

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS
DE BOTUCATU

Ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros:
caracterização fenotípica e genotípica dos isolados
toxigênicos

FABRÍCIO MOIREIRA CERRI

Botucatu, São Paulo
Fevereiro de 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS
DE BOTUCATU

Ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros:
caracterização fenotípica e genotípica dos isolados
toxigênicos

FABRÍCIO MOREIRA CERRI

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Botucatu, São Paulo
Fevereiro de 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Cerri, Fabrício Moreira.

Ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros :
caracterização fenotípica e genotípica dos isolados
toxigênicos / Fabrício Moreira Cerri. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Capes: 50501062

1. Bezerros. 2. Diarréia em bezerro. 3. Tipagem de
Sequências Multilocus. 4. *Clostridioides difficile*.

Palavras-chave: Bezerros; Diarréia; MLST; RT 126; ST35.

Nome do autor: Fabrício Moreira Cerri

Título: Ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros: caracterização fenotípica e genotípica dos isolados toxigênicos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. João Pessoa de Araújo Júnior

Membro da banca

Instituto de Biociências de Botucatu

DCBQ – IBB-UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Membro da Banca

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

DMVP – EV- UFMG – Belo Horizonte

Data da defesa: 05 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer avós paternos (Pedro Cerri e Aparecida Ferreira Cerri), avós maternos (Marcílio Moreira Gomes e Dirce da Silva Moreira Gomes), meus pais (Elder Juliano Cerri e Flávia Augusta Moreira Gomes) e meus irmãos (Eduarda Moreira Cerri e Enzo Moreira Cerri) meus grandes incentivadores e apoiadores em todas as jornadas.

A Minha namorada e companheira Roberta Martins Basso, por toda a jornada que construímos até o momento e por estar sempre comigo tornando os momentos difíceis mais fáceis. E ao seu avô Roberto Martins Brizolara com que posso conviver.

Ao meu orientador Professor Alexandre Secorun Borges por todos os ensinamentos fornecidos e pelas oportunidades dadas nestes anos em Botucatu.

Ao Professore Rogério Martins Amorim por compor a banca do exame de qualificação. A professora Eliane de Oliveira Ferreira por abrir as portas do laboratório de Biologia de Anaeróbios, por toda a receptividade e por participar da banca de qualificação.

Ao professor Márcio Garcia Ribeiro e ao técnico de laboratório Fernando José Paganini Liston pelo período em que estive no Laboratório de microbiologia da FMVZ/Unesp.

Ao professor Rodrigo Otávio Silveira da Silva e aos colegas da pós-graduação da UFMG pelos ensinamentos sobre o cultivo de *C. difficile* no período em que estive lá. E por toda colaboração na elaboração do artigo científico e por compor a banca de defesa.

Ao Professor João Pessoa Araújo Júnior por todo auxílio fornecido durante a realização de todos os procedimentos experimentais, desde cultivo até a realização do sequenciamento de genoma completo. Da mesma forma, agradeço também por compor a banca de defesa.

Agradeço também aos professores Wanderson Pereira Biscola e José Paes de Oliveira Filho pelo auxílio durante as etapas experimentais, confecção do manuscrito e composição da banca.

A todos os colegas e amigos que auxiliaram nas coletas (Marco Antônio Simão, Lukas Albertino Garrido, Lídia Maria dos Santos Sperandio, Heitor Cestari e Glauder Rocha Lago).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fornecimento da Bolsa de mestrado (processo 2022/00708-2), utilização de recursos da reserva técnica para realizar treinamentos e participação em eventos científicos. Não poderia deixar de agradecer a liberação para ministrar aulas durante o mestrado (solicitação para Exercer Atividades SM002 e 003 do respectivo processo).

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-Unesp) e ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (POSVET) pelo auxílio prestado durante o curso de mestrado com a liberação de recursos auxiliares em publicações paralelas. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim agradeço a todos que colaboraram para que fosse possível realizar este trabalho científico. Sem a colaboração mútua não seria possível a realização deste estudo.

A vocês o meu muito obrigado.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Estudos epidemiológicos sobre a ocorrência de <i>Clostridioides difficile</i> em bezerros.....	29
Table Suppl 1 - Epidemiological data of the properties (n=20) included in the current study.....	86
Table 1. Epidemiological data and determination of toxin genes of 17 <i>C. difficile</i> strains found in nursing calves.....	88
Table 2. Antimicrobial Susceptibility Test and Motility of Toxigenic <i>C. difficile</i> Strains (n=17) Isolated from Nursing Calves.....	89

Lista de figuras

Figura 1: <i>Locus</i> de patogenicidade (<i>PaLoc</i>) do <i>C. difficile</i> com diferentes perfis diferentes de toxigenicidade.....	19
Figura 2: Estágios de formação do esporo do <i>Clostridioides difficile</i> . Os pontos de interrogação indicam mecanismos sugestivos, mas não confirmados.....	21
Figura 3: Formação de biofilme de <i>C. difficile</i>	24
Figure 1 - Map of São Paulo state by macroregion - Brazil, describing the regions where fecal samples were collected from nursing calves.....	84
Figure 2 (supplementary) - Calves collected in the current study, A: Property 19, B: Property 13; C: Property 5; D: Property 6; E: Property 15. F: Calf from farm 13 voluntarily ingesting soil (ground).....	85

Lista de Abreviações

cbpA – gene da proteína de ligação a carboidratos.
 CDI – infecção causada pelo *Clostridioides difficile*.
 CDT – toxina não binária produzida pelo *Clostridioides difficile*.
cdtA – gene da toxina binária A.
cdtB – gene da toxina binária B.
cwp2 – gene da proteína de ligação a parede celular.
cwp66 – gene da proteína de superfície celular.
cwp84 – gene da cisteína protease.
ermB – gene de resistência a clindamicina.
fbpA – gene da fibronectina.
fliA – gene do complexo sigma.
fliC – gene da proteína flagelar.
fliC – gene da proteína flagelar.
fliD – gene da estrutura cristalina flagelar.
fliD – gene de proteína da estrutura cristalina flagelar.
groEL – gene da proteína de choque térmico.
mdtD – gene da proteína de resistência múltiplas drogas.
Mecl – gene da proteína reguladora de resistência a múltiplas drogas.
msrD – gene de resistência a macrolídeos.
NimB – gene da proteína de resistência à vancomicina.
PaLoc – locus de patogenicidade.
pilA1 – gene do complexo sigma.
 PMC – do inglês pseudomembranous enterocolitis.
qnr – gene de proteína resistente a quinolonas.
secA – gene da subunidade da proteína translocase.
slpA – gene percussor de proteínas da camada S.
 SNA – sistema nervoso autônomo
Spo0A – gene da proteína A do estágio 0 de esporulação.
tcdA – gene da toxina A.
 TcdA – toxina A produzida pelo *Clostridioides difficile*.
tcdB – gene da toxina B.
 TcdB – toxina B produzida pelo *Clostridioides difficile*.
tetO – proteína de proteção ribossômica resistente a tetraciclina.

tetW – gene da proteína de resistência a tetraciclina.

TPC - tempo de preenchimento capilar.

VanA – gene de proteínas resistente à vancomicina.

VanW – gene de proteínas resistente à vancomicina.

zmp1 – gene da metaloprotease.

Sumário

Página

Capítulo 1	14
Introdução.....	15
Revisão de literatura.....	17
<i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i> – História.....	18
<i>Clostridioides difficile</i> – Agente, esporulação e patogenia.....	18
<i>Clostridioides difficile</i> – Toxinas e fatores de virulência.....	22
<i>Clostridioides difficile</i> em animais.....	24
<i>Clostridioides difficile</i> em suínos.....	25
<i>Clostridioides difficile</i> em equinos.....	26
<i>Clostridioides difficile</i> em bezerros.....	27
<i>Clostridioides difficile</i> em animais de companhia.....	31
<i>Clostridioides difficile</i> em animais selvagens.....	31
<i>Clostridioides difficile</i> em seres humanos.....	32
<i>Clostridioides difficile</i> – diagnóstico.....	34
Referências.....	36
Objetivo específico.....	61
Objetivos gerais.....	61
Capítulo 2	62
Occurrence of <i>Clostridioides difficile</i> in calves.....	63
Capítulo 3.....	81
Considerações finais.....	90

CERRI, F.M. **Ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros: caracterização fenotípica e genotípica dos isolados toxigênicos** - 2024. 90p. Exame geral de qualificação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).

RESUMO

O *Clostridioides difficile* é uma das principais causas de diarreia em seres humanos e em animais. A participação deste agente como causador de diarreia neonatal bovina não é completamente elucidada. O objetivo do presente estudo foi determinar a ocorrência de *C. difficile* em bezerros. Para isso, colheram-se amostras (n=300) de fezes de bezerros em fase de amamentação (diarreicos n=78 e não diarreicos =222), provenientes de vinte propriedades diferentes. Estas foram cultivadas em condições de anaerobiose (10% CO₂, 5% H₂ e 85% N₂), as colônias foram consideradas positivas de acordo com as características morfológicas. Realizou-se a extração de DNA e a PCR multiplex para detecção dos genes *16S RNA*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* e *cdtB*. As amostras toxigênicas foram submetidas à ribotipagem e ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Cinco amostras foram selecionadas para realização do sequenciamento do genoma completo para determinação da MLST (tipo de sequência/clado) e dos genes de resistência a antimicrobianos. O *C. difficile* foi isolado em 29,33% (88/300) dos animais, sendo 80,7% (71/88) de cepas não toxigênicas e 19,3% (17/88) de cepas toxigênicas (A⁺B⁺ cdtA/B⁻ e A⁺B⁺ cdtA/B⁺). Os ribotipos (RT) identificados foram 046 (13/17- 76,47%) e 126 (4/17 – 23,53%). Em relação à cgMLST, as cepas selecionadas pertencentes ao RT046 (bezerros 38,182 e 243) foram classificadas como ST35 (clado 1), e RT126 (bezerros 40 e 49) como ST11 (clado 5). O perfil de resistência a antimicrobianos observado foi: vancomicina 0%, metronidazol 0%, rifamicina 52,9%, moxifloxacino 70,60%, tetraciclina 76,47% e eritromicina 100%. Não foram observadas correlações estatísticas entre os dados epidemiológicos e o isolamento do *C. difficile*. Os bezerros são fonte de cepas toxigênicas com perfil de multirresistência a antimicrobianos observado em seres humanos e outros animais.

Palavras-chave: bezerros, diarreia, RT126, ST35, MLST.

CERRI, F.M. ***Clostridioides difficile* in Calves**. 2024. 90 p. General Qualification Examination (Master's Thesis) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Botucatu Campus, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).

Abstract

The objective of the present study was to determine the occurrence of *C. difficile* in calves. For this purpose, samples (n=300) of feces from nursing calves (diarrheic n=78 and non-diarrheic calves =222) were collected from twenty different properties. These samples were cultivated under anaerobic conditions (10% CO₂, 5% H₂, and 85% N₂), colonies were considered positive based on morphological characteristics. DNA extraction and multiplex PCR were performed to detect genes *16S RNA*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB*. Toxigenic samples underwent ribotyping and antimicrobial susceptibility testing. Five samples were selected for whole-genome sequencing to determine cgMLST (sequence type/clade) and antimicrobial resistance genes. *C. difficile* was isolated in 29.33% (88/300) of the animals, with 80.7% (71/88) being non-toxigenic strains and 19.3% (17/88) toxigenic strains (A⁺B⁺ cdtA/B⁻ and A⁺B⁺ cdtA/B⁺). The identified ribotypes (RT) were 046 (13/17 - 76.47%) and 126 (4/17 – 23.53%). Regarding cgMLST, selected strains belonging to RT046 (calves 38, 182, and 243) were classified as ST35 (clade 1), and RT126 (calves 40 and 49) as ST11 (clade 5). The observed antimicrobial resistance profile was vancomycin 0/17 (0%), metronidazole 0/17 (0%), erythromycin 17/17 (100%), moxifloxacin 12/17 (70.60%), rifampicin 9/1 (52.9%), and tetracycline (13/17 - 76.47%). Most toxigenic strains (16/17 – 97.41%) were classified as multidrug-resistant to the tested antimicrobials. *C. difficile* can be isolated in the feces of nursing calves. No statistical correlations were observed between epidemiological data and *C. difficile* isolation. Calves are a source of toxigenic strains with a multidrug-resistant profile observed in humans and other animals.

Keywords: cattle, diarrhea, RT126, ST35, MLST.

Introdução

Clostridioides difficile (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbica, flagelada, capaz de esporulação. Em sua forma vegetativa, é descrita como bacilos gram-positivos. Sua primeira identificação ocorreu em 1935, quando Hall e O'Toole, no estado do Colorado, EUA. Neste momento realizou-se o isolamento em fezes de neonatos e a classificaram como *Bacillus difficilis* em função de suas características. O termo "*difficilis*" foi aplicado devido às dificuldades encontradas no isolamento por métodos tradicionais (HALL; O'TOOLE, 1935). Posteriormente, em 1938, o agente foi reclassificado, e incluído ao gênero *Clostridium* (PREVOT, 1938).

Sua importância está associada ao desenvolvimento de alterações entéricas em seres humanos e animais (CZEPIEL et al. 2019; WEESE 2020). É a principal causa de diarreia associada ao uso de antimicrobianos em pacientes hospitalizados. Estes quadros são denominados como infecção causada pelo *C. difficile* (CDI) (MASLENNIKOV et al. 2022). Apesar da sua epidemiologia tradicional, a CDI foi descrita em pacientes jovens, sem histórico prévio de hospitalização ou tratamento com antimicrobianos (ANJEWIERDNEN et al. 2020).

A CDI se desenvolve predominantemente pela via fecal-oral, iniciada com a ingestão de esporos. Os quais estão disseminados no ambiente, devido a eliminação por animais e seres humanos. No intestino ocorre a germinação do *C. difficile* em resposta a presença de sais biliares (taurina e glicina) e desenvolvimento de disbiose intestinal (SORG; SONESHEIN, 2008). Em condições favoráveis (anaerobiose e presença de nutrientes) ocorre a sua germinação.

Em situações normais *C. difficile* não é capaz de aderir-se a mucosa intestinal e proliferar-se de maneira acentuada devido a microbiota intestinal estabelecida (ZHU et al. 2018). Desta forma, a disbiose é necessária para o desenvolvimento da CDI e disseminação do *C. difficile* (BÅVERUD et al. 2002). A resposta inflamatória é o segundo ponto crucial para o aparecimento desta síndrome (PENICHE et al. 2013). Os hospedeiros respondem de maneira

diferente aos estímulos oriundos das toxinas clostridiais (TENG et al. 2018; WEESE, 2020).

As cepas toxigênicas de *C. difficile* produzem duas toxinas: a toxina A – TcdA (enterotoxina) e toxina B -TcdB (citotoxina) que causam lesões no epitélio intestinal e hipersecreção de mediadores inflamatórios (LYERLY et al. 1988). Os sinais clínicos da CDI podem variar de enterite pseudomembranosa a colite hemorrágica em função da necrose dos enterócitos (SLOVIS, 2009). Algumas cepas são capazes de produzir uma terceira toxina, conhecida como não binária (CDT), a sua participação na CDI ainda não é completamente elucidada (PENICHE et al. 2013).

A partir de 1978, diversos estudos focaram no isolamento e caracterização do *C. difficile* em diversas espécies de animais. A incidência deste agente foi observada em potros (JONES et al. 1989), gatos (WEBER et al. 1989), cães (RILEY et al. 1991), suínos (MARTIROSSIAN et al. 1992) e avestruzes em cativeiro (FRAZIER et al. 1993). Estes estudos tiveram por objetivo determinar a ocorrência deste patógeno nestas espécies.

O diagnóstico da CDI é baseado no isolamento e detecção das toxinas (TcdA, TcdB e CDT) associado a presença de fatores epidemiológicos e sinais clínicos compatíveis (DELMEÉ, 2001; CARVALHO et al. 2022). O isolamento clássico é realizado por meio de cultivos seletivos e manutenção da condição de anaerobiose (WHITTIER et al. 1993; LYERLY et al. 1998). As cepas toxigênicas são diferenciadas por meio da identificação das toxinas “*in vitro*” ou de seus genes por meio de técnicas de biologia molecular aplicada (KATO et al. 1991; ZIMMEL, 2008).

Em seres humanos, a CDI é uma das causas mais importantes de infecção hospitalar associada à administração de antimicrobianos, em especial as fluorquinolonas (MARTIN et al. 2016; LIM et al. 2020). Após a sua germinação, ocorre a produção de suas toxinas. A TcdA causa a quebra das junções a TcdB atua sobre o citoesqueleto resultando na sua desorganização (LIM et al. 2020). As ações de ambas as toxinas causam a secreção de mediadores inflamatórios no lúmen intestinal e modulam o sistema nervoso autônomo (SNA) (PENICHE et al. 2013; HRYCKOWIAN et al. 2017).

Consequentemente existe intensa migração leucocitária para a mucosa intestinal, que resulta na formação da pseudomembrana, típica da CDI (HOOKMAN et al. 2009).

É possível estabelecer que algumas cepas de *C. difficile* são mais comuns em seres humanos e outras em animais (ZHU et al. 2018; CZEPIEL et al. 2022). A identificação de cepas semelhantes em seres humanos e animais iniciou a discussão sobre possível disseminação recíproca com compartilhamento de cepas (MULLIGAN, 1984; KEESEN et al. 2013; LOO et al. 2016; HAIN-SAUNDERS et al. 2023). Apesar disso, a presença do patógenos nas fezes não está diretamente ligada a manifestação clínica da doença (JARDINE et al. 2013; RODRIGUEZ et al. 2016).

Os casos de CDI em humanos aumentaram substancialmente na última década. Acredita-se que os animais tenham importância epidemiológica na transmissão da doença. De forma que a CDI começa a ser analisada pela perspectiva da saúde única (HENSGENS et al. 2012; SQUIREAND-RILEY, 2013).

Revisão da Literatura

***Clostridioides (Clostridium) difficile* - História**

A sua primeira alusão ao hoje denominado *Clostridioides difficile* foi feito em 1935 por Hall e O'Toole no estado do Colorado, EUA, a partir de fezes de neonatos. A nova espécie foi classificada como *Bacillus difficilis*. O termo “*difficilis*” foi inserido em função da dificuldade da realização do seu isolamento por meios tradicionais e “*Bacillus*” devido a morfologia. Neste momento verificou-se que esta era produtora de toxina altamente patogênica para coelhos e cobaias (HALL, O'TOOLE, 1935). O agente foi denominado com pertencente ao gênero *Clostridium*, somente anos depois em 1938 (Prevot, 1938).

A sua correlação com quadros de colite pseudomembranosa em seres humanos foi descrita inicialmente por Tedesco et al. (1974) em pacientes recebendo clindamicina. Em animais o primeiro relato foi descrito por Green (1975) após administração de penicilinas, com a detecção de uma provável citotoxina causando colite hemorrágica. Estes estudos foram os pioneiros para

correlacionar o desenvolvimento de diarreia em pacientes recebendo antibióticos *C. difficile*. A, hoje, denominada CDI, era conhecida anteriormente como colite pseudomembranosa (PMC – do inglês pseudomembranous enterocolitis) (BARTLETT, 1994) e já havia sido descrita por Veillon em 1839 com a identificação de um agente anaeróbico como responsável por esta manifestação clínica.

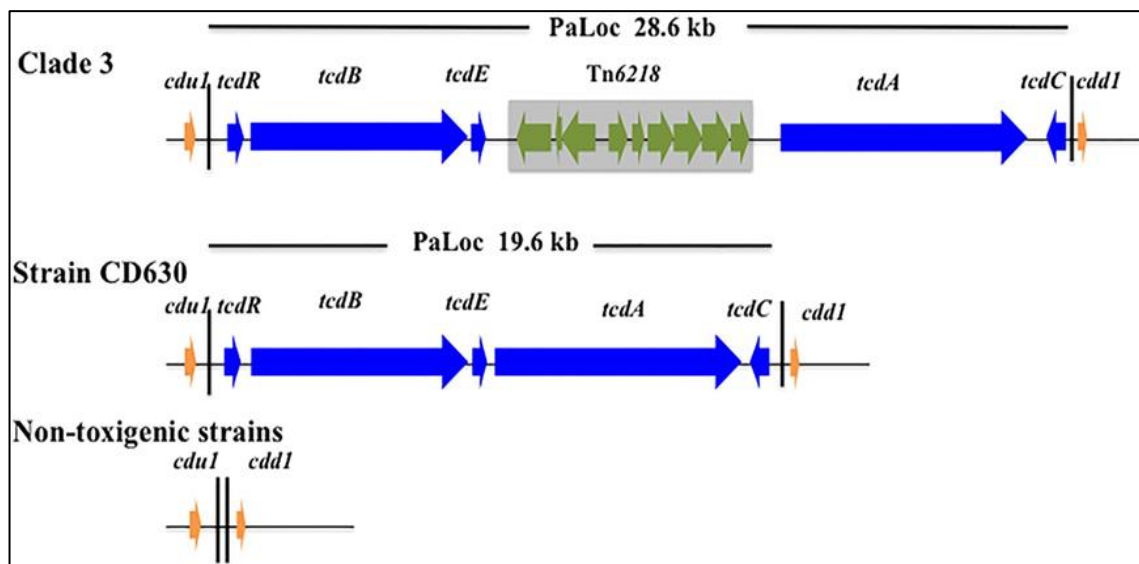
A nomenclatura, *Clostridium difficile*, foi oficializada a partir de 1980, com a publicação no Approved Lists of Bacterial Names (Listas Aprovadas de Nomes de Bactérias) (SKERMAN et al. 1980). Em 2016 houve divisão dentro dos grupos pertencentes ao gênero *Clostridium*, com a manutenção das cepas similares ao *Clostridium butyricum* e formação de novos clados. Neste momento o *Clostridium difficile* foi renomeado para *Clostridioides difficile* (LAWSON et al. 2016), terminologia utilizada atualmente (OREN; GARRITY, 2016).

***Clostridioides difficile* – Agente, esporulação e patogenia.**

Clostridioides difficile em sua forma vegetativa é observado na microscopia como um bastonete gram-positivo. É um anaeróbio estrito, formador de esporos e produtor de gás. A motilidades das cepas pode variar em função da presença de genes de virulência associados a esta condição. Suas dimensões podem variar entre 0,5-1,9 x 3,0 -16,9 µm (LAWSON et al. 2016).

As cepas podem ser divididas em dois grandes grupos: cepas produtoras de toxinas e as não produtoras ou atoxigênica. As linhagens toxigênicas possuem o *locus* de patogenicidade (*PaLoc*). Este alberga os principais genes de virulências e toxinas (Figura 1) (NATARAJAN et al. 2013; GERDING et al. 2014).

Figura 1: Locus de patogenicidade (PaLoc) do *C. difficile* com diferentes perfis de toxigenicidade (Fonte: Chen et al. Whole genome sequences of three Clade 3 *Clostridium difficile* strains carrying binary toxin genes in China. Scientific Reports, v.7, n. 4355, 2017).



A esporulação é mecanismo essencial para a perpetuação do *C. difficile* no ambiente (SORG et al. 2008). Quando em condições ambientais estressantes para sua sobrevivência inicia-se o processo de esporulação (PAREDES-SABJA et al. 2014). O gene da proteína A do estágio 0 de esporulação (*spo0A*) é o regulador central neste processo. O *spo0A* é responsável pela ativação do processo de esporulação, desenvolvido em resposta a estas condições (DEAKIN et al. 2012).

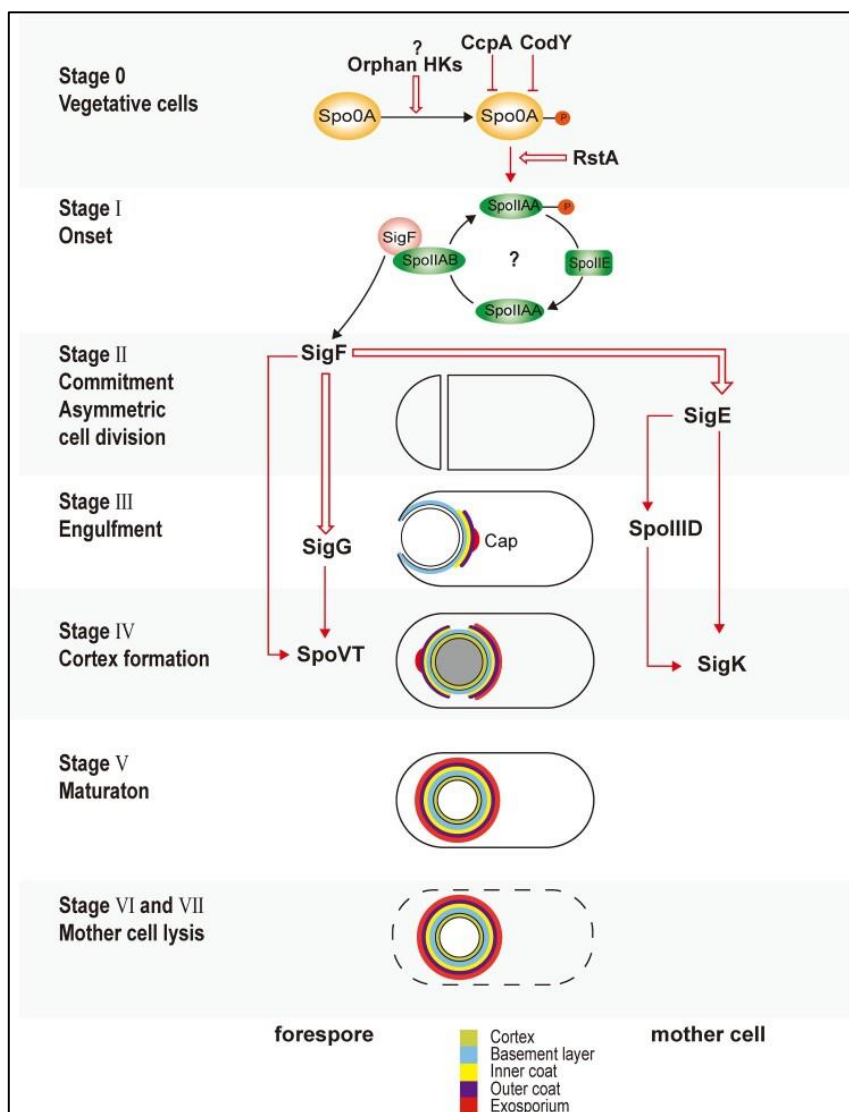
Para formação do esporo *C. difficile* passa por sete estágios sofrendo alterações genéticas e morfológicas. Inicialmente (estágio 0) não existem alterações morfológicas, neste ocorre a replicação do material genético. No estágio I existe unificação do DNA de forma axial. Posteriormente (estágio II) realiza-se a septação assimétrica (gerando célula mãe e compartimento menor). No terceiro estágio, a célula mãe fagocita o compartimento menor, resultando na formação de membranas que revestiram o esporo. No estágio IV descreve-se a formação de uma camada de peptideoglicanos entre as camadas celulares (córtex). Esta característica fornece a resistência ao etanol e calor (POPHAM; BERNHARDS, 2015). No quinto estágio de desenvolvimento relata-se a

dispersão de proteínas ao longo da superfície do esporo. Esta formação confere resistência a insultos químicos e enzimáticos (DRIKS; EICHENBERG, 2015). Nos estágios finais (VI e VII) desenvolve-se a camada de proteção mais externa (exosporium) (ZENG et al. 2022). Os estágios de desenvolvimento da formação do esporo podem ser observados na Figura 2.

O esporo possui três camadas: basal, revestimento interno e externo. Esse complexo revestimento fornece resistência a ampla variedade de condições e desinfetantes (SORG et al. 2008; GIL et al. 2017; ZENG et al. 2022). Assim quando liberados no meio ambiente estes podem permanecer viáveis por longos períodos (SORG et al. 2008). Além do *spo0A*, outros genes envolvidos na formação do esporo são *SigE*, *SigK*, *SigF* e *SigG*, entre outros genes ainda pouco estudados (PAREDES-SABJA et al. 2014).

A germinação *C. difficile* ocorre quando os seus receptores detectam a presença de moléculas favoráveis ao seu redor (ZHU et al. 2018). Os principais desencadeadores desse processo são sais biliares, como a taurina, e aminoácidos com glicina e alanina (YOUNG, 2014). A partir desse momento existe a reidratação das organelas centrais e iniciação do metabolismo celular (ZHU et al. 2018). Esta condição fornece *C. difficile* a capacidade de permanecer viável em instalações hospitalares indiferentemente a realização de procedimentos de desinfecção padrão (AWAD et al. 2014; KOENIGSKNECHT et al. 2015; LIM et al. 2019).

Figura 2: Estágios de formação do esporo do *Clostridioides difficile*. Os pontos de interrogação indicam mecanismos sugestivos, mas não confirmados (Zeng et al. *Clostridioides difficile* spore: coat assembly and formation. Emerging Microbes & Infections, v. 11, n.1, p. 2340-2349, 2022).



Na patogênese da CDI, além das toxinas, a formação de biofilme desempenha papel crucial na manutenção desse quadro clínico. Facilitando a permanência do *C. difficile* no intestino, tornando-o mais resistente à ação dos antimicrobianos (VUOTTO et al. 2018; SHOLEH et al. 2020).

O uso de antimicrobianos está intrinsecamente ligado à CDI, uma vez que esses medicamentos alteram o equilíbrio do microbioma intestinal. Como consequência, os metabólitos produzidos no intestino sofrem modificações,

criando um ambiente propício para a multiplicação e aderência do *C. difficile*, perpetuando esse processo de infecção (THERIOT; YOUNG, 2015).

***Clostridioides difficile* – Toxinas e Fatores de Virulência**

As cepas consideradas toxigênicas são detentoras dos genes produtores de toxinas: toxina A -TcdA (*tcdA*), toxina B -TcdB (*tcdB*) e a toxina binária - CDT (*cdtA* e *cdtB*) (AKTORIES et al. 2017). A TcdA e TcdB são constituintes das exotoxinas clostridiais, sendo caracterizadas pela sua infiltração e destruição de enterócitos (ORREL, MELNYK, 2021). TcdA e TcdB são glicosiltransferases que se ligam aos enterócitos, inativam a GTPases alterando o citoesqueleto dos enterócitos, aumentam a permeabilidade celular da mucosa intestinal (KORDUS et al. 2022). A CDT tem o poder de catalisar a despolimerização de actina, causando danos ao citoesqueleto das células da mucosa intestinal (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017). A sua real participação na CDI não é completamente elucidada (PENICHE et al. 2013).

Atualmente sabe-se que ambas as toxinas (TcdA e TcdB) possuem relevância na patogênese da CDI. Inicialmente acredita-se que a TcdA era responsável pela resposta inflamatória na mucosa intestinal, e consequentemente, a única causadora dos sinais clínicos. A observação de cepas detentoras exclusivamente de TcdB em indivíduos com CDI demonstrou a efetiva participação desta na CDI (KYNE 2007; MACKIN et al. 2015). Estes isolados possuem mutação em *tcdB*, a qual as torna capazes de causar danos a epitélio intestinal da mesma forma que cepas produtoras de ambas as toxinas (CHAVES-OLARTE et al. 1999; CHANDRASEKARAN; LACY, 2017).

Além das toxinas já citadas o *PaLoc* detém genes para produção de outras proteínas sendo elas TcdR, TcdE, TcdL e TcdC. A TcdR atua como regulador positivo para a produção das demais toxinas, respondendo a estímulos ambientes e disponibilidades de nutrientes (RAMSOM et al. 2018). Enquanto TcdC atuam como regulador negativo para a síntese de TcdA, TcdB e TcdR (MATAMOUROS et al. 2007). TcdE e TcdL não possuem sua participação e mecanismo de ação completamente elucidados, mas sabe-se que atuam sobre a

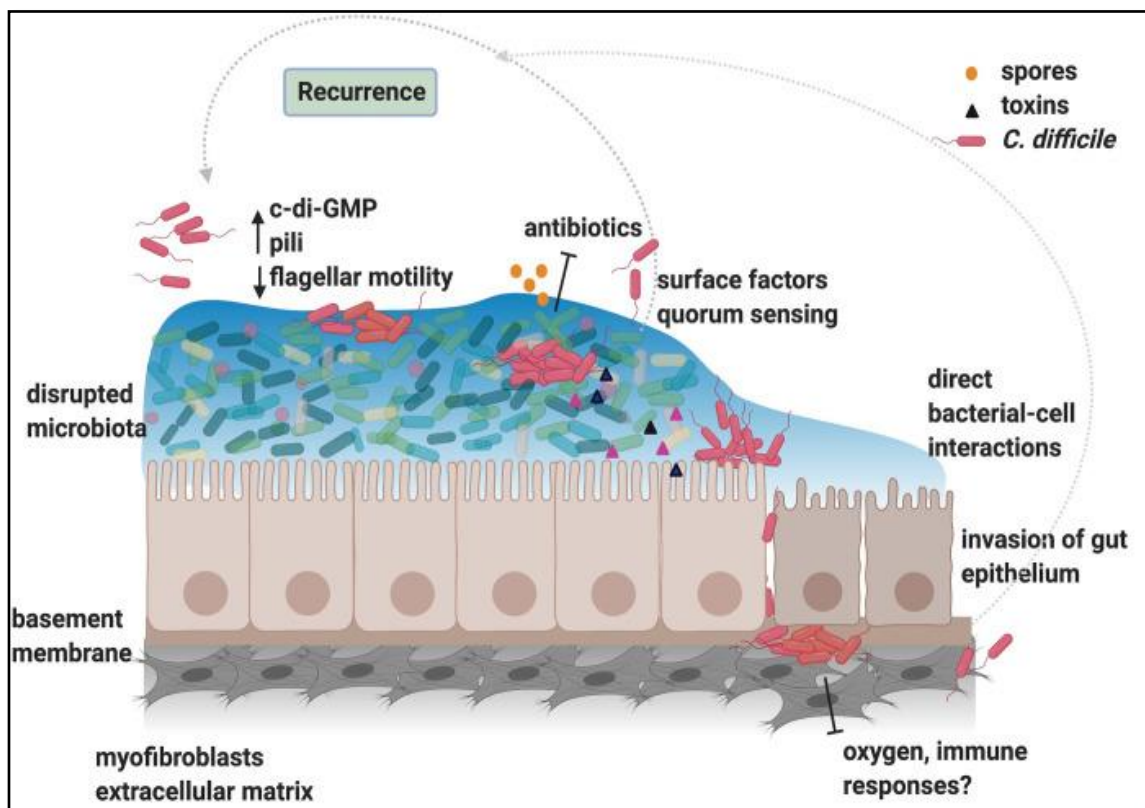
adesão e secreção, respectivamente, das demais toxinas (GOVIND et al. 2015; BREITFELD et al. 2018).

Os fatores de virulência observados na CDI são responsáveis pela produção de toxinas, adesão, motilidade, invasão e esporulação (BUDDLE, FAGAN, 2023). A adesão do *C. difficile* é mediada pelos genes *cwp2* (proteína de ligação a parede celular), *cwp66* (proteína de superfície celular), *cwp84* (cisteína protease), *cwpV*, *slpA* (percussor de proteínas da camada S), *secA* (subunidade da proteína translocase), *fbpA* (gene da fibronectina), *cbpA* (proteína de ligação ao açúcar), *groEL* (proteína do choque térmico) e *pilA1* (proteína PilA1). A Invasão e motilidade são controladas pelos genes *zmp1* (metaloprotease), *fliA* (complexo sigma), *fliC* (proteína flagelar), *fliD* (estrutura cristalina flagelar) e a esporulação por *spo0A* (RIZEK et al. 2022; BUDDLE; FAGAN, 2023).

Os principais genes de resistência á antimicrobianos encontrados em *C. difficile* são: *ermB* (resistência clindamicina), *mdtD* (proteína de resistência múltiplas drogas), *MecI* (proteína reguladora de resistência múltiplas drogas), *msrD* (resistência a macrolídeos), *NimB* (proteína de resistência metronidazol), *tetM*, *tetO* (proteína de proteção ribossômica resistente a tetraciclina), *tetW* (proteína de resistência a tetraciclina) e *qnr* (proteína de resistência a quinolonas) (SALDANHA et al. 2020). Outros dois genes importantes são *gyrA/gyrB* onde mutações neste genes conferem resistência a fluorquinolonas em cepas de *C. difficile* (Spigaglia et al. 2010; Fuzi et al. 2020).

A formação de biofilme é outro processo que está diretamente associando a gravidade dos casos de CDI. Quando em presença da disbiose, *C. difficile* adere-se a mucosa intestinal (Zhong et al. 2023). Posteriormente, existe o estabelecimento de agregados bacterianos (Frost et al. 2021) (Figura 3). Este complexo de peptídeos, proteínas, células bacterianas (germinativas e esporos), toxinas e DNA extracelular (eDNA) fornece resistência a antimicrobianos, predispondo a observação de casos recorrentes de CDI (Rubio-Mendonza et al. 2023).

Figura 3: Formação de biofilme de *C. difficile* (Fonte: Frost et al. *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut?. Plos Pathogens, v.17, n.3, p. 1-10, 2021).



***Clostridioides difficile* em animais**

Em animais, a CDI é comum em suínos (GRZESKOWIAK et al. 2019; GRZESKOWIAK et al. 2023) e equinos (SILVA et al. 2013; WESSE et al. 2021). A sua detecção já foi descrita em cães, bovinos, animais de laboratório e selvagens (BARTLETT et al. 2009; BANDELJ et al. 2019; WEESE, 2020).

C. difficile é agente causador de diarreia neonatal em potros (SILVA et al. 2013; WESSE et al. 2021), leitões (YAEGER et al. 2007; GRZESKOWIAK et al. 2023) e colite profusa em equinos adultos (GOHARI et al. 2014). A participação causando alterações digestórias em felinos (WEESE et al. 2001; SCHNEEBERG, et al. 2012), caninos (WEESE et al. 2001; BUSCH et al. 2015) e animais selvagens ainda não é completamente compreendida (WEESE, 2020). Entretanto, em aves (ABDEL-GIL et al. 2018) e pequenos ruminantes (KNIGHT; RILEY, 2013) sabe-se que *C. difficile* não possui importância epidemiológica com agente etiológico de diarreia (WEESE, 2020).

***Clostridioides difficile* em suínos**

A CDI em suínos é predominantemente observada em leitões com até sete dias de idade. Ao contrário do que ocorre em seres humanos, o seu desenvolvimento está correlacionado com deficiências na colonização intestinal (SONGER; UZAL, 2005). *C. difficile* adere-se à mucosa nos primeiros dias de vida, quando a microbiota intestinal ainda não está completamente estabelecida (HOPMAN et al. 2011). O agente está amplamente disseminado nas granjas suínas devido a sua eliminação nas fezes das matrizes (ALVES et al. 2022).

Clinicamente, a CDI em leitões neonatos caracteriza-se por diarreia pastosa ou aquosa com a presença de fibrina, anorexia, redução no ganho de peso e morte em poucos dias (SONGER; UZAL, 2005; GRZESKOWIAK et al. 2017; 2023). Em granjas acometidas cerca de 30% dos animais são positivos para a detecção de *tcdA* e *tcdB* (SONGER et al. 2004; YAEGER et al. 2007).

O isolamento de *C. difficile* pode ser realizado em leitões saudáveis e diarreicos (STEIN et al. 2017; RAMOS et al. 2020; UZAL et al. 2023). Existe correlação entre a identificação do agente nas matrizes, produtos cárneos, derivados de suínos e leitões (LICCIARDI et al. 2021). *C. difficile* pode ser observado a partir de 1 hora após o nascimento e de forma intermitente nas matrizes. Na suinocultura o principal ribotipo (RT) identificado é 078, o qual possui elevada dispersão ambiental e patogenicidade, sendo comumente observado em seres humanos (HOPMAN et al. 2011).

Em suínos a presença de cepas multirresistentes a antimicrobianos e altamente toxigênicas é descrita causando CDI em indivíduos jovens. Destaca-se a resistência dos RT's 078 e 126 a amoxiciclina, cefalosporinas, flurquinolonas e ceftriaxona (ANDINO-MOLINA et al. 2019). No exame de necropsia em leitões descreve-se o edema de mesocolôn, distensão de alças intestinais por gás e enterite difusa. Na histologia, destaca-se a presença de lâmina própria de ceco e colôn e redução da área de contato de mucosa intestinal (GRZESKOWIAK et al. 2017; UZAL et al. 2023).

***Clostridioides difficile* em equinos**

Na espécie equina *C. difficile* acomete, principalmente, potros no período neonatal (MAGDESIAN et al. 2021). Os principais achados do exame físico são a presença de diarreia aguda, desconforto e distensão abdominal, enoftalmia, aumento do tempo de preenchimento capilar (TPC), febre, desidratação moderada a grave e morte em poucas horas (KEEL; SONGER, 2006; MAGDESIAN et al. 2021).

Em equinos adultos descreve-se diarreia aquosa profusa, sudorese excessiva, desconforto abdominal evoluindo de forma aguda a óbito (DIAB et al. 2013). Nesta categoria o *C. difficile* é correlacionado como um dos agentes infecciosos associados ao desenvolvimento de duodeno-jejunitis proximal (DJP) (ARROYO et al. 2016) sendo possível o seu isolamento em refluxo gástrico de equinos com esta condição (ARROYO et al. 2006). Elevações nos valores de hematócrito, leucócitos, ureia, creatinina e amiloide sérico agudo (SAA) são as principais alterações laboratoriais em equinos com CDI (NOMURA et al. 2020). A taxa de mortalidade nesta categoria é alta, podendo chegar até a 83%. A detecção das toxinas binárias é usual em equinos, e o RT 078 é o mais comum (FUJII et al. 2023).

Em ambas as categorias os principais fatores associados ao desenvolvimento dos quadros são a utilização prévia e prolongada de antimicrobianos (β -lactâmicos, rifampicina, eritromicina e gentamicina), hospitalização e mudanças na alimentação (BÄVERUD, 2002; PREIS et al. 2012; SILVA et al. 2012; NOMURA et al. 2020; FUJII et al. 2023). Entretanto, deve-se destacar que existem estudos onde não foi possível correlacionar o desenvolvimento de CDI com o uso de antimicrobianos (WEESE et al. 2006; RUBY et al. 2009).

Os achados de necropsia e histopatologia são semelhantes aos relatados em quadros de enterite de origem bacteriana (DIAB et al. 2013; WEESE, 2020). Macroscopicamente descreve-se a presença de áreas de hemorragia multifocal e aumento da espessura da mucosa intestinal. Especialmente em ceco e cólon descreve-se a presença da pseudomembrana com coloração variando de marrom a verde escuro (DIAB et al. 2013).

Em potros no período neonatal a ultrassonografia abdominal é um método auxiliar na detecção prática de casos de CDI (SOLIS et al. 2012). Nestes é possível observar a *pneumatosis* em múltiplos locais na mucosa intestinal (KREISS et al. 1999). Além disso observa-se espessamento de submucosa (>5 mm) de intestino delgado, distensão de alças intestinais, acúmulo de líquido com aspecto heterogêneo em abdômen e aumento de ecogenicidade difuso de alças intestinais (HA; TSAI, 2012; SOLIS et al. 2012).

No Brasil, a primeira descrição de *C. difficile* em potros com diarreia ocorreu no estado de Minas Gerais. Dois equinos da raça Mangalarga Marchador, ambos com cinco meses de idade, desenvolveram diarreia aquosa após o início da antibioticoterapia, que consistiu na administração de penicilina e florfenicol. A identificação do patógeno foi realizada com sucesso, revelando a presença de cepas toxigênicas (A⁺B⁺) (SILVA et al. 2012).

A primeira investigação da ocorrência de *C. difficile* revelou positividade de 4,6%, e todas as cepas foram isoladas de potros com diarreia e/ou internados (SILVA et al. 2013). Os principais RT's identificados em equinos incluem: 001, 012, 014, 017, 027 e 078 (WEESE, 2020). No contexto nacional, foram detectados os RT's 009 (A⁻B⁻ CDT⁻), 014/20 (A⁺B⁺ CDT⁻) e 053 (A⁻B⁻ CDT⁻) em animais com diarreia (SILVA et al. 2015).

***Clostridioides difficile* em bezerros**

A primeira alusão ao isolamento do *C. difficile* em bezerros foi relatada em 1994 nos EUA em animais com diarreia neonatal (GERMANI et al. 1994). Em 2088 amostras de fezes submetidas ao cultivo, em uma foi possível realizar a identificação do agente. Posteriormente, foi possível detectar suas toxinas (TcdA e TcdB) em bezerros saudáveis e diarreicos (7,6%-31/278) (RODRIGUEZ-PALACIOS et al. 2006). Foram observadas cepas de *C. difficile* na maioria das propriedades com a identificação diversos RT's (014, 017, 027, 033, 077 e 078) (RODRIGUEZ-PALACIOS et al. 2006).

Estudos realizado exclusivamente em bezerros com diarreia isolou-se o *C. difficile* e detecção direta de suas toxinas por ELISA em 25,3% (58/253) (HAMMITT et al. 2008). No exame histológico dos animais com resultados

fortemente positivos para TcdA e TcdB foi observada a degeneração das vilosidades intestinais e erosão de mucosa intestinal e infiltrado inflamatório (HAMMITT et al. 2008; SONGER, 2008).

Os principais RT's encontrados em bezerros são: 009, 012, 027, 033, 045, 046, 078 e 126 (RODRIGUEZ-PALACIOS et al. 2006; SCHNEEBERG et al. 2013; MAGISTRALI et al. 2015; BANDEJI et al. 2018; MASARIKOVA et al. 2020; BLASI et al. 2021). Em neonatos com diarreia a ocorrência varia entre 19,9% e 7,6% (RODRIGUEZ-PALACIOS et al. 2006; BANDEJI et al. 2018; MASARIKOVA et al. 2020; BLASI et al. 2021). Na Tabela 1 é possível observar trabalhos epidemiológicos a respeito ocorrência de *C. difficile* em bezerros, as diferentes técnicas de isolamento e epidemiologia das amostras.

De acordo com a literatura consultada, há apenas um relato da presença do *C. difficile* em bezerros no Brasil (SILVA et al. 2015). Neste trabalho foi possível isolar diferentes cepas: A⁻B⁻ CDT⁻ (RT 009 e RT 053) e A⁺B⁺ CDT⁻ (SLO147 e SLO198) em animais com e sem diarreia.

Em bovinos adultos o *C. difficile* não possui relevância clínica completamente elucidada, existindo lacunas na sua epidemiologia. Não sendo possível correlacionar o desenvolvimento de forma concreta da CDI nesta categoria animal. Em bezerros a sua real participação ainda não é completamente elucidada (WEESE, 2020). Sabe-se que a presença de diarreia, uso de antimicrobianos (quinolonas e penicilinas) são fatores de risco para o desenvolvimento desta síndrome (MAGISTRALI et al. 2015; BLASI et al. 2021). A disbiose é o principal fator associado ao desenvolvimento da CDI em bezerros (GOMEZ et al. 2017). Mudanças na diversidade bacteriana favorecem a proliferação de enteropatogénos, em especial do *C. difficile* (REDDING et al. 2021).

Tabela 1: Estudos epidemiológicos sobre a ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros.

Autor	Ano	País	Idade	Raça	Fazenda	Técnica	Ocorrência (%)	Diarreia**
Palacios et al.	2006	Canadá	<1 mês	HPB	102	Isolamento	31/278 (7,6)	Sim
						ELISA	85/278 (57,1)	
Avbersek et al.	2007	Eslovênia	<12 semanas	HPB	1	Isolamento	4/42 (9,5)	Não
Hammitt et al.	2008	EUA	1-6 semanas	HPB	NT	EIA*	58/253 (22,9)	Sim
						Isolamento	64/253 (25,3)	
Houser et al.	2010	EUA	<5 semanas	Corte	1	qPCR (<i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA/B</i>)	24/71 (33,8)	Sim
Hoffer et al.	2010	Suíça	4-6 meses	NT	46	Isolamento	1/204 (0,04)	Sim
			<48 h				56/174 (32)	
Costa et al al.	2011	Canadá	1 semana	HPB	1	Isolamento	88/172 (51)	Sim
			17 semanas				4/183 (2)	
			21 semanas				4/156 (2)	
Scheneeborg et al.	2013	Alemanha	NT	NT	603	Isolamento	176/999 (17,6)	Sim
Knight et al.	2013	Austrália	1-6 semanas	Corte	128	Isolamento	204/360 (56,7)	Sim
						qPCR 16S <i>rRNA</i>	90/150 (60)	
Doosti, Farsani	2014	Iran	3-25 dias	NT	2	qPCR <i>tcdA</i>	8/150 (5,3)	Sim
						qPCR <i>tcdB</i>	16/150 (10,6)	
						qPCR <i>cdtA</i>	8/150 (5,3)	
						qPCR <i>cdtB</i>	14/150 (9,3)	

Tabela 1: continuação

			0-16 dias				85/420 (20,2)	
Magistrali et al.	2015	Itália	90-120 dias	Corte	2	Isolamento	3/416 (0,72)	Não
			>150 dias				0/313 (0)	
Bandelj et al.	2016	Eslovênia	0-180 dias	HPB	20	Isolamento	101/2442 (4,1)	Sim
Knight et al.	2016	Australia	>7 dias	Corte	NT	Isolamento	18/30 (60)	NT
Rodrigues et al.	2017	Bélgica	>6 meses	Corte	5	Isolamento	8/71 (11,3)	Sim
Bandelj et al.	2018	Eslovênia	>1 ano	NT	20	qPCR (16S)	243/2442 (9,96)	NT
Masarikova a et al.	2020	República Tchaca	2-58 dias	HPB	29	Isolamento	44/297 (14,8)	Sim
Zhang et al.	2020	China	<7 dias	NT	NT	Isolamento	51/118 (43,2)	Sim
Redding et al.	2021	EUA	>2 semanas	HPB	23	qPCR (<i>tcdB</i> e <i>cdtA/B</i>)	28/92 (30)	NT
Blasi et al.	2021	Itália	>60 dias	HPB	101	Isolamento	27/404 (6,7)	Sim
Redding et al.	2021	EUA	>2 semanas	HPB	23	qPCR (<i>tcdB</i> e <i>cdtA/B</i>)	28/92 (30)	Não
Spigaglia et al.	2023	Itália	>3 semanas	NT	15	Isolamento	13/700 (1,8)	Sim

NT: não determinado; *Ensaio imuno enzimático comercial; ** Bezerros com diarreia foram incluídos no estudo?

***Clostridioides difficile* em animais de companhia**

Em cães, a importância de *C. difficile* em animais diarreicos ainda não é totalmente elucidada. Inicialmente deduziu-se que o agente era responsável por casos de diarreia crônica recidivante (BERRY; LEVETT, 1986; MARKS; KATHER, 2003) e síndrome hemorrágica aguda em cães (CAVE et al. 2002). Estudos posteriores demonstraram maior risco de colonização por cepas de *C. difficile* em pacientes internados (STRUBLE et al. 1994; CLOOTEN et al. 2008).

Em gatos os valores de ocorrência variam entre 2,5 e 38,1% em animais saudáveis e diarreicos (WEESE, 2020). Em animais hospitalizados observou-se valores próximos a 20%, com o isolamento intermitente. Os principais RT's foram 010 e 106 (CLOOTEN et al. 2008). Em animais diarreicos cepas toxigênicas foram observadas em gatos com quadros de diarreia aguda sem o histórico de utilização de antimicrobianos (WESSE et al. 2001).

Os sinais clínicos da CDI em animais de companhia variam de apresentação subclínica a diarreia hemorrágica aguda e fatal. Estudos de incidência determinaram resultados baixos (1,2%) de *C. difficile* em cães (MARKS et al. 2011).

Devido ao contato íntimo entre cães e gatos com seus tutores, desenvolveu-se a hipótese da possibilidade de disseminação entres estes (WESSE et al. 2010). Estudos posteriores demonstraram que a possibilidade da troca de cepas entre proprietários e animais de companhia é baixa (RABOLD et al. 2018; FINSTERWALDER et al. 2022; REDDING et al. 2023). Contudo, um reporte de caso recente demonstrou o desenvolvimento de rCDI em uma paciente devido a eliminação constante de seu gato recém adquirido (GARZA et al. 2023).

***Clostridioides difficile* em animais selvagens**

C. difficile já foi isolado em diversas espécies de animais selvagens com diversos hábitos alimentares incluindo carnívoros, onívoros, herbívoros e insetívoros (BANDELJ et al. 2014; WEESE et al. 2020). No Brasil foi descrita em

lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e jaguatirica (*Leopardus pardallis*) com a observação de cepas toxigênicas (A⁺B⁺) (SILVA et al. 2014).

A CDI em animais selvagens ainda requer estudos epidemiológicos e genéticos mais profundos. Dados sobre a ocorrência da CDI em animais silvestres saudáveis, diarreicos e em cativeiro são cruciais para a compreensão da sua ação sobre estes (ANDERSON et al. 2015; WEESE 2020). A presença de cepas toxigênicas em animais silvestres está intimamente ligada à sua disseminação, pois alguns destes (sinantrópicos) estão próximos a sociedade (HIMSWORTH et al. 2014). Assim a contaminação por resíduos de antibióticos, contato com animais de produção e animais carreadores podem estar associados a disseminação de genes de virulência da CDI (DINGLE et al. 2011; SILVA et al. 2013, JANOIR, 2016).

Os animais sinantrópicos selvagens merecem atenção especial, pois atuam como disseminadores de *C. difficile* entre áreas urbana e regiões silvestres. A sua movimentação por áreas altamente povoadas e a presença de esporos do *C. difficile* nas suas fezes é um problema de saúde única (SANTANA et al. 2022). A identificação do *C. difficile* em ursos polares (*Ursus maritimus*) mantidos em cativeiro e em seu habitat natural demonstra a flexibilidade de seus esporos em diferentes ambientes (WEESE et al. 2019).

***Clostridioides difficile* em humanos**

Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em 1935, somente na década de 70 *C. difficile* foi reconhecido como agente causador de diarreia em seres humanos (BARTLETT, 1994). Desde então passou a ser a principal causa de diarreia associada a antibioticoterapia e uso de fármacos que alterem o pH gástrico (SAMIE et al. 2008; ANJEWIERDEN et al. 2021).

A CDI acomete aproximadamente 400 mil pessoas por ano nos EUA, os custos com tratamento e medidas de controle e prevenção estão em torno de 800 milhões de dólares anualmente (DESAI et al. 2016). Estes são intimamente associados ao aumento na incidência e observação de cepas multirresistentes (ELLIOTT et al. 2017). As estimativas indicam 12.800 mortes anuais em decorrência da CDI nos EUA, principalmente devido a elevada resistência da

cepa BI/NAP1/027, observadas em casos de colite (PEPIN et al. 2005). No Brasil a incidência em um hospital de referência foi 9,2 em 10.000 paciente-dia, sendo os RT's 014 e 106 os mais frequentes (BRAGA et al. 2023).

Atualmente tem-se um conceito novo que é a infecção recorrente pelo *C. difficile* (rCDI do inglês recurrent *C. difficile* infection). Onde ocorre o desenvolvimento da CDI em dois ou mais momentos diferentes em curto espaço de tempo (OKAFOR et al. 2023). Os principais fatores para o desenvolvimento de rCDI são pacientes com imunossupressão, idade superior a 65 anos, episódios graves de CDI e isolamento da cepa BI/NAP1/027 (GERDING et al. 2018; KHANNA et al. 2022).

O tratamento da CDI preza pela utilização de antimicrobianos como metronidazol, vancomicina, fidaxomicina (KOCIOLEK; GERDING, 2016). Este último vem sendo mais indicado nos últimos anos devido ao seu espectro mais estreito, o que reduz a possibilidade de rCDI em função da menor modificação de microbiota intestinal (LOUIE et al. 2011; DILNESSA et al. 2022; LUNA et al. 2023). A retirada do antimicrobiano desencadeador da CDI deve preconizada após a verificação dos sinais clínicos. O segundo passo na conduta terapêutica visa a adoção de medidas que favoreçam o reestabelecimento da microbiota intestinal (KOCIOLEK; GERDING, 2016).

Além das terapias convencionais o transplante de microbiota fecal é uma opção, principalmente nos casos de rCDI (MINKOFF et al. 2023; TERRA et al. 2022). Cuidados direcionados ao restabelecimento da imunidade podem ser instituídos em pacientes imunossuprimidos (KOCIOLEK; GERDING, 2016; ELLIOTT et al. 2017). A utilização de anticorpos monoclonais para TcdB como bezloxumab vem sendo preconizada de forma preventiva e terapêutica da CDI (GERDIN et al. 2018).

Os sintomas da CDI estão associados ao nível de proliferação e a toxigenicidade das cepas envolvidas (COLLEEN et al. 2021). Clinicamente observa-se diarreia acentuada e colite pseudomembranosa (FEUERSTADT et al. 2021).

A mortalidade associada à CDI está associada, ao aumento na resistência bacteriana e casos recorrentes (MASLENNIKOV et al. 2022). A colite

pseudomembranosa foi à principal causa de óbito em pacientes internados ano de 1999 em hospitais na Inglaterra (KELLY; LAMONT, 2008). Acredita-se que o aumento do número de casos registrados deve-se ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas. Os principais riscos para o desenvolvimento da CDI são, além do uso de antimicrobianos, idade avançada e hospitalização (BARTLETT, 2009).

Com o uso da técnica da ribotipagem, estudos recentes relataram que cepas de *C. difficile* isoladas de produtos cárneos compartilhavam grande semelhança com os isolados de seres humanos sugerindo possível transmissão do *C. difficile* por alimentos de origem animal (RODRIGUEZ et al. 2007; SONGER et al. 2009). A partir desses resultados, alguns trabalhos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a semelhança entre isolados em seres humanos e de animais domésticos (ARROYO et al. 2005; JHUNG et al. 2008; NORMAN et al. 2011).

Nas últimas décadas *C. difficile* foi mais bem compreendido, aparecendo nas listas de diagnóstico diferenciais em casos de diarreia em seres humanos. Todavia, existem diversas lacunas em sua cadeia epidemiológica e diversos elementos de sua patogênese ainda não foram completamente elucidados (SONGER, 2004; SONGER; ANDERSON, 2006; THERIOT; YOUNG, 2015; ELLIOTT et al. 2017).

***Clostridioides difficile*- Diagnóstico**

O diagnóstico da CDI deve ser realizado com base nos fatores epidemiológicos, sinais clínicos e teste laboratoriais confirmatórios. A CDI pode ser diagnosticada por meio da identificação do agente (isolamento clássico – anaerobiose) juntamente com detecção de suas toxinas (TcdA e TcdB) (“*cultura toxigênica*”) e detecção de seu material genético (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al. 2017). Os principais pontos críticos no diagnóstico da CDI é o subdiagnóstico (devido à dificuldade de se isolar o agente) e o fato de ser constituinte da microbiota intestinal e ser observado em indivíduos saudáveis (MAESTRI et al. 2023).

O isolamento clássico *C. difficile* baseia-se na cultura direta em condição de anaerobiose (KNIGHT et al. 2014; YANG et al. 2014; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al. 2017). Com o desenvolvimento de meios seletivos e caldos de enriquecimento, essa técnica vem apresentando maiores índices de sensibilidade sendo considerado padrão ouro (KNIGHT et al. 2014; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al. 2017; MCDONALD et al. 2018; PENG et al. 2018; MAESTRI et al. 2023). Devendo-se realizar o teste de susceptibilidade a antimicrobianos posteriormente ao isolamento. As opções possíveis para sua realização são o método de difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima pelo teste epsilométrico (ETEST) (CARVALHO et al. 2023).

O ensaio de neutralização de citotoxicidade é uma opção para confirmação da presença de ambas as toxinas (PENG et al. 2018). Atualmente estão disponíveis teste rápidos baseados na identificação GDH (RAMOS et al. 2021; CARVALHO et al. 2022). Outra opção é a identificação dos genes *tcdA* e *tcdB* responsáveis pela produção de toxinas. Pode-se realizar a amplificação de fragmentos por meio da qPCR diretamente das fezes (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al. 2017; BANDEJI et al. 2018). Esta técnica possui alta sensibilidade e pode ser realizada rapidamente em comparação com o isolamento clássico (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al. 2017; McDONALD et al. 2018; GUERY et al. 2019).

Conceitualmente pode-se diferenciar o termo colonização, o qual significa a identificação do *C. difficile* e a ausência dos sinais clínicos. Todavia, detecção do *C. difficile* e suas toxinas acompanhadas de diarreia e/ou colite, pode-se determinar a presença da CDI (CROBACH et al. 2018). Neste contexto a realização da ribotipagem para determinação da região intergênica (23S-16S) *C. difficile* possui relevada importância para melhorar caracterização dos ribotipos circulantes nas diferentes espécies (Weese, 2020; GUERY et al. 2019). Já o MLST fornece uma melhor caracterização de genes *housekeeping* (*adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *secA*, *sodA* e *tpi*) para determinação do *strain* (ST) e *clade*. Nesta situação é possível realizar melhor caracterização destas cepas (Griffiths et al. 2010).

Referências

- ABDEL-GIL, M.Y.; THOMAS, P.; SCHMOOCK, G.; EL-AZM, K.A.; WIELER, L.H.; NEUBAUER, H.; SEYBOLDT, C. Presence of *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat in Egypt. *Anaerobe*, v.51, n.1, p.21-25, 2018.
- AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; JANK, T. *Clostridium difficile* toxin biology. *Annual Review of Microbiology*, v.71, n.1, p.281–307, 2017.
- ALVES, F.; NUNES, A.; CASTRO, R.; SEQUEIRA, A.; MOREIRA, O.; MATIAS R.; RODRIGUES, J.C.; SILVEIRA, L.; GOMES, J.P.; OLEASTRO, M. Assessment of the Transmission Dynamics of *Clostridioides difficile* in a Farm Environment Reveals the Presence of a New Toxigenic Strain Connected to Swine Production. *Frontiers in Microbiology*, v.14, n.13, p.1-14, 2022.
- ANDERSON C.E.; HAULENA, M.; ZABEK, E.; HABING, G.; RAVERTY, S. Clinical and epidemiologic considerations of *Clostridium difficile* in harbor seals (*Phoca vitulina*) at a marine mammal rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife medicine*, v.42, n.2, p.191-197, 2015.
- ANDINO-MOLINA, M.; BARQUERO-CALVO, E.; SEYBOLDT, C.; SCMOOCK, G.; NEUBAUER, H.; TZOC, E.; RODRIGUES, C.; GOMEZ, C.Q. Multidrug-resistant *Clostridium difficile* ribotypes 078 and 014/5-FLI01 in piglets from Costa Rica. *Anaerobe*, v.55, n.1, p.78-82, 2019.
- ANDRÉS-LASHERAS, S.; MARTÍN-BURRIEL, I.; MAINAR-JAIME, R.C.; MORALES, M.; KUIJPER, E.; BLANCO, J.L.; CHIRINO-TREJO, M.; BOLEA, R. Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. *BMC Veterinary Research*, v.14, n.77, p.1-5, 2018.
- ANJEWIERDEN, S.; HAN, Z.; BROWN, A.M.; DONSKEY, C.J.; DESHPANDE, A. Risk factors for *Clostridioides difficile* colonization among hospitalized adults: A meta-analysis and systematic review. *Infection Control Hospitalization Epidemiology*, v.42, n.5, p.565-572, 2021.
- ARROYO, L.G.; COSTA, M.C.; GUEST, B.B.; PLATTNER, B.L.; LILLIE, B.N.; WEESE, J.S.; Duodenitis-Proximal Jejunitis in Horses After Experimental

Administration of *Clostridium difficile* Toxins. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.31, n.1, p.158-163, 2016.

ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal Medicine Microbiology* v.54, p.163-166, 2005.

ARROYO, L.G.; STÄMPFLI, H.R.; WEESE, J.C.; Potential role of *Clostridium difficile* as a cause of duodenitis-proximal jejunitis in horses. *Journal of Medical Microbiology*, v.5, n. 55, p.605-608, 2006.

AWAD, M.M.; JOHANESEN, A.; CARTER, G.P.; ROSE, E.; LYRAS, D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, v.5, n.5, p.579–593, 2014.

BANDELJ P.; TRILAR, T.; BLAGUS, R.; OCEPEK, M.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.C.; VENGUST, M. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European Barn Swallows (*Hirundo rustica*) during migration. *BMC Veterinary Research*, v.40, n.10, p.1-4, 2014.

BANDELJ, P.; HARMANUS, C.; BLAGUS, R.; COTMAN, M.; KUIJPER, E.J.; OCEPEK, M.; VENGUST, M. Quantification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in feces of calves of different age and determination of predominant *Clostridioides difficile* ribotype 033 relatedness and transmission between family dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *BMC Veterinary Research*, v.1, n.14, p.298-306, 2018.

BANDELJ, P.; KNAPIČ, T.; ROUSSEAU, J.; PODGORELEC, M.; PRESETNIK, P.; VENGUST, M.; WEESE, J.S. *Clostridioides difficile* in bat guano. *Comparative Immunology Microbiology Infection Diseases*, v.65, n.1, p.144-147, 2019.

BARKETI-KLAI, A.; MONOT, M.; HOYS, S.; BORDES, S.L.; KUENE, S.A.; MINTO, N.; COLLIGNON, A.; DUPUY, B.; KANSUN, I The flagellin FlhC of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo infection. *PLoS ONE*, v.9, n.5, p.96876, 2014.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge About the Organism. *Clinical Infectious Diseases*, v.18, sup.4, p.262-272, 1994.

BARTLETT, J.G. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Annals of Internal Medicine*, v.145, n.21, p.758-764, 2006.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Veterinary Clinic of the North America: Equine Practice*, v.20, p.615-630, 2014.

BAVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary Qartely*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.

BERRY, A. P.; LEVETT, P. N. Chronic diarrhea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *The Veterinary Record*, v.118, n.4, p.102–3, 25, 1986.

BLASI, F.; LOVITO, C.; ALBINI, E.; BANO, L.; DALMONTE, G.; DRIGO, I.; MARESCA, C.; MASSACCO, F.R.; ORSINI, S.; PRIMAVILLA, S.; SCOCCI, E.; TOFANI, S.; FORTE, C.; MAGISTRALI, C.H. *Clostridioides difficile* in Calves in Central Italy: Prevalence, Molecular Typing, Antimicrobial Susceptibility and Association with Antibiotic Administration. *Animals*, v.11, n.2, p.1-15, 2021.

BONDO, K.J.; PÉROLA, D.L.; REID-SMITH, R.J.; PARMELEY, E.J.; WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; TABOADA, E.; MUTSCHALL, S.; JARDINE, C.M. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, and anti-microbial resistant *Escherichia coli* in the faeces of sympatric meso-mammals in southern Ontario, Canada. *Zoonoses and Public Health*, v.66, n.4, p.406-416, 2019.

BRAGA, D.S.; OLIVEIRA, D.F.; LOURANÇO, N.V.; CARVALHO, G.M.; REZENDE, V.M.L.R.; LOURENÇO, T.V.; SILVA, R.O.S.; KUIJPER, E.J.; VILELA, E.G. Incidence of healthcare-associated *Clostridioides difficile* infection in a quaternary referral university hospital in Brazil. *Anaerobe*, v.79, n.2, p.1-3, 2023.

BREITFELD, D.M.; RATHMANN, C.; RIEDEL, T.; JUST, I.; GERHARD, R.; OVERMANN, J.; BRUSER, T. Evidence for an Adaptation of a Phage-Derived

Holin/Endolysin System to Toxin Transport in *Clostridioides difficile*. *Frontiers in Microbiology*, v.9, n.1, p.2446-2459, 2018.

BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, v.146, n.6, p.547–553, 2014.

BUDDLE, J.E.; FAGAN R.P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, v.14, n.1, p.1-25, 2023.

BUSCH, K.; SUCHODOLSKI, J.S.; KUHNER, K.A.; MINAMOTO, Y.; MULLER, R.S.; HARTMANN, K.; UNTERER, S. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dog. *Veterinary Records*, v.173, n.253, p.1-5, 2015.

CARVALHO, G.M.; RAMOS, C.P.; LOBATO, F.C.F.; GUEDES, R.M.C.; GIARETTA, P.R.; SILVA, R.O.S. Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. *Anaerobe*, v.75, n.1, p.1-5, 2022.

CARVALHO, G.M.; SILVA, B.A.; XAVIER, R.G.C.; ZANON, I.P.; VILELA, E.G., NICOLINO, R.M.; TAVARES, G.C.; SILVA, R.O.S. Evaluation of disk diffusion method for testing the rifampicin, erythromycin, and tetracycline susceptibility of *Clostridioides (prev. Clostridium) difficile*. *Anaerobe*, v. 80, n. 4, p. 1-10, 2023.

CAVE, N.J.; MARKS, S.L.; KASS, P.H.; MELLI, A.C.; BROPHY, M.A. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.221, n.1, p.52-59, 2002.

CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D.B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. The role of toxin in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Review*, v.41, n.6, p.723-750, 2017.

CHAVES-OLARTE, E.; FREER, P.L.; NORLIN, T.; WEIDMANN, M.; STREIBER, C.V.; THELESTAM, M. A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.16, n.274, p.11046-11052, 1999.

CLOOTEN, J.; KRUTH, S.; ARROYO, L.; WEESE, J.S. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Veterinary Microbiology*, v.129, n.2, p.209-214, 2008.

COLLEEN, K.; FISCHER, M.; ALLEGRETTI, J.; LaPLANTE, L.; STEWART, D.; LIMKETKAI, N.B.; STOLLMAN, N.H. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. *The American Journal of Gastroenterology*, v.116, n.6, p.1124-11-47, 2021.

CROBACH, M.J.; VERNON, J.J.; LOO, V.G.; KONG, L.Y.; PÉCHINÉ, S.; WILCOX, M.H.; KUIJPER, E.J. Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clinical Microbiology Reveviw*, v.31, n.2, p.1-87, 2018.

CZEPIEL, J.; DRÓZDZ, M.; PITUCH, H.; KUIJPER, E.J.; PERUCKI, W.; MIELIMONKA, A.; GOLDMAN, S.; WULTÁNSKA, D.; GARLICKI, A.; BIESIADA, G. *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infections diseases*, v.38, n.7, p.1211-1221, 2019.

DABARD, J.; DUBOS, F.; MARTINET, L.; DUCLUZEAU, R. Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infection and Immunity*, v.24, n.1, p.7–11, 1979.

DEAKIN, L.J.; CLARE, S.; FAGAN, R.P.; DAWSON, L.F.; PICKARD, D.J.; WEST, M.R.; WREN, B.W.; FAIRWEATHER, N.F.F.; DOUGAN, F.; LAWLEY, T.D. The *Clostridium difficile* *spo0A* Gene Is a Persistence and Transmission Factor. *Infection and Immunity*, v.80, n.8, p. 2704-2701, 2012.

DELMÈE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology Infecections*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

DESAI, K.; GUPTA, S.B.; DUBBERKE, E.R.; PRABHU, V.S.; BROWNE, C.; MAST, T.C. Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States: estimates from a modeling approach. *BMC Infectious Diseases*, v.303, n.1, p.1-5, 2017.

DILNESSA, T. GETANEH, A.; HALIU, W.; MOGES, F.; GELAW, B. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized

diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis. *Plos One*, v.17, n.1, p.1-15, 2022.

DINGLE, T.C.; MULVEY, G.L.; ARMSTRONG, G.D. Mutagenic Analysis of the *Clostridium difficile* Flagellar Proteins, FliC and FliD, and Their Contribution to Virulence in Hamsters. *Infection and Immunity*, v.79, n.10, p.4061-4067, 2011.

DOOSTI, A.; FARSANI, A.M. Study of the frequency of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB* genes in feces of Calves in south west of Iran. *Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials*, v.5, n.1, p.13-21, 2014.

DRIGO, I.; MAZZOLINI, E.; BACCHIN, C.; TONON, E.; PIUATTI, C.; BANO, L.; SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; AGNOLETTI, F. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Veterinary Microbiology*, v.181, n.31, p.3-4, 2015.

DRIKS, A.; EICHENBERG, P. The spore coat. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, v.15, n.3, p. 124-176, 2015.

ELLIOTT, B.; ANDROGA, G.O.; KNIGHT, R.; RIELY, T.V. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infections, Genetics and Evolution*, v.49, n.1, p.1-11, 2017.

FERNANDEZ, F.A.S.; GALLIEZ, M.; LEITE, MS.; QUEIROZ, T.L.; PALMERIM, A.F. natural history of the water opossum *Chironectes minimus*: a review. *Oecologia Australis*, v.19, n.1, p.47-62, 2015.

FEUERSTADT, P.; BOULES, M.; STONG, L.; DAHDAL, D.N.; SACKS, N.C.; LANG, K.; NELSON, W.W. Clinical complications in patients with primary and recurrent *Clostridioides difficile* infection: A real-world data analysis. *Sage Open Medicine*, v.8, n.1, p.1-8, 2021.

FINSTERWALDER, S.K.; LONCARICO, I.; CABAL, A.; SXOSTAK, M.P.; BARF, L.M.; MARZ, M.; ALLEBERG, F.; BURGNER, I.A.; TICHY, A.; SCHWARTZ, S.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; RUPPITSCH, W.; SPERFGSER, J.; KUNZEL, F. Dogs as carriers of virulent and resistant genotypes of *Clostridioides difficile*. *Zoonoses Public Health*, v.69, n.8, p.673-681, 2022.

FROST, L.R.; CHENG, J.K.J.; UNNIKRISHNAN, M. *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut?. *Plos Pathogens*, v.17, n.3, p. 1-10, 2021.

FUJII, E.U.; NIWA, H.; SENOH, M.; KATO, H.; KINOSHITA, Y.; MITA, H.; UENO, Y. *Clostridioides difficile* infection in thoroughbred horses in Japan from 2010 to 2021. *Scientific reports*, v.13, n.13099, p.1-8, 2023.

FURNESS, L.E.; CAMPEBELL, A.; ZHANG, L.; GAZE, W.H.; McDONALD, R.A. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Enviromental Research*, v.154, n.1, p.28-34, 2017.

GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; RUPINIK, M.; AKTORIES, K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, v.5, n.1, p.15–27, 2014.

GERDING, D.N.; KELLY, C.P.; RAHAV, G.; LEE, C.; DUBBERKE, E.R.; KUMAR, P.N.; YACYSHYN, B.; KAO, D.; EVES, K.; ELLISON, M.C.; HANSON, M.E.; GURIS, D.; DORR, M.B. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection in Patients at Increased Risk for Recurrence. *Clinical Infectious Diseases*, v.67, n.5, p.649-656, 2018.

GERMANI, Y.; MORILLON, M.; BEGAUD, E.; DOBOURDIEU, H.; COSTA, R.; THEVENON, J. Two-year study of endemic enteric pathogens associated with acute diarrhea in New Caledonia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.6, p.1532-1536, 1994.

GIL, F.; LAGOS-MORANGA, S.; CÁLDERON-ROMERO, P.; PIZARRO-GUAJARDO, M. Updates on *Clostridium difficile* spore biology. *Anaerobe*, v.45, p.3–9, 2017.

GOHARI, I.M.; ARROYO, L.; MACLNNES, J.I.; TIMONEY, J.F.; PARREIRA, V.R. Characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of adult horses and foals with acute enterocolitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.78, n.1, p.1-7, 2014.

GOMEZ, D.E.; ARROYO, L.G.; COSTA, M.C.; VIEL, L.; WEESE, J.S. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Nedicine*, v.31, n.3, p.928-939, 2017.

GONÇALVES, C.; DECRÉ, D.; BARBUT, F.; BURGHIFER, B.; PETIT, J.C. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP ribosyl transferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.5, p.1933-1939, 2004.

GOVIND, R. FITZWATER, L.; NICHOLS, R. Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion. *Journal Bacteriology*, v.197, p.2600-2609, 2015.

GREEN, R.H. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. *Yale Journal Biologic Medicine*, v.47, n.1, p.166-181, 1974.

GRZEŚKOWIAK, Ł.; DADI, T.H.; ZENTEK, J.; VAHJEN, W. Developing Gut Microbiota Exerts Colonisation Resistance to *Clostridium* (syn. *Clostridioides*) *difficile* in Piglets. *Microorganisms*, v.7, n.218, p.1-11, 2019.

GRZEŚKOWIAK, L.; SALIU, E.M.; WESSELS, A.G.; MARTÍNEZ-VALLESPÍN, B.; MÄNNER, K.; CERÓN, J.J.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. *Clostridioides difficile*-mesocolonico edema in neonatal suckling piglets develops regardless of the fibre composition in sow's diets. *Animals*, v.17, n.2, p.1-12, 2023.

GRZESKOWIAK, L.; VALLESPÍN, B.M.; DADI, T.H.; RADLOFH, J.; AMASHEH, S.; HEINSEN, F.A.; FRANCO, A.; REINERT, K.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Formula Feeding Predisposes Neonatal Piglets to *Clostridium difficile* Gut Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v.219, n.9, p.1-9, 2018.

GUERRANT, R. L.; STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; BOBAK, D. A. How intestinal bacteria cause disease. *The Journal of Infection Diseases*, v.179, 331-337, 1999.

GUERY, B.; GALPERINE, T.; BARBUT, F. *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments. *Clinical Revivew*, v.366, n.1, p.1-18, 2019.

GUPTA A, KHANNA S. Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat. *Infection Drug Resistance*, v.7, n.1, p.63-72, 2014.

GÜRTLER, V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *Journal Genetical Microbiology*, v.139, n.12, p.3089-3097, 1993.

HA, D.; TSAI, C.J. Pneumatosis intestinalis in a patient with recurrent *Clostridium difficile* infection. *BMJ Case Report*, p.1-4, 2012.

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.

HALL, I.C.; O'TOOLE, E.; WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, *BACILLUS DIFFICILIS*. *American Journal of Diseases Children*, v.42, n.2, p. 390–402, 1935.

HAMMIT, M.C.; BUESCHEL D.M.; KEEL, M.V.; GLOCK, R.D.; CUNEO, P.; YOUNG, D.W.; REGGIARDO, C.; TRINH, H.T.; SONGES, J.G. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Veterinary Microbiology*, v.127, n.3, p.343-352, 2008.

HENSGENS, M. P. M.; KEESSEN, E.C.; SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V.; KOENE, M.G.; BOER, E.; LIPMAN, L.J.A.; KUIJPER, E.J.; *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v.18, n.7, p.635–645, 2012.

HIMSWORTH, C.G.; PATRICK, D.M.; MAK, S.; JARDINE, C.M.; WEESE, J.C. Carriage of *Clostridium difficile* by Wild Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*) and Black Rats (*Rattus rattus*). *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, n.4, p.1299-1305, 2014.

HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World JOURNAL Gastroenterology*, v.15, n.13, p.1554-80, 2009.

HOPMAN, N.E.M.; KEESSEN, E.C.; HARMANUS, C.; SANDRES, I.M.; LEENGOED, A.M.G.; KUIJPER, E.J.; LIPMAN, L.J.A. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, v.149, n.1-2, p.186-192, 2011.

HRYPKOWIAN, A.J.; PRUSS, K.M.; SONNENBURG, J.L. The emerging metabolic view of *Clostridium difficile* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v.35, n.1, p.42-47, 2017.

INIZ, A.M.; MOURA, L.N.F.; CRUZ, D.S.G.; OLIVEIRA JÚNIOR, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CUNHA, J.L.C., VILELA, E.G.; KUIJPER, E.J., WILCOX, M.H.; LOBATO, F.C.; SILVA, R.O.S. Characterization of the virulence of three novel clades 2 *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains and a two-year screening in animals and humans in Brazil. *Plos One*, v.17, n.8. p.1-13, 2022.

IZQUIERDO-RODRIGUEZ, E.; CARRILO, N.M.; VALLADARES, B.; FORONDA, P. Study of Zoonotic Enteric Pathogens of *Atelerix algirus* in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Frontiers Veterinary Science*, v.8, n.1, p.1-4, 2020.

JACOBS, A.; BARNARD, K.; FISHEL, R.; GRANDON, J.D. Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections: Presentation of 2 cases and review of the literature. *Medicine*, v.80, n.1, p.88-101, 2001.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, v.37, n.1, p.13-24, 2016.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, v.37, p.13–24, 2016.

JARDINE, C. M.; REID-SMITH, R.J.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild infection. *Journal of Clinical Pathology*, v.36, n.1, p.84–87, 1983.

JARDINE, C.M.; REID-SMITH, R.J.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Detection of *Clostridium difficile* in Small and Medium sized Wild Mammals in Southern Ontario, Canada. *BioOne*, v.49, n.2, p.418-421, 2013.

JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E.; ZUKOWSKI, W.E.; SONGER, G.; WARNY, M.; JOHNSON, S.; GERDING, D.N.; McDONALD, L.C.; LIMBAGO, B.M. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infection Diseases*, v.14, n.7, p.1039- 45, 2008.

JONES, G. F.; WARD, G.E; MURTAUGH, M. P.; LIN, G.; GEBHART, C. J. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.31, n.10, p.2611-2615, 1993.

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 Clinical Microbiology*, v.25, n.7, p.1225-1227, 1987.

KATO, N.; OU, C. Y.; KATO, H.; BARTLEY, S. L.; BROWN V. K.; DOWELL Jr, V. R.; UENO, K. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.29, p.33-37, 1991.

KEESSEN, E. C.; HARMANUS, C.; DOHMEN, C.; KUIJPER, E.; LIPMAN, L.J.A. *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, n.6, p.1032–1034, 2013.

KHANNA, S.; SIMS, M.; LOUIE, T.J.; FISCHER, M.; LaPLANTE, K., ALLEGRETTI, J.; HASSON, B.R.; FONTE, A.T.; McCHALICHER, C.; EGE, D.S.; BRYANT, B.R.; STRAUB, T.J.; FORD, C.B.; HENN, M.R.; WANG, E.E.L. MOLTKE, L.V. WILCOX, M.H. SER-109: An Oral Investigational Microbiome Therapeutic for Patients with Recurrent *Clostridioides difficile* Infection (rCDI). *Antibiotics*, v.11, n.9, p.1234-1245, 2022.

KING, A.M.; MACKIN, K.E.; LYRAS, D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. *Future Microbiology*, v.1, n.10, p.1–4, 2015

KNIGHT, D.R.; RILEY, T.V. Prevalence of gastrointestinal *Clostridium difficile* carriage in Australian sheep and lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, v.79, n.18, p.5689-5692, 2013.

KNIGHT, D.R.; SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V. Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.52, n.11, p.3856–62, 2014.

KNIGHT, D.R.; THEAN, S.; PUTSATHIT, P.; FENWICK, S. RILEY, T.V. Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. *Applied and environmental microbiology*, v.79, n.8, p.2630-2635, 2013.

KOCIOLEK, L.K.; GERDING, D.N. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, v.13, n.1, p.150-160, 2016.

KOENIGSKNECHT, M.J.; THERIOT, C.M.; BERGIN, I.L.; SCHUMACHER, C.A.; SCHLOSS, P.D.; YOUNG, V.B. Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, v.83, n.3, p.934–941, 2015.

KORDDUS, S.L.; THOMAS, A.K.; LACY, D.B. *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, v.20, n.1, p.285-298, 2022.

KREISS, C.; FOROHAR, F.; SMITHLINE, A.E.; BRANDT, L.J. Pneumatosis intestinalis complicating *C. difficile* pseudomembranous colitis. *American Journal Gastroenterology*, v.97, n.4, p.2560-2561, 1999.

KRIJGER, I.M.; MEERBURG, B.G.; BURT, S.A. *Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands. *Letters in Applied Microbiology*, v.96, n.1, p.35-40, 2019.

KYNE, L.; WARNY, M.; QAMAR A.; KELLY, C.P. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*, v.357, n.1, p.189–193, 2007.

LAWSON, P.; CITRON D.M.; TYRREL K.L.; FINEGOLD, S.M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, v.40, n.7, p.95-99, 2016.

LAWSON, P.A.; CITRON, D.M.; TYRREL, 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.

LICCIARDI, C.; PRIMAVILLA, S.; ROILA, R.; LUPATTELLI, A.; FARNETI, S.; BLASI, G.; PETRUZZELLI, A.; DRIGO, I.; MARROCCHI, E.D. Prevalence, Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridioides difficile* isolated from pig carcasses and pork products in Central Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.18, n.21, p.1-10, 2021.

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.

LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infection and Immunity*, v.56, n.3, p. 582-588, 1988.

LOO, V.G.; BRASSARD, P.; MILLER, M.A. Household transmission of *Clostridium difficile* to family members and domestic pets. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v.37, n.11, p.1342–1348, 2016.

LOUIE, T.J.; MILLER, M.A.; MULLANE, K.M.; WEISS, K.; LENTNEK, A.; GOLAN, Y.; GORBACH, S.; SEARS, P.; SHUE, Y.K. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *The New England Journal of Medicine*, v.364, n.4, p.422-431, 2011.

LUNA, A.J.G.; CARLSON, T.J.; GAREY, K.W. Gut microbiota changes associated with *Clostridioides difficile* infection and its various treatment strategies. *Gut Microbes*, v.15, n.1, p.1-11, 2023.

LYERLY, D.M.; NEVILLE, L.M.; EVANS, D.T. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.1, p.184-190, 1998.

MAESTRI, A.C.; NOGUEIRA, K.S.; MIALSKI, R.; SANTOS, E.M.; KRAFT, L. RABONI, S.M. Laboratory diagnosis of *Clostridioides difficile* infection in symptomatic patients: what can we do better?. *Clinical Microbiology*, v.54, n.1, p.849-857, 2023.

MAGDESIAN, K.G.; BARNUM, S.; PUSTERLA, N. Fecal PCR testing for detection of *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* toxin genes and other pathogens in foals with diarrhea: 28 cases. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.34, n.3, p.396-401, 2022.

MAGISTRALI, C.F.; MARESCA, C.; CUCCU, L.; BANO, L.; DRIGO, I.; FILIPPINI, G.; DETTORI, A.; BROCCATELLI, S.; PEZZOTI, G. Prevalence and risk factors associated with *Clostridium difficile* shedding in veal calves in Italy. *Anaerobe*, v.33, n.1, p.42-47, 2015.

MARKS, S.L.; RANKIN, S.C.; BYRNE, B.A.; WEESE, J.S. Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.25, n.6, p.1195-1208, 2011.

MARTIN, J.S.H.; MONAGHAN, T.M.; WILCOX, M.H. *Clostridium difficile* infection: mammals in Southern Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, v.49, n.2, p.418–421, 2013.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A.; CAMACHO-ORTIZ, A.; MORFIN-OTERO, R.; JÉSUS, H.; TREVINO, L.V.; GONZALEZ, E.G. Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *World Journal of Gastroenterology*, v.23, n.9, p.1552–1567, 2017.

MARTIROSSIAN G.; SOKOŁ-LESZCZYŃSKA B, MIERZEJEWSKI J. Occurrence of *Clostridium difficile* in the digestive system of dogs. *Medycyna Doswiadczalna I Microbiologia*, v.44, p.49–54, 1992.

MASARIKOVA, M.; SIMKOVA, I.; PLESKO, M.; ERETOVA, V.; KRUTOVA, M.; CIZEK, A. 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*, v.8, n.6, p.1-9, 2020.

MASLENNIKOV, R.; IVASHKIN, V.; UFTIMTSEVA, A.; POLUEKTOVA, E.; ULYANIN, A. *Clostridioides difficile* co-infection in patients with COVID-19. *Future Microbiology*, p.1-11, 2022

MATAMOURUS, S.; ENGLAND, P.; DUPUY, B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Molecular Microbiology*, v.64, n.5, p.1274-1288, 2007.

McDONALD, L.C.; GERDING, D.N.; JOHNSON, S.; BAKKEN, J.S.; CARROLS, K.C.; COFFIN, S.E.; DURBERKE, E.R.; GAREY, K.W.; GOULD, C.V.; KELLY, C.; LOO, V.; SAMMONS, J.K.; SANDORA, T.S.; WILCOX, M.H. 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. 1–48, 2018.

MINKOFF, N.Z.; ASLAM, S.; MEDINA, M.; SMITH, E.E.T.; ZACKULAR, J.P.; ACRA, S.; NICHOLSON, M.R.; IMDAD, A. Fecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*). *The Cochrane Database of systematic Reviews*, v.25, n.4, p.1-15, 2023.

MULLIGAN, M.E. Epidemiology of *Clostridium difficile*-induced intestinal disease. *Reviews of Infectious Diseases*, v.6, n.1, p. 222-228, 1984.

NAMURA, M.; KURODA, T.; 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.14-14, 2020.

NATARAJAN, M.; WALK, S.T.; YOUNG, V.B.; ARONOFF, D.M. A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, v.22, n.734, p.1–5, 2013.

OKAFOR C.M. CLOGHER, P.; OLSON, D.; NICCOLAI, L. HADLER, J. Trends in and Risk Factors for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection, New Haven County, Connecticut, USA, 2015–2020. *Emerging Infectious Diseases*, v.29, n.5, p.877-887, 2023.

OLAITAN, A.O.; DUREJA, C.; YOUNGBLOM, M.A.; TOPF, M.A.; SHEN, W.J.; LUNA, A.J.G.; DESPANDE, A.; HEVENER, K.E.; FREEMAN J.; WILCOX, M.H.; PALMER, K.L. GAREY, K.W.; PEPPERELL, C.T.; HURDLE, J.G. Decoding a

cryptic mechanism of metronidazole resistance among globally disseminated fluoroquinolone-resistant *Clostridioides difficile*. *Nature communications*, v.14, n.4130, p.1-15, 2022.

OREN, A.; GARRITY, G.M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.66, n.9, p.3761–3764, 2016.

ORREL, K.E.; MELNYK, R.A. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.85, n.3, p.1-30, 2021.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J.A. *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, v.22, n.7, p.406–416, 2014.

PENG, Z., LING, L.; STRATTON, C.W., LI, C.; POLAGE, C.R.; WU, B.; TANG, Y. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerging Microbes & Infections*, v.7, n.7, p.1-15, 2018.

PENICHE, A.G.; SAVIDGE, T.C.; DANN, S. Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. *Infectious Diseases*, v.26, n.5, p.447-453, 2013.

PEPIN, J.; VALIQUETTE, L.; COSSETE, B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *Canadian Medical Association Journal*, v.173, n.9, p.1037-1042, 2005.

PLANCHE, T.; AGHAIZU, A.; HOLLIMAN, R.; RILEY, P.; POLONIECKI, I.; BREATNACH, A.; KRISHNA, S. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases*, v.8, n.12, p.777–84, 2008.

POPHAM, D.L.; BERNHARDS C.B.; Spore peptidoglycan. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, v.15, n.3, p. 157-177, 2015.

PREVOT, A.R. Études de Systématique Bactérienne IV: Critique de La Conception Actuelle du gene *Clostridium*. *Annales de l'Institut Pasteur: Journal de Microbiologie/publiées sous le patronage*, v.61, n.7, p.72-92, 1938.

RABOLD, D.; ESPELAGE, W.; ABU, S.I.N.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.1-8, 2018.

RAMOS, C.P.; DINIZ, A.N.; LEITE, S.M.; LOBATO, F.C.F.; PEREIRA, S.T.; RENNÓ, M.C.; FERREIRA, E.O.; SILVA, R.O.S. Evaluation of an immunochromatographic test for the detection of glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in dogs. *Veterinary Microbiology*, v.52, n.1, p.2555-2558, 2021.

RAMOS, C.P.; LOPES, E.O.; OLIVEIRA JÚNIOR, C.A.; DINIZ, A.N.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. 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*, v.51, n.1, p.1459–1462, 2020.

RAMOS, C.P.; SANTANA, J.A.; COURA, F.M.; 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. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella Spp.*, *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. *Biomedical Research Internal*, p.1-9, 2019.

RAMSOM, E.M.; KAUS, G.M.; TRAN, P.M.; ELLERMEIER, C.D.; WEISS, D.S. Multiple factors contribute to bimodal toxin gene expression in *Clostridioides (Clostridium) difficile*. *Molecular Microbiology*, v.110, n.4, p.533-549, 2018.

REDDING, L.; HUANG, E.; RYAVE, J.; WEBB, T.; BARNHART, D.; BAKER, L.; BENDER, J.; KRISTULA, M.; KELLY, D. *Clostridioides difficile* on dairy farms and potential risk to dairy farm workers. *Anaerobe*, n.1, v.69, p.1-5, 2021.

REDDING, L.E.; BERRY, A.S.; INDUGU, N.; HUANG, E.; BEITING, D.P. PITTA, D. Gut microbiota features associated with *Clostridioides difficile* colonization in dairy calves. *Plos One*, v.16, n.12, p.1-15, 2021.

REDDING, L.E.; HABING, G.G.; T.U.V.; BITTINGER, K.L.; O'DAY, J.; PANCHOLI, P.; WANG, S.H.; ALEXANDER, A.; KELLY, B.J.; WEESE, J.S.;

STULL, J.W. Infrequent intrahousehold transmission of *Clostridioides difficile* between pet owners and their pets. *Zoonoses Public Health*, v.70, n.4, p.341-351, 2023.

RILEY, T.V.; ADAMS, J.E.; O'NEILL, G.L.; BOWMAN, R.A. Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiology Infections*, v.107, n.3, p.659- 665, 1991.

RIZEK, C.A.; MATINS, R.C.; GIRÃO, E.S.; TAVARES, B.M.; SANTOS, S.A.; GAMARRA, G.L.; PERDIGÃO NETO, L.V.; DIOGO, C.; ORSI, T.D.; BOSZCZWKI, I.; PIASTRELI, F.; COSTA, C.L.; COSTA, D.V.; MACIEL, G.; ROMÃO, J.; BRITO, G.A.C.; COSTA, S.F. *Clostridioides difficile* from Brazilian hospitals: characterization of virulence genes by whole genome sequencing. *Microbes and Infection*, v. 24, n.5, p.1-5, 2022.

RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; BROECK, J.V.; DAUBE, G. *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.932, n.1, p.65–92, 2016.

RODRIGUEZ-PALÁCIOS, A.; STAEMPFLI, H.R.; DUFFIELD, T.; PEREGRINE, A.W.S.; TROTZ-WILLIAMS, L.A.; ARROYO, L.G.; BRAZIER, J.S.; WEESE, J.S. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, n.11, p.1730-1736, 2006.

RUBUI-MENDONZA, D.; MELÉNDEZ, A.M.; GARZA, H.J.M.; FLESTES, C.C.; GONZÁLEZ, E.G. Review of the Impact of Biofilm Formation on Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *Microorganisms*, v.11, n.10, p. 1-18, 2023.

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.

RUPNIK, M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v.13, n.5, p.457–459, 2005.

SALDANHA, G.Z.; PIRES, R.N.; RAUBER, A.P.; MORALES, D.L.; FALCI, D.R.; CAIERÃO, J.; PASQUALOTTO, A.C.; MARTINS, A.F. 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*, v.22, n.1, p.117-121, 2020.

SAMIE, A.; OBI, C.L.; FRANASIAK, J.; PANNONE, L.A.; BESSONG, P.O.; WARREN, C.A.; GUERRANT, R.L. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdtA*, *cdtB*), and *tcdC* genes in Vhembe District, South Africa. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. v.78, n.4, p.577-585, 2008.

SANTANA, J.A.; COLOMBO, S.A.; SILVA, B.A.; OLIVEIRA, L.R.A.A.; LOBATO, F.C.F.; TRINDADE, G.S.; PAGLIA, A.P. SILVA, R.O.S. *Clostridioides difficile* and multi-drug-resistant *staphylococci* in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1, p.401-410, 2022.

SCHNEEBERG, A.; RUPNIK, M.; NEUBAUER, H.; SAYBOLDT, C. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, v.18, n.5, p.484-488, 2012.

SCHNEEBERG, A.; RUPNIK, M.; NEUBAUER, H.; SAYBOLDT, C. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, v.18, n.5, p.484-488, 2012.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T.; VAN HAM, M.; ROHDE, M.; HARDT, W.D.; WEHLAND, J.; AKTORIES, K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*, v.5, p.1-10, 2009.

SHOLEH, M.; KRUTOVA, M.; FOROUZESH, M.; MIRONOV, S.; SADEGHIFARD, N.; MOLAEIPOUR, L.; MALEKI, A.; KOUHSARI, E. Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance Infection Control*, v.25, n.9, p.815-850, 2020.

SHRESTHA, R.; SORG, J. A. Hierarchical recognition of amino acid co-germinants during *Clostridioides difficile* spore germination. *Anaerobe*, v.49, p.41–47, 2018.

SILVA, R.O.S.; ALMEIDA, L.R.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; SOARES, D.F.M.; PEREIRA, P.L.L.; RUPNIK, M.; LOBATO, F.C.F. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe*, v.30, n.1, p.99-101, 2014.

SILVA, R.O.S.; D'ÉLIA, M.L.; SOARES, D.F.M.; CAVALCANTI, A.R.; LEAL, R.C.; CAVALCANTI, R.; PEREIRA, P.L.L.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, n.1, p.82-84, 2013.

SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; TEIXEIRA, E.P.T.; PEREIRA, P.L.L.; SOARES, D.F.M.; CAVALCANTI, A.R.; KOCUVAN, A.; RUPNIK, M.; SANTOS, A.L.Q.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe*, v.28, n.1, p.207-211, 2014.

SILVA, R.O.S.; DORELLA, F.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; COSTA, E.A.; PELÍCIA, V.; RIBEIRO, B.L.D.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. *Anaerobe*, v.48, n.1, p.66-69, 2017.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V.; PIRES, P.S.; MARANHÃO, R.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.1-4, 2012.

SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S.; BORGES, A.S.; MARANHÃO, R.P.A.; SILVA, M.X.; LUCAS, T.M.; OLIVO, G.; LOBATO, F.C.F. 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.

SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S.; BORGES, A.S.; MARANHÃO, R.P.A.; SILVA, M.X.; LUCAS, T.M.; OLIVIO, G.; LOBATO, F.C.F.

Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Veterinary Journal*, v.45, n.1, p.671-675, 2012.

SILVA, R.O.S.; SOARES, M.L.D.D.F.M., CAVALCANTI, A.R.; LEAL, R.C. PEREIRA, P.L.L.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, n.1, p.82-84, 2013.

SILVA, R.O.S.; VILELA, E.G.; NEVES, M.S; LOBATO, F.C.F. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.47, n.4, p.447–450, 2014.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.30, n.1, p.225–420, 1980.

SLOVIS, N.M. My horse has Salmonella – now what? In: *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, p.13-27, 2007.

SNOOK SS, CANFIELD DR, SEHGAL PK. Focal ulcerative ileocolitis with terminal thrombocytopenic purpura in juvenile cotton top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Laboratory Animal Science*, v.39, n.1, p.109–114, 1989.

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.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, v.8, n.2, p.321-326, 2004.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, v.5, n.2, p.321–326, 2004.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1–4, 2006.

SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A.D.; McDONALD, L.C.; LIMBARGO, B.M. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infection Diseases*, v.15, n.5, p.819-821, 2009.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v.17, n.6, p.528–36, 2005.

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

SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.365, n.4, p.299– 314, 2013.

STEIN, K., EGAN, S.; LYNCH, H.; HARMANUS, C.; KYNE, L.; HERRA, C.; McDERMOTT, S.; KUIJPER, E.; FITZPATRICK, F.; FITZGERALD, S.; FENELON, L.; DRUDY, D. PCR-ribotype distribution of *Clostridium difficile* in Irish pigs. *Anaerobe*, v.48, n.1, p. 237-241, 2017.

STRUBLE, A.L.; TANG, Y.J.; KASS, P.H.; GUMERLOCK, P.H.; MADEWELL, B.R.; SILVA, J. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, n.3, p.342-347, 1994.

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B.; POPOFF, M. Production of actin-specific ADP ribosyl transferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, v.186, p.307-312, 2000.

TEDESCO, F.J.; BARTON, R.W.; ALPERS, D.H. Clindamycin-associated colitis. *Annals of Internal Medicine*, v.81, n.1, p.429-435, 1974.

TERRA, D.A.A.; VILELA, E.G.; SILVA, R.O.S.; LEÃO, L.A.; LIMA, K.S.; KUIJPER, E.J.; PASSOS, R.I.F.A.; COELHO, L.G.F. Experience of the first Brazilian fecal microbiota transplantation center in treating recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Microbiota in Health and Diseases*, v. 4, n. 1-6, 2022.

THERIOT, C.M.; YOUNG, V.B. Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. *Annual Review of Microbiology*, v.69, n.1, p. 445-461, 2015.

UZAL, F.A.; NAVARRO, M.A.; ASIN, J.; BOIX, O.; RODRIGUEZ, I.B.; GIBERT, X. Clostridial diarrheas in piglets: A review. *Veterinary Microbiology*, v.280, n.5, p.1-12, 2023.

VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian Journal Medicine Microbiology*. v.27, n.4, p.289-300, 2009.

VEILLON, A. Sur un micrococque anaerobic trouve dans des suppurations fetide. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, v.45, n.1, p.807-809, 1983.

VUOTTO, C.; DONELLI, G.; BUCKLEY, A.; CHILTON, C. *Clostridium difficile* Biofilm. *Advances in Experimental Medicine Biology*, v.10, n.5, p.97-115, 2018.

WEBER, A.; KROTH, P.; HEIL, G. The occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of dogs and cats. *Zentralbl Veterinarmed*, v.36, p.568–576, 1989.

WEESE, J.S.; BIERMAN, F.S.; RUPNIK, M.; SMITH, D.A.; GROOT, P.V.C. *Clostridium (Clostridioides) difficile* shedding by polar bears (*Ursus maritimus*) in the Canadian Arctic. *Anaerobe*, v.57, n.1, p.35-38, 2019.

WEESE, J.S.; FINLEY, R.; REID-SMITH, R.R.; JANECKO, N.; ROUSSEAU, J. Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiology Infections*, v.138, n.8, p.1100-1104, 2010.

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

WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F.; KRUTH, S.A.; GREENWOOD, S.J.; WEESE, H.E. The Roles of *Clostridium difficile* and Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.15, n.4, p.374–378, 2001.

WEESE, J.S.; WEESE, H.E.; BOURDEAU, T.L.; STAEMPFLI, R.H. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *Journal American Veterinary Science Medical Association*, v.218, n.9, p.1436-1439, 2001.

WESSE, J.S. *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.32, n.2, p.213-221, 2020.

WESSE, 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.

WHITTIER, S.; SHAPIRO, D.S.; KELLY, W.F.; WALDEN T.P.; WAIE, K.J.; McMILLON, L.T.; GILLIGAN, P.H. Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. v.31, n.11, p.2861-2865, 1993.

WILLIAMS, S.H.; CHE, X.; PAULICK, A.; GUO, C.; LEE, B.; MULLER, D.; UHLEMANN, A.C.; LOWY, F.D.; CORRIGAN, R.M.; LIPKIN, W.I. New York City House Mice (*Mus musculus*) as Potential Reservoirs for Pathogenic Bacteria and Antimicrobial Resistance Determinants. *American Society for Microbiology*, v.9, n.2, p-14-18, 2018.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; GLENN SONGER, J.A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v.19, n.1, p.52–9, 2007.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; SONGER, J.G. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colo/n of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, n.1, p.52-59, 2007.

YANG, J.J.; NAM, Y.S.; KIM, M.J.; CHO, S.Y.; YOU, E.; SOH, Y.S.; LEE, H.J. Evaluation of a chromogenic culture medium for the detection of *Clostridium difficile*. *Yonsei Medical Journal*, v.55, n.4, p.994–8, 2014.

ZENG, J.; WANG, H.; DONG, M.; TIAN, G.B. *Clostridioides difficile* spore: coat assembly and formation. *Emerging Microbes & Infections*, v.1, n.1, p.2340-2349, 2022.

ZHANG, W.Z.; LI, W.G.; LIU, Y.Q.; GU, W.P.; LI, H.; LIU, Z.H.; ZHANG, X.; WU, Y.; LU, J.X. The molecular characters and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* from economic animals in China. *BMC Microbiology*, v.20, n.70, p.1-7, 2020.

ZHONG, S.; YANG, J.; HUANG, H. The role of single and mixed biofilms in *Clostridioides difficile* infection and strategies for prevention and inhibition. *Critical Reviews in Microbiology*, v.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, n.29, p.1-13, 2018.

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, n.2, p.1–10, 2018.

ZHU, D.; SORG, J.A.; SUN, X. *Clostridioides difficile* Biology: Sporulation, Germination, and Corresponding Therapies for *C. difficile* Infection. *Fronteirs in Cellular and Infection Microbiology*, v.8, n.2, p.28-29, 2018.

ZLENDER, T.; GOLOB, Z.; RUPNIK, M. Low *Clostridioides difficile* positivity rate in wild animal shelter in Slovenia. *Anaerobe*, v.77, n.12, p.102643, 2022.

Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de *Clostridioides difficile* em bezerros no estado de São Paulo, Brasil.

Objetivos Específicos

Determinar o perfil dos genes codificadores de toxinas das cepas de *C. difficile* isoladas de bezerros.

Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das cepas toxigênicas de *C. difficile* isoladas de bezerros.

Determinar os ribotipos das cepas toxigênicas de *C. difficile* isoladas de bezerros.

Determinar o MLST e presença de genes de resistência a antimicrobianos das cepas toxigênicas de *C. difficile* isoladas de bezerros.

Capítulo 2

Trabalho Científico

Trabalho 1: formatado de acordo com as normas da revista Journal of Veterinary Diagnostic Investigation no formato artigo completo (<https://journals.sagepub.com/author-instructions/VDI>).

Fecal Shedding of *Clostridioides difficile* in Calves in São Paulo state Brazil

Fabício M. Cerri^a, Roberta M. Basso^a, Wanderson P. Biscola^a, Júlia M. Silva^b, Eliane O. Ferreira^b, Amanda Haisi^c, João P. Araújo Júnior^c, Luis G. Arroyo^d, Yasmin G. Castro^e Rodrigo O.S. Silva^e, José P. de Oliveira-Filho^a, Alexandre S. Borges^{a1}

^a Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Botucatu, São Paulo, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Departamento de Microbiologia Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, Rio Janeiro, Brasil.

^c Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Botucatu, São Paulo, Brasil.

^d University of Guelph, Ontario Veterinary College, Department of Clinical Studies, Guelph, Ontario, Canada.

^e "Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), School of Veterinary Medicine (EV), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author: Alexandre S. Borges, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Professor Doctor Walter Mauricio Correa Street, No. - Unesp Campus of Botucatu, Botucatu, São Paulo 18618-681, Brasil. (email: alexandre.s.borges@unesp.br)

Abstract

Clostridioides difficile is one of the most important cause of diarrhea in hospitalized human patients, recognized as *C. difficile* infection (CDI). In calves, its role as a diarrhea-causing agent and epidemiological factors are not fully understood. In addition to the significance of *C. difficile* as an enteropathogen in some species, studies have suggested that animals may serve as a source of toxigenic strains for humans. The aim of this study was to evaluate the fecal shedding of *C. difficile* in calves. Fecal samples (n=300) were collected from diarrheic (n=78) and non-diarrheic calves =222, less than 60 days of age, from 20 farms. Fecal samples were inoculated into enrichment broth supplemented with taurocholate and cultured under anaerobic conditions. Colonies suspected to be *C. difficile* were harvest for DNA extraction, and then multiplex PCR for the detection of genes encoding toxins A, B, and binary toxin. All toxigenic isolates were ribotyped and tested for antimicrobial susceptibility, and five selected strains were also subjected to whole genome sequencing to determine the sequence type. *C. difficile* was isolated from 29.3% (88/300) samples. All toxigenic isolates (17/88, 19.3%) were classified as ribotypes RT046 (13/17 -79.47%, all A⁺B⁺ CDT⁻) and RT126 (4/17=20.53%, all A⁺B⁺ CDT⁺). Sequenced strains from RT046 were classified into ST35(Clade 1), while RT126 were ST11 (Clade 5). No association between epidemiological factors for each group and the isolation of *C. difficile* were observed. Most of the toxigenic isolates (16/17=94.41%) were classified as multidrug resistant. Calves can be an important source of toxigenic *C. difficile* strains, including multidrug resistant isolates from ribotypes commonly observed in humans.

Keywords: cattle, diarrhea, RT126, ST35, MLST.

Introduction

Clostridioides difficile is an anaerobic gram-positive bacillus capable of forming endospores, consequently exhibiting high resistance in the environment (Buddle & Fagan, 2023). *C. difficile* infection (CDI) is a major cause of diarrhea in hospitalized humans, but cases without previous hospitalization (community-acquired infection) seem to be growing (Goorhuis et al. 2008; Keessen et al. 2013; Ogielska et al. 2015; Li et al. 2018). In humans, antimicrobial use and hospitalization are strongly associated with the occurrence of CDI, but the use of corticosteroid therapy and drugs that inhibit gastric acid production have been also suggested as relevant risk factors (Anjewierden et al. 2020; Cataldo et al. 2021).

C. difficile is recognized as an enteropathogen in horses (both foals and adults) (Silva et al. 2012; Lee et al. 2023), piglets (Yaeger & Kinyon & Songer, 2007; Grzeskowiak et al. 2023), and in some wild animals (Bojesen et al. 2006; Yamazaki et al. 2017; Carvalho et al. 2022; Silva et al. 2017). In addition to the importance of *C. difficile* as pathogen in animals, it had been hypothesized that animals can act as a reservoir of toxigenic strains to humans, including multidrug resistant isolates. This complex epidemiology emphasizes the need of a One Health approach to control this disease (Knetsch et al. 2018; Knight et al., 2019).

Despite the importance of *C. difficile* in animals, there are very few studies on calves. So far, studies have suggested that cattle can harbor *C. difficile*, including antimicrobial resistance strains (Redding et al. 2021; Redding et al. 2022). The main ribotypes of *C. difficile* shed by calves and whether this microorganism can cause diarrhea in these animals remains uncertain. The objective of this study was to describe the fecal prevalence, ribotypes and susceptibility profile of *C. difficile* strains isolated from calves.

Materials and methods

Animals and sampling

Fecal samples were collected in January and February 2023 from lactating calves (Figure 1) kept either in intensive or extensive production systems, from 20 farms across 9 municipalities in São Paulo state (Figure 2) (Supplementary table 1). Fecal samples were collected directly from the rectal ampulla of 300 calves (with and without diarrhea). The sample size was calculated considering the population of 500,000 calves in São Paulo State (IBGE, 2023). A frequency of *C. difficile* in fecal samples in calves from previous studies was used: from 7.6% to 17.6%, with a confidence level of 95% (Palacios et al. 2006; Scheneberg et al. 2013). The number of properties to be included in the present study is based on previous research (Bandelj et al. 2016; 2018; Masarikova et al. 2020; Redding et al. 2021; Spigaglia et al. 2023). Diarrhea was defined as calves that showed changes in fecal consistency (liquid), color (green, red, gray, and yellow), and an increased frequency of defecation (Larson et al. 1977). The study was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Universidade Estadual Paulista (Protocol CEUA 0215/2022).

Epidemiological data

Data collected included signalment (date of birth, age, sex and breed), calf and farm management/husbandry practices (production system, rearing method, feeding practices, causes of calf mortality, and neonatal calf handling, disease history, and medication use), fecal characteristics (color, consistency, and odor), and property (total cattle count, location,). The

farms were graded into levels of management/husbandry practice (low, medium, and high) based on the level of hygiene, zootechnical practices, and sanitary management.

Isolation, identification, and molecular characterization of *Clostridioides difficile*.

Bacterial isolation was performed as previously described (Arroyo et al., 2004). Briefly, 250 mg of feces were inoculated into nonselective fructose broth (Oxoid) supplemented with 0.1% sodium taurocholate (Thermo Scientific). After incubation at 37°C for eight days, 2 mL of the broth was transferred into a fresh tube and mixed with an equal amount of absolute ethanol (alcohol shocked) as previously described, and then centrifuged at 4.000 g for 30 minutes (Arroyo et al., 2004). The resulting pellets were plated onto *C. difficile* moxalactam norfloxacin agar (CDMN) (Oxoid) and incubated for 5 days under anaerobic conditions (10% CO₂, 5% H₂, and 85% N₂; Whitley A25 Workstation, Don Whitley Scientific). Colonies exhibiting characteristic *C. difficile* morphology and odor were tested for enzymatic hydrolysis of L-proline-naphthylamide (Prodisc Hardy Diagnostics) and MALDI-ToF (MALDI Biotyper System Bruker Daltonics) for further identification. Bacterial DNA was extracted from *C. difficile* colonies using the InstaGene kit (Bio-Rad Laboratories). A multiplex PCR was performed to identify the following genes: *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* (Persson et al. 2012), and isolates positive for *tcdA* and/or *tcdB* were considered toxigenic.

For ribotyping, the samples underwent conventional PCR for the amplification of rRNA (16S and 23S) from the intergenic spacer region (Bidet et al. 1999). The primers were adapted as described by Fawley et al. (2015). The amplified fragments were subjected to capillary

electrophoresis and screened against a database (WEBRIBO-<https://webribo.ages.at/>) to determine the ribotypes (RTs) (Fawley et al. 2015).

The isolates were cultured on Mueller–Hinton agar supplemented with 5% equine blood and 0.1% taurocholate (Sigma) and incubated for 24h in an anaerobic chamber (Thermo Fisher Scientific) in an anaerobic atmosphere (10% H₂, 10% CO₂, and 80% N₂) at 37°C for 48h. Then colonies were harvest and were suspended in 0.85% saline solution to 0.5 or 1.0 McFarland density and plated using a cotton swab onto Brucella blood agar (Oxoid) supplemented with vitamin K (Sigma-Aldrich Co.,) and hemin (Difco Laboratories,) previously kept at anaerobic atmosphere for 24h (CLSI, 2021). The following antimicrobials were tested by disk diffusion method: erythromycin, rifampicin, tetracycline, metronidazole, moxifloxacin, vancomycin (Wong et al. 1999; Carvalho et al. 2023). All resistant isolates were confirmed by epsilometer test (E-TEST®). The plates were incubated in an anaerobic atmosphere in an anaerobic chamber (Thermo Fisher as recommended by the manufactures Scientific, USA) for 48 h. The reference strains *S. aureus* ATCC® 29213TM and *B. fragilis* ATCC® 25285TM were used for quality control purposes. Isolates resistant to at least one antibiotic in three or more drug classes were considered multidrug resistant (Mellata, 2013; CDC, 2019).

The isolates were also subjected to a motility test as previously described (Li et al. 2018). Briefly, a single colony was inoculated in the central region of the plate (37 g/L BHI broth medium, 0.3% agar [w/v] BD Biosciences) and maintained under the anaerobic conditions described earlier for 72h. The test was performed in triplicate for each sample. The motility zone (in millimeters) was measured at three time points (0-24h, 48h, and 72h). The average colony diffusion was calculated at different time intervals. A reference toxigenic isolate (R20291, RT027) was used as a control. Samples with diffusion similar to the reference strain (R20291,

RT027) were classified as moderate motility, those with higher values as high motility, and those with lower results as low motility.

Five toxigenic isolates belonging to RT046 (isolates 29,182 and 243) and RT126 (isolates 40 and 45) were subjected to whole genome sequencing. Briefly, DNA was extracted using a DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Germany). Genome sequencing was performed using a HiSeq 2500 platform (Illumina, USA), paired-end, 2 × 150 bp. Raw data quality was analyzed using FastQC v.0.11.3 (Babraham Bioinformatics) with a Phred score = 30. Adapters were removed using Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al., 2014), and the genome assembly was performed using SPAdes 3.5.0 (Bankevich et al., 2012). ResFinder 4.4.2 were used to identify acquired antimicrobial resistance determinants (Camacho et al. 2009; Bortolaia et al. 2020; Zankari et al. 2020) and Multilocus sequence typing (MLST) 2.0 was used to determine sequencing types (Lemee et al. 2004; Griffiths et al. 2010; Larsen et al. 2012).

Statistical analysis

Chi-square test (SAS) was used to evaluate possible associations between each farm, age, sex, breed, exploitation, rearing system, fecal characteristics (consistency, color, and odor), disease history, presence of diarrhea, antimicrobial use, and the outcomes of culture and toxin genes detection (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB*). A P value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The average age of the sampled calves was 18.38 ± 1.68 days. Out of the 300 animals included, 222 (74%) were healthy, while 78 (26%) had diarrhea at the time of sampling. *C. difficile* was isolated from 29.3% (88/300) of the studied calves, of which 20.5% (16/78) were diarrhea samples. *C. difficile* was detected on 90% (18/20) of the farms, of which 8/20 farms had toxigenic strains. Among these isolates, 71 (80.68%) were non-toxigenic, thus the remaining 17 (20.12%) were toxigenic strains. Toxigenic strains of *C. difficile* were recovered from calves aged 1-to-57 days old. Detailed information regarding the epidemiological aspects, toxigenic profiles, and ribotypes is provided in Table 2. No statistically significant association was found between epidemiological variables and *C. difficile* isolation ($p>0.05$).

The ribotyping revealed two circulating types, RT046 1 (13/17 - 76.5%), all A⁺B⁺ CDT⁻, and RT 126 (4/17 -23.5%), and all were A⁺B⁺ CDT⁺ strains. The 3 RT046 subjected to whole genome sequencing were classified into ST35 (clade 1), while the 2 RT126 isolates were ST11 (clade 5). All toxigenic isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin (Table 3). On the other hand, most isolates were resistant to erythromycin, moxifloxacin, tetracycline and to rifampicin. Most of the toxigenic isolates (16/17=94.1%) were classified as multidrug resistant. Interestingly, all 5 isolates subjected to whole genome sequencing were positive for *tetM* and *ermB*. In terms of motility testing, 17.5% (3/17) showed low motility, 65% (11/17) moderate motility, and 17.5% (3/17) highly motile.

Discussion

The prevalence of *C. difficile* based on fecal bacterial culture in calves observed in this study is in agreement with previously studies in other countries which reported between 20 and 30% (Hammitt et al. (2022; Redding et al. (2021; Magistrali et al., 2015). The isolation rate of toxigenic strains was also similar to most previous studies, which reported up to 11% (Avbersek et al. 2007; Bandelj et al. 2018; Rodriguez et al. 2017; Doosti, Farsani, 2014). Further, the presence of *C. difficile* in most sampled farms indicates that it is widely spread in the calf population of dairy farms in Sao Paulo state, regardless of the production systems, as previously suggested by other authors (Masarikova et al. 2020; Blasi et al. 2020).

The prevalence of diarrhea in the sample population at the time of collection (26%) was not correlated with the isolation of *C. difficile* ($p>0.05$). This reinforce the hypothesis that *C. difficile* is unlikely primary or secondary agent involved in calves diarrhea, as previously suggested (Foster; Smith, 2009; Cho;Yoon, 2014; Redding et al., 2021). Also, no association between antimicrobials used and *C. difficile* isolation was found, contrasting previous works suggesting that the use of penicillin and quinolones increases the isolation rate of *C. difficile* humans and cattle (Blasi et al. 2021; Li et al. 2018).

Interestingly, different strains were observed within the same farms, indicating the presence of multiple strains in the same environment (Grady et al. 2021). The observed RTs in the present study are not commonly in calves or other animals in general (Hoffer et al. 2010; Knight et al. 2013; Magistrali et al. 2015; Rodriguez et al. 2017; Bandelj et al. 2019; Moloney et al. 2021; Dorp et al. 2017; Viegas et al. 2022). There is however a report of both strain types (RT 046 and 126) found in dairy calves kept in a large-scale production system in the Czech Republic (Masarikova et al., 2020). The presence of *ermB* resistance genes (clindamycin resistance) was also observed in RT 046/ST35/clade 1 isolates reported in that study.

The RT 046/ST35/clade has been described in isolates recovered from pigs (Norén et al., 2014) and humans (Nogueira et al., 2021; Magnusson et al., 2022). Using whole-genome sequencing, transmission between pigs and humans was recently reported (Werner et al., 2020). Presumably, farm workers handling live stock these animals are at high risk of acquiring the bacteria, become colonized strains and subsequently developing CDI.

Note, four farms (15-to-18) included in this study from which samples were collected from 13 calves, 5 were culture positive. These farms' purpose is for family self-sustain than commercial exploitations. Further, In addition to cattle, these farms house a variety of other animals' species, including poultry, pigs, dogs, cats, and horses. The cohabitation of multiple species can facilitate the cross-contamination of bacterial strains between animals and potentially the spread of resistance genes among different animal species and humans (Rodriguez et al. 2017).

The presence of multidrug-resistant strains (erythromycin, rifampicin, tetracycline, and moxifloxacin) in this study deserves attention due to reciprocal transmission between animals and humans. Further, resistance elements can be transferred between different bacteria, increasing their virulence (Spigaglia et al. 2018; Soleh et al. 2020; O'Grady et al. 2021; Mutai et al. 2021; Santana et al. 2022).

Although no statistically significant correlation was found between *C. difficile* culture and specific farms, it is noteworthy that seven toxigenic strains and two different ribotypes (RT's 046 and 126) were isolated from a single farm (property 13). No risk factors for the spread of *C. difficile* were identified on this farm, however. The presence of distinct ribotypes and strains resistant to the key antimicrobials used in CDI treatment in humans and animals is of great concern from the One Health concept point of view. Implementing biosafety measures in calf management can contribute to reducing the dissemination of *C. difficile* among calves, other

animals, and humans. Farm workers directly involved with these animals may benefit from hygiene practices training while handling these animals in order minimize or prevent zoonotic infections.

Conclusions

C. difficile can be isolated from the feces of nursing calves, but no association with enteric disease was observed. The strains isolated in these animals are from ribotypes commonly reported infecting humans, this is also important considering the MDR patterns of these samples.

Declaration of conflicting interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Acknowledgments

The authors sincerely thank the support Brazilian government agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do São Paulo (FAPESP) (2022/00708-2), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES), for funding this study.

References

- 262 Abay S et al. Presence of *Clostridioides difficile* in cattle feces, carcasses, and slaughterhouses:
263 Molecular characterization and antibacterial susceptibility of the recovered isolates. *Anaerobe*
264 2022,75:1-11.
- 265 Anjewierden S, et al. Risk factors for *Clostridioides difficile* colonization among hospitalized
266 adults: A meta-analysis and systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2021,42:565-572.
- 267 Arroyo LG, et al. Experimental *Clostridium difficile* enterocolitis in foals. *J Vet Intern Med*
268 2008,5:734-738.
- 269 Aschbacher R, et al. Predominance of *Clostridium difficile* 027 during a five-year period in
270 Bolzano, Northern Italy. *Infez Med* 2017, 15(1):13-20.
- 271 Avbersek J, et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*
272 2009,15:252-2555.
- 273 Bandelj P, et al. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Clostridium difficile* Isolates from Family
274 Dairy Farms. *Zoonoses Public Health* 2017,64:213-221.
- 275 Bandelj P, et al. *Clostridioides difficile* in bat guano. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis*
276 2019,65:144-147.
- 277 Bandelj P, et al. Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-
278 size dairy farms. *Vet Res* 2016,47:1-10.
- 279 Bandelj P, et al. Quantification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in feces of calves of
280 different age and determination of predominant *Clostridioides difficile* ribotype 033 relatedness
281 and transmission between family dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat
282 analysis. *BMC Vet Res* 2018,14:298-305.

- 283 Bankevich A, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-
284 Cell Sequencing 2012, 5:455-477.
- 285 Berger FK, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile*
286 detected in chicken, soil and human samples from Zimbabwe. Inf J Infect Dis 2020,96:82-87.
- 287 Blasi F, et al. *Clostridioides difficile* in Calves in Central Italy: Prevalence, Molecular Typing,
288 Antimicrobial Susceptibility and Association with Antibiotic Administration. Animals 2021,11:1-
289 15.
- 290 Bojesen EM, et al. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by
291 *Clostridium difficile*. Vet Microbiol 2006, 4:329-335.
- 292 Bolger AM, et al. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics
293 2014,30:2114-2120.
- 294 Bortolaia V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob
295 Chemother 2020,12:3491-3500.
- 296 Bunddle JE, Fagan RP. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. Virulence 2023,1:1-
297 25.
- 298 Camacho C, et al. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 2009,2105:10-
299 421.
- 300 Carvalho GM, et al. Evaluation of disk diffusion method for testing the rifampicin, erythromycin,
301 and tetracycline susceptibility of *Clostridioides* (prev. *Clostridium*) *difficile*. Anaerobe 2023, 80:1-
302 7.

- 303 Carvalho TP, et al. Lethal acute diarrhea associated with *Clostridioides difficile* toxin A and B in
304 a buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*). J Med Primatol 2022,6:400-403.
- 305 Cataldo MA, et al. Hospitalized patients with diarrhea: Rate of *Clostridioides difficile* infection
306 underdiagnoses and drivers of clinical suspicion. Anaerobe 2021,70:1-12.
- 307 CDC, 2019. Centers for Disease Control and Prevention. Glossary of Terms Related to Antibiotic
308 Resistance. [s.l: s.n.].
- 309 Cho YI, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention.
310 J Vet Sci 2014,15:1-17.
- 311 Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. Performance Standards for Antimicrobial
312 Susceptibility Testing, CLSI supplement M100; 33 ed. CLSI 2023. 402p.
- 313 CLSI, M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed., 2021.
- 314 Costa MC, et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* on a veal farm: prevalence, molecular
315 characterization and tetracycline resistance. Vet Microbiol 2011,28:379-384.
- 316 Doosti A, Farsani A.M. Study of the frequency of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB*
317 genes in feces of Calves in southwest of Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014,5:13-21.
- 318 Dorp SM, et al. Ribotype 078 *Clostridium difficile* infection incidence in Dutch hospitals is not
319 associated with provincial pig farming: Results from a national sentinel surveillance, 2009-2015.
320 Plos One 2017,12:1-10.
- 321 Foster DM, Smith GM. Pathophysiology of diarrhea in calves. Vet Clin North Am Food Anim
322 Pract 2009, 25:13-36.

- 323 Goldenberg JZ, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in
324 adults and children. Cochrane Database Sys Rev 2017,19:1-15.
- 325 Goorhuis A, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain,
326 polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 2008,47:1162–1170.
- 327 Griffiths D, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. Journal of Clinical
328 Microbiology 2010,48:770-778.
- 329 Grzeskowiak I, et al. *Clostridioides difficile*-mesocolonic edema in neonatal suckling piglets
330 develops regardless of the fiber composition in sow's diets. Animals 2023,17:1-12.
- 331 Hain-Sauders NMR. *Clostridioides difficile* infection and One Health: an equine perspective.
332 Environ Microbiol 2022,24:985-997.
- 333 Hammitt MC, et al. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. Vet
334 Microbiol 2008,127:343-52.
- 335 Himsworth CG, et al. Carriage of *Clostridium difficile* by Wild Urban Norway Rats (*Rattus*
336 *norvegicus*) and Black Rats (*Rattus rattus*). Appl Environ Microbiol 2014,80:1233-1305.
- 337 Hoffer E, et al. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs
338 at slaughter and in minced meat in Switzerland. J Food Prot 2010,73:973-975.
- 339 Houser BA. Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of
340 *Clostridium difficile* Toxin-Encoding Strains. Foodborne Pathog Dis 2010,7:719–726.
- 341 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Brazilian Institute of Geography and Statistics] –
342 IBGE. Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas) [Cattle herd (Steers and Cows)]. Censo Agropecuário

343 [Agricultural Census]. 2023 Nov 03. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao->
344 [agropecuaria/bovinos/sp](https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/sp)

345 Jolley KA, et al. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org
346 website and their applications. Open Res 2018, 24:124-127.

347 Keessen EC, et al. *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. Emerg Infect Dis
348 2013,19:1032–1034.

349 Knetsch CW, et al. Lawley. Zoonotic Transfer of *Clostridium difficile* Harboring Antimicrobial
350 Resistance between Farm Animals and Humans. J Clin Microbiol 2018,56:1-8.

351 Knight DR, et al. Contamination of Australian newborn calf carcasses at slaughter with *Clostridium*
352 *difficile*. Clin Microbiol Infect 2016,22:1-7.

353 Knight DR, et al. Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR
354 ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. Appl Environ Microbiol 2013,79:2630-
355 2635.

356 Knight DR, et al. Evolutionary and Genomic Insights into *Clostridioides difficile* Sequence Type
357 11: a Diverse Zoonotic and Antimicrobial-Resistant Lineage of Global One Health Importance.
358 MBio 2019, 10:446-519.

359 Krutova M, et al. The recognition and characterisation of Finnish *Clostridium difficile* isolates
360 resembling PCR-ribotype 027. J Microbiol Immunol Infect 2018,51(3): 344-351.

361 Larsen M, et al. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. Journal of
362 Clinical Microbiology 2012,4:1355-1361.

- 363 Larson et al. Guidelines Toward More Uniformity in Measuring and Reporting Calf Experimental
364 Data. J Dairy Sci 1997,6:989-991.
- 365 Lee YL, et al Prevalence, genetic characteristics, and antimicrobial resistance of *Clostridioides*
366 *difficile* isolates from horses in Korea. Anaerobe 2023,80:1-5.
- 367 Lemee L, et al. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile*
368 isolates of various toxigenic types. Journal of Clinical Microbiology 2004, 42:2609-261.
- 369 Li C, et al. Characterization of the virulence of a non-RT027, non-RT078 and binary toxin-positive
370 *Clostridium difficile* strain associated with severe diarrhea. Emerg Microbes Infect 2018,7:1-11.
- 371 Liao F, et al. A retrospective study of community-acquired *Clostridium difficile* infection in
372 southwest China. Sci Rep 2018,18:62-67.
- 373 Licciardi G, et al. Prevalence, Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of
374 *Clostridioides difficile* Isolated from Pig Carcasses and Pork Products in Central Italy. Int J
375 Environ Public Health 2021,18:21-45.
- 376 Lim SC, et al. *Clostridium difficile* and One Health. Clin Microbiol Infect 2019,26:857-863.
- 377 Lim SC, et al. *Clostridium difficile* in soil conditioners, mulches and garden mixes with evidence
378 of a clonal relationship with historical food and clinical isolates. Environ Microbiol Rep
379 2020,126:72-680.
- 380 Magistrali CF, et al. Prevalence and risk factors associated with *Clostridium difficile* shedding in
381 veal calves in Italy. Anaerobe 2015,33:42-47.
- 382 Magnusson C, et al. Characterization of a *Clostridioides difficile* outbreak caused by PCR ribotype
383 046, associated with increased mortality. Emerg Microbes Infect 2022,11:850-859.

- 384 Maloney G, et al. Human and Porcine Transmission of *Clostridioides difficile* Ribotype 078,
385 Europe Emerg Infect Dis 2021,27:2294-2300.
- 386 Marcos P, et al. A Small Study on *Clostridioides difficile* in Spinach Field Soil and the Chemical
387 and Microbial Factors that may Influence Prevalence. Curr Microbiol 2023;80:1-11.
- 388 Masarikova M, et al. Colonization of Calves in Czech Large-Scale Dairy Farms by Clonally
389 Related *Clostridioides difficile* of the Sequence Type 11 Represented by Ribotypes 033 and 126.
390 Microorganisms 2022,8:1-9.
- 391 Mellata, M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic
392 Risks, and Antibiotic Resistance Trends. Foodborne Pathog Dis 2013,11:916-932.
- 393 Mutai WC, et al. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Clostridioides difficile* Following
394 Extensive Use of Antimicrobials in Hospitalized Patients in Kenya. Front Cell Infect Microbiol
395 2021,8:1-11.
- 396 Nogueira HBR, et al. Infection with *Clostridioides difficile* ribotype 046 in a paediatric liver
397 transplant patient. Access Microbiol 2021,3(10)1-8.
- 398 Norén T, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and
399 humans in Sweden. Clin Microbiol Infect 2014,20(1):2-6.
- 400 O'Grady K, et al. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. Eur J Clin Microbiol Infect
401 Dis 2021,12:2459-2478.
- 402 Ogielska M, et al. Emergence of community-acquired *Clostridium difficile* infection: the
403 experience of a French hospital and review of the literature. Int J Infect Dis 2015,37:36-41.

- 404 Poilane, I. Interest of the disk diffusion method for screening *Clostridium difficile* isolates with
405 decreased susceptibility to antibiotics. *Pathol. Biol* 2007,55: 429–433,
- 406 Ramos CP, et al. Enteric Organisms Detected in Feces of Dogs with Bloody Diarrhea: 45 Cases.
407 *Top Companion Anim Med* 2021,45:1-7.
- 408 Redding LE, et al. *Clostridioides difficile* on dairy farms and potential risk to dairy farm workers.
409 *Anaerobe* 2021,69:353-359.
- 410 Redding LE, et al. Genetic and phenotypic characteristics of *Clostridium (Clostridioides) difficile*
411 from canine, bovine, and pediatric populations. *Anaerobe* 2022,74:1-28.
- 412 Redding LE, et al. Gut microbiota features associated with *Clostridioides difficile* colonization in
413 dairy calves. *Plos One* 2021,16:1-15.
- 414 Rodriguez C, et al. *Clostridium difficile* in beef cattle farms, farmers and their environment:
415 Assessing the spread of the bacterium. *Vet Microbiol* 2017,210:183-187.
- 416 Rodriguez-Palacios A, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect*
417 *Dis* 2006,12:1730-1736.
- 418 Santan JA, et al. *Clostridioides difficile* and multi-drug-resistant staphylococci in free-living
419 rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. *Braz J Microbiol* 2022,53:401-410.
- 420 Schneeberg A, et al. Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and
421 045 in diarrhoeic calves in Germany. *J Med Microbiol* 2013,62:1190-1198.
- 422 Sholeh M, et al. Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from
423 humans: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020,25:158-169.

- 424 Silva ROS, et al. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua*
425 *nasua*) in Brazil. Anaerobe 2014,30:99-101.
- 426 Silva ROS, et al. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in
427 Brazil. Anaerobe 2014, 28:207-211.
- 428 Silva ROS, et al. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. Mem Int Oswaldo
429 Cruz 2015,110:1062- 1065.
- 430 Silva ROS, et al. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. Mem Inst Osw
431 Cruz 2015,(8):1062–5.
- 432 Silva ROS, et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium*
433 *perfringens* from foals. Equine Vet J 2012,45:671-675.
- 434 Soleh M, et al. Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from
435 humans: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control 2020,9:158-160.
- 436 Spigaglia P, et al. Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. Adv Exp Med Biol
437 2018,1050:137-159.
- 438 Spigaglia P, et al. *Clostridioides difficile* in Pigs and Dairy Cattle in Northern Italy: Prevalence,
439 Characterization and Comparison between Animal and Human Strains. Microorganisms
440 2023,11:1-20.
- 441 Trindade CNR, et al. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic
442 review covering thirty years. Anaerobe 2019,58:13-21.

- 443 Viegas FM, et al. Fecal shedding of *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, and *Clostridioides*
444 *difficile* in dogs fed raw meat-based diets in Brazil and their owners' motivation. Plos One
445 2020,15:1-13.
- 446 Weese JS, et al. *Clostridium difficile* shedding by healthy dogs in Nigeria and Malawi. J Vet Diag
447 Invest 2019,1:1-4.
- 448 Werner A, et al. Whole genome sequencing of *Clostridioides difficile* PCR ribotype 046 suggests
449 transmission between pigs and humans. Plos One 2020, 15(12):1-10.
- 450 Wong SS, et al. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and
451 vancomycin by disk diffusion and Etest. Diagn /microbiol Infect Dis 1999,34:1-6.
- 452 Yaeger MJ, et al. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium*
453 *difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. J Vet Diag Invest
454 2007,19:52-59.
- 455 Zankari E, et al. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance
456 associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J Antimicrob Chemother
457 2017,10:2764-2768.
- 458 Zhang WZ, et al. The molecular characters and antibiotic resistance of *Clostridioides difficile* from
459 economic animals in China. BMC Microbiol 2020,70:1-7.

Table Suppl 1. Epidemiological data of the properties (n=20) included in the current study.

ID	City	Collected Calves	Toxigenic/ Nontoxigenic	Total Cattle	Purpose	System	Breeds	Level of management/husbandry ³	Calf Mortality*	Cause of death
1	Botucatu	8	0/3	248	Dairy	Intensive ¹	Holstein, Gir, Giorlando and Simental	Medium	Yes (8)	Diarrhea and Pneumonia
2	Botucatu	11	0/5	440	Dairy	Extensive ²	Holstein, Gir and Girolando	Low	Yes (3)	Pneumonia and CTF
3	Cerqueira César	7	0/1	571	Dairy	Intensive ¹	Holstein and Girolando	High	No	Pneumonia
4	Avaré	20	4/3	937	Dairy	Intensive ¹	Holstein and Girolando	High	Yes (6)	Pneumonia, Omphalitis, and Abomasitis
5	Itatinga	14	2/2	926	Dairy	Intensive ¹	Holstein and Girolando	Medium	Yes (6)	Diarrhea and Pneumonia
6	Itatinga	25	1/4	622	Dairy	Intensive ¹	Holstein and Girolando	Low	Yes (10)	Pneumonia, Omphalitis, and Diarrhea
7	Botucatu	10	0/2	146	Dairy and Beef	Extensive ²	Holstein, Nelore and Crossbred	Low	Yes (2)	Pneumonia, Omphalitis, and CTF
8	Pardinho	19	1/5	1070	Dairy	Intensive ¹	Gir, Jersey, Girolando and Holstein	Medium	No	-
9	Descalvado	73	1/18	10220	Dairy	Intensive ¹	Holstein	High	Yes (20)	Diarrhea and Omphalitis
10a	Avaré	7	1/3	210	Beef	Intensive ¹	Sindi	Medium	Yes (1)	Diarrhea
10b	Avaré	15	0/6	459	Beef	Extensive ²	Sindi	Medium	Yes (4)	Omphalitis
11	Avaré	4	0/0	605	Beef	Extensive ²	Simental	Medium	Yes (2)	Omphalitis
12	Areiopolis	7	0/0	561	Dairy	Intensive ¹	Holstein	Low	Yes (20)	Diarrhea and Omphalitis
13	Cravinhos	20	5/4	1233	Dairy	Intensive ¹	Holstein	High	Yes (10)	Omphalitis, Diarrhea, and CTF
15	Botucatu	4	1/0	104	Dairy	Extensive ²	Crossbred	Low	Yes (4)	Diarrhea
16	Botucatu	2	0/1	112	Dairy	Extensive ²	Crossbred	Low	Yes (2)	Diarrhea
17	Botucatu	3	0/2	104	Dairy	Extensive ²	Crossbred	Low	Yes (1)	Diarrhea
18	Botucatu	4	0/1	192	Dairy	Extensive ²	Crosbred	Low	Yes (1)	Diarrhea
19	Piracicaba	47	2/8	3950	Dairy	Intensive ¹	Holstein	High	Yes (20)	Diarrhea and Acidosis

CTF: Cattle tick fever is a complex caused by the diseases babesiosis and anaplasmosis *Number of calves that died in the last six months.1 Intensive systems were those where a high population density and confinement of animals were observed. 2 Extensive systems were those in which the calves spent part of the day in pasture, in contact with cows, without nutritional supplementation. 3 The level of management/husbandry was defined based on the cleanliness of facilities, adoption of sanitary practices (for cows and calves), control of synanthropic animals, and the breeding system adopted.

Table 1. Epidemiological data and determination of toxin genes of 17 *C. difficile* strains found in nursing calves.

Id	Farm	Age	Breed	Previous Disease History¹	Diarrhea²	Antimicrobial Usage/Days prior to treatment³	Toxigenic Profile	Ribotype	Sequence type (ST)/Clade
29	4	8	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
38	4	45	Holstein	Diarrhea	Yes	Ceftiofur/Ongoing Treatment	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	046	35/1
40	4	46	Holstein	N/A	Yes	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	126	11/5
45	4	29	Holstein	CTF	No	Oxytetracycline and Enrofloxacin/7 days	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
49	5	35	Holstein	Broncopneumonia	No	Penincilin/10 days	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	126	11/5
52	5	15	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
70	6	29	Holstein	N/A	Yes	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
98	8	40	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
106	9	28	Holstein	Diarrhea	Yes	Gentamicin/8 days	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
182	10	57	Sindi	N/A	Yes	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	35/1
228	13	18	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
235	13	7	Holstein	N/A	Yes	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	126	N/P
236	13	1	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
237	13	7	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	126	N/P
243	15	30	Crossbred	Broncopneumonia and CTF	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	35/1
272	19	24	Holstein	N/A	No	-	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P
283	19	38	Holstein	CTF	No	Enrofloxacin/10 days	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	046	N/P

CTF: Cattle tick fever is a complex caused by the diseases babesiosis and anaplasmosis.1 Observation of diseases was performed prior to collection. 2 Observation of diarrhea at the time of collection, valid for animals already under treatment for this condition and calves where diarrhea was first observed at the time of sampling. 3Days of antimicrobial administration until the time of harvest.

Table 2. Antimicrobial Susceptibility Test and Motility of Toxigenic *C. difficile* Strains (n=17) Isolated from Nursing Calves.

Id	Antimicrobial Susceptibility Test						AMG
	VAN	MET	ERI	MOX	RIF	TET	
29	S	S	R	R	S	S	N/P
38	S	S	R	R	S	R	<i>ermB</i> and <i>tetM</i>
40	S	S	R	R	R	R	<i>ermB</i> and <i>tetM</i>
45	S	S	R	R	R	S	N/P
49	S	S	R	R	S	S	<i>ermB</i> and <i>tetM</i>
52	S	S	R	S	R	R	N/P
70	S	S	R	R	R	R	N/P
98	S	S	R	S	R	R	N/P
106	S	S	R	R	R	R	N/P
182	S	S	R	R	R	R	<i>ermB</i> and <i>tetM</i>
228	S	S	R	S	R	R	N/P
235	S	S	R	R	R	S	N/P
236	S	S	R	R	R	R	N/P
237	S	S	R	R	R	R	N/P
243	S	S	R	S	R	R	<i>ermB</i> and <i>tetM</i>
272	S	S	R	S	R	R	N/P
283	S	S	R	R	S	R	N/P
	0/17	0/17	17/17	12/17	9/17	13/17	
	(0%)	(0%)	(100%)	(70.60%)	(52.9%)	(76.47%)	

S: Sensitive; R: Resistant; AMG: Antimicrobial resistance determinants; N/P: Not; *ermB*: clindamycin resistance; *tetM*: tetracycline resistance protein

Figure 1. Map of São Paulo state by macroregion - Brazil, describing the regions where fecal samples were collected from nursing calves.

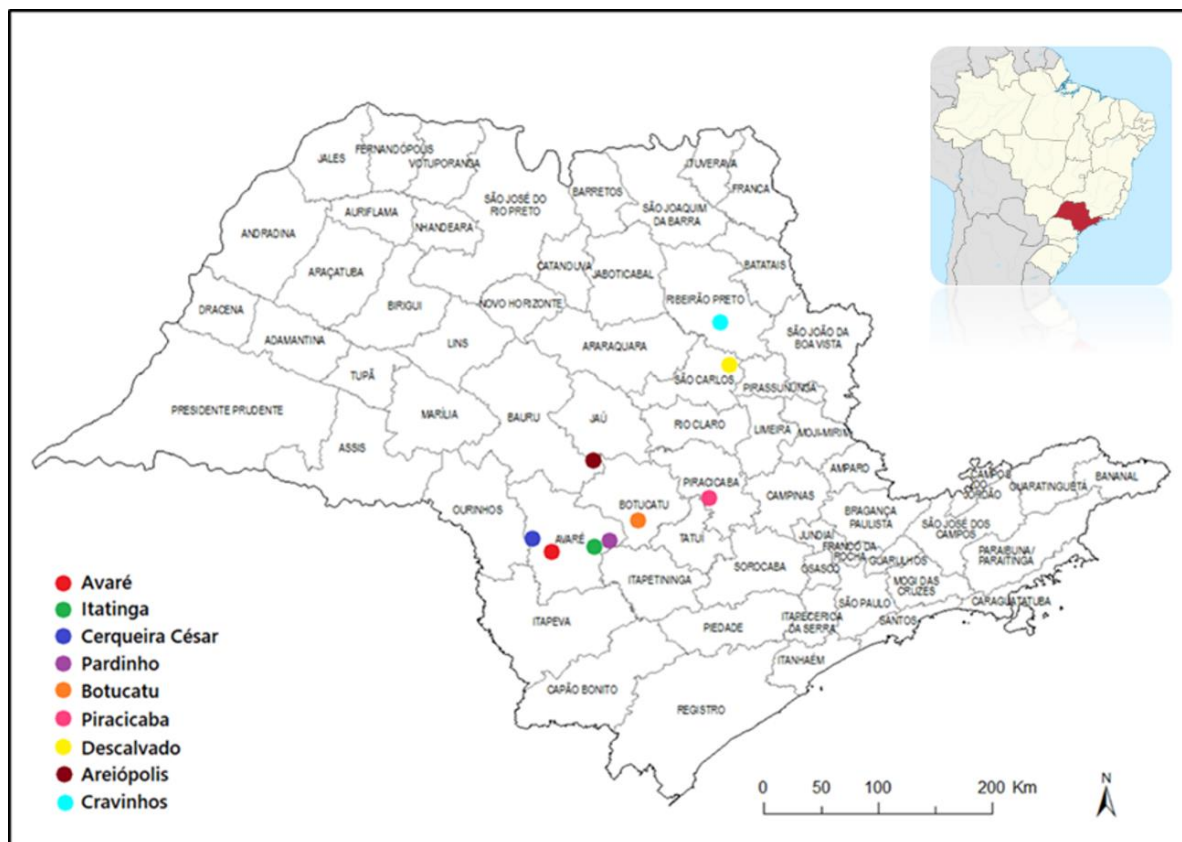


Figure 2. Calves collected in the current study, A: Property 19, B: Property 13; C: Property 5; D: Property 6; E: Property 15. F: Calf from farm 13 voluntarily ingesting soil (ground).



Capítulo 3

Considerações Finais

O *C. difficile* pode ser encontrado nas fezes de bezerros durante a amamentação, sendo observado que mesmo as cepas não toxigênicas são parte da microbiota desses animais. Isso pode facilitar a transferência de genes de resistência entre diferentes cepas, destacando a importância da investigação do papel desses animais no ciclo de disseminação e evolução dos fatores de virulência do *C. difficile*. O sequenciamento completo do genoma revelou a presença de genes de resistência que podem ser compartilhados entre as cepas.

Embora não seja o foco principal, compreender o envolvimento desse agente em casos de diarreia neonatal bovina parece ser um desafio cada vez maior. Portanto, não se pode incluir o *C. difficile* na lista de agentes causadores de diarreia em bezerros.