

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 16/04/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA, VARIABILIDADE TOXIGÊNICA E RIBOTIPOS DE
CLOSTRIDIODES DIFFICILE ISOLADOS EM AMOSTRAS DE FEZES
DE POTROS

THAIS FERNANDA RIBEIRO

Botucatu, São Paulo

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA, VARIABILIDADE TOXIGÊNICA E RIBOTIPOS DE
CLOSTRIDIODES DIFFICILE ISOLADOS EM AMOSTRAS DE FEZES
DE POTROS

THAIS FERNANDA RIBEIRO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Giorgi Abranches de Andrade

Botucatu, São Paulo

2026

R484o Ribeiro, Thais Fernanda
Ocorrência, variabilidade toxigênica e ribotipos de *Clostridioides difficile* isolados em amostras de fezes de potros / Thais Fernanda Ribeiro. -- Botucatu, 2026
65 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Alexandre Secorun Borges Coorientador:
Danilo Giorgi Abranches de Andrade

1. cepas toxigênicas. 2. diarreia. 3. potros neonatos. 4. ribotipos. I. Título.

Titulo da dissertação: Ocorrência, variabilidade toxigênica e ribotipos de *Clostridioides difficile* isolados em amostras de fezes de potros

Impacto potencial desta pesquisa

Impacto científico esperado: Ampliação do conhecimento sobre a ocorrência e a diversidade molecular de *Clostridioides difficile* em potros no Brasil, incluindo a identificação de ribotipos emergentes e cepas toxigênicas. Os resultados contribuem para a compreensão da epidemiologia do agente em equinos jovens e seu potencial papel como reservatório de linhagens de relevância em saúde pública.

Impacto social e econômico: O reconhecimento precoce da circulação de cepas toxigênicas pode subsidiar medidas de prevenção e biosseguridade em propriedades rurais, reduzindo perdas produtivas e riscos sanitários. A pesquisa também fortalece estratégias integradas de Saúde Única, com benefícios para a saúde animal e humana.

Potential impact of this research

Expected scientific impact: Expansion of knowledge on the occurrence and molecular diversity of *Clostridioides difficile* in foals in Brazil, including the identification of emerging ribotypes and toxigenic strains. The findings contribute to understanding the epidemiology of this pathogen in young horses and its potential role as a reservoir of strains relevant to public health.

Social and economic impact: Early recognition of circulating toxigenic strains may support preventive and biosecurity measures on farms, reducing productive losses and sanitary risks. This research also strengthens integrated One Health strategies benefiting both animal and human health.

Nome do autor: Thais Fernanda Ribeiro

Título: Ocorrência, variabilidade toxigênica e ribotipos de *Clostridioides difficile* isolados em amostras de fezes de potros

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Jose Paes de Oliveira-Filho

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Lukas Garrido Albertino

Membro

Universidade Cruzeiro do Sul - SP

Data da defesa: 16 de abril de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Ivanete Aparecida Porte Ribeiro (BA) e Joaquim Mário Ribeiro, e ao meu irmão Bruno Porte Ribeiro, por todo amor, incentivo e apoio incondicional ao longo desses anos. Obrigada por acreditarem em mim e apoiarem meus sonhos, sendo minha base em todos os momentos.

Agradeço à minha amiga de infância Aline Claro, por todo amor, amizade e companheirismo durante esta jornada. Sua presença foi essencial e motivo constante de força e alegria.

Aos meus queridos amigos Ana Maria Dias da Costa, Paula Angelo Catharini, Lucas Gabriel Rocha e Kaique Pires Moura da Silva, que foram os maiores presentes que a UNESP me proporcionou. Obrigada pelos incontáveis momentos felizes, pelas risadas, pela parceria e por tantas lembranças carinhosas que levarei comigo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Danilo Giorgi Abranches de Andrade, pela oportunidade, orientação, dedicação, paciência e por todo o aprendizado compartilhado.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e aos demais professores, pela troca de conhecimentos, convivência e contribuições durante esse período.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fornecimento da Bolsa de mestrado (processo 2024/01072-0), utilização de recursos da reserva técnica para realização deste projeto e publicação dos resultados em eventos e revista científica. A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-Unesp) e ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, e ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

A vocês o meu muito obrigado.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Estudos epidemiológicos sobre a ocorrência de <i>Clostridioides difficile</i> em potros.....	26
Table 1 - Distribution of <i>Clostridioides difficile</i> , positive and toxigenic isolates among foals sampled longitudinally (D7, D30, D60) across 10 farms in the Midwestern region of São Paulo State, Brazil.....	58
Table 2 - Prevalence and toxin gene profiles of <i>Clostridioides difficile</i> in foals by age group.....	59
Table 3 - Clinical and microbiological data of 29 foals presenting diarrhea at different time points.....	60

Lista de figuras

Figura 1 – Estágios de formação do esporo do <i>Clostridioides difficile</i> (Adaptado de BUDDLE, et al., 2023)	15
Figura 2 – <i>Locus</i> de patogenicidade (PaLoc) do <i>C. difficile</i> composto por cinco genes (Adaptado de BUDDLE, et al., 2023)	17

Lista de Abreviações

CDI – infecção causada pelo *Clostridioides difficile*.

CDT – toxina binária produzida pelo *Clostridioides difficile*.

cdtA – gene da toxina binária A.

cdtB – gene da toxina binária B.

HA-CDI - infecção causada pelo *Clostridioides difficile* associados a comunidade.

PaLoc – *locus de* patogenicidade.

RT - Ribotipo

Spo0A – gene da proteína A do estágio 0 de esporulação.

tcdA – gene da toxina A.

tcdB – gene da toxina B.

tcdC – gene regulador negativo

tcdE – gene da proteína semelhante a holina

tcdR – gene do fator sigma alternativo

SUMÁRIO

	Página
Capítulo I	12
Introdução.....	13
Revisão de literatura.....	14
A bactéria <i>Clostridioides difficile</i>	14
Fatores de Virulência do <i>Clostridioides difficile</i>	16
Infecção por <i>Clostridioides difficile</i> em humanos.....	19
Potencial zoonótico <i>Clostridioides difficile</i>	20
<i>Clostridioides difficile</i> em animais.....	21
<i>Clostridioides difficile</i> em equinos.....	22
Diagnóstico <i>Clostridioides difficile</i>	27
Objetivos gerais.....	29
Objetivo específico.....	29
Referências.....	30
Capítulo 2	43
Longitudinal detection and molecular characterization of <i>Clostridioides difficile</i> isolates in foals in Brazil.....	44
Capítulo 3.....	63
Considerações finais.....	64

RIBEIRO, T.F. **Ocorrência, variabilidade toxigênica e ribotipos de *Clostridioides difficile* isolados em amostras de fezes de potros** - 2026. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).

RESUMO

A bactéria *Clostridioides difficile* é um dos principais agentes etiológicos responsáveis por doenças gastrointestinais em humanos e animais. A importância deste microorganismo em potros é bem reconhecida, mas no Brasil os dados são escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência, os perfis toxigênicos e a diversidade de ribotipos de *C. difficile* isolados longitudinalmente de fezes de potros. Foram coletadas amostras fecais de 102 potros aos 7, 30 e 60 dias de idade, provenientes de dez propriedades rurais, e foram submetidas a isolamento bacteriano pelo cultivo em condições de anaerobiose (10% CO₂, 5% H₂ e 85% N₂). As colônias com as características morfológicas da espécie (vidro fosco, halo amarelo, planas, cheiro de para-cresol), foram submetidas à extração de DNA e à PCR para detecção do gene 16S RNA como método de triagem. E em casos positivos, as amostras foram submetidas a multiplex PCR para detecção dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* e *cdtB*, e ribotipadas. A prevalência geral foi de 17,9% (55/306), diminuindo significativamente com a idade, com potros aos 7 dias apresentando maiores taxas de isolamento de *C. difficile* em comparação com aqueles aos 60 dias (OR = 21,3; p < 0,05). Nenhuma associação estatística foi encontrada entre o isolamento bacteriano e as variáveis epidemiológicas. Foram identificados sete ribotipos (010, RT 009, 126, AI-60, 066/2, 557, 078/4), com perfis recém-descritos no Brasil. Potros são fonte de cepas toxigênicas, e os ribotipos RT 078 e RT 126, são associadas à infecção por *C. difficile* adquirida na comunidade e cepas hipervirulentas em humanos. Esses achados ampliam a compreensão da epidemiologia de *C. difficile* em cavalos jovens e reforçam a necessidade de vigilância contínua de linhagens toxigênicas emergentes.

Palavras-chave: cepas toxigênicas; diarreia; potros neonatos; ribotipos.

RIBEIRO, T.F. **Occurrence, toxigenic variability, and ribotypes of *Clostridioides difficile* isolated from foal fecal samples**. 2026. 65p. Dissertation (Master's Thesis) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Botucatu Campus, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).

ABSTRACT

Clostridioides difficile is one of the main etiological agents responsible for gastrointestinal diseases in humans and animals. The importance of this microorganism in foals is well recognized; however, data from Brazil remain scarce. The aim of this study was to evaluate the occurrence, toxigenic profiles, and ribotype diversity of *C. difficile* isolated longitudinally from foal feces. Fecal samples were collected from 102 foals at 7, 30, and 60 days of age, originating from ten farms, and were subjected to bacterial isolation by culture under anaerobic conditions (10% CO₂, 5% H₂, and 85% N₂). Colonies presenting morphological characteristics consistent with the species (ground-glass appearance, yellowish halo, flat morphology, and p-cresol odor) were subjected to DNA extraction and PCR targeting the 16S rRNA gene as a screening method. Positive samples were subsequently analyzed by multiplex PCR for the detection of the *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* genes and were further characterized by ribotyping. The overall prevalence was 17.9% (55/306), decreasing significantly with age, with foals at 7 days showing higher isolation rates compared to those at 60 days (OR = 21.3; *p* < 0.05). No statistically significant association was found between bacterial isolation and the evaluated epidemiological variables. Seven ribotypes were identified (010, RT 009, 126, AI-60, 066/2, 557, 078/4), including profiles recently described in Brazil. Foals represent a source of toxigenic strains, and ribotypes RT 078 and RT 126 are associated with community-acquired *C. difficile* infection and hypervirulent strains in humans. These findings expand the understanding of the epidemiology of *C. difficile* in young horses and reinforce the need for continuous surveillance of emerging toxigenic lineages.

Keywords: diarrhea; neonatal foals; ribotypes; toxigenic strains.

Capítulo I

Introdução

A bactéria *Clostridioides difficile* é um dos principais agentes relacionados a doenças gastrointestinais em humanos e animais, responsável por causar a doença denominada infecção por *C. difficile* (CDI) (LIM et al., 2020). A transmissão ocorre pela via fecal-oral e a virulência é atribuída a duas principais toxinas, a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB), com algumas cepas produzindo uma toxina binária (CDT) (KATTAPPAN et al., 2023; WEESE, 2020). Além disso, estudos apontam o potencial zoonótico de *C. difficile* (ANDERSON et al., 2017; KNIGHT e RILEY, 2019).

A apresentação clínica da CDI em humanos e animais pode incluir desde sintomas leves, como diarreia, até colite com risco de morte (LEE et al., 2020; WESSE, 2020). Equinos são considerados reservatórios para disseminação de *C. difficile* desde o primeiro relato que ocorreu em 1984, em cavalos adultos na região do Rio Potomac, EUA (EHRICH et al., 1984). O microorganismo apresenta característica oportunista e, portanto, presume-se que disbiose intestinal seja necessária para a ocorrência da enfermidade (SCHOSTER et al., 2019).

O diagnóstico de CDI é baseado nas manifestações clínicas e em testes laboratoriais para confirmar a presença de cepas toxigênicas ou suas toxinas em amostras de fezes. O cultivo e isolamento de *C. difficile*, seguido da detecção de genes que codificam as toxinas (TcdA e TcdB), é reconhecido como “padrão ouro” para o diagnóstico da CDI em humanos (GATEAU et al., 2018). Entretanto testes comerciais, como imunoensaios enzimáticos, e reação em cadeia da polimerase (PCR) são amplamente empregados na rotina (MCDONALD et al., 2018).

A colonização persistente e a infecção recorrente por *C. difficile* são frequentemente documentadas em humanos (GHOSH et al., 2024), no entanto, faltam evidências para afirmar a ocorrência destes processos em equinos. No Brasil, os estudos sobre a infecção por *C. difficile* (CDI) em potros ainda são escassos (OLIVO et al., 2016; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013), e as informações referentes à ribotipagem dos isolados permanecem limitadas a apenas seis casos clínicos de CDI em equinos no estado de Minas Gerais (DINIZ et al., 2021).

Referências

ABNEY, S. E.; IJAZ, M. K.; MCKINNEY, J.; GERBA, C. P. Laundry hygiene and odor control: state of the science. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, e0300220, 2021.

AITKEN, S. L.; ALAM, M. J.; KHALEDUZZUMAN, M.; WALK, S. T.; MUSICK, W. L.; PHAM, V. P.; CHRISTENSEN, J. L.; ATMAR, R. L.; GAREY, K. W. In the endemic setting, *Clostridium difficile* ribotype 027 is virulent but not hypervirulent — erratum. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, p. 124, 2015.

ALAM, M. Z.; MADAN, R. *Clostridioides difficile* toxins: host cell interactions and their role in disease pathogenesis. **Toxins**, v. 16, n. 6, p. 241, 2024.

ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; BLANCO, J. L.; BOUZA, E.; ALBA, P.; GIBERT, X.; MALDONADO, J.; GARCÍA, M. E. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 302–305, 2009.

ANDERSON, D. J.; ROJAS, L. F.; WATSON, S.; KNELSON, L. P.; PRUITT, S.; LEWIS, S. S.; MOEHRING, R. W.; SICKBERT-BENNETT, E. E.; WEBER, D. J.; CHEN, L. F.; SEXTON, D. J.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION EPICENTERS PROGRAM. Identification of novel risk factors for community-acquired *Clostridium difficile* infection using spatial statistics and geographic information system analyses. **PLoS One**, v. 12, n. 5, e0176285, 2017.

ARROYO, L. G.; WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R. Experimental *Clostridium difficile* enterocolitis in foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 734–738, 2004.

BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, suppl. 1, p. S12–S18, 2008.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; ASPÁN, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 465–471, 2003.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; LINDHOLM, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 279–284, 1997.

BIDET, P.; BARBUT, F.; LALANDE, V.; BURGHOFFER, B.; PETIT, J. C. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, n. 2, p. 261–266, 1999.

BUDDLE, J. E.; FAGAN, R. P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. **Virulence**, v. 14, n. 1, p. 2150452, 2023.

CARTER, G. P.; LYRAS, D.; ALLEN, D. L.; MACKIN, K. E.; HOWARTH, P. M.; O'CONNOR, J. R.; ROOD, J. I. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7290–7301, 2007.

CERRI, F. M.; BASSO, R. M.; PEREIRA, W. A. B.; SILVEIRA, J. M. S.; FERREIRA, E. O.; HAISI, A.; BORGES, A. S. Fecal shedding of *Clostridioides difficile* in calves in São Paulo State, Brazil. **Anaerobe**, v. 88, p. 102861, 2024.

CHANG, T. H.; HSU, W. Y.; YANG, T. I. *et al.* Increased age and proton pump inhibitors are associated with severe *Clostridium difficile* infections in children. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 4, p. 578–584, 2020.

COWARDIN, C. A.; BUONOMO, E. L.; SALEH, M. M. *et al.* The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 1–10, 2016.

CYMBAL, M.; CHATTERJEE, A.; BAGGOTT, B.; AURON, M. Management of *Clostridioides difficile* infection: diagnosis, treatment, and future perspectives. **The American Journal of Medicine**, v. 137, n. 7, p. 571–576, 2024.

CZEPIEL, J.; DRÓŹDŹ, M.; PITUCH, H.; KUIJPER, E. J.; PERUCKI, W.; MIELIMONKA, A.; GOLDMAN, S.; WULTAŃSKA, D.; GARLICKI, A.; BIESIADA, G. *Clostridium difficile* infection: review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, p. 1211–1221, 2019.

DE ROO, A. C.; REGENBOGEN, S. E. *Clostridium difficile* infection: an epidemiology update. **Clinical Colon and Rectal Surgery**, v. 33, p. 49–57, 2020.

DEAKIN, L. J.; CLARE, S.; FAGAN, R. P. *et al.* The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 8, p. 2704–2711, 2012.

DIAB, S. S.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; UZAL, F. A. Pathology and diagnostic criteria of *Clostridium difficile* enteric infection in horses. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1028–1036, 2013.

DINIZ, A. N.; CRUZ, D. S. G.; RAMOS, C. P.; OLIVEIRA JÚNIOR, C. A.; WINTER, I. C.; LIMA, J. T. B. D.; CARVALHO, A. M.; LOBATO, F. C. F.; SILVA, R. O. *Clostridioides (Clostridium) difficile*-associated diarrhea in equine in Minas Gerais, Brazil: clinical and microbiological characterization of six cases. **Ciência Rural**, v. 51, n. 8, e20200878, 2021.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

EHRICH, M.; PERRY, B. D.; TROUTT, H. F.; DELLERS, R. W.; MAGNUSSON, R. A. Acute diarrhea in horses of the Potomac River area:

examination for clostridial toxins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, p. 433–435, 1984.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629–635, 2002.

FREDERICK, J.; GIGUÈRE, S.; SANCHEZ, L. C. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003–2008). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1254–1260, 2009.

GATEAU, C.; COUTURIER, J.; COIA, J.; BARBUT, F. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 5, p. 463–468, 2018.

GHOSH, S.; ANTUNES, A.; KOKKO, H. R.; CHAPAROVA, E.; FLURRIE, S. L.; TRICOTEL, A.; ANDERSSON, F. L. *Clostridioides difficile* infections, recurrences, and clinical outcomes in real-world settings from 2015–2019: The RECUR England study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2024.

GUH, A. Y.; MU, Y.; WINSTON, L. G. *et al.* Trends in U.S. burden of *Clostridioides difficile* infection and outcomes. **New England Journal of Medicine**, v. 382, p. 1320–1330, 2020.

HAIN-SAUNDERS, N. M. R.; KNIGHT, D. R.; BRUCE, M.; BYRNE, D.; RILEY, T. V. Genomic analysis of *Clostridioides difficile* recovered from horses in Western Australia. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1743, 2023.

HAIN-SAUNDERS, N. M. R.; KNIGHT, D. R.; BRUCE, M.; RILEY, T. V. *Clostridioides difficile* infection and One Health: an equine perspective. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 985–997, 2022.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infant. **American Journal of Diseases of Children**, v. 49, n. 2, p. 390, 1935.

HAMMITT, M. C.; BUESCHEL, D. M.; KEEL, M. K.; GLOCK, R. D.; CUNEO, P.; DEYOUNG, D. W.; *et al.* A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3–4, p. 343–352, 2008.

HOFFER, E.; HAECHLER, H.; FREI, R.; STEPHAN, R. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 5, p. 973–975, 2010.

JANK, T.; BELYI, Y.; AKTORIES, K. Bacterial glycosyltransferase toxins. **Cellular Microbiology**, v. 17, p. 1752–1765, 2015.

JONES, R. L.; ADNEY, W. S.; SHIDELER, R. K. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 1225–1227, 1987.

KACHRIMANIDOU, M.; TZIKA, E.; FILIOUSSIS, G. *Clostridioides (Clostridium) difficile* in food-producing animals, horses and household pets: a comprehensive review. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 667, 2019

KELLY, C. P. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, suppl. S6, 2012.

KELLY, C. R.; FISCHER, M.; ALLEGRETTI, J. R.; LAPLANTE, K.; STEWART, D. B.; LIMKETKAI, B. N.; STOLLMAN, N. H. ACG clinical guidelines: prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridioides difficile* infections. **Official Journal of the American College of Gastroenterology (ACG)**, v. 116, n. 6, p. 1124–1147, 2021.

KELLY, C. R.; KAHN, S.; KASHYAP, P.; LAINE, L.; RUBIN, D.; ATREJA, A.; *et al.* Update on fecal microbiota transplantation 2015: indications, methodologies, mechanisms, and outlook. **Gastroenterology**, v. 149, p. 223–237, 2015.

KNETSCH, C. W.; CONNOR, T. R.; MUTREJA, A.; VAN DORP, S. M.; SANDERS, I. M.; BROWNE, H. P.; HARRIS, D.; LIPMAN, L.; KEESEN, E. C.; CORVER, J.; KUIJPER, E. J.; LAWLEY, T. D. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 45, p. 20954, 2014.

KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Genomic delineation of zoonotic origins of *Clostridium difficile*. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 164, 2019.

KUTTAPPAN, D. A.; MOOYOTTU, S.; SPONSELLER, B. A. An overview of equine *Clostridioides difficile* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v. 32, n. 2, p. 213–221, 2020.

LAWLEY, T. D.; CLARE, S.; WALKER, A. W.; *et al.* Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3661–3669, 2009.

LAWSON, P. A.; CITRON, D. M.; TYRRELL, K. L.; FINEGOLD, S. M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95–99, 2016.

LEE, J. C.; HUNG, Y. P.; TSAI, B. Y.; *et al.* Severe *Clostridium difficile* infections in intensive care units: diverse clinical presentations. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2020.

LEE, Y.-R.; LEE, K.; BYUN, J.-W.; KIM, H.; SO, B.; KU, B.-K.; KIM, H.-Y.; MOON, B.-Y. Prevalence, genetic characteristics, and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* isolates from horses in Korea. **Anaerobe**, v. 80, p. 102700, 2023.

LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* and One Health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 857–863, 2020.

LUK, S.; TO, W. K.; NG, T. K.; HUI, W. T.; LEE, W. K.; LAU, F.; CHING, A. M. W. A cost-effective approach for detection of toxigenic *Clostridium difficile*:

toxigenic culture using ChromID *Clostridium difficile* agar. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 671–673, 2014.

MAESTRI, A. C.; RABONI, S. M.; MORALES, H. M. P.; FERRARI, L. F.; TUON, F. F. B.; LOSSO, A.; MARCONI, C.; NOGUEIRA, K. D. S. Multicenter study of the epidemiology of *Clostridioides difficile* infection and recurrence in southern Brazil. **Anaerobe**, v. 64, p. 102238, 2020.

MAGDESIAN, K. G.; HIRSH, D. C.; JANG, S. S.; HANSEN, L. M.; MADIGAN, J. E. Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993–1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 67–73, 2002. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.2002.220.67>.

MAJUMDAR, A.; GOVIND, R. Regulation of *Clostridioides difficile* toxin production. **Current Opinion in Microbiology**, v. 65, p. 95–100, 2021.

MANI, N.; DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, p. 5844–5849, 2001.

MARKANTONIS, J. E.; FALLON, J. T.; MADAN, R.; ALAM, M. Z. *Clostridioides difficile* infection: diagnosis and treatment challenges. **Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 118, 2024.

MARKOVSKA, R.; DIMITROV, G.; GERGOVA, R.; BOYANOVA, L. *Clostridioides difficile*, a new “superbug”. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 845, 2023.

MC DONALD, L. C. *et al.* 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**, v. 66, n. 7, p. e1–e48, 2018.

MCCOLLUM, D. L.; RODRIGUEZ, J. M. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 581–592, 2012.

MCDONALD, L. C.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S. et al. 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**, v. 66, n. 7, p. e1–e48, 2018.

MENGOLI, M.; BARONE, M.; FABBRINI, M.; D'AMICO, F.; BRIGIDI, P.; TURRONI, S. Make it less *difficile*: Understanding genetic evolution and global spread of *Clostridioides difficile*. **Genes**, v. 13, p. 2200, 2022.

MORSI, A. E. K. M.; ELSOHABY, I.; ABDELMAGEED, M.; AL-MARRI, T.; FAYEZ, M. *Clostridium difficile* infections in adult horses and foals: prevalence and associated risk factors. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. s2, p. 169–174, 2019.

NEGRUT, N.; BUNGAU, S.; BEHL, T.; KHAN, S. A.; VESA, C. M.; BUSTEA, C.; NISTOR-CSEPPENTO, D. C.; RUS, M.; PAVEL, F. M.; TIT, D. M. Risk factors associated with recurrent *Clostridioides difficile* infection. **Healthcare**, v. 8, n. 3, p. 352, 2020.

NOMURA, M.; KURODA, T.; TAMURA, N.; MURANAKA, M.; NIWA, H. Mortality, clinical findings, predisposing factors and treatment of *Clostridioides difficile* colitis in Japanese thoroughbred racehorses. **Veterinary Record**, v. 187, n. 2, p. e14, 2020.

OLIVO, G.; LUCAS, T. M.; BORGES, A. S.; SILVA, R. O.; LOBATO, F. C.; SIQUEIRA, A. K.; DA SILVA LEITE, D.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; DE OLIVEIRA-FILHO, J. P.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M. G. Enteric Pathogens and Coinfections in Foals with and without Diarrhea. **BioMed research international**, v.2016, n.1512690, 2016.

PETERSON, L. R.; KELLY, P. J.; NORDBROCK, H. A. Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 330–336, 1996.

RABOLD, D.; ESPELAGE, W.; ABU SIN, M.; ECKMANN, T.; SCHNEEBERG, A.; NEUBAUER, H.; MÖBIUS, N.; HILLE, K.; WIELER, L. H.; SEYBOLDT, C.; LÜBKE-BECKER, A. The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0193411, 2018.

RAHMOUN, L. A.; BOUZID, M.; HAKEM, A.; MERAD, T.; SAADI, M.; BENTCHOUALA, C.; BITAM, I. Antibiotic resistance and biofilm production capacity in *Clostridioides difficile* isolates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

RELLER, M. E.; LEMA, C. A.; PERL, T. M.; CAI, M.; ROSS, T. L.; SPECK, K. A.; CARROLL, K. C. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3601–3605, 2007.

RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; VAN BROECK, J.; AVESANI, V.; DELMÉE, M.; DAUBE, G. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. **Anaerobe**, v. 18, n. 6, p. 621–625, 2012.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; LEJEUNE, J. T. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 3085–3091, 2011.

RUBY, R.; MAGDESIAN, K. G.; KASS, P. H. Comparison of clinical, microbiologic, and clinicopathologic findings in horses positive and negative for *Clostridium difficile* infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 6, p. 777–784, 2009.

SAHOO, S.; MESHRAM, M. Biofilm formation in chronic infections: a comprehensive review of pathogenesis, clinical implications, and novel therapeutic approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024.

SCHOSTER, A.; KUNZ, T.; LAUPER, M.; GRAUBNER, C.; SCHMITT, S.; WEESE, J. S. Prevalence of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in Swiss horses with and without gastrointestinal disease and microbiota composition in relation to *Clostridium difficile* shedding. **Veterinary Microbiology**, v. 239, p. 108433, 2019.

SHAW, S. D.; STÄMPFLI, H. R. Diagnosis and treatment of undifferentiated and infectious acute diarrhea in the adult horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 34, p. 39–53, 2018.

SILVA, R. O. S.; MOREIRA, F. M.; REZENDE, J. V.; PIRES, P. S.; MARANHÃO, R. D. P. A.; PALHARES, M. S.; LOBATO, F. C. F. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 498–500, 2012.

SILVA, R. O.; RIBEIRO, M. G.; PALHARES, M. S.; BORGES, A. S.; MARANHÃO, R. P.; SILVA, M. X.; LUCAS, T. M.; OLIVO, G.; LOBATO, F. C. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 6, p. 671–675, 2013.

SIQUEIRA, A. K.; DA SILVA LEITE, D.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; DE OLIVEIRA-FILHO, J. P.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M. G. Enteric pathogens and coinfections in foals with and without diarrhea. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1512690, 2016.

SOAVELOMANDROSO, A. P.; GAUDIN, F.; HOYS, S.; NICOLAS, V.; VEDANTAM, G.; JANOIR, C. et al. Biofilm structures in a mono-associated mouse model of *Clostridium difficile* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. PMID: 29118745.

SOLIS, C. N.; PALMER, J. E.; BOSTON, R. C.; REEF, V. B. The importance of ultrasonographic pneumatosis intestinalis in equine neonatal gastrointestinal disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 41, p. 64–68, 2012.

SORG, J. A.; SONENSHEIN, A. L. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2505–2512, 2008.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; FACCINI, S.; VESCOVI, M.; CRISCUOLO, E. M.; CERUTI, R.; GASPANO, C.; ROSIGNOLI, C. *Clostridioides difficile* in pigs and dairy cattle in Northern Italy: prevalence, characterization and comparison between animal and human strains. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1738, 2023.

SUETENS, C.; LATOUR, K.; KÄRKI, T.; RICCHIZZI, E.; KINROSS, P.; MORO, M. L. et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. **Eurosurveillance**, v. 23, p. 1800516, 2018. PMID: 30458912.

SCHUMANN, P.; PUKALL, R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 369-375, 2013

TRUONG, C.; SCHROEDER, L. F.; GAUR, R. et al. *Clostridium difficile* rates in asymptomatic and symptomatic hospitalized patients using nucleic acid testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, p. 365–370, 2017.

UCHIDA-FUJII, E.; NIWA, H.; SENOH, M.; KATO, H.; KINOSHITA, Y.; MITA, H.; UENO, T. *Clostridioides difficile* infection in thoroughbred horses in Japan from 2010 to 2021. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13099, 2023.

UZAL, F. A.; NAVARRO, M. A.; ASIN, J.; HENDERSON, E. E. Clostridial diseases of horses: a review. **Vaccines**, v. 10, n. 2, p. 318, 2022.

VAN PREHN, J.; REIGADAS, E.; VOGELZANG, E. H.; BOUZA, E.; HRISTEA, A.; GUERY, B.; KRUTOVA, M.; NORÉN, T.; ALLERBERGER, F.; COIA, J. E.; GOORHUIS, A.; VAN ROSSEN, T. M.; OOIJEVAAAR, R. E.; BURNS, K.; SCHARVIK OLESEN, B. R.; TSCHUDIN-SUTTER, S.; WILCOX, M. H.; VEHRESCHILD, M. J. G. T.; FITZPATRICK, F.; KUIJPER, E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, Suppl. 2, p. S1–S21, 2021.

WEESE J. S. *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**. v.32, n.2, p.213–221, 2020.

WEESE, J. S.; SLOVIS, N.; ROUSSEAU, J. *Clostridioides (Clostridium) difficile* in neonatal foals and mares at a referral hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 35, n. 2, p. 1140–1146, 2021.

WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 4, p. 403–409, 2001.

WEESE, J. S.; TOXOPEUS, L.; ARROYO, L. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in horses within the community: predictors, clinical presentation and outcome. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 2, p. 185–188, 2006.

ZENG, J.; WANG, H.; DONG, M.; TIAN, G. B. *Clostridioides difficile* spore: coat assembly and formation. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2022.

ZHU, D.; SORG, J. A.; SUN, X. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 29, 2018.