Legenda: CDT⁺, *C. difficile transferase* positivo; A⁻, toxina A negativo; B⁺, toxina B positivo.

Fonte: Adaptado de Weese, 2020.

Nas últimas décadas, surtos da ICD em seres humanos ocorreram na América do Norte e na Europa após a emergência do ribotipo hipervirulento RT027 (pertencente ao clado 2), o qual foi notificado pela primeira vez em 2005 (McDonald, *et al.*, 2005). A incidência do RT027 diminuiu em algumas áreas da Europa Ocidental nos últimos anos, devido a uma redução na incidência total de ICD, bem como uma redução na proporção de casos atribuídos

a esse ribotipo (Martin *et al.*, 2016). No entanto, RT027 persiste na América do Norte e está aumentando em outras áreas, especialmente na Europa Oriental (Cheknis *et al.*, 2018; Freeman *et al.*, 2020).

Em 2005 na Holanda, um aumento na ocorrência de *C. difficile* em suínos e bovinos foi relacionado à emergência de outro ribotipo hipervirulento denominado 078, pertencente ao clado 5. Com o avanço dos estudos de vigilância sanitária, foi observado o isolamento cada vez mais frequente desse ribotipo em seres humanos, afetando principalmente populações jovens com casos de ICD associadas à comunidade. Além disso, constatou-se também que isolados de humanos e suínos apresentaram alta similaridade genética, sugerindo ausência de barreiras interespecíficas para tal ribotipo (Goorhuis *et al.*, 2008).

Ao contrário da Europa e da América do Norte, a Austrália não sofreu grandes epidemias associadas ao RT027. Sugere-se que o isolamento geográfico do país e as práticas de prescrição antimicrobiana relativamente conservadoras tenham contribuído para a contenção desse ribotipo. Entretanto, a partir do ano de 2010, há registros de surtos na Austrália em função da emergência do ribotipo hipervirulento RT244, pertencente ao clado 2. Tal ribotipo demonstrou estar significativamente relacionado a infecções comunitárias e rapidamente se espalhou por todo o país (Eyre *et al.*, 2015).

Já na Ásia, contrastando com países europeus e com a América do Norte, os ribotipos mais prevalentes são RT001, RT002, RT014, RT018, pertencentes ao clado 1; e RT017 pertencente ao clado 4. Diferente dos ribotipos hipervirulentos clássicos (i.e. RT027 e RT078), os ribotipos RT017 e RT018, por exemplo, não produzem toxina binária. Porém, outros fatores de virulência podem ter contribuído para a propagação dessas estirpes no continente, como a resistência à clindamicina e às fluoroquinolonas pelo RT018. Em Hong Kong, demonstrou-se que isolados do RT002 apresentam maior taxa de esporulação quando comparados a outros ribotipos, favorecendo sua maior disseminação em ambientes hospitalares (Cheng *et al.*, 2011; Collins *et al.*, 2013).

No continente africano, a maioria dos estudos epidemiológicos sobre *C. difficile* são restritos à África do Sul. O contexto da ICD nesse país é especialmente importante devido à elevada prevalência de certas comorbidades na população, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV) e a tuberculose (Legenza *et al.*, 2018). Em um estudo realizado ao longo de um ano em dois hospitais de referência no atendimento a pacientes com tuberculose na África do Sul, foram notificados cerca de 70 casos de ICD a

cada 1000 pacientes. Nesse trabalho, obteve-se 110 isolados toxigênicos de *C. difficile*, sendo 105 (95,5%) deles pertencentes ao RT017 (clado 4). Dos 72 isolados do RT017 testados para sensibilidade antimicrobiana, 19 (26,4%) eram corresponsíveis à moxifloxacina, uma quinolona de uso amplo, e à rifampicina, droga comumente utilizada no tratamento da tuberculose (Kullin *et al.*, 2018).

No Brasil, os estudos epidemiológicos de *C. difficile* tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade também são escassos. Mesmo com a subnotificação de casos da ICD, considera-se que *C. difficile* seja o terceiro patógeno mais prevalente nos casos de diarreia comunitária do país (Trindade *et al.*, 2019). Entre os principais ribotipos já relatados nos estados brasileiros estão: RT014/020 e RT106, e em menor frequência outros ribotipos como RT046, RT132, RT133, RT134 e RT135, sendo todos pertencentes ao clado 1 (Trindade *et al.*, 2019). Em 2018, foi notificado pela primeira vez no país o isolamento do RT027 no estado do Rio Grande do Sul. Nesse caso, o paciente era um homem de 68 anos que apresentava diarreia por dois meses, além de ter sido submetido à terapia antimicrobiana (i.e. vancomicina, metronidazol, ampicilina e meropenem) (Pires *et al.*, 2018). De qualquer forma, deve-se salientar que a grande maioria dos levantamentos realizados em diferentes estados brasileiros não encontraram ribotipos classicamente associados à hipervirulência, como RT027, RT078 e RT244.

Em seres humanos, há uma maior quantidade de relatos de estirpes pertencentes a diferentes clados (i. e. clados 1, 2, 4 e 5) sendo capazes de causar a ICD. O clado 1 contém as estirpes mais prevalentes na maioria das regiões do mundo, como os ribotipos RT001, RT012 e RT014/020. Já o clado 2 contém o ribotipo RT027, estirpe hipervirulenta associada à disseminação internacional da doença em seres humanos. O clado 4 contém estirpes que são importantes causas da ICD em regiões específicas. Por fim, o clado 5 caracteriza-se pelo agrupamento de ribotipos predominantemente hipervirulentos, como o RT078, capaz de infectar seres humanos e animais, sugerindo potencial zoonótico (Janezic e Rupnik, 2015).

2.5. Doença em seres humanos

Alguns fatores são comumente relacionados a ocorrência da ICD em seres humanos, sendo a antibioticoterapia o principal deles. Alguns outros fatores como idade avançada, uso de inibidores de bomba de prótons (omeprazol, por exemplo) e o ribotipo relacionado à doença são os fatores de risco mais frequentes para a recorrência da ICD (McDonald *et al.*,

2018). Novamente, idade avançada, leucocitose, insuficiência renal, doença pulmonar crônica, doença inflamatória intestinal e *diabetes mellitus* são fatores que podem promover complicações da ICD, inclusive aumentando a chance de óbito (Chakra *et al.*, 2014). Tem-se relatado ainda um aumento da ICD em populações mais jovens sem contato prévio com o ambiente hospitalar e ou com antibióticos (ICD comunitária). Nesse caso, destacam-se populações específicas que anteriormente apresentavam baixo risco, como crianças e mulheres grávidas (Kim *et al.*, 2008; Roupael *et al.*, 2008).

A ocupação profissional também é um importante fator que aumenta a exposição ao patógeno, contribuindo para maior risco da ICD em determinados grupos da sociedade. Em um estudo realizado na Alemanha, pacientes de instituições de cuidados prolongados como asilos, por exemplo, tiveram taxa de colonização por *C. difficile* de 4,6%, em comparação com 0,8% na população adulta residente da comunidade local. Dentre as estirpes isoladas nos asilos, 90% eram toxigênicas, predominantemente dos ribotipos RT014 (30%) e RT001 (20%), cujo resultado foi 10 vezes maior do que o encontrado na comunidade, indicando a maior exposição a *C. difficile* por profissionais da área de saúde que trabalham nesses locais (Arvand *et al.*, 2012). Sabe-se ainda que funcionários que trabalham com suinocultura também apresentam uma prevalência maior de colonização por *C. difficile*, comumente pelo ribotipo hipervirulento RT078, altamente prevalente em leitões (Goorhuis *et al.*, 2008). Deve-se enfatizar ainda que este ribotipo é o terceiro mais isolado em casos de infecção comunitária em todo o mundo, reforçando a hipótese de intercâmbio de estirpes de *C. difficile* entre espécies (Rupnik *et al.*, 2008; Knetsch *et al.*, 2014).

2.6. Doença em animais domésticos e silvestres

Comparado aos ribotipos descritos em humanos, a heterogeneidade de ribotipos presentes em animais parece ser menor (Keessen *et al.*, 2011a). Entretanto, essa observação provavelmente corresponde a uma falha amostral, visto que há maior quantidade de estudos epidemiológicos em seres humanos do que em animais. Os ribotipos mais comuns variam de acordo com as espécies afetadas. De forma geral, estudos sugerem que estirpes do clado 1, como RT014/020 e RT106, são mais comuns em cães e gatos, correspondendo ainda em mais da metade dos isolados de equinos. Já em bovinos e suínos, estirpes do clado 5, sobretudo ribotipo RT078, são as mais comuns (Weese, 2020).

Os fatores de risco relacionados à ocorrência da ICD em animais são mais variados e não têm um padrão específico para todas as espécies. Em suínos, por exemplo, a doença acomete apenas os recém-nascidos, os quais permanecem susceptíveis ao patógeno até aproximadamente os sete dias de vida. Após esse período, a microbiota intestinal dos leitões já está bem estabelecida e impede o desenvolvimento da infecção, mesmo depois do uso de antimicrobianos (Arruda *et al.*, 2013). Já nos cães, as faixas etárias que apresentam maior taxa de infecção pelo patógeno são os filhotes e animais idosos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2015). Em equinos a doença tende a acometer animais jovens e adultos (Weese *et al.*, 2010).

Enquanto *C. difficile* é um importante causador de doença em algumas espécies de animais domésticos, como suínos e equinos, em outras espécies parece atuar apenas como um agente comensal da microbiota intestinal, sem desempenhar papel clinicamente relevante. Nessa perspectiva, bovinos, ovinos, caprinos, gatos e aves, por exemplo, podem ser colonizados pelo patógeno e permanecerem como hospedeiros assintomáticos, não havendo indícios claros de desenvolvimento da doença nessas espécies. Porém, é inquestionável a importância epidemiológica na disseminação de ribotipos possivelmente zoonóticos que tais animais podem ter (Avbersek *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

Em animais silvestres, há estudos que relatam o isolamento de *C. difficile* em felinos, canídeos, roedores e répteis, por exemplo (Silva *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Oliveira Júnior *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019). Em sua maioria, os estudos relatam apenas a colonização pelo agente, sem ocorrência da doença. Entretanto, alguns casos de ICD têm sido descritos nesses animais. Dessa forma, a antibioticoterapia também pode ser um fator predisponente, como foi sugerido em um relato de caso no Brasil de uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*) de vida livre que desenvolveu a doença após ser tratada com cefalosporina devido a um procedimento cirúrgico ortopédico (Silva *et al.*, 2013). Outra possibilidade seria a influência da dieta na composição da microbiota intestinal, cuja diversidade pode ser alterada de modo que favoreça a ICD. Nesse sentido, foi relatado na Dinamarca um surto em elefantes (*Elephas maximus*) em que cinco animais de um zoológico apresentaram enterocolite, causando dois óbitos. Exames laboratoriais *post mortem* diagnosticaram ICD, possivelmente ocasionada por ingestão de brócolis, alimento capaz de inibir o crescimento de alguns micro-organismos no intestino (Bojesen *et al.*, 2006). Vale ressaltar que comumente as estirpes encontradas em animais silvestres se assemelham geneticamente aos isolados de seres humanos, até mesmo em casos em que apenas a colonização assintomática foi observada (Weese, 2020).

2.7. Diagnóstico

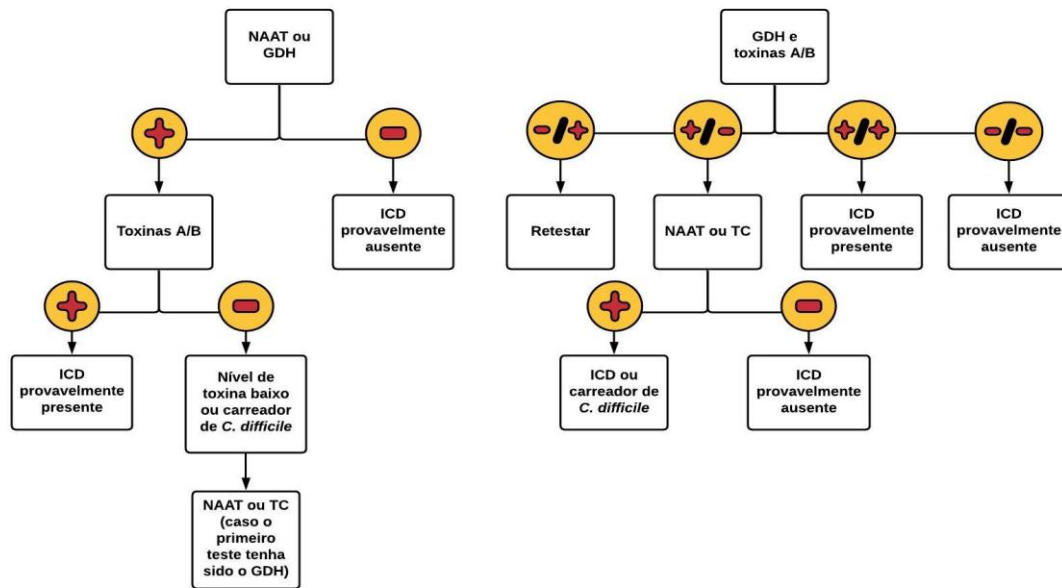
Em seres humanos, um diagnóstico rápido e preciso da ICD é essencial para direcionar o tratamento correto e impedir a transmissão nosocomial. Através do diagnóstico é possível reduzir o tempo de início do tratamento de pacientes com resultado positivo e descontinuação do tratamento empírico de pacientes com resultado negativo. Os testes são recomendados para indivíduos internados em unidades hospitalares que tenham pelo menos três episódios de evacuação com fezes não formadas num intervalo de 24 horas. A necessidade de aplicação do teste é reforçada se o paciente recebeu tratamento antimicrobiano previamente e se exames para detecção de outros enteropatógenos comuns for negativo, bem como se outras causas de diarreia como colite inflamatória e nutrição enteral forem descartadas (Bagdasarian *et al.*, 2015).

As opções de diagnóstico para seres humanos consistem na aplicação de testes capazes de detectar o agente etiológico ou suas toxinas (Guery *et al.*, 2019). Dessa forma, alguns testes utilizados atualmente têm como alvo a detecção do material genético ou proteínas de *C. difficile*, são eles: cultura toxigênica (*toxigenic culture* – TC), teste de amplificação de ácido nucleico (*nucleic acid amplification tests* – NAAT) e glutamato desidrogenase (*glutamate dehydrogenase* – GDH). Adicionalmente, alguns testes com ensaios imunoenzimáticos (*enzyme immunoassays* – EIA) preconizam a detecção das toxinas presente nas fezes por meio de anticorpos monoclonais ou policlonais antitoxinas A e B.

Apesar dos recentes avanços, o diagnóstico da ICD permanece desafiador, pois não existe teste que combine simultaneamente alta sensibilidade e especificidade, tempo de resposta rápido e baixo custo. Além disso, alguns testes não permitem afirmar a natureza toxigênica do isolado, visto que *C. difficile* é um agente comensal da microbiota intestinal, podendo ser não toxigênico. Portanto, é recomendado a execução de pelo menos um algoritmo de duas etapas, em que diferentes testes são combinados a fim de aperfeiçoar o diagnóstico (Gateau *et al.*, 2018) (FIGURA 1).

Em animais, os recursos utilizados para o diagnóstico da ICD se assemelham àqueles utilizados para seres humanos, devido à ausência de testes específicos para animais domésticos e silvestres. Assim, a presença de estirpes toxigênicas e/ou detecção de toxinas em amostras de fezes são correlacionadas com as manifestações clínicas observadas no animal avaliado para conclusão do diagnóstico (Keessen *et al.*, 2011b; Ramos *et al.*, 2020).

Figura 1 - Algoritmo para o diagnóstico da ICD em seres humanos com a suspeita da doença



Legenda: GDH, glutamato desidrogenase; NAAT, teste de amplificação de ácido nucleico; TC, cultura toxigênica.

Fonte: Adaptado de Gateau *et al.*, 2018.

2.8. Tratamento

Os protocolos de tratamento para ICD em seres humanos estabelecem diretrizes distintas de acordo com a severidade da doença e o risco de recorrência ou complicações (McDonald *et al.*, 2018). Quanto ao uso de antimicrobianos, metronidazol e vancomicina são as drogas de eleição para o tratamento convencional da doença. Embora a eficácia do metronidazol seja cada vez mais questionada devido à emergência de estirpes com sensibilidade reduzida, tal droga continua sendo a opção de terapia inicial em alguns países, como no Brasil, para a maioria dos pacientes com infecção leve a moderada e para o primeiro episódio de recorrência da ICD (Moura *et al.*, 2013). Nesses países, a vancomicina é recomendada como terapia inicial apenas para casos graves, pois há uma preocupação crescente na seleção de outros micro-organismos resistentes a essa droga, como os do gênero *Enterococcus* e *Staphylococcus* (Dubin *et al.*, 2019). Porém, em vários países europeus e nos EUA, a vancomicina passou a ser a primeira escolha independente da gravidade. Para pacientes com recorrência ou que apresentem alto risco de recorrência da ICD, sugere-se o uso de uma terceira droga: fidaxomicina, cujo espectro de ação na microbiota intestinal é menor, comparado aos antibióticos citados, reduzindo a disbiose que favorece a ICD (Mullane, 2014). Entretanto, devido ao seu elevado custo, a fidaxomicina não é comumente usada em muitos países, inclusive no Brasil (Bartsch *et al.*, 2013).

Na medicina veterinária, também se recomenda o uso de antimicrobianos, sobretudo quando a terapia de suporte não é suficiente para promover a recuperação do estado clínico do animal. Da mesma forma que em seres humanos, o uso da vancomicina é indicado apenas quando as estirpes são resistentes ao metronidazol, a fim de evitar a seleção de outros microrganismos resistentes a essa droga (Keessen *et al.*, 2011a). Em cães, a terapia antimicrobiana é baseada apenas no uso de metronidazol, limitando as opções de tratamento nos casos de recorrência (Diniz *et al.*, 2021). Em algumas espécies, como suínos, o tratamento antimicrobiano de leitões neonatos pode ser caro e trabalhoso, dada a quantidade de leitões que pode contrair a ICD.

Além disso, os protocolos também recomendam o transplante de microbiota fecal (TMF) como uma opção de tratamento quando houver duas ou mais recorrências da ICD ou quando houver refratariedade ao tratamento antimicrobiano (Rao e Malani, 2020). Assim, o paciente recebe, via colonoscopia ou via oral (pílulas gastroresistentes), uma solução fecal oriunda de um doador saudável que atenda a vários requisitos clínicos e testes microbiológicos. Porém, ainda existem algumas restrições e questionamentos sobre a aplicação desse procedimento por se tratar de uma técnica recente e com um grande desconhecimento de seus efeitos a longo prazo no indivíduo transplantado. Logo, são essenciais estudos multicêntricos com acompanhamento dos pacientes tratados para avaliar a eficácia e a segurança do TMF (Beurden *et al.*, 2017; Tariq *et al.*, 2019). Em 2018, foi relatada pela primeira vez a utilização do TMF via colonoscopia para o tratamento de um cão com diarreia crônica-recorrente por *C. difficile* (Diniz *et al.*, 2021). Deve-se destacar que recentemente foi criado o primeiro centro de TMF no Brasil, sediado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Terra *et al.*, 2020). Existem vários estudos de estratégias de tratamento inovadoras que envolvem o uso de outros antimicrobianos, de bacteriófagos, de antitoxinas A e B, de probióticos e de produtos naturais. Esses estudos fornecem abordagens otimistas para terapias futuras. No entanto, o conhecimento limitado sobre a segurança e eficácia desses tratamentos exige mais pesquisas que os tornem amplamente aceitos na comunidade médica e científica (Roshan *et al.*, 2018).

2.9. Resistência antimicrobiana

A pressão seletiva promovida através do uso de antimicrobianos desempenha papel importante na epidemiologia de *C. difficile*, cuja capacidade adaptativa e a plasticidade do seu genoma determinam um aumento de estirpes resistentes a vários antibióticos. A emergência

de novas estirpes está intimamente relacionada ao surgimento de mecanismos de resistência - de natureza multifatorial - às drogas. Assim, tais fatores têm sido descritos recentemente, como: aquisição de genes de resistência a antimicrobianos por meio da transferência de elementos genéticos móveis intraespecíficos e interespecíficos, pressão seletiva *in vivo*, resultando em mutações, expressão alterada de proteínas ativas redox, metabolismo do ferro, reparo do ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* - DNA) e formação de biofilme (Peng *et al.*, 2017).

Nesse sentido, acreditava-se que a resistência ao metronidazol estava relacionada à presença de genes da família nitroimidazol (*nim*) (Gal e Brazier, 2004). Entretanto, alguns estudos apontam que estirpes sabidamente resistentes a tal droga não apresentam nenhum dos genes pertencentes a essa família. Outros dados provenientes de estudos proteômicos sugerem que a resistência provavelmente é devida a várias alterações em vias metabólicas ainda a serem definidas, como àquelas que envolvem a atividade de nitrorredutases, captação de ferro e reparo do DNA, por exemplo (Chong *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2014). Além disso, o biofilme, estrutura de múltiplas camadas composta por polissacarídeos, proteínas e DNA, tem sido proposto como fator importante que contribui para a resistência antimicrobiana de *C. difficile*, sobretudo ao metronidazol e à vancomicina. A presença de genes como *cwp84*, *flicC* e *luxS* relacionados a proteínas da matriz extracelular, à flagelina, e ao mecanismo de *quorum sensing*, respectivamente, demonstrou estimular a formação de biofilme (Đapa *et al.*, 2013; Vuotto *et al.*, 2016).

Recentemente, um plasmídeo de 7 Kb denominado pCD-METRO (*plasmid from C. difficile associated with metronidazole resistance*) foi proposto como um dos fatores genotípicos responsáveis por conferir resistência ao metronidazol em estirpes toxigênicas e não toxigênicas de *C. difficile* (Boekhoud *et al.*, 2020). Nesse estudo, foi observada ampla distribuição desse plasmídeo nos países da Europa, visto que estirpes oriundas da Espanha, Polônia, República Checa e Alemanha foram pCD-METRO⁺. Dentre os isolados portadores do plasmídeo, quase 74% (n = 17) pertenciam ao ribotipo não toxigênico RT010 (clado 1). Além disso, durante uma ICD recorrente, foi sugerida a aquisição do pCD-METRO por uma estirpe toxigênica por meio da transferência horizontal de genes.

Há também um mecanismo genético ainda em estudo regulado pelo operon *heme-sensing membrane protein system* (HsmRA), capaz de reduzir a sensibilidade antimicrobiana ao metronidazol e à vancomicina através do grupo heme liberado durante o processo

inflamatório desencadeado pela ICD (Knippel *et al.*, 2020). Dessa forma, mediante a presença de uma elevada concentração do grupo heme no lúmen intestinal, o operon HsmRA é expresso de modo que as moléculas heme são redirecionadas para algumas proteínas de membrana, promovendo uma barreira protetora frente ao estresse oxidativo gerado pela resposta inflamatória do organismo, bem como pelo efeito do metronidazol e da vancomicina sobre as células de *C. difficile*.

Em relação à vancomicina, possivelmente a resistência também esteja associada à presença dos genes *vanA*, *rpoC* e *murG* (Baghani *et al.*, 2020). O gene *vanA* foi relatado pela primeira vez no ano de 1988 em isolados de *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina. É provável que sua transferência horizontal ocorra pelo transposon Tn1546, tornando-se um marcador genético com relevância epidemiológica em *C. difficile* (Cetinkaya *et al.*, 2000). Além disso, antibióticos utilizados em casos recorrentes de ICD, como as rifamicinas, têm promovido pressão seletiva *in vivo* capaz de mediar mutações na subunidade *beta* (β) do gene *rpoB*, que codifica uma RNA polimerase bacteriana (O'Connor *et al.*, 2008). As alterações de *rpoB* também podem estar envolvidas na sensibilidade reduzida de *C. difficile* à fidaxomicina (Leeds *et al.*, 2014).

A pressão seletiva *in vivo* também é observada na seleção de subpopulações resistentes às fluoroquinolonas, como no caso do antibiótico moxifloxacina, significativamente associado à predisposição da ICD. Quando a concentração ambiental de fluoroquinolonas não é capaz de inibir *C. difficile*, o patógeno pode sofrer mutações nos genes constitutivos *gyrA* e/ou *gyrB*. Caso ocorra substituições de aminoácidos armazenados nas subunidades da enzima DNA-girase (i. e. GyrA e GyrB), tais estirpes podem tornar-se resistentes a essa classe de drogas (Kuwata *et al.*, 2015). Dentre outros fatores, esse processo foi observado durante a década de 2000 na emergência do RT027, estirpe hipervirulenta clássica representante do clado 2 que se disseminou por várias regiões do mundo, causando surtos em seres humanos com sintomatologia grave (He *et al.*, 2013).

A resistência à tetraciclina em *C. difficile* se dá por meio da presença de diversos genes *tet*, como: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)* e *tet(44)*, por exemplo (Spigaglia *et al.*, 2006; Spigaglia *et al.*, 2018; Knight *et al.*, 2019). Estudos sugerem que esses genes são transferidos por transposons do tipo Tn5397, Tn6164, Tn6190, Tn916 e seus variantes. A classe *tet* mais difundida é a *tet(M)*, cujo mecanismo de aquisição por *C. difficile* permanece incerto. Um modelo proposto para essa aquisição é por transferência genética através de

transposons oriundos de outras bactérias patogênicas contendo *tet(M)*, como *Bifidobacterium longum*. Por sua vez, o gene *tet(W)*, que possui a segunda maior variedade de hospedeiros, demonstrou-se presente em estirpes resistentes à tetraciclina de suínos e humanos (Fry *et al.*, 2012).

A tetraciclina é amplamente utilizada na prevenção e tratamento de infecções em animais nos sistemas de produção pecuária, sobretudo na suinocultura (Van Boeckel *et al.*, 2015). Em um estudo recente realizado no Reino Unido, algumas evidências apoiam a hipótese de que a administração desse antimicrobiano em animais fomentou uma pressão seletiva que resultou na evolução do RT078 resistente à tetraciclina em pelo menos três eventos independentes. Nesse trabalho, verificou-se que o RT078, pertencente ao clado 5, compartilha algumas características genotípicas, como o gene *tet(O)*, com 99% de homologia da sequência nucleotídica com patógenos de suínos (i.e. *Streptococcus suis*) e outros patógenos zoonóticos (i.e. *Campylobacter jejuni* e *C. coli*). Possivelmente, a rápida expansão geográfica desse ribotipo emergente com potencial zoonótico se deu através da cadeia produtiva de alimentos (Dingle *et al.*, 2019).

Em *C. difficile*, a resistência à família de antibióticos macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLS_B) geralmente é conferida por metilação ribossômica. Isso se deve ao gene das metilases ribossômicas da eritromicina de classe B (*ermB*), que codifica uma RNA metilase 23S e induz resistência à clindamicina e à eritromicina, por exemplo (Spigaglia *et al.*, 2018). Esse gene geralmente está localizado em transposons Tn6194, Tn6215, Tn5398 e seus variantes. Verificou-se que o transposon Tn5398 pode ser transferido de *C. difficile* para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, enquanto o Tn6194 pode ser transferido entre estirpes de *C. difficile* ou para *E. faecalis* (Wasels *et al.*, 2014).

Entretanto, alguns estudos demonstraram que isolados de *C. difficile* que apresentavam resistência fenotípica para antibióticos MLS_B eram negativos para o gene *ermB* (Spigaglia *et al.*, 2011). Recentemente, apontaram-se outros genes que provavelmente desempenham mecanismos de resistência a essa classe de antibióticos na ausência do gene *ermB*. Os genes em questão são *cfrB* e *cfrC*, os quais também codificam uma 23S rRNA metiltransferase e conferem resistência aos antibióticos PhLOPSA (fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e estreptogramina A) (Candela *et al.*, 2017). O gene *cfr* foi identificado em variantes do transposon Tn6218 (Dingle *et al.*, 2014).

2.10. Testes de sensibilidade antimicrobiana

Há vários testes de sensibilidade antimicrobiana disponíveis para *C. difficile* que têm sido utilizados em análises clínicas e em estudos epidemiológicos. A maioria dos métodos bem aceitos se concentra em mensurar a concentração inibitória mínima (CIM) de determinado antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para *C. difficile*, tais métodos incluem diluição em ágar, microdiluição em caldo e *epsilometer test (E-test)* (Brook *et al.*, 2013). Todos esses são classificados como testes quantitativos.

O teste de diluição em ágar é recomendado como “padrão-ouro” para *C. difficile* pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* (CLSI, 2020; EUCAST, 2020). A maioria dos estudos que visam avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *C. difficile* utiliza esse método, tornando-se uma referência comparativa dos demais testes. O teste de diluição em ágar é um método preciso, a escolha dos antibióticos a serem testados é flexível e pode ser modificada de acordo com a finalidade clínica e/ou científica, sendo adequado para testar um grande número de isolados. Entretanto, é trabalhoso e requer profissionais qualificados e experientes para realizar o teste adequadamente. Além disso, geralmente é realizado em lotes e não permite prontamente o teste de isolados individuais, conforme a demanda de laboratórios clínicos (Peng *et al.*, 2017).

Diante disso, atualmente grande parte dos laboratórios utiliza o *E-test*, dispositivo em forma de fita com um gradiente predefinido de determinado antibiótico, cobrindo uma faixa de concentração contínua para a indicação da CIM. Embora existam diferenças nos valores da CIM entre a diluição em ágar e o *E-test*, foi demonstrada alta concordância categórica entre esses métodos, visto que os resultados não levaram a nenhuma discrepância na classificação do resultado final: *wild-type* (WT – sem mecanismo de resistência fenotípico detectável) e *non-wild-type* (NWT – com mecanismos presumidos ou conhecidos de resistência adquirida e susceptibilidade reduzida) (Poilane *et al.*, 2000; Baines *et al.* 2008; Moura *et al.* 2013). Assim, o *E-test* possibilita a análise de diversos antibióticos para várias estirpes ao mesmo tempo. Apesar disso, o alto custo dificulta o uso extensivo desse método em laboratórios clínicos e em estudos epidemiológicos.

Embora em alguns trabalhos os valores da CIM de *C. difficile* tenham sido obtidos usando microdiluição em caldo, o CLSI recomenda esse método, dentre os micro-organismos anaeróbios, apenas para testar espécies de *Bacteroides spp.* e *Parabacteroides spp.* (CLSI,

2020). Um estudo recente com *C. difficile* demonstrou um viés negativo para a microdiluição em caldo, cuja CIM foi inferior quando comparada com a diluição em ágar. Além disso, a reprodutibilidade com microdiluição em caldo foi variável, provavelmente dependente dos antibióticos testados. Portanto, de acordo com as diretrizes do CLSI, os resultados indicaram que o método de microdiluição em caldo não é uma alternativa para testes de sensibilidade antimicrobiana para *C. difficile* (Hastey *et al.*, 2017).

Por sua vez, o teste de disco difusão não é recomendado pelo CLSI para *C. difficile*, mas alguns trabalhos sugerem que poderia ser uma opção para o teste de sensibilidade antimicrobiana desse patógeno, tornando-se uma alternativa viável como teste de triagem ou até mesmo único. Tal teste promove a formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano em placa, em que o diâmetro obtido classificaria o isolado como WT ou NWT em relação à droga testada (Valsesia *et al.*, 2015). Em 2012, um estudo realizado na Dinamarca com 211 isolados mostrou que foi encontrada uma excelente concordância entre os resultados da CIM obtidas por *E-test* e por disco difusão para avaliar a sensibilidade de estirpes de *C. difficile* ao metronidazol, à vancomicina e à moxifloxacina (Erikstrup *et al.*, 2012). Após três anos, outro estudo também realizado na Dinamarca com um número expressivo de isolados (n = 2702) confirmou que o teste por disco difusão permite triar amostras que tenham sensibilidade reduzida ao metronidazol e à vancomicina (Holt *et al.*, 2015).

Em relação ao uso do teste de disco difusão para outras drogas, como amoxicilina-ácido clavulânico, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacina, ceftriaxona, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, linezolida, clindamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, teicoplanina e tetraciclina, também há estudos que sugerem a confiabilidade desse método para *C. difficile* (Poilane *et al.*, 2007; Corbellini *et al.*, 2014). Apesar disso, a utilização de valores da zona de inibição para interpretação dos testes em relação a *C. difficile* não é determinado pelo CLSI ou pelo EUCAST, para qualquer tipo de antibiótico. Portanto, o debate sobre o teste de disco difusão como método qualificado para análise de sensibilidade antimicrobiana em *C. difficile* ainda está aberto.

2.11. Prevenção e Controle

Como já foi mencionado, os esporos formados por *C. difficile* permanecem viáveis no ambiente por um longo período, favorecendo ampla distribuição do agente e consequente contaminação de novos hospedeiros susceptíveis. Assim, medidas que atuem na eliminação de

esporos são essenciais para prevenção da ICD. Nesse sentido, protocolos de desinfecção com ação esporicida devem ser aplicados periodicamente em leitos de internação hospitalar, clínicas veterinárias e baias e galpões que abrigam criações, por exemplo. Tais medidas devem ser reforçadas após o diagnóstico de pessoas e animais infectados, bem como promover o isolamento desses indivíduos em áreas com acesso restrito (Barra-Carrasco e Paredes-Sabja, 2014; McDonald *et al.*, 2018). Na pecuária, algumas medidas como a compostagem de bio sólidos e a digestão anaeróbia termofílica dos excrementos dos animais provaram ser intervenções eficazes para reduzir a concentração de esporos de *C. difficile*, contribuindo para o controle da carga ambiental de esporos (Xu *et al.*, 2016a; Xu *et al.*, 2016b).

Uma forma de grande potencial na prevenção da ICD seria o uso de vacinas em seres humanos e animais. Porém, ainda não há nenhum imunógeno no mundo aprovado por agências regulatórias. Atualmente, existem diversos grupos de estudos engajados na descoberta de uma formulação que atenda aos requisitos necessários para garantir a segurança e proteção dos indivíduos vacinados (Riley *et al.*, 2019). Assim, destaca-se uma vacina experimental bivalente em desenvolvimento para prevenção da doença em humanos que contém as toxinas A e B alteradas geneticamente e quimicamente, de modo que são capazes de induzir altos níveis de anticorpos neutralizantes. Essa vacina demonstra ser promissora e segue em análise já na fase III dos testes clínicos (Kitchin *et al.*, 2020).

Além da utilização de imunoprofiláticos de resposta ativa, a ICD também pode ser prevenida por meio de estirpes não toxigênicas de *C. difficile*. Apesar de não produzirem toxinas, essas estirpes são capazes de colonizar o cólon intestinal do seu hospedeiro, competindo com estirpes toxigênicas pelos sítios de ligação nos enterócitos. Estudos experimentais em roedores, leitões e humanos já demonstraram que essas estirpes não toxigênicas são capazes de prevenir a ICD ou reduzir suas manifestações clínicas, bem como diminuir a disseminação ambiental de esporos de estirpes toxigênicas, como o ribotipo hipervirulento RT078 (Oliveira Júnior *et al.*, 2016; Gerding *et al.*, 2018; Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

Mediante a possibilidade de transmissão interespecífica de *C. difficile*, medidas de higiene pessoal ao estabelecer contato com animais domésticos, sobretudo com suas fezes, são essenciais para prevenção da transmissão de esporos via fecal-oral. Separação de rebanhos de diferentes espécies, controle de roedores e exposição a animais silvestres são medidas

oportunas no meio rural. Cuidados no preparo e consumo de alimentos como frutas, hortaliças, carnes e frutos do mar também são importantes para reduzir os riscos de exposição à forma esporulada do patógeno. Por fim, deve-se manter vigilante na manutenção da limpeza de dependências domiciliares e hospitalares de uso médico-veterinário, a fim de reduzir a disseminação de esporos e minimizar o desafio de novos hospedeiros (Rodríguez Diaz *et al.*, 2018).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana ao metronidazol, à vancomicina e à moxifloxacina de estirpes toxigênicas e não toxigênicas de *C. difficile* isoladas de seres humanos e animais no Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana ao metronidazol, à vancomicina e à moxifloxacina por meio do método de disco difusão;
- 2) Avaliar a CIM ao metronidazol, à vancomicina e à moxifloxacina por meio do método *E-test* apenas dos isolados considerados NWT pelo teste de disco difusão;
- 3) Detectar possíveis mutações no gene *gyrA* de parte dos isolados resistentes à moxifloxacina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização dos isolados

Foram utilizadas 120 estirpes de *C. difficile* pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacterioses e Pesquisas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Cadastro SISGEN: AEC0B9A) (ANEXO A). Os isolados são compostos por 97 (81%) estirpes toxigênicas e por 23 (19%) estirpes não toxigênicas, isoladas entre o período de 2011 a 2020 no Brasil, tendo como hospedeiras as seguintes espécies: seres humanos (n = 75), cães (n = 18), suínos (n = 9), equinos (n = 8), felinos (n = 7), roedores (n = 2) e répteis (n = 1). A maioria dos isolados toxigênicos possuía a identificação do ribotipo definida previamente, os quais se destacam o RT106 (n = 26), RT014/020 (n = 12) e RT126 (n = 8) (APÊNDICE A). As amostras permaneciam armazenadas sob refrigeração a -20 °C em alíquotas de um mL em meio de cultura líquido, composto por infusão de cérebro coração (*brain heart infusion* – BHI).

4.2. Sensibilidade antimicrobiana - Disco difusão

Foi utilizado o método de disco difusão para avaliar a sensibilidade antimicrobiana de isolados de *C. difficile* conforme os parâmetros estabelecidos por Erikstrup *et al.* (2012) e Holt *et al.* (2015), a fim de triar os isolados possivelmente resistentes (NWT) aos antimicrobianos metronidazol, vancomicina e moxifloxacina, ambos com disco de 6 mm de diâmetro. Dessa forma, as amostras foram descongeladas e estriadas em meio de cultura seletivo composto por ágar Mueller-Hinton (Oxoid) suplementado com 5% de sangue equino e 1% de Ácido Taurocólico de Sódio Hidratado (Sigma–Aldrich) (Ágar Sangue Taurocolate – AST). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por até 48 horas em câmara de anaerobiose (Thermo Fisher Scientific) com a composição atmosférica de 80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂.

Após confirmação do crescimento de colônias puras, os isolados foram utilizados para execução do teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão. O procedimento baseou-se nas recomendações do CLSI para o teste de sensibilidade antimicrobiana por diluição em ágar indicado para micro-organismos anaeróbios (CLSI, 2020). Resumidamente, colônias dos isolados foram diluídas até escala McFarland 1,0 e, com um suabe estéril, cada solução foi estriada em uma placa previamente pré-reduzida de ágar Brucella (Difco Laboratories) suplementado com sangue ovino (5% v/v), hemina (5 µg/mL) e vitamina K (1 µg/mL)

(*Brucella Blood Agar* – BBA). O estriamento foi realizado em toda a placa em quatro sentidos sobrepostos com ângulo de 90°. Em seguida, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de metronidazol (5 µg), de vancomicina (5 µg) e de moxifloxacina (5 µg) foram adicionados na placa em posições equidistantes. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas em câmara de anaerobiose com a condição atmosférica já citada. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar em um prazo máximo de 25 minutos por processamento.

Após o período de incubação, as placas foram avaliadas visualmente sobre uma superfície de fundo preto com o auxílio de uma fonte luminosa. As placas que apresentaram zona de inibição do crescimento bacteriano tiveram o halo medido através de um paquímetro. Mediante os valores obtidos, as estirpes foram classificadas como NWT se o halo apresentado foi < 23 mm para metronidazol, < 19 mm para vancomicina e < 20 mm para moxifloxacina. Para valores iguais ou superiores aos que foram citados, as estirpes foram classificadas como WT (Erikstrup *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2015).

Durante todos os processamentos foram utilizados os seguintes controles de acordo com as respectivas faixas de controle de qualidade: *B. fragilis* ATCC 252805 (clindamicina, 0,5 µg/mL – 2,0 µg/mL) incubado em anaerobiose e *S. aureus* ATCC 29213 (ciprofloxacina, 0,12 µg/mL – 0,5 µg/mL) incubado em aerobiose, ambos a 37 °C durante 48 horas.

4.3. Sensibilidade antimicrobiana - *E-test*

Somente os isolados que demonstraram fenótipo resistente (NWT) no teste de disco difusão para qualquer um dos antimicrobianos testados foram avaliados por *E-test* a fim de determinar a CIM para confirmação da resistência antimicrobiana. O protocolo adotado para execução do *E-test* foi o mesmo aplicado para o teste de disco difusão, seguindo o uso da escala 1,0 do padrão McFarland, conforme as instruções do fabricante das fitas (metronidazol e vancomicina, Oxoid; moxifloxacina, BioMérieux). Cada uma das fitas apresentava graduação crescente de 0,015 µg/mL – 256 µg/mL de metronidazol, 0,015 µg/mL – 256 µg/mL de vancomicina e 0,015 µg/mL – 32 µg/mL de moxifloxacina. Os valores da CIM obtidos foram interpretados de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo CLSI e EUCAST para confirmação do perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados NWT (CLSI, 2020; EUCAST, 2020). Os isolados classificados como resistentes ao metronidazol por meio do *E-test* (CIM > 2 µg/mL) foram submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana em meio de cultura desprovido de sangue e de hemina para avaliar se houve

influência do grupo heme na CIM obtida por esse antibiótico (Boekhoud *et al.*, 2020). Dessa forma, foi utilizado o mesmo protocolo de padronização do inóculo das etapas anteriores. Em seguida, as amostras foram plaqueadas em ágar BHI sem hemina e vitamina K, com adição de uma fita de *E-test*. Novamente, todas as placas foram incubadas juntamente com os controles *B. fragilis* ATCC 252805 e *S. aureus* ATCC 29213 como descrito anteriormente.

4.4. Sequenciamento

Três dos isolados classificados como resistentes à moxifloxacina pelo *E-test* foram submetidos à PCR para amplificação do gene *gyrA* seguido de sequenciamento capilar para avaliar a presença de mutações nas regiões determinantes de resistência às quinolonas (Chatedaki *et al.*, 2019). Resumidamente, colônias puras foram diluídas em microtubo contendo 400 µl de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram submetidas ao método de extração térmica do DNA por meio de aquecimento a 98 °C durante 20 minutos, seguido de centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi pipetado em microtubo e refrigerado a -20 °C. Posteriormente, foi realizada a reação de PCR como previamente descrito (Mulvey *et al.*, 2010) (QUADRO 2).

Quadro 2 – Descrição dos primers utilizados para detecção do gene *gyrA*

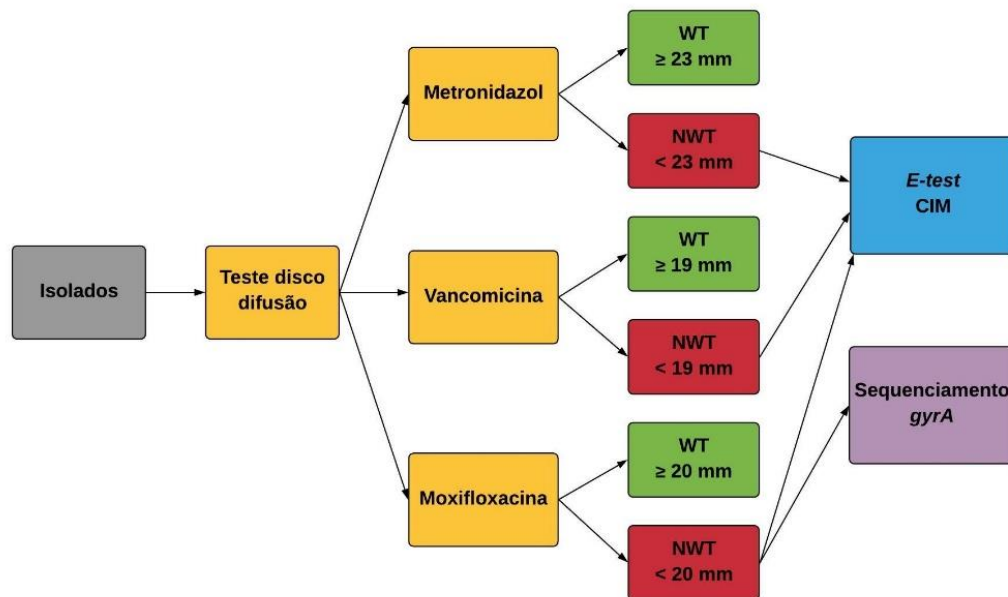
| Genes | Sequência primer (5' – 3') | [] Primer | Anelamento | Banda | Referência |
|-------------|----------------------------|------------|------------|--------|--------------------------------|
| <i>GyrA</i> | F: TTGAAATAGCGGAAGAAATGA | 0,6 µM | 52° C | 633 pb | Mulvey <i>et al.</i> , 2010 |
| | R: TTGCAGCTGTAGGGAAATC | | | | |

Legenda: F, *forward*; R, *reverse*; [], concentração; pb, pares de bases.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para confirmação da amplificação, 5 µl dos amplicons foram submetidos à corrida eletroforética (120 V, 30 mA, 40 minutos) em gel de agarose a 1,5% suplementado com 0,01% de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As bandas foram observadas sob luz UV e comparadas a um marcador de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Brasil). Os amplicons foram então submetidos à purificação (AMPure XP, Agencourt) e ao sequenciamento capilar (Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis, Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram alinhadas com os alelos de referência *gyrA* disponíveis no *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* (PubMLST) e traduzidas em aminoácidos através do programa Bioedit 7.2 (FIGURA 2).

Figura 2 - Fluxograma das etapas realizadas



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5. Análises estatísticas

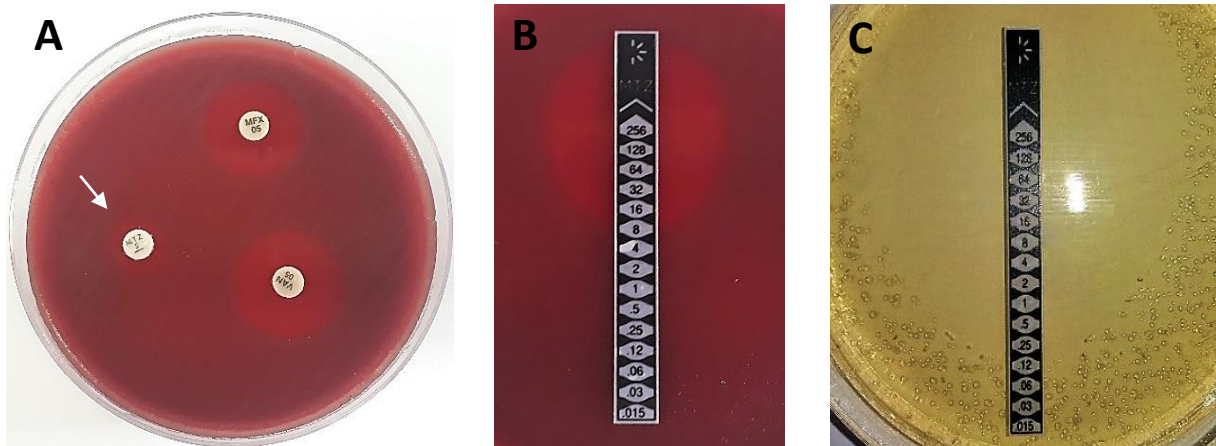
O teste Exato de Fisher ou o teste Qui-quadrado foram utilizados para avaliação de possíveis associações entre resistência e sensibilidade de acordo com as seguintes variáveis: ribotipo, espécie, ano de isolamento, provável clado, presença do gene codificador da toxina binária (*cdtB*) e estirpes toxigênicas/não toxigênicas (GraphPad Prism 8). Além disso, foi calculada a razão *Odds-Ratio* (OR) entre as variáveis que apresentaram diferenças estatísticas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes.

5. RESULTADOS

5.1. Sensibilidade antimicrobiana

Das 120 amostras avaliadas, apenas um isolado (0,8%) foi resistente ao metronidazol no método disco difusão. Os demais isolados apresentaram halo ≥ 28 mm (GRÁFICO 1), valor bastante distante do limite de 23 mm para definição como NWT (Erikstrup *et al.*, 2012). A amostra NWT foi submetida ao *E-test* e apresentou o valor da CIM > 256 $\mu\text{g/mL}$ para o metronidazol, confirmando a classificação de resistência. Posteriormente, ao executar o ensaio em meio BHI para a avaliação da influência do grupo heme na resistência antimicrobiana, houve marcante redução da CIM para 8 $\mu\text{g/mL}$ no meio BBA, utilizado como controle deste ensaio. Ainda assim, o valor de 8 $\mu\text{g/mL}$ permite a classificação do isolado como resistente ao metronidazol. No *E-test* em ágar BHI, houve uma redução da CIM para 0,12 $\mu\text{g/mL}$, classificando a estirpe como sensível ao metronidazol nessa circunstância (FIGURA 3). Esse isolado corresponde a uma estirpe não toxigênica, pertencente ao RT010 (clado 1) que foi isolada de um cão com diarreia em 2014.

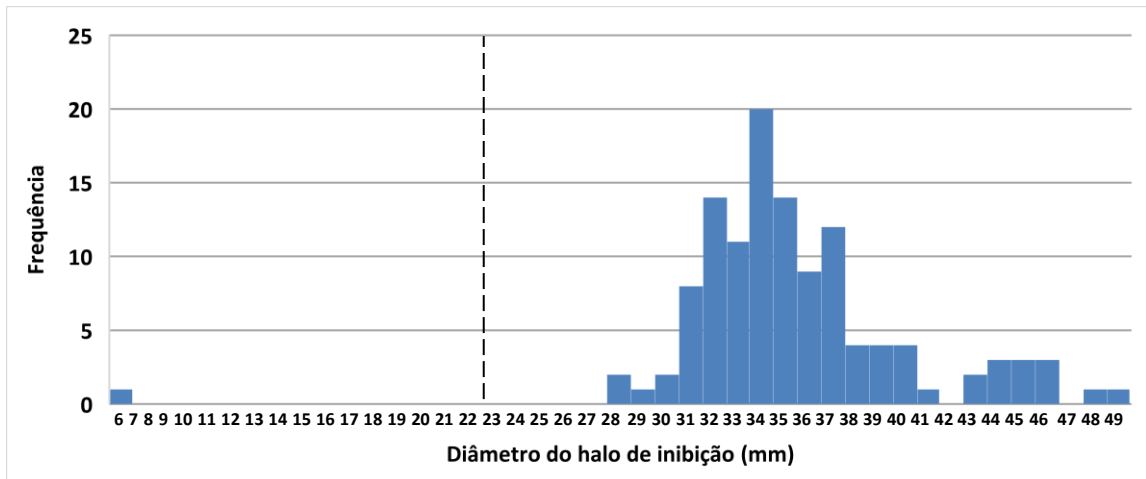
Figura 3 – Teste de sensibilidade antimicrobiana para o metronidazol



Legenda: A, teste de disco difusão com isolado resistente ao metronidazol (seta) em BBA; B, *E-test* com isolado apresentando CIM = 8 $\mu\text{g/mL}$ para o metronidazol em BBA; C, *E-test* com isolado apresentando CIM = 0,12 $\mu\text{g/mL}$ para o metronidazol em BHI sem suplementos.

Fonte: Arquivo pessoal.

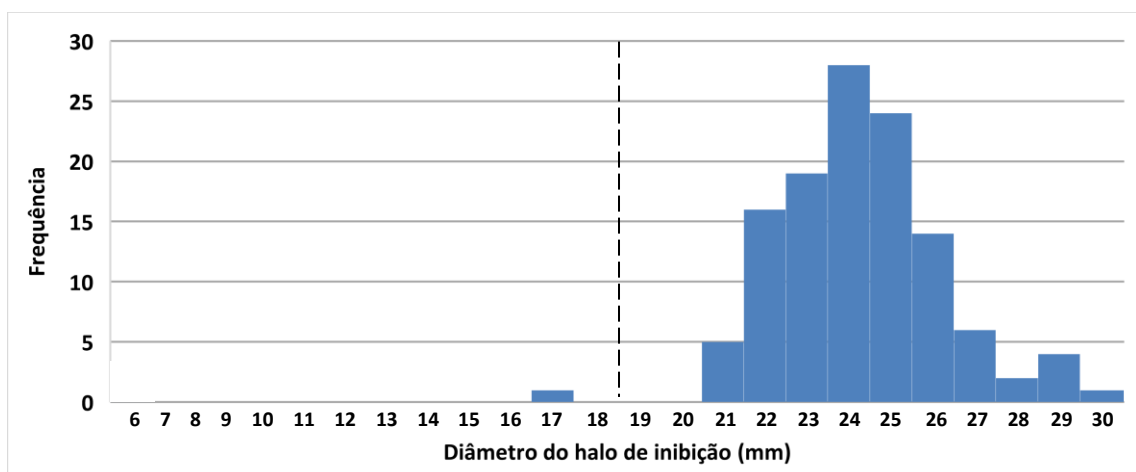
Gráfico 1 - Distribuição da frequência dos isolados de *C. difficile* (n = 120) de acordo com o diâmetro do halo obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão para o metronidazol, destacando o ponto de corte de 23 mm (linha tracejada)



Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação à vancomicina, um isolado (0,8%) apresentou halo igual a 17 mm, sendo classificado como NWT pelos padrões sugeridos por Erikstrup *et al.* (2012) (NWT < 20 mm). Porém, a CIM de tal isolado foi igual a 2 µg/mL no *E-test*, valor limite estabelecido pelo EUCAST que configura sensibilidade à vancomicina (≤ 2 µg/mL), sendo, portanto, considerado sensível. O isolado em questão é toxigênico e pertencente ao RT882, sendo isolado de um ser humano com diarreia em 2012. Demais isolados apresentaram halo ≥ 21 mm para vancomicina (GRÁFICO 2).

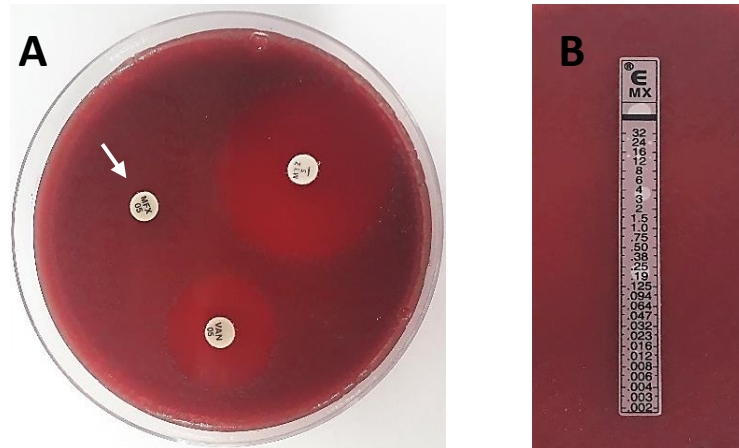
Gráfico 2 - Distribuição da frequência dos isolados de *C. difficile* (n = 120) de acordo com o diâmetro do halo obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão para a vancomicina, destacando o ponto de corte de 19 mm (linha tracejada)



Fonte: Arquivo pessoal.

Já a moxifloxacina, 17 (14%) isolados foram resistentes, todos com ausência de halo de inibição no teste de disco difusão (FIGURA 4). Os demais isolados, classificados como WT, apresentaram halo ≥ 21 mm (GRÁFICO 3).

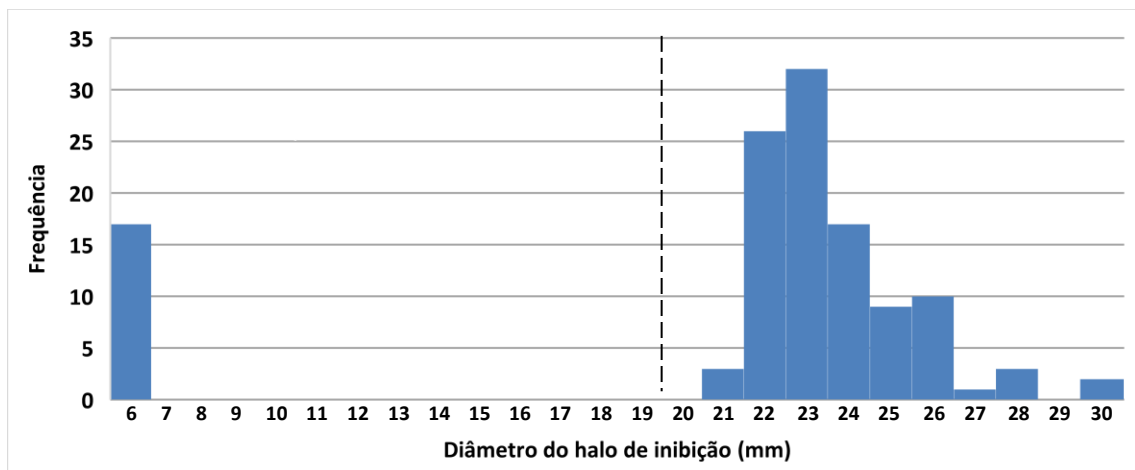
Figura 4 – Teste de sensibilidade antimicrobiana para a moxifloxacina



Legenda: A, teste de disco difusão com isolado resistente à moxifloxacina (seta) em BBA; B, *E-test* com isolado apresentando CIM > 32 $\mu\text{g/mL}$ para a moxifloxacina em BBA.

Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico 3 - Distribuição da frequência dos isolados de *C. difficile* ($n = 120$) de acordo com o diâmetro do halo obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão para a moxifloxacina, destacando o ponto de corte de 20 mm (linha tracejada)

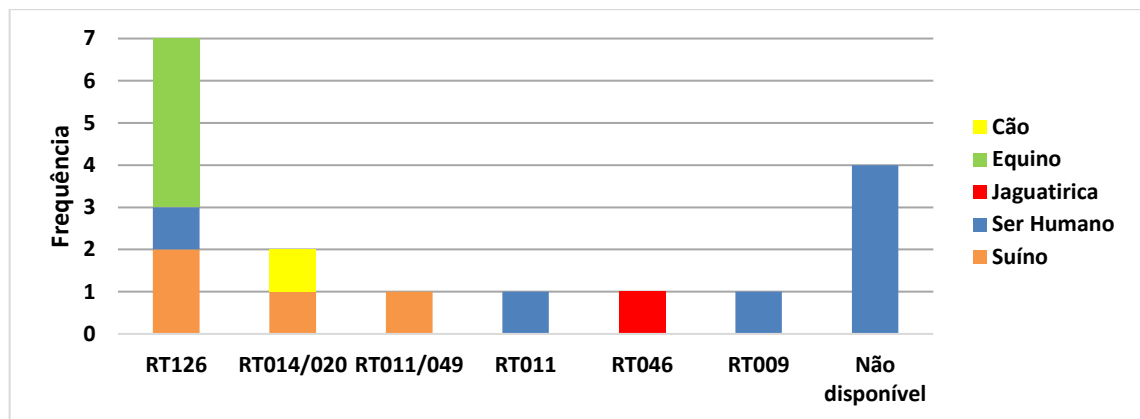


Fonte: Arquivo pessoal.

Todos os isolados classificados como NWT no teste de disco difusão para moxifloxacina obtiveram no *E-test* a CIM > 32 $\mu\text{g/mL}$. Dos isolados resistentes, 12 (71%) eram toxigênicos e cinco (29%) não toxigênicos. Entre os toxigênicos, foram encontradas amostras resistentes dos ribotipos RT126 ($n = 7$), RT014/020 ($n = 2$), RT011/049 ($n = 1$), RT011 ($n = 1$) e RT046 ($n = 1$). Apenas um isolado não toxigênico possui a ribotipagem

definida, sendo RT009. As estirpes resistentes à moxifloxacina foram isoladas de seres humanos (n = 7) e de diversas espécies de animais, incluindo suínos (n = 4), equinos (n = 4), cão (n = 1) e felino (n = 1) (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 - Distribuição da frequência dos hospedeiros de isolados de *C. difficile* (n = 17) resistentes à moxifloxacina de acordo com o ribotipo



Fonte: Arquivo pessoal.

Não foi observada associação entre resistência à moxifloxacina e ano de isolamento, bem como entre estirpes toxigênicas e não toxigênicas ($P = 0,3157$; $OR = 1,96$). Por espécie, observou-se uma associação entre resistência à moxifloxacina e isolados de equinos e de suínos ($P = 0,0139$; $OR = 7,61$ e $P = 0,0228$; $OR = 6,03$, respectivamente). Quando os isolados dessas espécies são comparados individualmente apenas com isolados de seres humanos, há uma associação de resistência com os isolados de equinos e de suínos ($P = 0,0093$; $OR = 9,71$ e $P = 0,0149$; $OR = 7,77$, respectivamente). Em adição, o RT126 (clado 5) foi o único ribotipo a apresentar associação com resistência à moxifloxacina ($P < 0,0001$, $OR = 71,4$), enquanto o RT106 (clado 1) foi associado à sensibilidade à droga ($P = 0,0220$). Além disso, estirpes pertencentes ao clado 5, o qual inclui o RT126, foram associadas à resistência à moxifloxacina ($P = 0,0003$; $OR = 13,42$). Comparando o clado 5 apenas com o clado 1, observa-se maior resistência entre isolados do clado 5 ($P = 0,0006$; $OR = 11,86$). Por fim, quando se considera apenas as estirpes toxigênicas, há associação entre a presença do gene codificador da toxina binária (*cdtB*) e a resistência à moxifloxacina ($P = 0,0144$; $OR = 4,86$).

5.2. Sequenciamento

Foram sequenciadas três amostras com fenótipo resistente à moxifloxacina ($CIM > 32 \mu\text{g/mL}$) para o gene *gyrA*. Tais amostras foram isoladas de cão (RT014/020, 2011), de suíno

(RT126, 2019), e de ser humano (não toxigênica, 2018). Ambas as amostras apresentaram uma mutação na cadeia polipeptídica, ocorrendo uma substituição do aminoácido treonina pelo aminoácido isoleucina na posição 82 (Thr82Ile).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou o teste de disco difusão, previamente avaliado em outros trabalhos, para triar estirpes de *C. difficile* possivelmente resistentes ao metronidazol, à vancomicina e à moxifloxacina (Erikstrup *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2015). Estirpes classificadas como NWT no teste de disco difusão foram submetidas ao *E-test* para confirmação da resistência. Entre as 120 amostras testadas, 19 (15%) foram submetidas à confirmação via *E-test* e apenas um isolado (0,8%) foi reclassificado após o teste confirmatório. Essa proporção é inferior ao limite considerável aceitável (i.e. 3%) de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CLSI (CLSI M23-ED5, 2018).

Somente um isolado (0,8%) foi resistente ao metronidazol no teste de disco difusão, cujo resultado foi posteriormente confirmado por *E-test*. Os demais isolados apresentaram halos com medidas consideravelmente superiores ao ponto de corte estabelecido em estudos anteriores (i.e. 23 mm) (Erikstrup *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2015). Esse fato corrobora os achados de Erikstrup *et al.* (2012) e Holt *et al.* (2015), os quais destacaram que a maioria dos isolados considerados sensíveis apresentaram uma média elevada no tamanho dos halos, facilitando a classificação segura do perfil de sensibilidade antimicrobiana em relação ao metronidazol frente ao seu ponto de corte. Apesar de existirem trabalhos indicando uma alta proporção de amostras resistentes ao metronidazol (Alder *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2017; Baghani *et al.*, 2020), a baixa frequência encontrada no presente estudo assemelha-se à grande maioria dos estudos prévios (Saha *et al.*, 2019).

A única estirpe resistente ao metronidazol no presente estudo foi isolada de um cão diarreico e classificada como RT010. De acordo com Orden *et al.* (2017), tal ribotipo não toxigênico é amplamente difundido e comumente isolado de cães, os quais parecem desempenhar papel relevante na sua dispersão. Há relatos do isolamento do RT010 também de seres humanos (Moura *et al.*, 2013; Boekhoud *et al.*, 2020). Deve-se destacar que o uso recorrente do metronidazol para o tratamento de cães diarreicos pode estar contribuindo para a seleção de ribotipos resistentes a essa droga (Andrés-Lasheras *et al.*, 2018).

A estirpe em questão, desde o seu isolamento em 2014, foi armazenada a -20 °C e descongelada algumas vezes para execução dos testes de sensibilidade antimicrobiana. Inicialmente, essa estirpe apresentou CIM > 256 µg/mL. Entretanto, posteriormente houve uma redução da CIM (8 µg/mL) de no mínimo 32 vezes. Uma ocorrência semelhante foi descrita no trabalho de Peláez *et al.* (2008), em que todas as estirpes inicialmente resistentes

ao metronidazol (n = 14) tornaram-se sensíveis após serem descongeladas para uma nova realização do teste de sensibilidade antimicrobiana. Porém, Peláez *et al.* (2008) relataram ainda que, após exposição prolongada *in vitro* a concentrações subinibitórias de metronidazol, a resistência foi restaurada. Álvarez-Pérez *et al.* (2014) também relataram que um isolado do RT078 inicialmente resistente à droga (CIM > 256 µg/mL), tornou-se sensível após uma segunda passagem no meio de cultura BBA (CIM = 0,25 µg/mL). Deve-se destacar, porém, que no presente estudo, mesmo com a redução dos valores da CIM a estirpe permaneceu classificada como resistente ao metronidazol (> 2 µg/mL) (EUCAST, 2020).

Além disso, não foi observada a formação de colônias heterorresistentes ao metronidazol dentre todos os isolados avaliados. Novamente, Peláez *et al.* (2008) destacaram que o método de disco difusão facilita a observação do crescimento progressivo de colônias com sensibilidade reduzida ao metronidazol dentro do halo de inibição ao longo do período de incubação, as quais podem contribuir para o fracasso no tratamento da ICD *in vivo*.

A resistência ao metronidazol possui natureza multifatorial, sendo o mecanismo molecular relacionado a tal fato ainda desconhecido (Lynch *et al.*, 2013; Dingsdag e Hunter, 2018; Boekhoud *et al.*, 2020). Resultados preliminares de um estudo apresentado no *7th International C. difficile Symposium* (ICDS, 2020) sugerem um novo mecanismo de resistência ao metronidazol. Foi observada uma relação dose dependente do grupo heme presente na composição do meio de cultura utilizado no teste de sensibilidade antimicrobiana e o aumento da CIM frente ao metronidazol. Essa relação ocorreu em diferentes ribotipos de isolados clínicos de *C. difficile*. O mecanismo molecular associado a esse efeito heme dependente permanece desconhecido. Porém, constatou-se uma deleção na porção C-terminal do gene *hsmA*, regulado pelo grupo heme, em todos os RT010 resistentes ao metronidazol. Deve-se destacar que recentemente Knippel *et al.* (2020) apontaram a influência desse gene na falha terapêutica da ICD com a vancomicina em modelo murino. Dessa forma, é possível que o mesmo resultado também seja observado no tratamento com o metronidazol, pois ambas as drogas geram efeito citotóxico através do estresse oxidativo, o qual é minimizado pela expressão do gene *hsmA*. Entretanto, na comunicação pessoal apresentada durante o ICDS, não houve alteração da CIM pelos isolados de *C. difficile* em relação à vancomicina mediante a variação na concentração do grupo heme. No presente estudo, o isolado RT010 resistente ao metronidazol foi testado por *E-test* em ágar BHI sem adição de hemina e apresentou CIM = 0,12 µg/mL, tornando-se sensível à droga nessa condição experimental, corroborando os relatos recém apresentados (ICDS, 2020).

Nenhum dos isolados avaliados apresentou resistência à vancomicina. Deve-se pontuar, porém, que um isolado apresentou diâmetro compatível com a classificação NWT no teste de disco difusão, sugerindo resistência à droga. Entretanto, tal fenótipo não foi confirmado no *E-test*, de modo que se evitou a classificação errônea do perfil de sensibilidade antimicrobiana do isolado via teste de disco difusão. Conforme já mencionado, é aceitável que o teste de disco difusão possa apresentar resultado “falso resistente” com uma margem de erro de até 3% do total de isolados avaliados (CLSI M23-ED5, 2018). Dessa forma, o presente trabalho se adequa a esse parâmetro (0,8%). É importante destacar que esse erro de classificação pode ser ainda uma falha do *E-test*, visto que em alguns casos é possível que a CIM mensurada por esse teste seja subestimada em pelo menos uma diluição quando comparada com o valor obtido por teste de diluição em ágar, considerado “padrão-ouro” (Moura et al, 2013; Baines e Wilcox, 2015). Caso tenha ocorrido a redução da CIM, a classificação do isolado “falso resistente” seria afetada, haja vista que o resultado obtido foi igual a 2 µg/mL, valor equivalente ao ponto de corte para vancomicina (EUCAST, 2020). Nessa perspectiva, a classificação do isolado seria, de fato, resistente. Apesar disso, na maioria das vezes, esse desvio não interfere na classificação do perfil de sensibilidade antimicrobiana por *E-test*, pois mesmo com a redução da CIM, na maioria dos casos o valor mantém-se dentro do intervalo de classificação em relação ao ponto de corte do antimicrobiano testado (Poilane *et al.*, 2000). Para elucidar essa hipótese seria necessário realizar o teste de diluição em ágar com o isolado suspeito.

A ausência de isolados resistentes à vancomicina no presente estudo vai de encontro à maioria dos resultados obtidos por trabalhos realizados em todo o mundo (Saha *et al.*, 2019). No Brasil, além de serem escassos os estudos em que houve avaliação da sensibilidade antimicrobiana de *C. difficile*, a testagem de amostras foi pequena na maioria deles (Balassiano *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2017). Tal fato dificulta estabelecer comparações em relação ao perfil de sensibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas no país, embora não tenha sido relatado isolados resistentes à vancomicina, como foi observado no presente estudo. Entretanto, os trabalhos de Fraga *et al.* (2015) e Saldanha *et al.* (2020) configuram as únicas exceções nesse cenário, visto que nesses estudos 58% (n = 29) e 75% (n = 9), respectivamente, dos isolados avaliados foram resistentes à vancomicina, valores superiores à maioria dos trabalhos relatados em diversos países (Norman *et al.*, 2014; Samonis *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2017).

Dentre os três antimicrobianos avaliados, a moxifloxacina apresentou maior frequência de estirpes resistentes ($n = 17$, 14%), das quais sete (41%) foram isoladas de seres humanos. Segundo Krutova *et al.* (2020), uma susceptibilidade reduzida à moxifloxacina em isolados causadores da ICD em seres humanos aumenta a chance de desfecho fatal dos pacientes, sendo então relevante do ponto de vista clínico e epidemiológico. No Brasil, até o momento, a maior frequência de estirpes resistentes à essa droga foi de 8% (Fraga *et al.*, 2016) em isolados de seres humanos do estado de São Paulo. Estirpes do RT027, consideradas hipervirulentas e isoladas no início da década de 2010 em hospitais dos EUA, tendem a apresentar taxas de resistência à moxifloxacina superiores a 90% (Tickler *et al.*, 2019). Dessa forma, as taxas de resistência a essa droga variam muito em função da localização geográfica, do período de amostragem e do ribotipo avaliado.

Avaliando especificamente os isolados, chama a atenção para a maior frequência de resistência à moxifloxacina nos isolados do ribotipo RT126 (clado 5), onde sete dos oito isolados (87%) apresentaram esse perfil. Tal frequência é similar à relatada por Baghani *et al.* (2020), em que todos os seis (100%) isolados avaliados de seres humanos do RT126 foram resistentes à droga. Deve-se enfatizar que o RT126, assim como o RT078, está relacionado ao aumento da ocorrência da ICD em seres humanos adquirida na comunidade, e nesse contexto animais têm sido considerados possíveis reservatórios dessas estirpes toxigênicas (Zhang *et al.*, 2020). Equinos e suínos, por exemplo, apresentam alta prevalência do *sequence type* (ST) 11, o qual pertence ao clado 5 e abrange os ribotipos RT126 e RT078 (Rodríguez Diaz *et al.*, 2018; Knight *et al.*, 2019). Estirpes desses ribotipos tendem a ser resistentes à moxifloxacina, principalmente quando isoladas de suínos e de seres humanos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2017; Barbanti e Spigaglia, 2020). Ainda, observa-se no presente estudo que estirpes isoladas de equinos e suínos apresentaram uma forte associação com a resistência à moxifloxacina quando comparadas a isolados de seres humanos. Deve-se enfatizar que tais associações estatísticas parecem caminhar juntas: estirpes do clado 5 (sobretudo RT126) são comumente resistentes à moxifloxacina e são frequentemente isoladas de algumas espécies animais, incluindo equinos e suínos.

Estirpes classificadas como RT014/020 (clado 1) apresentaram apenas dois (16%) isolados resistentes, cuja frequência foi semelhante ao estudo epidemiológico de Tickler *et al.* (2019). Outros quatro isolados de diferentes ribotipos que também pertencem ao clado 1 foram resistentes à moxifloxacina. Em contrapartida, todos os 26 (100%) isolados do RT106 (clado 1) foram sensíveis a essa droga ($P = 0,0220$), ratificando a baixa prevalência de

isolados resistentes desse ribotipo relatada em vários outros países (Cheknis *et al.*, 2018). De fato, no presente estudo, a probabilidade de uma estirpe do clado 1 ser resistente à moxifloxacina é pelo menos 11 vezes menor que as estirpes do clado 5.

Além disso, é importante destacar a frequência de isolados não toxigênicos resistentes à moxifloxacina ($n = 5$). Apesar de inicialmente incapazes de causar doença pela ausência dos genes codificadores das toxinas A e B, a resistência antimicrobiana dessas estirpes não deve ser ignorada já que existe a possibilidade de transmissão dos genes de resistência para estirpes toxigênicas, além da já descrita possibilidade de reversão de virulência através da aquisição por transferência horizontal do PaLoc (Brouwer *et al.*, 2013). Diante disso, torna-se cada vez mais relevante avaliar o protagonismo epidemiológico de isolados não toxigênicos na emergência de estirpes de *C. difficile* que apresentam resistência antimicrobiana (Barbanti e Spigaglia, 2020; Imwattana *et al.*, 2020).

Do ponto de vista genotípico, é interessante notar que, entre isolados clínicos com alto nível de resistência às fluoroquinolonas, as mutações no gene *gyrA* são mais frequentes do que as mutações no gene *gyrB* (Spigaglia *et al.*, 2018). Dessa forma, optou-se no presente trabalho avaliar a presença de mutações apenas no gene *gyrA*, de modo que os três isolados selecionados para sequenciamento desse gene apresentaram a mesma mutação (Thr82Ile) que pode justificar a resistência à moxifloxacina com uma CIM elevada (Kuwata *et al.*, 2015). De acordo com Spigaglia *et al.* (2018), essa mutação é a alteração mais comum encontrada nas regiões determinantes de resistência às quinolonas em *C. difficile*. Além disso, tal mutação não afeta o *fitness* de *C. difficile in vitro*, sugerindo que essa substituição pode ser mantida na população bacteriana mesmo na ausência da pressão seletiva por antibióticos, de modo que diferentes estirpes possam apresentar essa alteração (Wasels *et al.*, 2015). De acordo com Vernon *et al.* (2019), a mutação Thr82Ile no gene *gyrA* foi identificada em isolados do ribotipo hipervirulento RT027 (clado 2), sugerindo uma possível vantagem epidemiológica em relação ao elevado potencial de expansão clonal em diferentes regiões. No presente estudo, o gene mutante foi observado em isolados pertencentes aos ribotipos toxigênicos RT126 e RT014/020, além de um isolado não toxigênico sem ribotipo definido. Ambos os ribotipos com fenótipo resistente à moxifloxacina (i.e. CIM > 32 µg/mL) já foram descritos em países da Europa e da Ásia com a presença da mutação Thr82Ile, cujo isolamento foi realizado através de amostras de bovinos e seres humanos (Arca-Suarez *et al.*, 2018; Baghani *et al.*, 2020; Masarikova *et al.*, 2020). Em relação às estirpes não toxigênicas, Kuwata *et al.* (2015) identificaram tal mutação nos ST48 e ST109. No Brasil, apenas dois estudos avaliaram

a presença de substituições nos genes *gyrA* e *gyrB* em *C. difficile*, não sendo encontrada a mutação do tipo Thr82Ile (Balassiano *et al.*, 2011; Secco *et al.*, 2014).

Dentre as limitações inerentes ao presente trabalho, o uso de isolados de *C. difficile* previamente refrigerados pode gerar resultados que favoreçam a classificação WT ao metronidazol, devido à tendência de redução da CIM para estirpes submetidas a esse tipo de armazenamento, conforme descrito por Peláez *et al.* (2008). Além disso, a ausência de metadados do histórico clínico dos pacientes não permite inferir suposta influência de medidas terapêuticas prévias na promoção da pressão seletiva nos casos de ICD. Por último, deve-se enfatizar que a grande maioria das estirpes de seres humanos foram oriundas de um único hospital, o que representa uma baixa representatividade epidemiológica nos padrões de resistência dos isolados.

7. CONCLUSÃO

A resistência antimicrobiana ao metronidazol e à vancomicina foi pouco frequente nos isolados de *C. difficile* avaliados. Já a moxifloxacina apresentou taxa de resistência moderada, sobretudo dentre as estirpes isoladas de equinos, suínos e seres humanos, nas quais foi detectado em algumas delas a mutação Thr82Ile no gene *gyrA*.

REFERÊNCIAS

- Abou Chakra, C. N., Pepin, J., Sirard, S., & Valiquette, L. (2014). Risk Factors for Recurrence, Complications and Mortality in *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 9(6), e98400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098400>
- Adler, A., Miller-Roll, T., Bradenstein, R., Block, C., Mendelson, B., Parizade, M., Paitan, Y., Schwartz, D., Peled, N., Carmeli, Y., & Schwaber, M. J. (2015). A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: The dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(1), 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.05.015>
- Aguayo, C., Flores, R., Lévesque, S., Araya, P., Ulloa, S., Lagos, J., Hormazabal, J. C., Tognarelli, J., Ibáñez, D., Pidal, P., Duery, O., Olivares, B., & Fernández, J. (2015). Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. *Epidemiology and Infection*, 143(14), 3069–3073. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000023>
- 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>
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J. L., Peláez, T., Lanzarot, M. P., Harmanus, C., Kuijper, E., & García, M. E. (2015). Faecal shedding of antimicrobial-resistant *Clostridium difficile* strains by dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 56(3), 190–195. <https://doi.org/10.1111/jsap.12311>
- Álvarez-Pérez, Sergio. (2014). Shedding of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (*Equus quagga burchellii*). *S. A*, 5.
- 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(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1402-7>
- Arca-Suárez, J., Galán-Sánchez, F., Cano-Cano, F., García-Santos, G., & Rodríguez-Iglesias, M. A. (2018). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of toxigenic clinical isolates of *Clostridium difficile* causing infections in the south of Spain. *Anaerobe*, 54, 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.09.006>

- Arruda, P. H. E., Madson, D. M., Ramirez, A., Rowe, E., Lizer, J. T., & Songer, J. G. (2013). Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe*, 22, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.010>
- Arvand, M., Moser, V., Schwehn, C., Bettge-Weller, G., Hensgens, M. P., & Kuijper, E. J. (2012). High Prevalence of *Clostridium difficile* Colonization among Nursing Home Residents in Hesse, Germany. *PLoS ONE*, 7(1), e30183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030183>
- Avberšek, J., Pirš, T., Pate, M., Rupnik, M., & Ocepek, M. (2014). *Clostridium difficile* in goats and sheep in Slovenia: Characterisation of strains and evidence of age-related shedding. *Anaerobe*, 28, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.009>
- Bagdasarian, N., Rao, K., & Malani, P. N. (2015). Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* in Adults: A Systematic Review. *JAMA*, 313(4), 398. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.17103>
- Baghani, A., Mesdaghinia, A., Kuijper, Ed. J., Aliramezani, A., Talebi, M., & Douraghi, M. (2020). High prevalence of *Clostridiodes difficile* PCR ribotypes 001 and 126 in Iran. *Scientific Reports*, 10(1), 4658. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61604-z>
- Baines, S. D., O'Connor, R., Freeman, J., Fawley, W. N., Harmanus, C., Mastrantonio, P., Kuijper, E. J., & Wilcox, M. H. (2008). Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1046–1052. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn313>
- Baines, S., & Wilcox, M. (2015). Antimicrobial Resistance and Reduced Susceptibility in *Clostridium difficile*: Potential Consequences for Induction, Treatment, and Recurrence of *C. difficile* Infection. *Antibiotics*, 4(3), 267–298. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4030267>
- Balassiano, I. T., Yates, E. A., Domingues, R. M. C. P., & Ferreira, E. O. (2012). *Clostridium difficile*: A problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *Journal of Medical Microbiology*, 61(2), 169–179. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.037077-0>
- Balassiano, Ilana T., Miranda, K. R., Boente, R. F., Pauer, H., Oliveira, I. C. M., Santos-Filho, J., Amorim, E. L. T., Caniné, G. A., Souza, C. F., Gomes, M. Z. R., Ferreira, E. O., Brazier, J. S., & Domingues, R. M. C. P. (2009). Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, 15(3), 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.12.007>

- Balassiano, Ilana T., Santos-Filho, J. dos, Vital-Brazil, J. M., Nouér, S. A., Souza, C. R. C., Brazier, J. S., de O. Ferreira, E., & Domingues, R. M. C. P. (2011). Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(2), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9483-8>
- Balassiano, Ilana Teruszkin, dos Santos-Filho, J., de Oliveira, M. P. B., Ramos, M. C., Japiassu, A. M., dos Reis, A. M., Brazier, J. S., de Oliveira Ferreira, E., & Domingues, R. M. C. P. (2010). An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(4), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017>
- Barbanti, F., & Spigaglia, P. (2020). Microbiological characteristics of human and animal isolates of *Clostridioides difficile* in Italy: Results of the Istituto Superiore di Sanità in the years 2006–2016. *Anaerobe*, 61, 102136. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102136>
- Barra-Carrasco, J., & Paredes-Sabja, D. (2014). *Clostridium difficile* spores: A major threat to the hospital environment. *Future Microbiology*, 9(4), 475–486. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.2>
- Bartlett, J. G. (1994). *Clostridium difficile*: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge about the Organism. *Clinical Infectious Diseases*, 18, S265–S272. <http://www.jstor.org/stable/4457852>
- Bartsch, S. M., Umscheid, C. A., Fishman, N., & Lee, B. Y. (2013). Is Fidaxomicin Worth the Cost? An Economic Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 57(4), 555–561. <https://doi.org/10.1093/cid/cit346>
- 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>
- Bjöersdorff, O. G., Lindberg, S., Kiil, K., Persson, S., Guardabassi, L., & Damborg, P. (2021). Dogs are carriers of *Clostridioides difficile* lineages associated with human community-acquired infections. *Anaerobe*, 67, 102317. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102317>
- Boekhoud, I. M., Hornung, B. V. H., Sevilla, E., Harmanus, C., Bos-Sanders, I. M. J. G., Terveer, E. M., Bolea, R., Corver, J., Kuijper, E. J., & Smits, W. K. (2020). Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nature Communications*, 11(1), 598. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14382-1>

- Bojesen, A. M., Olsen, K. E. P., & Bertelsen, M. F. (2006). Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Veterinary Microbiology*, 116(4), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.025>
- Borriello, S. P. (1978). *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* AND THE ETIOLOGY OF PSEUDOMEMBRANOUS COLITIS H. E. LARSON A. B. PRICE P. HONOUR. 4.
- Britton, R. A., & Young, V. B. (2014). Role of the Intestinal Microbiota in Resistance to Colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, 146(6), 1547–1553. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.059>
- Brook, I., Wexler, H. M., & Goldstein, E. J. C. (2013). Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 526–546. <https://doi.org/10.1128/CMR.00086-12>
- Brouwer, M. S. M., Roberts, A. P., Hussain, H., Williams, R. J., Allan, E., & Mullany, P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nature Communications*, 4(1), 2601. <https://doi.org/10.1038/ncomms3601>
- 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>
- Candela, T., Marvaud, J.-C., Nguyen, T. K., & Lambert, T. (2017). A cfr- like gene cfr (C) conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(3), 496–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.013>
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *CLIN. MICROBIOL. REV.*, 13, 22.
- Chandrasekaran, R., & Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 723–750. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>
- Chatedaki, C., Voulgaridi, I., Kachrimanidou, M., Hrabak, J., Papagiannitsis, C. C., & Petinaki, E. (2019). Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance of

Greek *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.09.009>

Cheknis, A., Johnson, S., Chesnel, L., Petrella, L., Sambol, S., Dale, S. E., Nary, J., Sears, P., Citron, D. M., Goldstein, E. J. C., & Gerding, D. N. (2018). Molecular epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains recovered from clinical trials in the US, Canada and Europe from 2006-2009 to 2012-2015. *Anaerobe*, 53, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.009>

Cheng, V. C. C., Yam, W. C., Lam, O. T. C., Tsang, J. L. Y., Tse, E. Y. F., Siu, G. K. H., Chan, J. F. W., Tse, H., To, K. K. W., Tai, J. W. M., Ho, P. L., & Yuen, K. Y. (2011). *Clostridium difficile* isolates with increased sporulation: Emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(11), 1371. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1231-0>

Chong, P. M., Lynch, T., McCorrister, S., Kibsey, P., Miller, M., Gravel, D., Westmacott, G. R., Mulvey, M. R., & the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). (2014). Proteomic Analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* Clinical Isolate Resistant to Metronidazole. *PLoS ONE*, 9(1), e82622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082622>

CLSI. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. 5th ed. CLSI guideline M23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

Collins, D. A., Hawkey, P. M., & Riley, T. V. (2013). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-21>

Corbellini, S., Piccinelli, G., De Francesco, M. A., Ravizzola, G., & Bonfanti, C. (2014). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* strains from nosocomial-acquired infections. *Folia Microbiologica*, 59(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0281-3>

Costa, C. L., López-Ureña, D., de Oliveira Assis, T., Ribeiro, R. A., Silva, R. O. S., Rupnik, M., Wilcox, M. H., de Carvalho, A. F., do Carmo, A. O., Dias, A. A. M., de Carvalho, C. B. M., Chaves-Olarte, E., Rodríguez, C., Quesada-Gómez, C., & de Castro Brito, G. A. (2016). A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. *Anaerobe*, 40, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.005>

- Cowardin, C. A., Buonomo, E. L., Saleh, M. M., Wilson, M. G., Burgess, S. L., Kuehne, S. A., Schwan, C., Eichhoff, A. M., Koch-Nolte, F., Lyras, D., Aktories, K., Minton, N. P., & Petri, W. A. (2016). The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. *Nature Microbiology*, *1*(8), 16108. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.108>
- Dallal, R. M., Harbrecht, B. G., Boujoukas, A. J., Sirio, C. A., Farkas, L. M., Lee, K. K., & Simmons, R. L. (2002). Fulminant *Clostridium difficile*: An Underappreciated and Increasing Cause of Death and Complications: *Annals of Surgery*, *235*(3), 363–372. <https://doi.org/10.1097/00000658-200203000-00008>
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D., & Unnikrishnan, M. (2013). Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, *195*(3), 11.
- 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*(2), e02790-18, /mbio/10/2/mBio.02790-18.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.02790-18>
- Dingle, K. E., Elliott, B., Robinson, E., Griffiths, D., Eyre, D. W., Stoesser, N., Vaughan, A., Golubchik, T., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., Peto, T. E., Walker, A. S., Riley, T. V., Crook, D. W., & Didelot, X. (2014). Evolutionary History of the *Clostridium difficile* Pathogenicity Locus. *Genome Biology and Evolution*, *6*(1), 36–52. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt204>
- Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: An update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(2), 265–279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx351>
- Diniz, A. N., de Oliveira Júnior, C. A., Vilela, E. G., Figueiredo, H. C. P., Rupnik, M., Wilcox, M. H., Fawley, W. N., Blanc, D. S., Faria Lobato, F. C., & Silva, R. O. S. (2019). Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe*, *56*, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.01.010>
- Diniz, A. N., Souza, A. da C. F. de, Nepomuceno, A. C., Marcelino, S. A. C., Pierezan, F., Lobato, F. C. F., & Silva, R. O. S. (2021). Fecal microbiota transplantation via colonoscopy in a dog with *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* infection. *Ciência Rural*, *51*(3), e20200783. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200783>

- Dubin, K. A., Mathur, D., McKenney, P. T., Taylor, B. P., Littmann, E. R., Peled, J. U., van den Brink, M. R. M., Taur, Y., Pamer, E. G., & Xavier, J. B. (2019). Diversification and Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* during Intestinal Domination. *Infection and Immunity*, 87(7), e00102-19, /iai/87/7/IAI.00102-19.atom. <https://doi.org/10.1128/IAI.00102-19>
- Edwards, A. N., Suárez, J. M., & McBride, S. M. (2013). Culturing and Maintaining *Clostridium difficile* in an Anaerobic Environment. *Journal of Visualized Experiments*, 79, 50787. <https://doi.org/10.3791/50787>
- Erikstrup, L. T., Danielsen, T. K. L., Hall, V., Olsen, K. E. P., Kristensen, B., Kahlmeter, G., Fuursted, K., & Justesen, U. S. (2012). Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), E266–E272. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020.
- Eyre, D., Tracey, L., Elliott, B., Slimings, C., Huntington, P., Stuart, R., Korman, T., Kotsiou, G., McCann, R., Griffiths, D., Fawley, W., Armstrong, P., Dingle, K., Walker, A., Peto, T., Crook, D., Wilcox, M., & Riley, T. (2015). Emergence and spread of predominantly community-onset *Clostridium difficile* PCR ribotype 244 infection in Australia, 2010 to 2012. *Eurosurveillance*, 20(10), 21059. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.10.21059>
- Farrar, W. E. ([s.d.]). *ENTERITIS AND COLIFORM BACTEREMIA IN GUINEA PIGS GIVEN PENICILIN*. 14.
- Forster, A. J., Taljaard, M., Oake, N., Wilson, K., Roth, V., & van Walraven, C. (2012). The effect of hospital-acquired infection with *Clostridium difficile* on length of stay in hospital. *Canadian Medical Association Journal*, 184(1), 37–42. <https://doi.org/10.1503/cmaj.110543>
- Fraga, E. G., Nicodemo, A. C., & Sampaio, J. L. M. (2016). Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(5), 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.07.004>
- Freeman, J., Vernon, J., Pilling, S., Morris, K., Nicolson, S., Shearman, S., Clark, E., Palacios-Fabrega, J. A., & Wilcox, M. (2020). Five-year Pan-European, longitudinal surveillance of *Clostridium difficile* ribotype prevalence and antimicrobial resistance: The extended ClosER study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(1), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03708-7>

- Fry, P. R., Thakur, S., Abley, M., & Gebreyes, W. A. (2012). Antimicrobial Resistance, Toxinotype, and Genotypic Profiling of *Clostridium difficile* Isolates of Swine Origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2366–2372. <https://doi.org/10.1128/JCM.06581-11>
- Gal, M. (2004). Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. Carrying nim genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(1), 109–116. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh296>
- Gateau, C., Couturier, J., Coia, J., & Barbut, F. (2018). How to: Diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(5), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005>
- Gerding, D. N., Sambol, S. P., & Johnson, S. (2018). Non-toxicogenic *Clostridioides* (Formerly *Clostridium*) *difficile* for Prevention of C. *difficile* Infection: From Bench to Bedside Back to Bench and Back to Bedside. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1700. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01700>
- Giel, J. L., Sorg, J. A., Sonenshein, A. L., & Zhu, J. (2010). Metabolism of Bile Salts in Mice Influences Spore Germination in *Clostridium difficile*. *PLoS ONE*, 5(1), e8740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008740>
- Gonzalez Ronquillo, M., & Angeles Hernandez, J. C. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A., Dekker, F. W., & Kuijper, E. J. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*, 47(9), 1162–1170. <https://doi.org/10.1086/592257>
- Gould, L. H., & Limbago, B. (2010). *Clostridium difficile* in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 577–582. <https://doi.org/10.1086/655692>
- Green, R. H. (1974). *The Association of Viral Activation with Penicillin Toxicity in Guinea Pigs and Hamsters*. *Yale Journal of Biology and Medicine* 3. 166-181.
- Guery, B., Galperine, T., & Barbut, F. (2019). *Clostridioides difficile*: Diagnosis and treatments. *BMJ*, l4609. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4609>

- Guh, A. Y., Adkins, S. H., Li, Q., Bulens, S. N., Farley, M. M., Smith, Z., Holzbauer, S. M., Whitten, T., Phipps, E. C., Hancock, E. B., Dumyati, G., Concannon, C., Kainer, M. A., Rue, B., Lyons, C., Olson, D. M., Wilson, L., Perlmutter, R., Winston, L. G., McDonald, L. C. (2017). Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection in Adults: A Case-Control Study. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(4). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx171>
- Hall, I. C. (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. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1935.01970020105010>
- Hastey, C. J., Dale, S. E., Nary, J., Citron, D., Law, J. H., Roe-Carpenter, D. E., & Chesnel, L. (2017). Comparison of *Clostridium difficile* minimum inhibitory concentrations obtained using agar dilution vs broth microdilution methods. *Anaerobe*, 44, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.006>
- He, M., Sebaihia, M., Lawley, T. D., Stabler, R. A., Dawson, L. F., Martin, M. J., Holt, K. E., Seth-Smith, H. M. B., Quail, M. A., Rance, R., Brooks, K., Churcher, C., Harris, D., Bentley, S. D., Burrows, C., Clark, L., Corton, C., Murray, V., Rose, G., ... Parkhill, J. (2010). Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7527–7532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914322107>
- Hernández-Rocha, C., & Naour, S. (2012). Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: Una visión actualizada. *Rev Chilena Infectol*, 12.
- Hernández-Rocha, C., Naour, S., Álvarez-Lobos, M., & Paredes-Sabja, D. (2012). Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: Una visión actualizada. *Revista chilena de infectología*, 29(4), 434–445. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000400011>
- Himsworth, C. G., Patrick, D. M., Mak, S., Jardine, C. M., Tang, P., & Weese, J. S. (2014). Carriage of *Clostridium difficile* by Wild Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*) and Black Rats (*Rattus rattus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1299–1305. <https://doi.org/10.1128/AEM.03609-13>
- Holt, H. M., Danielsen, T. K., & Justesen, U. S. (2015). Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(11), 2243–2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>
- Hundsberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M., & Eichel-Streiber, C. (1997). Transcription Analysis of the Genes *tcdA-E* of the Pathogenicity Locus of

Clostridium difficile. *European Journal of Biochemistry*, 244(3), 735–742. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00735.x>

Imwattana, K., Kiratisin, P., Riley, T. V., & Knight, D. R. (2020). Genomic basis of antimicrobial resistance in non-toxicogenic *Clostridium difficile* in Southeast Asia. *Anaerobe*, 66, 102290. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102290>

Indra, A., Huhulescu, S., Schneeweis, M., Hasenberger, P., Kernbichler, 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>

International *C. difficile* Symposium. 7th. 2020. Bleed. Boekhoud, Ilse M. Heme is crucial for médium-dependent metronidazole resistance in clinical isolates of *C. difficile*. Virtual Meeting

Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., & Rupnik, M. (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *PLOS ONE*, 11(11), e0167101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>

Janezic, S., & Rupnik, M. (2015). Genomic diversity of *Clostridium difficile* strains. *Research in Microbiology*, 166(4), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.002>

Jank, T., Gieseemann, T., & Aktories, K. (2007). Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: New insights into structure and function. *Glycobiology*, 17(4), 15R–22R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm004>

Jin, D., Luo, Y., Huang, C., Cai, J., Ye, J., Zheng, Y., Wang, L., Zhao, P., Liu, A., Fang, W., Wang, X., Xia, S., Jiang, J., & Tang, Y.-W. (2017). Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Patients in Eastern China. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(3), 801–810. <https://doi.org/10.1128/JCM.01898-16>

Jones, R. L., Adney, W. S., & Shideler, R. K. (1987). Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(7), 1225–1227. <https://doi.org/10.1128/JCM.25.7.1225-1227.1987>

Kamiya, S., & Nakamura, S. (1993). Virulence Factors of *Clostridium difficile* and Its Pathogenesis in Intestinal Infection in Man. *Bifidobacteria and Microflora*, 12(1), 1–17. https://doi.org/10.12938/bifidus1982.12.1_1

- Keessen, E. C., Gaastra, W., & Lipman, L. J. A. (2011a). *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., 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. (2011b). 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>
- Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., Frost, E. H., Savelkoul, P., Nicholson, B., van den Berg, R. J., Kato, H., Sambol, S. P., Zukowski, W., Woods, C., Limbago, B., Gerding, D. N., & McDonald, L. C. (2008). Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease Analysis, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PCR-Ribotyping, Multilocus Sequence Typing, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Surface Layer Protein A Gene Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(2), 431–437. <https://doi.org/10.1128/JCM.01484-07>
- Kim, J., Smathers, S. A., Prasad, P., Leckerman, K. H., Coffin, S., & Zaoutis, T. (2008). Epidemiological Features of *Clostridium difficile*-Associated Disease Among Inpatients at Children’s Hospitals in the United States, 2001-2006. *PEDIATRICS*, *122*(6), 1266–1270. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0469>
- Kitchin, N., Remich, S. A., Peterson, J., Peng, Y., Gruber, W. C., Jansen, K. U., Pride, M. W., Anderson, A. S., Knirsch, C., & Webber, C. (2020). A Phase 2 Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Two 3-Dose Regimens of a *Clostridium difficile* Vaccine in Healthy US Adults Aged 65 to 85 Years. *Clinical Infectious Diseases*, *70*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz153>
- Knetsch, C., Connor, T., Mutreja, A., van Dorp, S., Sanders, I., Browne, H., Harris, D., Lipman, L., Keessen, E., Corver, J., Kuijper, E., & Lawley, T. (2014). Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Eurosurveillance*, *19*(45), 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. (2017). Zoonotic Transfer of *Clostridium difficile* Harboring Antimicrobial Resistance between Farm Animals and Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(3), e01384-17, /jcm/56/3/e01384-17.atom. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-17>

- Knight, D. R., Elliott, B., Chang, B. J., Perkins, T. T., & Riley, T. V. (2015). Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 721–741. <https://doi.org/10.1128/CMR.00127-14>
- 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, /mbio/10/2/mBio.00446-19.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.00446-19>
- Knippel, R. J., Wexler, A. G., Miller, J. M., Beavers, W. N., Weiss, A., de Crécy-Lagard, V., Edmonds, K. A., Giedroc, D. P., & Skaar, E. P. (2020). *Clostridioides difficile* Senses and Hijacks Host Heme for Incorporation into an Oxidative Stress Defense System. *Cell Host & Microbe*, 28(3), 411-421.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.015>
- Krutova, M., Capek, V., Nycova, E., Vojackova, S., Balejova, M., Geigerova, L., Tejkalova, R., Havlinova, L., Vagnerova, I., Cermak, P., Ryskova, L., Jezek, P., Zamazalova, D., Vesela, D., Kucharova, A., Nemcova, D., Curdova, M., Nyc, O., & Drevinek, P. (2020). The association of a reduced susceptibility to moxifloxacin in causative *Clostridium (Clostridioides) difficile* strain with the clinical outcome of patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00765-y>
- Kuijper, E. J., Coignard, B., & Tüll, P. (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x>
- Kullin, B. R., Reid, S., & Abratt, V. (2018). *Clostridium difficile* in patients attending tuberculosis hospitals in Cape Town, South Africa, 2014–2015. *African Journal of Laboratory Medicine*, 7(2). <https://doi.org/10.4102/ajlm.v7i2.846>
- Kuntz, J. L., Chrischilles, E. A., Pendergast, J. F., Herwaldt, L. A., & Polgreen, P. M. (2011). Incidence of and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: A nested case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 11(1), 194. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-194>
- Kuwata, Y., Tanimoto, S., Sawabe, E., Shima, M., Takahashi, Y., Ushizawa, H., Fujie, T., Koike, R., Tojo, N., Kubota, T., & Saito, R. (2015). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from a university teaching hospital in Japan. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(4), 763–772. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2290-9>

- Larson, H. E., Parry, J. V., Price, A. B., Davies, D. R., Dolby, J., & Tyrrell, D. A. (1977). Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *BMJ*, *1*(6071), 1246–1248. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6071.1246>
- 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>
- Leeds, J. A., Sachdeva, M., Mullin, S., Barnes, S. W., & Ruzin, A. (2014). In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(1), 41–44. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt302>
- Legenza, L., Barnett, S., Rose, W., Safdar, N., Emmerling, T., Peh, K. H., & Coetzee, R. (2018). *Clostridium difficile* infection perceptions and practices: A multicenter qualitative study in South Africa. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *7*(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0425-y>
- Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2019). *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology and Infection*, S1198743X19305592. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- Loo, V. G., Oughton, M., Bourgault, A.-M., Kelly, M., Dewar, K., & Monczak, Y. (2005). A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality. *The New England Journal of Medicine*, *8*.
- Lynch, T., Chong, P., Zhang, J., Hizon, R., Du, T., Graham, M. R., Beniac, D. R., Booth, T. F., Kibsey, P., Miller, M., Gravel, D., Mulvey, M. R., & Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). (2013). Characterization of a Stable, Metronidazole-Resistant *Clostridium difficile* Clinical Isolate. *PLoS ONE*, *8*(1), e53757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053757>
- Martin, J. S. H., Monaghan, T. M., & Wilcox, M. H. (2016). *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *13*(4), 206–216. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>
- Masarikova, M., Simkova, I., Plesko, M., Eretova, V., Krutova, M., & Cizek, A. (2020). The Colonisation of Calves in Czech Large-Scale Dairy Farms by Clonally-Related *Clostridioides difficile* of the Sequence Type 11 Represented by Ribotypes 033 and 126. *Microorganisms*, *8*(6), 901. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060901>

- 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>
- McDonald, L. C., Owens, R. C., & Johnson, S. (2005). An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*, 9.
- Moono, P., Foster, N. F., Hampson, D. J., Knight, D. R., Bloomfield, L. E., & Riley, T. V. (2016). *Clostridium difficile* Infection in Production Animals and Avian Species: A Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 647–655. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2181>
- Moura, I., Spigaglia, P., Barbanti, F., & Mastrantonio, P. (2013). Analysis of metronidazole susceptibility in different *Clostridium difficile* PCR ribotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 362–365. <https://doi.org/10.1093/jac/dks420>
- Moura, Ines, Monot, M., Tani, C., Spigaglia, P., Barbanti, F., Norais, N., Dupuy, B., Bouza, E., & Mastrantonio, P. (2014). Multidisciplinary Analysis of a Nontoxicogenic *Clostridium difficile* Strain with Stable Resistance to Metronidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4957–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.02350-14>
- Mullane, K. (2014). Fidaxomicin in *Clostridium difficile* infection: Latest evidence and clinical guidance. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 5(2), 69–84. <https://doi.org/10.1177/2040622313511285>
- Mulvey, M. R., Boyd, D. A., Gravel, D., Hutchinson, J., Kelly, S., McGeer, A., Moore, D., Simor, A., Suh, K. N., Taylor, G., Weese, J. S., Miller, M., & the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. (2010). Hypervirulent *Clostridium difficile* Strains in Hospitalized Patients, Canada¹. *Emerging Infectious Diseases*, 16(4), 678–681. <https://doi.org/10.3201/eid1604.091152>
- Muto, C. A., Pokrywka, M., Shutt, K., Mendelsohn, A. B., Nouri, K., Posey, K., Roberts, T., Croyle, K., Krystoflak, S., Patel-Brown, S., Pasculle, A. W., Paterson, D. L., Saul, M., & Harrison, L. H. (2005). A Large Outbreak of *Clostridium difficile* –Associated Disease with an Unexpected Proportion of Deaths and Colectomies at a Teaching Hospital Following Increased Fluoroquinolone Use. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 26(3), 273–280. <https://doi.org/10.1086/502539>
- Norman, K. N., Scott, H. M., Harvey, R. B., Norby, B., & Hume, M. E. (2014). Comparison of Antimicrobial Susceptibility Among *Clostridium difficile* Isolated from

- an Integrated Human and Swine Population in Texas. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(4), 257–264. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1648>
- O'Connor, J. R., Galang, M. A., Sambol, S. P., Hecht, D. W., Vedantam, G., Gerding, D. N., & Johnson, S. (2008). Rifampin and Rifaximin Resistance in Clinical Isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2813–2817. <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-08>
- Ofori, E., Ramai, D., Dhawan, M., Mustafa, F., Gasperino, J., & Reddy, M. (2018). Community-acquired *Clostridium difficile*: Epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. *Journal of Hospital Infection*, 99(4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.01.015>
- Oliveira Júnior, C. A., de Paula Gabardo, M., Guedes, R. M. C., Poncet, F., Blanc, D. S., Lobato, F. C. F., & Silva, R. O. S. (2018). Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. *Anaerobe*, 51, 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.006>
- Oliveira Júnior, C.A., Silva, R. O. S., Lage, A. P., Coura, F. M., Ramos, C. P., Alfieri, A. A., Guedes, R. M. C., & Lobato, F. C. F. (2019). Non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm. *Veterinary Microbiology*, 231, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.026>
- Oliveira Júnior, Carlos Augusto de, Silva, R. O. S., Diniz, A. N., Pires, P. S., Lobato, F. C. F., & Assis, R. A. de. (2016). Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxigenic strain. *Ciência Rural*, 46(5), 853–859. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150454>
- Orden, C., Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., Garcia-Sancho, M., Rodriguez-Franco, F., Sainz, A., Villaescusa, A., Harmanus, C., Kuijper, E., & Garcia, 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>
- Oren, A., & Rupnik, M. (2018). *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: Two validly published and correct names. *Anaerobe*, 52, 125–126. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.005>
- Paredes-Sabja, D., Shen, A., & Sorg, J. A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22(7), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>

- Pelaez, T., Cercenado, E., Alcalá, L., Marin, M., Martín-López, A., Martínez-Alarcón, J., Catalan, P., Sánchez-Somolinos, M., & Bouza, E. (2008). Metronidazole Resistance in *Clostridium difficile* Is Heterogeneous. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 3028–3032. <https://doi.org/10.1128/JCM.00524-08>
- Peng, Z., Addisu, A., Alrabaa, S., & Sun, X. (2017). Antibiotic Resistance and Toxin Production of *Clostridium difficile* Isolates from the Hospitalized Patients in a Large Hospital in Florida. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2584. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02584>
- Pepin, J. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: A changing pattern of disease severity. *Canadian Medical Association Journal*, 171(5), 466–472. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1041104>
- Pereira, N. G. (2014). Infecção pelo *Clostridium difficile*. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 102(5), 23.
- Pires, R. N., Monteiro, A. A., Saldanha, G. Z., Falci, D. R., Caurio, C. F. B., Sukiennik, T. C. T., Adam, F. C., Pasqualotto, A. C., & Martins, A. F. (2018). Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 39(3), 371–373. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.280>
- Poilane, I., Cruaud, P., Torlotin, J.C. and Collignon, A. (2000). Comparison of the E test to the reference agar dilution method for antibiotic susceptibility testing of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 155-156.
- Poilane, I., Bert, F., Cruaud, P., Nicolas-Chanoine, M.-H., & Collignon, A. (2007). Évaluation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé pour le dépistage de souches de *Clostridium difficile* de sensibilité diminuée aux antibiotiques. *Pathologie Biologie*, 55(8–9), 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2007.07.010>
- Rabold, D., Espelage, W., Abu Sin, M., Eckmanns, T., Schneeberg, A., Neubauer, H., Möbius, N., Hille, K., Wieler, L. H., Seyboldt, C., & Lübke-Becker, A. (2018). The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. *PLOS ONE*, 13(2), e0193411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193411>
- 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*. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00275-4>
- Ramos, C. P., Santana, J. A., Morcatti Coura, F., Xavier, R. G. C., Leal, C. A. G., Oliveira Junior, C. A., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Lobato, F. C. F., & Silva, R. O. S.

- (2019). Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. *BioMed Research International*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/9530732>
- Rao, K., & Malani, P. N. (2020). Diagnosis and Treatment of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* Infection in Adults in 2020. *JAMA*, 323(14), 1403. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3849>
- Riley, T. V., Lyras, D., & Douce, G. R. (2019). Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. *Vaccine*, 37(50), 7300–7306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.052>
- Rodriguez Diaz, C., Seyboldt, C., & Rupnik, M. (2018). Non-human *C. difficile* Reservoirs and Sources: Animals, Food, Environment. In P. Mastrantonio & M. Rupnik (Orgs.), *Updates on Clostridium difficile in Europe* (Vol. 1050, p. 227–243). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_13
- Roshan, N., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2018). Non-conventional antimicrobial and alternative therapies for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 49, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.003>
- Rouphael, N. G., O'Donnell, J. A., Bhatnagar, J., Lewis, F., Polgreen, P. M., Beekmann, S., Guarner, J., Killgore, G. E., Coffman, B., Campbell, J., Zaki, S. R., & McDonald, L. C. (2008). *Clostridium difficile*–associated diarrhea: An emerging threat to pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(6), 635.e1–635.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.01.062>
- Rupnik, M., Widmer, A., Zimmermann, O., Eckert, C., & Barbut, F. (2008). *Clostridium difficile* Toxinotype V, Ribotype 078, in Animals and Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 2146–2146. <https://doi.org/10.1128/JCM.00598-08>
- Rupnik, Maja, Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>
- 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>
- Saldanha, G. Z., Pires, R. N., Rauber, A. P., de Lima-Morales, D., Falci, D. R., Caierão, J., Pasqualotto, A. C., & Martins, A. F. (2020). Genetic relatedness, Virulence factors and Antimicrobial Resistance of *C. difficile* strains from hospitalized patients in a

- multicentric study in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.007>
- Samonis, G., Vardakas, K. Z., Tansarli, G. S., Dimopoulou, D., Papadimitriou, G., Kofteridis, D. P., Maraki, S., Karanika, M., & Falagas, M. E. (2016). *Clostridium difficile* in Crete, Greece: Epidemiology, microbiology and clinical disease. *Epidemiology and Infection*, 144(1), 161–170. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000837>
- 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>
- Schwan, C., Kruppke, A. S., Nölke, T., Schumacher, L., Koch-Nolte, F., Kudryashev, M., Stahlberg, H., & Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2313–2318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311589111>
- Secco, D. A., Balassiano, I. T., Boente, R. F., Miranda, K. R., Brazier, J., Hall, V., Santos-Filho, J. dos, Lobo, L. A., Nouér, S. A., & Domingues, R. M. C. P. (2014). *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. *Anaerobe*, 28, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.013>
- Silva, R. O. S., D'elia, M. L., de Magalhães Soares, D. F., Cavalcanti, Á. R., Leal, R. C., Cavalcanti, G., Pereira, P. L. L., & Lobato, F. C. F. (2013). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, 20, 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.007>
- Silva, R. O. S., Oliveira Junior, C. A., Diniz, A. N., Alves, G. G., Guedes, R. M. C., Vilela, E. G., & Lobato, F. C. F. (2014a). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from animals and humans in Brazil. *Ciência Rural*, 44(5), 841–846. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000500013>
- Silva, R. O. S., Ribeiro de Almeida, L., Junior, C. A. O., de Magalhães Soares, D. F., Pereira, P. L. L., Rupnik, M., & Lobato, F. C. F. (2014b). Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe*, 30, 99–101. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.012>
- Silva, R. O. S., Rupnik, M., Diniz, A. N., Vilela, E. G., & Lobato, F. C. F. (2015). *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(8), 1062–1065. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150294>

- Skerman, V. B. D., McGOWAN, V., & Sneath', P. H. A. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *INT.J. SYST.BACTERIOL.*, 30, 196.
- Spigaglia, P. (2006). New variants of the tet(M) gene in *Clostridium difficile* clinical isolates harbouring Tn916-like elements. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1205–1209. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1105>
- Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P., on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD), Ackermann, G., Balmelli, C., Barbut, F., Bouza, E., Brazier, J., Delmee, 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, Patrizia, Mastrantonio, P., & Barbanti, F. (2018). Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. In P. Mastrantonio & M. Rupnik (Orgs.), *Updates on Clostridium difficile in Europe* (Vol. 1050, p. 137–159). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_9
- Squire, M. M., Carter, G. P., Mackin, K. E., Chakravorty, A., Norén, T., Elliott, B., Lyras, D., & Riley, T. V. (2013). Novel Molecular Type of *Clostridium difficile* in Neonatal Pigs, Western Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 19(5). <https://doi.org/10.3201/eid1905.121062>
- Stewart, D. B., Berg, A., & Hegarty, J. (2013). Predicting Recurrence of *C. difficile* Colitis Using Bacterial Virulence Factors: Binary Toxin Is the Key. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 17(1), 118–125. <https://doi.org/10.1007/s11605-012-2056-6>
- Tariq, R., Pardi, D. S., Bartlett, M. G., & Khanna, S. (2019). Low Cure Rates in Controlled Trials of Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 68(8), 1351–1358. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy721>
- Tedesco, F. J. (1974). Clindamycin-Associated Colitis: A Prospective Study. *Annals of Internal Medicine*, 81(4), 429. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-81-4-429>
- Terra, D. A. de A., Vilela, E. G., Silva, R. O. S., Leão, L. A., Lima, K. S., Passos, R. I. F. Â., Diniz, A. N., & Coelho, L. G. V. (2020). STRUCTURING A FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION CENTER IN A UNIVERSITY HOSPITAL IN BRAZIL. *Arquivos de Gastroenterologia*. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.202000000-79>

- Theriot, C. M., & Young, V. B. (2015). Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 445–461. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104115>
- Tickler, I. A., Obradovich, A. E., Goering, R. V., Fang, F. C., & Tenover, F. C. (2019). Changes in molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in the United States between 2011 and 2017. *Anaerobe*, 60, 102050. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.003>
- Trindade, C. N. R., Domingues, R. M. C. P., & Ferreira, E. O. (2019). The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. *Anaerobe*, 58, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.002>
- Valsesia, G., Roos, M., Böttger, E. C., & Hombach, M. (2015). A Statistical Approach for Determination of Disk Diffusion-Based Cutoff Values for Systematic Characterization of Wild-Type and Non-Wild-Type Bacterial Populations in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(6), 1812–1822. <https://doi.org/10.1128/JCM.03506-14>
- Van Beurden, Y. H., de Groot, P. F., van Nood, E., Nieuwdorp, M., Keller, J. J., & Goorhuis, A. (2017). Complications, effectiveness, and long term follow-up of fecal microbiota transfer by nasoduodenal tube for treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *United European Gastroenterology Journal*, 5(6), 868–879. <https://doi.org/10.1177/2050640616678099>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*, 365(6459), eaaw1944. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>
- Vernon, J. J., Wilcox, M. H., & Freeman, J. (2019). Effect of fluoroquinolone resistance mutation Thr-82→Ile on *Clostridioides difficile* fitness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(4), 877–884. <https://doi.org/10.1093/jac/dky535>
- 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>

- Wasels, F., Monot, M., Spigaglia, P., Barbanti, F., Ma, L., Bouchier, C., Dupuy, B., & Mastrantonio, P. (2014). Inter- and Intraspecies Transfer of a *Clostridium difficile* Conjugative Transposon Conferring Resistance to MLS_B. *Microbial Drug Resistance*, 20(6), 555–560. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0015>
- Weber, D. J., Anderson, D. J., Sexton, D. J., & Rutala, W. A. (2013). Role of the environment in the transmission of *Clostridium difficile* in health care facilities. *American Journal of Infection Control*, 41(5), S105–S110. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.009>
- Weese, J. S., Staempfli, H. R., & Prescott, J. F. (2010). 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. Scott. (2020). *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1040638719899081>
- Xu, C., Wang, D., Huber, A., Weese, S. J., & Warriner, K. (2016a). Persistence of *Clostridium difficile* in wastewater treatment-derived biosolids during land application or windrow composting. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 312–320. <https://doi.org/10.1111/jam.13018>
- Xu, C., Salsali, H., Weese, S., & Warriner, K. (2016). Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(1), 16–23. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0511>
- Yutin, N., & Galperin, M. Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia: Genomics update. *Environmental Microbiology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12173>
- Zhang, W.-Z., Li, W.-G., Liu, Y.-Q., Gu, W.-P., Zhang, Q., Li, H., Liu, Z.-J., Zhang, X., Wu, Y., & Lu, J.-X. (2020). The molecular characters and antibiotic resistance of *Clostridioides difficile* from economic animals in China. *BMC Microbiology*, 20(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01757-z>

APÊNDICE A - Caracterização dos isolados de *C. difficile* (n = 120)

| Isolado | Hospedeiro | Ano | T/NT | <i>cdtB</i> | Ribotipo | Clado |
|----------------|-------------------|------------|-------------|--------------------|-----------------|--------------|
| 1 | Cão | 2011 | T | - | 014/020 | 1 |
| 2 | Cão | 2012 | NT | - | 009 | 1 |
| 3 | Cão | 2012 | T | - | 106 | 1 |
| 4 | Cão | 2013 | NT | - | 053 | 1 |
| 5 | Cão | 2014 | NT | - | 010 | 1 |
| 6 | Cão | 2014 | T | - | 106 | 1 |
| 7 | Cão | 2014 | T | - | 014/020 | 1 |
| 8 | Cão | 2014 | T | - | 014/020 | 1 |
| 9 | Cão | 2015 | NT | - | 010 | 1 |
| 10 | Cão | 2015 | T | + | 602 | 3 |
| 11 | Cão | 2016 | NT | - | ND | 4 |
| 12 | Cão | 2017 | T | - | 014/020 | 1 |
| 13 | Cão | 2017 | T | - | 014/020 | 1 |
| 14 | Cão | 2017 | T | - | 106 | 1 |
| 15 | Cão | 2018 | T | - | 600 | 1 |
| 16 | Cão | 2019 | T | - | 014 | 1 |
| 17 | Cão | 2020 | T | - | 014 | 1 |
| 18 | Cão | 2020 | T | - | 014 | 1 |
| 19 | Equino | 2012 | T | + | 078 | 5 |
| 20 | Equino | 2012 | T | + | 078 | 5 |
| 21 | Equino | 2013 | T | - | 014/020 | 1 |
| 22 | Equino | 2014 | T | + | 078 | 5 |
| 23 | Equino | 2016 | T | + | 126 | 5 |
| 24 | Equino | 2018 | T | + | 126 | 5 |
| 25 | Equino | 2018 | T | + | 126 | 5 |
| 26 | Equino | 2019 | T | + | 126 | 5 |
| 27 | Gato | 2015 | NT | - | ND | 1 |
| 28 | Gato | 2016 | T | - | 106 | 1 |
| 29 | Gato | 2016 | T | - | 106 | 1 |
| 30 | Gato | 2017 | T | - | 106 | 1 |
| 31 | Gato | 2017 | T | - | 106 | 1 |
| 32 | Jaguarica | 2013 | T | - | 046 | 1 |
| 33 | Leão | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 34 | Réptil | 2016 | T | - | 081 | 1 |
| 35 | Roedor | 2018 | NT | - | ND | ND |
| 36 | Roedor | 2018 | T | - | 064 | ND |
| 37 | Ser humano | 2012 | NT | - | 010 | 1 |
| 38 | Ser humano | 2012 | T | - | 882 | ND |
| 39 | Ser humano | 2012 | T | + | 014/020 | 1 |
| 40 | Ser humano | 2012 | T | + | 106 | 1 |
| 41 | Ser humano | 2012 | T | + | 884 | 2 |

| Isolado | Hospedeiro | Ano | T/NT | <i>cdtB</i> | Ribotipo | Clado |
|----------------|-------------------|------------|-------------|--------------------|-----------------|--------------|
| 42 | Ser humano | 2012 | T | + | 885 | 2 |
| 43 | Ser humano | 2012 | NT | - | 009 | 1 |
| 44 | Ser humano | 2013 | T | - | 001/072 | 1 |
| 45 | Ser humano | 2013 | T | - | 050 | 1 |
| 46 | Ser humano | 2013 | T | + | 424 | 2 |
| 47 | Ser humano | 2013 | T | + | 821 | 2 |
| 48 | Ser humano | 2015 | T | - | 216 | 1 |
| 49 | Ser humano | 2015 | T | - | 133 | 1 |
| 50 | Ser humano | 2015 | T | - | 009 | 1 |
| 51 | Ser humano | 2015 | T | - | 106 | 1 |
| 52 | Ser humano | 2015 | T | - | 046 | 1 |
| 53 | Ser humano | 2017 | NT | - | ND | ND |
| 54 | Ser humano | 2017 | T | + | 102 | 3 |
| 55 | Ser humano | 2017 | T | + | 602 | 3 |
| 56 | Ser humano | 2018 | NT | - | ND | ND |
| 57 | Ser humano | 2018 | NT | - | ND | ND |
| 58 | Ser humano | 2018 | NT | - | ND | ND |
| 59 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 60 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 61 | Ser humano | 2018 | T | - | 014/020 | 1 |
| 62 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 63 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 64 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 65 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 66 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 67 | Ser humano | 2018 | T | - | 014/020 | 1 |
| 68 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 69 | Ser humano | 2018 | T | - | 104 | 1 |
| 70 | Ser humano | 2018 | T | - | 014 | 1 |
| 71 | Ser humano | 2018 | T | - | 014/020 | 1 |
| 72 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 73 | Ser humano | 2018 | T | - | 012 | 1 |
| 74 | Ser humano | 2018 | T | - | 001 | 1 |
| 75 | Ser humano | 2018 | T | - | 011 | 1 |
| 76 | Ser humano | 2018 | T | - | 770 | ND |
| 77 | Ser humano | 2018 | T | - | ND | ND |
| 78 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 79 | Ser humano | 2018 | T | - | ND | ND |
| 80 | Ser humano | 2018 | T | - | ND | ND |
| 81 | Ser humano | 2018 | T | + | 131 | ND |
| 82 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |
| 83 | Ser humano | 2018 | T | - | 037 | ND |
| 84 | Ser humano | 2018 | T | - | 106 | 1 |

| Isolado | Hospedeiro | Ano | T/NT | <i>cdtB</i> | Ribotipo | Clado |
|----------------|-------------------|------------|-------------|--------------------|-----------------|--------------|
| 85 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 86 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 87 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 88 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 89 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 90 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 91 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 92 | Ser humano | 2019 | NT | - | ND | ND |
| 93 | Ser humano | 2019 | T | - | 039 | 1 |
| 94 | Ser humano | 2019 | T | + | 126 | 5 |
| 95 | Ser humano | 2019 | T | - | 106 | 1 |
| 96 | Ser humano | 2019 | T | - | 106 | 1 |
| 97 | Ser humano | 2019 | T | + | ND | ND |
| 98 | Ser humano | 2019 | T | - | ND | ND |
| 99 | Ser humano | 2019 | T | - | ND | ND |
| 100 | Ser humano | 2019 | T | + | ND | ND |
| 101 | Ser humano | 2019 | T | - | 174 | 1 |
| 102 | Ser humano | 2019 | T | - | 258 | ND |
| 103 | Ser humano | 2019 | T | - | 054 | ND |
| 104 | Ser humano | 2019 | T | - | 009 | 1 |
| 105 | Ser humano | 2019 | T | - | 106 | 1 |
| 106 | Ser humano | 2019 | T | - | 106 | 1 |
| 107 | Ser humano | 2019 | T | - | 106 | 1 |
| 108 | Ser humano | 2019 | T | - | 076 | ND |
| 109 | Ser humano | 2019 | T | - | 014 | 1 |
| 110 | Ser humano | 2020 | NT | - | ND | ND |
| 111 | Ser humano | 2020 | T | + | ND | ND |
| 112 | Suíno | 2012 | T | - | 001/072 | 1 |
| 113 | Suíno | 2014 | T | - | 014/020 | 1 |
| 114 | Suíno | 2014 | T | + | 126 | 5 |
| 115 | Suíno | 2014 | T | - | 011/049 | 1 |
| 116 | Suíno | 2015 | T | + | 126 | 5 |
| 117 | Suíno | 2016 | T | - | 014/020 | 1 |
| 118 | Suíno | 2016 | T | + | 078 | 5 |
| 119 | Suíno | 2016 | T | + | 680 | 5 |
| 120 | Suíno | 2019 | T | + | 126 | 5 |

Legenda: ND, não disponível; NT, não toxigênica; T, toxigênica.

ANEXO A - Cadastro SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AEC0B9A

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AEC0B9A**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Clostridium sp.

Título da Atividade: **Isolamento, caracterização e aplicação de estirpes do gênero Clostridium no diagnóstico e na produção de insumos biológicos**

Equipe

Rodrigo Otávio Silveira Silva **Universidade Federal de Minas Gerais**
Francisco Carlos Faria Lobato **UFMG**

Data do Cadastro: **29/10/2018 22:33:38**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:03 de 10/08/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**