

Clostridioides difficile RT596: una cepa no-toxigénica multidrogoresistente

Clostridioides difficile RT596: a non-toxigenic multidrug-resistant strain

Andino-Molina, Mauricio¹
Barquero-Calvo, Elías²
Seyboldt, Christian³
Schmoock, Gernot⁴
Heinrich Neubauer⁵
Tzoc, Edgardo⁶
Rodríguez, César⁷
Quesada-Gómez, Carlos⁸

Recibido: 22 de enero de 2025
Aceptado: 17 de febrero de 2025

¹ Grupo de Investigación en Microbiología One Health, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Escuela de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de Honduras; Jena University Hospital, Institute of Infectious Diseases and Infection Control, Friedrich-Schiller-University Jena, Am Klinikum 1, Jena 07747, Germany & Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; mauricio.andino@unah.edu.hn; <https://orcid.org/0000-0001-5720-1223>

² Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica; elias.barquero@una.ac.cr; <https://orcid.org/0000-0003-4428-3340>

³ Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; christian.seyboldt@fli.de; <https://orcid.org/0000-0003-4587-1152>

⁴ Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; gernot.schmoock@fli.de; <https://orcid.org/0000-0003-4723-4608>

⁵ Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; heinrich.neubauer@fli.de; <https://orcid.org/0000-0002-8287-6705>

⁶ Grupo de Investigación en Microbiología One Health, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Escuela de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de Honduras; edgardo.ramirez@unah.edu.hn; <https://orcid.org/0000-0001-9121-5821>

⁷ Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; cesar.rodriguez@ucr.ac.cr; <https://orcid.org/0000-0001-5599-0652>

⁸ Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; carlos.quesada@ucr.ac.cr; <https://orcid.org/0000-0002-2293-8257>

Resumen

Clostridioides difficile es un agente patógeno del tipo “Una sola salud”, y que es responsable de la diarrea asociada a antibióticos. Su epidemiología es dinámica, y se ha reportado que existe un cruce o solapamiento entre hospederos humanos y animales a nivel global. El objetivo de la presente investigación es caracterizar aislamientos obtenidos a partir de heces de origen animal que podrían actuar como reservorio de resistencia a los antimicrobianos (RAM). Mediante el uso de técnicas de cultivo, PCR, ribotipificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (PSA), se caracterizaron 10 aislamientos no toxigénicos de *C. difficile*. Todos ellos fueron identificados como RT596, una cepa que ha sido previamente documentada en animales y humanos. Además, los aislamientos revelaron cuatro perfiles de multidrogoresistencia (MDR). Nuestros hallazgos constituyen la primera caracterización a nivel regional de un genotipo no toxigénico, con potencial zoonótico y MDR. Se plantea la posibilidad de que, debido a la falta de inclusión de la PSA en los algoritmos de diagnóstico actuales o a su circulación en ambientes hospitalarios, este genotipo pueda actuar como un vector de MDR.

Palabras clave: CDI, *Clostridioides difficile*, MDR, RT596.

Abstract

Clostridioides difficile is a One Health pathogen responsible for antibiotic-associated diarrhea. Its epidemiology is dynamic and overlap between human and animal hosts has been reported globally. The aim of the present investigation is to characterize isolates obtained from animal feces that could act as a reservoir of antimicrobial resistance (AMR). Using culture, PCR, ribotyping and antimicrobial susceptibility testing (AST) techniques, 10 non-toxigenic isolates of *C. difficile* were characterized. All of them were identified as RT596, a strain that has been previously documented in animals and humans. In addition, the isolates revealed four multidrug resistance (MDR) profiles. Our findings constitute the first region-wide characterization of a non-toxigenic genotype with zoonotic potential and MDR. We raise the possibility that, due to the lack of inclusion of AST in current diagnostic algorithms or its circulation in hospital settings, this genotype may act as a vector of MDR.

Keywords: CDI, *Clostridioides difficile*, MDR, RT596.

***Clostridioides difficile* RT596: una cepa no-toxigénica multidrogoresistente**

***Clostridioides difficile* RT596: a non-toxigenic multidrug-resistant strain**

Introducción

La infección por *Clostridioides difficile* (CDI) constituye una de las principales causas de diarrea infecciosa asociada a la atención sanitaria (Abad & Safdar, 2021). La expansión global de cepas hipervirulentas agudiza la morbilidad y mortalidad de los casos clínicos (Smits et al., 2016). *C. difficile* es un agente con potencial zoonótico frecuentemente aislado en animales, y el ambiente (Esfandiari et al., 2021); los animales han sido señalados como reservorios de resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Argudin et al., 2017). Las cepas no toxigénicas de *C. difficile* no son capaces de causar daño, indistintamente de su hospedero, y en tal contexto, su importancia radica en la posibilidad de acarrear y transferir genes RAM a otras cepas toxigénicas y no toxigénicas de forma horizontal, tal como sugiere un estudio realizado en el sudeste asiático (Imwattana et al., 2020), contribuyendo a la evolución de su capacidad patogénica.

En animales, *C. difficile* se ha sido asociado con diarrea neonatal y tiflocolitis en lechones, enterocolitis en equinos y enfermedad entérica (diarrea) en murinos (Uzal et al., 2016); los modelos porcinos constituyen una valiosa fuente de información experimental para el desarrollo de fármacos, tratamientos o evaluación de patogenicidad (Grześkowiak et al., 2019). En la última década se ha incrementado el reporte de solapamientos entre cepas de *C. difficile* y hospederos (humanos y animales), por lo que su implicación como agente de interés “Una sola salud” requiere vigilancia y control (Knetsch et al., 2018).

La RAM es un factor determinante en la epidemiología cambiante de *C. difficile* (Abad & Safdar, 2021; Lim et al., 2020), la caracterización de reservorios de RAM, así como posibles fuentes de infección, son vitales para contribuir con el control y manejo del patógeno; notoriamente, los animales han sido señalados como posibles reservorios (Argudin et al., 2017). Asimismo, la RAM supone una amenaza al tratamiento de CDI (Peng et al., 2017); el fallo terapéutico conlleva episodios de relapso y severidad (Cho et al., 2021). La presencia de *C. difficile* no toxigénico ocurre aparentemente de manera

frecuente en ambientes hospitalarios (Natarajan et al., 2013), y por ello no se debe ignorar su rol en la dinámica de CDI, ya que puede acarrear y transferir genes de resistencia a los antimicrobianos (Imwattana et al., 2020), funcionando así como reservorio, que por razones técnicas (al no causar enfermedad o producir toxinas), puede ser subestimado o no detectado mediante los algoritmos diagnósticos actuales (Lee et al., 2021).

Aislamientos toxigénicos hipervirulentos de *C. difficile* con RAM han sido reportados a partir de humanos en Costa Rica (Ramírez-Vargas et al., 2017) y Honduras (Hidalgo-Villeda et al., 2018), así como genotipos con potencial zoonótico a partir de fuentes animales (Andino-Molina et al., 2019). Consecuentemente, nuestra investigación tiene como objetivo la caracterización fenotípica y genómica de aislamientos no toxigénicos de *C. difficile* a partir de muestras fecales porcinas, evaluando así su potencial como vector de RAM.

Metodología

El presente estudio es descriptivo, transversal y no probabilístico. Se realizó el aislamiento de *C. difficile* a partir de muestras fecales en lechones sin historial declarado de uso o aplicación de antimicrobianos o factores de crecimiento en una finca costarricense de producción con fines educativos. Brevemente, 44 lechones (5-7 días postparto en 2017) aparentemente sanos fueron muestreados y 88 hisopados fueron obtenidos y transportados en medio FAB (Lab M) hasta su procesamiento. Las muestras (0.5 - 1 g de materia fecal de 44 hisopados rectales) fueron posteriormente inoculadas en los medios agar Cefoxitina-Cicloserina-Fructuosa (CCFA; Oxoid) y en caldo de enriquecimiento para Anaerobios Fastidiosos (FAB; Lab M), ambos incubados en anaerobiosis a 37 °C por 24 y 168 horas, respectivamente (Andino-Molina et al., 2019; Ramírez-Vargas et al., 2017).

Colonias típicas en CCFA fueron inoculadas en agar Columbia enriquecido con sangre ovina [5%], hemina y vitamina K, y aquellas con resultados positivos para la prueba de aglutinación en látex para la detección de la enzima glutamato-deshidrogenasa (constitutiva en *C. difficile*) y la prueba de fluorescencia a 365 nm fueron sometidas a PCR para su identificación y toxinotipificación (*tcdA*, *tcdB*, *cdtAB*, y delección en *tcdC*), de acuerdo con metodologías previamente publicadas (Schneeberg, Neubauer, Schmoock, Baier, et al., 2013). Posteriormente, regiones ARN, 16S/23S fueron amplificadas y separadas por medio de electroforesis capilar (Schneeberg, Neubauer, Schmoock, Baier, et al., 2013); el electroferograma obtenido se procesa digitalmente y los perfiles de amplicones resultantes se comparan con los depositados en el sistema *Webribo* (<http://webribo.ages.at>), para la obtención de ribotipo (RT).

Finalmente, se realizó la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (PSA) mediante el método epsilométrico utilizando tiras de antibióticos (ETEST®, Biomerieux, Francia; Liofilchem, Italia) para antimicrobianos que se constituyen como tratamiento para CDI, promotores de CDI, y aquellos comúnmente utilizados en sistemas hospitalarios, entornos comunitarios y atención veterinaria. Asimismo, los puntos de corte para la interpretación de los resultados se detallan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. *Antimicrobianos y criterios de interpretación para prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de C. difficile*

	<i>Antimicrobiano</i>	<i>Punto de corte (MIC µg/mL)</i>	<i>Rango analizado (µg/mL)</i>
(XL)	Amoxicilina-ácido clavulánico	≥16	0.016 – 256
(AM)	Ampicilina	≥2	0.016 – 256
(CT)	Cefotaxime	≥64	0.002 – 32
(CI)	Ciprofloxacina	≥8 ^a	0.002 – 32
(EN)	Enrofloxacin	≥8 ^a	0.002 – 32
(MX)	Moxifloxacina	≥8 ^a	0.002 – 32
(LE)	Levofloxacina	≥8 ^a	0.002 – 32
(CL)	Clindamicina	≥8	0.016 – 256
(CF)	Cloranfenicol	≥32	0.016 – 256
(MP)	Meropenem	≥8	0.002 – 32
(MZ)	Metronidazol	≥16	0.016 – 256
(TE)	Tetraciclina	≥16	0.016 – 256
(VA)	Vancomicina	≥2 ^b	0.016 – 256

Nota. En esta tabla se muestra la información técnica de acuerdo con las guías metodológicas de CLSI (a) y EUCAST (b), para la interpretación de los resultados de los aislamientos de *C. difficile* no-toxigénicos (Clinical Laboratory Standards Institute, 2012, 2017; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019); CLSI M11-A8, M100-S27.

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Bienestar Animal y Bioética, oficio número FCSA-CBAB-EMV-ACUE-005-2016.

Resultados y discusión

C. difficile no-toxigénico (CDNT; *tcdA*⁻, *tcdB*⁻, *CDT*⁻) fue aislado en 22.7% (10/44) de las muestras de lechones aparentemente sanos. La colonización de *C. difficile* no-toxigénico y toxigénico puede presentarse tanto en animales sanos como en animales sintomáticos (Uzal et al., 2016). El análisis de electroferogramas de las regiones ARN 16S/23S en la base de datos Webribo consignó el ribotipo RT596 al 100% (10/10) de los aislamientos. El genotipo RT596 ha sido previamente descrito en bovinos (Schneeberg, Neubauer, Schmoock, Grossmann, et al., 2013) y en pacientes de un hospital europeo (Krutova et al., 2016). Su presencia en entornos diversos sugiere un potencial zoonótico similar a lo descrito en Australia, América y Europa con los genotipos RTO14 y RTO78 (Knetsch et al., 2018; Knight et al., 2017).

Los aislamientos no toxigénicos RT596 mostraron resistencia (RAM) y multidrogore-sistencia (MDR) a los antimicrobianos; lo anterior coincide con investigaciones recientes que demuestran la plasticidad genómica y el potencial como vector de RAM/MDR de *C. difficile* expresado fenotípicamente (Imwattana et al., 2020); los perfiles de resistencia (PR) y concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se detallan en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. *Perfiles de resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de C. difficile RT596*

<i>Perfiles de resistencia</i>	<i>Clases de antibióticos (n)</i>	<i>Aislamientos (n=10)</i>
EN/CI + CL + AM + CF + CT	5	1
EN/LE/CI + CL + AM + CF + CT	5	3
EN/LE/CI + CL + AM + CT	4	3
EN/LE/CI + AM + CT	3	3

Nota. EN (Enrofloxacina), CI (Ciprofloxacina), LE (Levofloxacina), CL (Clindamicina), AM (Ampicilina), CF (Cloranfenicol), CT (Cefotaxime).

Considerando el potencial zoonótico del RT596, debido a su hallazgo en poblaciones animales (Schneeberg, Neubauer, Schmooch, Grossmann, et al., 2013) y humanas (Krutova et al., 2016), así como en el ambiente (Dharmasena & Jiang, 2018), es evidente que el control y vigilancia de cepas no toxigénicas es vital para mitigar el riesgo de expansión de genes y elementos RAM/MDR.

Tabla 3. *Concentraciones mínimas inhibitorias en aislamientos de C. difficile RT596*

	<i>Antimicrobiano</i>	<i>Rango CMI (µg/mL)</i>	<i>Aislamientos resistentes (n)</i>
(XL)	Amoxicilina-ácido clavulánico	0.5 – 1.5	0
(AM)	Ampicilina	1 – 3	5
(CT)	Cefotaxime	≥ 32	10
(CI)	Ciprofloxacina	≥ 32	10
(EN)	Enrofloxacina	≥ 32	10
(MX)	Moxifloxacina	0.5 – 0.75	0
(LE)	Levofloxacina	3 – 12	2
(CL)	Clindamicina	6 – 12	7
(CF)	Cloranfenicol	6 – 32	1
(MP)	Meropenem	0.75 – 1	0
(MZ)	Metronidazol	0.13 – 0.75	0
(TE)	Tetraciclina	24 – 48	10
(VA)	Vancomicina	0.5 – 0.75	0

Nota. Para la interpretación de los resultados de los aislamientos de *C. difficile* no-toxi-
génicos se han utilizado los criterios clínicos (Clinical Laboratory Standards Institute,
2012, 2017; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019)

Conclusiones

Nuestros hallazgos demuestran que los aislamientos no toxigénicos derivados de fuentes animales poseen potencial zoonótico y acarrean elementos de RAM/MDR que podrían transferirse a cepas ya toxigénicas y potencialmente epidémicas o a cepas no toxigénicas que podrían circular en entornos comunitarios u hospitalarios.

El presente estudio tiene como principal limitación la naturaleza clonal de los aislamientos, lo que no permite una generalización contextual apropiada; sin embargo, constituyen el primer reporte a nivel latinoamericano del genotipo RT596 MDR a partir de poblaciones porcinas.

Es evidente que el análisis de genoma completo y su comparación con otros genotipos toxigénicos/no toxigénicos es clave para comprender más sobre la epidemiología de *C. difficile*; asimismo, nuestros resultados respaldan la necesidad de una vigilancia no solo molecular sino fenotípica de los aislamientos de *C. difficile*, indistintamente de la presencia o ausencia de toxinas (A, B o binaria) o sus genes, en un contexto y abordajes consistentes con el enfoque “Una sola salud”.

Fuentes de financiamiento

Fondos propios de la Universidad Nacional (Heredia, Costa Rica) y Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica). Beca de programa regional y fondos de investigación de *Deutscher Akademischer Austauschdienst* (DAAD, Bonn, Germany).

Referencias

- ABAD, C. L. R., & SAFDAR, N. (2021). A Review of Clostridioides difficile Infection and Antibiotic-Associated Diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am*, 50(2), 323-340. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2021.02.010>
- ANDINO-MOLINA, M., BARQUERO-CALVO, E., SEYBOLDT, C., SCHMOOCK, G., NEUBAUER, H., TZOC, E., RODRIGUEZ, C., & QUESADA-GOMEZ, C. (2019). Multidrug-resistant Clostridium difficile ribotypes 078 and 014/5-FLI01 in piglets from Costa Rica. *Anaerobe*, 55, 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.11.004>

- ARGUDIN, M. A., DEPLANO, A., MEGHRAOUI, A., DODEMONT, M., HEINRICHS, A., DENIS, O., NONHOFF, C., & ROISIN, S. (2017). Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics (Basel)*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012>
- CHO, J., CUNNINGHAM, S., PU, M., LENNON, R. J., DENS HIGANO, J., JERALDO, P., SAMPATHKUMAR, P., SHANNON, S., KASHYAP, P. C., & PATEL, R. (2021). Clostridioides difficile Whole-genome Sequencing Differentiates Relapse With the Same Strain From Reinfection With a New Strain. *Clin Infect Dis*, 72(5), 806-813. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa159>
- DHARMASENA, M., & JIANG, X. (2018). Isolation of Toxigenic Clostridium difficile from Animal Manure and Composts Being Used as Biological Soil Amendments. *Appl Environ Microbiol*, 84(16), Article e00738-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00738-18>
- ESFANDIARI, Z., AMANI, F., KHAVARI, S., & SAMI, M. (2021). Clostridioides difficile in Non-hospital Sources (Animals, Food, and Environment) in Asian Countries: A Literature Review. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 14(3). <https://doi.org/10.5812/jjm.115347>
- GRZEŚKOWIAK, Ł., DADI, T. H., ZENTEK, J., & VAHJEN, W. (2019). Developing gut microbiota exerts colonisation resistance to clostridium (Syn. clostridioides) difficile in piglets [Article]. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080218>
- HIDALGO-VILLEDA, F., TZOC, E., TORRES, L., BU, E., RODRIGUEZ, C., & QUESADA-GOMEZ, C. (2018). Diversity of multidrug-resistant epidemic Clostridium difficile NAP1/RT027/ST01 strains in tertiary hospitals from Honduras. *Anaerobe*, 52, 75-78. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.001>
- IMWATTANA, K., KIRATISIN, P., RILEY, T. V., & KNIGHT, D. R. (2020). Genomic basis of antimicrobial resistance in non-toxigenic Clostridium difficile in Southeast Asia [Article]. *Anaerobe*. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102290>
- KNETSCH, C. W., KUMAR, N., FORSTER, S. C., CONNOR, T. R., BROWNE, H. P., HARMANUS, C., SANDERS, I. M., HARRIS, S. R., TURNER, L., MORRIS, T., PERRY, M., MIYAJIMA, F., ROBERTS, P., PIRMOHAMED, M., SONGER, J. G., WEESE, J. S., INDRA, A., CORVER, J., RUPNIK, M., WREN, B. W., RILEY, T. V., KUIJPER, E. J., & LAWLEY, T. D. (2018). Zoonotic Transfer of Clostridium difficile Harboring Antimicrobial Resistance between Farm Animals and Humans. *J Clin Microbiol*, 56(3). <https://doi.org/10.1128/jcm.01384-17>
- KNIGHT, D. R., SQUIRE, M. M., COLLINS, D. A., & RILEY, T. V. (2017). Genome analysis of Clostridium difficile PCR ribotype 014 lineage in australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission [Article]. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02138>

- KRUTOVA, M., NYC, O., MATEJKOVA, J., ALLERBERGER, F., WILCOX, M. H., & KUIJPER, E. J. (2016). Molecular characterisation of Czech *Clostridium difficile* isolates collected in 2013-2015. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 306(7), 479-485. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.07.003>
- LEE, H. S., PLECHOT, K., GOHIL, S., & LE, J. (2021). *Clostridium difficile*: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. *Infect Dis Ther*, 10(2), 687-697. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00417-7>
- LIM, S. C., KNIGHT, D. R., & RILEY, T. V. (2020). *Clostridium difficile* and One Health [Review]. *Clin Microbiol Infect*, 26(7), 857-863. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- NATARAJAN, M., WALK, S. T., YOUNG, V. B., & ARONOFF, D. M. (2013). A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 22, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.005>
- PENG, Z., JIN, D., KIM, H. B., STRATTON, C. W., WU, B., TANG, Y.-W., & SUN, X. (2017). Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998-2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.02250-16>
- RAMÍREZ-VARGAS, G., QUESADA-GÓMEZ, C., ACUÑA-AMADOR, L., LÓPEZ-UREÑA, D., MURILLO, T., DEL MAR GAMBOA-CORONADO, M., CHAVES-OLARTE, E., THOMSON, N., RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E., & RODRÍGUEZ, C. (2017). A *Clostridium difficile* lineage endemic to Costa Rican hospitals is multidrug resistant by acquisition of chromosomal mutations and novel mobile genetic elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02054-16>
- SCHNEEBERG, A., NEUBAUER, H., SCHMOOCK, G., BAIER, S., HARLIZIUS, J., NIENHOFF, H., BRASE, K., ZIMMERMANN, S., & SEYBOLDT, C. (2013). *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in germany [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.01440-13>
- SCHNEEBERG, A., NEUBAUER, H., SCHMOOCK, G., GROSSMANN, E., & SEYBOLDT, C. (2013). Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany [Article]. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056473-0>
- SMITS, W. K., LYRAS, D., LACY, D. B., WILCOX, M. H., & KUIJPER, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
- UZAL, F. A., SONGER, J. G., PRESCOTT, J. F., & POPOFF, M. R. (2016). *Clostridial Diseases of Animals*. <https://doi.org/10.1002/9781118728291>