

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ADITIVOS Y CONDICIONES
DE PROCESAMIENTO EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE ESPORAS DE
Clostridioides difficile IN VITRO Y EN UN MODELO CÁRNICO.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de
Maestría Académica en Microbiología.

Marcy González Vargas
991814

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

A YWHE

AGRADECIMIENTO

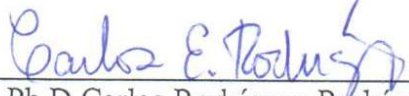
Gracias a la Universidad de Costa Rica por permitirme una vez más obtener un grado académico, por todos los profesores que se disponen para que cada día miles de estudiantes aprendan de la mejor forma para llegar a ser los mejores profesionales que pueden ser.

Gracias a Mauricio por creer en mí, a Eric por siempre ayudarme sin importar la hora y el día y a Carlos por todos sus conocimientos. Gracias a todo el personal del Laboratorio de Anaerobios, CIET y el CITA por el apoyo en este proyecto.


Gracias a mi familia de sangre (papi, mami, Tavo y Kate) y mi familia en la fe (Sil, Vale, Yu, Mari y Ser) por siempre apoyarme.

Gracias a Roberto por darme una perspectiva diferente de la vida.

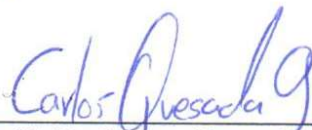
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.



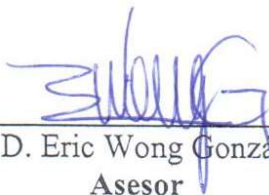
Ph.D Carlos Rodríguez Rodríguez
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



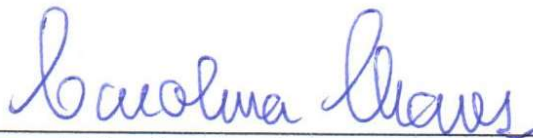
Ph.D Mauricio Redondo Solano
Director de Tesis



Ph.D. Carlos Quesada Gómez
Asesor



Ph.D. Eric Wong González
Asesor



M.Sc. Carolina Chaves Ultate
Representante

**Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e
Inmunología**



Licda. Marcy González Vargas
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
HOJA APROBACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN	viii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Clostridioides difficile</i>	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Patogénesis de la infección con <i>C. difficile</i> (ICD).....	2
1.1.3 Estructura de la espora, esporulación y germinación	6
1.1.4 Clasificación de <i>C. difficile</i>	12
1.1.5 Epidemiología del ICD	14
1.1.6 Casos comunitarios de <i>C. difficile</i>	16
1.1.7 Recuperación de <i>C. difficile</i> en medios de cultivo.....	18
1.2 Productos cárnicos	21
1.3 Presencia de <i>C. difficile</i> en alimentos	24
1.3.1 Estrategias para la prevención de <i>C. difficile</i> en alimentos	33
CAPITULO II. OBJETIVOS.....	41

2.1	General	41
2.2	Específicos	41
2.2.1	Optimizar la cantidad de taurocolato utilizada en medios líquidos de enriquecimiento para la germinación y crecimiento de esporas de <i>C. difficile</i>	41
2.2.2	Determinar el efecto de aditivos propios de la producción de productos cárnicos (nitrito, eritorbato de sodio, cloruro de sodio y lactato de potasio) sobre la capacidad de cepas de <i>C. difficile</i> para germinar y crecer en medio de cultivo.	41
CAPITULO III. METODOLOGÍA		42
3.1.	Cepas utilizadas y obtención de suspensiones de esporas	42
3.2.	Optimización de una metodología para estimular la germinación y crecimiento de <i>C. difficile</i> en Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC).....	42
3.3.	Determinación del efecto de varios aditivos propios de la producción de productos cárnicos sobre la capacidad de germinación y crecimiento de <i>C. difficile</i> en medio de cultivo.....	44
3.4.	Determinación del efecto de la congelación previa en la germinación y crecimiento de <i>C. difficile</i> en medio de cultivo.	45
3.5.	Determinación del efecto de la preredución del medio en el crecimiento y la germinación de <i>C. difficile</i>	46
3.6.	Determinación del efecto de variaciones en los factores intrínsecos y extrínsecos más significativos sobre la capacidad de cepas de <i>C. difficile</i> para germinar y crecer en un producto cárnico modelo.....	47
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		50
4.1.	Optimización de una metodología para estimular la germinación y crecimiento de <i>C. difficile</i>	50
4.2.	Efecto del nitrito, eritorbato de sodio, cloruro de sodio y lactato de potasio sobre la capacidad de cepas de <i>C. difficile</i> para germinar y crecer en medio de cultivo.....	59
4.3.	Determinación del efecto de la congelación previa en la germinación y el crecimiento de <i>C. difficile</i>	64

4.4. Determinación del efecto del tiempo de pre-reducción en la germinación y el crecimiento de <i>C. difficile</i>	68
4.5. Determinación del efecto de variaciones en la concentración de nitrito sobre la capacidad de cepas de <i>C. difficile</i> para germinar y crecer en un producto cárnico modelo	
72	
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	82
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....	84
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....	85

RESUMEN

Clostridiodes difficile es uno de los principales agentes infecciosos causantes de la diarrea nosocomial, la cual se asocia con altas tasas de morbilidad y mortalidad, además de altos costos en atención médica. Las esporas son la forma infectante de *C. difficile* y se transmiten por medio de la ruta fecal-oral. Diversos estudios en América del Norte y otras partes del mundo (incluyendo Costa Rica) han demostrado niveles importantes de contaminación de carne cruda con esta bacteria. Lo anterior podría representar un riesgo de contagio para el consumidor a nivel comunitario.

Una problemática en los estudios de prevalencia son las diferentes técnicas utilizadas para el aislamiento de *C. difficile* y ningún estudio se ha dado a la tarea de realizar una evaluación sistemática de los factores que pueden afectar el crecimiento de este microorganismo en los medios de enriquecimiento. En este estudio se optimizó la concentración de taurocolato el cual es el componente más importante en la germinación de la espora de esta bacteria y cuya respuesta puede estar relacionada con la cepa involucrada.

La dosis infectante de este microorganismo sigue siendo desconocida y su prevalencia es cada vez mayor y, tomando en cuenta que la ruta de infección es fecal-oral, este estudio determinó la capacidad de este microorganismo de crecer en un alimento procesado de origen cárnico, en el cual se utiliza materias primas que contienen este microorganismo.

Para todos los estudios se utilizaron 3 cepas aisladas en Costa Rica de muestras clínicas y una cepa de referencia lo que permitió determinar si hay diferencias en su capacidad de germinar y crecer en cada una de las condiciones que se evaluaron en este trabajo. Las condiciones utilizadas fueron aquellas propias de los procesos productivos de embutidos a nivel nacional y de esta forma se pudo tener un panorama más claro de si esta bacteria podría ser un riesgo en productos de origen cárnico.

Entre los principales resultados, al optimizar la cantidad de taurocolato y temperatura de activación para las cepas C30 y NAP7/RT078, se encontró que el modelo es significativo, para NAP1/RT027 el modelo no lo fue y para el VPI 10463 sí se presenta un modelo significativo y presenta significancia en los efectos cuadráticos por lo que el valor predicho de 0,7182 se puede alcanzar con varias combinaciones dentro del modelo.

Al analizar el efecto de la adición de nitrito, sal, eritorbato y lactato, la combinación de los cuatro ingredientes cárnicos resultó en una inhibición significativa del crecimiento y para el caso del efecto de los ingredientes individuales, se reportó inhibición significativa para nitrito, lactato y sal en el caso de todas las cepas a excepción del aislado de referencia VPI/104693; para esta cepa de referencia se encontró una inhibición significativa solo en el caso del lactato.

Al analizar efecto del tiempo de congelación previo en el crecimiento de esporas de *C. difficile* se observa que las cepas de los genotipos NAP1/RT027, NAP7/RT078 y C30 no presentan diferencia significativa en los diferentes tiempos de congelación y para el caso de la cepa de referencia VPI 10463 no se encontró un resultado lógico. En lo que respecta al tiempo de prerreducción del medio en el crecimiento de esporas de *C. difficile* todas las cepas crecieron aun cuando el medio no estaba prerreducido (0 horas) y no se encontró diferencia significativa para los tiempos de 0 y 3 horas para ninguna de las cepas con excepción de la C30.

Por último, se realizó un modelo secundario con la cepa del genotipo NAP1/RT027 con las tasas de crecimiento a diferentes concentraciones de nitritos se obtuvo una ecuación polinómica de segundo orden que mejor tuvo el ajuste y donde se puede observar una relación directamente proporcional ($p < 0,05$) entre la tasa de crecimiento y la concentración de nitrito (ppm).

Todos los resultados indican que *C. difficile* es una bacteria que, no solo puede ser un patógeno de origen alimentario, sino que resiste condiciones típicas de la industria de cárnicos listos para consumir.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por <i>C. difficile</i>	25
Cuadro 2. Diseño central compuesto para la optimización de la cantidad de taurocolato y la temperatura de activación de las esporas de <i>C. difficile</i>	43
Cuadro 3. Variables independientes y su nivel para el diseño central compuesto.	44
Cuadro 4. Análisis estadístico del diseño central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de <i>C. difficile</i> C30.	51
Cuadro 5. Análisis estadístico del modelo central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de <i>C. difficile</i> NAP7/078.	53
Cuadro 6. Análisis estadístico del modelo central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de <i>C. difficile</i> NAP1/027.	54
Cuadro 7. Análisis estadístico del modelo central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de <i>C. difficile</i> VP1/10463.	55
Cuadro 8. Valores de absorbancia (nm) de cuatro cepas de <i>C. difficile</i> expuestas a diferentes ingredientes cárnicos y su combinación después de 12 horas de incubación.	60
Cuadro 9. Valores de absorbancia de cuatro cepas de <i>C. difficile</i> expuestas a diferentes tiempos de congelación después de 12 horas de incubación.	66
Cuadro 10. Valores de absorbancia de cuatro cepas de <i>C. difficile</i> expuestas a diferentes tiempos de pre-reducción después de 12 horas de incubación.	70
Cuadro 11. Tasas de crecimiento y R2 para los modelos primario de dos cepas de <i>C. difficile</i> en carne de cerdo a diferentes concentraciones de nitrito y empacada al vacío.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de contorno de diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de <i>C. difficile</i> C30.	51
Figura 2. Gráfico de contorno de diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de <i>C. difficile</i> NAP7/078	52
Figura 3. Gráfico de contorno y superficie de respuesta a diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de <i>C. difficile</i> NAP1/027..	54
Figura 4. Gráfico de contorno y superficie de respuesta a diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de <i>C. difficile</i> VP1/10463.	55
Figura 5. Modelos primarios de NAP1/027 a diferentes concentraciones de nitrito (A: 0 ppm, B:50 ppm, C:100 ppm, D: 150 ppm, E: 200 ppm y F: 250 ppm) y diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) en un modelo de carne de cerdo.....	74
Figura 6. Modelos primarios de NAP7/078 a diferentes concentraciones de nitrito (A: 0 ppm, B:50 ppm, C:100 ppm, D: 150 ppm, E: 200 ppm y F: 250 ppm) y diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) en un modelo de carne de cerdo.....	75
Figura 7. Representación gráfica y las ecuaciones obtenidas entre la tasa de crecimiento (\log_{10}/h) de <i>C. difficile</i> versus concentración de nitrito (ppm) para la cepa NAP1/027.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxi-ribonucleíco
- APE: Agua peptonada estéril
- ATCC: American Type Culture Collective
- ATP: adenosin trifosfato
- CA ICD: infección por *C. difficile* asociada por la comunidad
- CDC: Center of Disease of Control and Prevention
- CDCA: ácido quenodesoxicólico
- CDTA ADP: ribosiltransferasa
- CICC: Caldo Infusión Cerebro Corazón
- CIM: concentración inhibitoria mínima
- DACD: diarrea asociada a *C. difficile*
- DPA: ácido dipicolínico
- GR: germinación GerA
- HACCP: Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control
- HA ICD: infección por *C. difficile* asociada a hospitales
- ICD: infección con *C. difficile*
- LIBA: Laboratorio de Investigación en Bacterias Anaerobias
- log: logaritmo
- NaCl: Cloruro de sodio
- nm: nanómetros
- PAGE: electroforesis de gel de poliacrilamida
- PBS: Buffer de Fosfatos
- PCR: reacción de la cadena de la polimerasa
- PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado
- PMN: polimorfonucleares
- ppm: partes por millón

- RG: receptores germinantes
- RT: ribotipo
- RICD: infección recurrente por *C. difficile*
- RTCR: Reglamento Técnico Centroamericano
- TCDA: toxinas de pared celular
- UFC: unidades formadoras de colonia
- UV: ultravioleta

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 *Clostridioides difficile*

1.1.1 Generalidades

Clostridioides difficile se describió por primera vez como parte de la microbiota normal en muestras de heces de niños sanos en 1935 y la llamaron originalmente *Bacillus difficilis* por su morfología y la dificultad para cultivarla (Hall & O'Toole, 1935) y todavía se detecta en una cantidad considerable de niños sanos (Rousseau, et al., 2012); en el 2016 se transfirió del género *Clostridium* a *Clostridioides* (Lawson et al., 2016). Se creía que *C. difficile* era un comensal hasta que en los años 70 fue reconocido como el agente etiológico asociado con colitis pseudomembranosa e infección de heridas y pulmón (Bartlett, 2009). Esta bacteria es causante del 10-35% de las diarreas asociadas con antibióticos y la causa más común de diarrea nosocomial, la cual está asociada con una elevada morbilidad y mortalidad (Ricciardi et al, 2007).

C. difficile es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas y anaerobia obligada; crece más lentamente que otros clostridios y esto hace que sea más difícil de aislar porque a menudo es superada por otras bacterias en cultivos mixtos. La secuenciación del genoma de una cepa virulenta epidémica reveló que *C. difficile* comparte alrededor del 15% de sus secuencias de codificación con *C. botulinum* y *C. tetani* y alrededor del 11% de su genoma consiste en elementos genéticos móviles, algunos de los cuales contienen genes de resistencia a antibióticos. Estos elementos móviles incluyen transposones y profagos que pueden pasarse horizontalmente de una célula de *C. difficile* a otra y probablemente juegan un papel importante en la rápida evolución de esta bacteria en la última década. Algunos profagos son inducidos durante la infección y puede aislarse como partículas virales libres en muestras fecales (Meessen-Pinard et al., 2012). Además, *C. difficile* posee un genoma "abierto" con niveles extremos de plasticidad, con acceso e intercambio frecuente con múltiples entornos de host y grupos de genes bacterianos (Knight et al., 2015).

C. difficile puede detectarse en muestras de heces de muchos niños sanos menores de 1 año y un pequeño porcentaje de adultos. Aunque estos datos respaldan el potencial de fuentes endógenas de infección humana, hay evidencia que este patógeno es transmisible y adquirido de fuentes externas (Cohen et al., 2010). De hecho, *C. difficile* se encuentra a menudo en el ambiente y puede sobrevivir durante largos períodos como esporas.

1.1.2 Patogénesis de la infección con *C. difficile* (ICD)

C. difficile es una causa infecciosa importante de diarrea nosocomial que se asocia a altas tasas de morbilidad y mortalidad, además de altos costos en atención médica (Tillotson & Tillotson, 2011). Los síntomas de la infección con *C. difficile* (ICD) típicamente se presentan como diarrea acuosa, fiebre, anorexia, dolor o sensibilidad abdominal y náuseas (Jeneau et al., 2013). En ciertos casos la infección puede progresar a colitis pseudomembranosa, colitis fulminante, megacolon tóxico, shock y muerte (Bartlett et al., 1978; Warny et al., 2005; Wenisch et al., 2012). Esta bacteria es responsable de un 15 a 20% de diarrea asociada con antibióticos de origen hospitalario (Cohen et al., 2010). Los factores de riesgo para ICD incluyen el uso de antibióticos o inhibidores de la bomba de protones, aumento de la edad, cirugía gastrointestinal, baja inmunocompetencia, enfermedad crónica complicada o estancias prolongadas en centros de atención de salud (Jeneau et al., 2013). La recurrencia de ICD también es común ya que se presenta en un 20 a 35% de los pacientes que padecieron la enfermedad; de estos pacientes hasta un 45% experimentan una segunda recurrencia. En ciertos casos las recurrencias, pueden conducir al trasplante de microbiota fecal (FMT) (Shaughnessy et al., 2016).

Las esporas son la forma infectante de *C. difficile* y se transmiten a través de la ruta fecal-oral, generalmente después del contacto con superficies contaminadas (por ejemplo, bañeras, sondas de termómetro rectal), o con frecuencia después del contacto con manos contaminadas de los trabajadores de salud (Jeneau et al., 2013). Durante el curso de ICD, *C. difficile* inicia una vía de esporulación que culmina en la producción de una espora latente, lo que permite que el patógeno persista en el huésped y se disemine por medio del contacto paciente-paciente y contaminación ambiental. En efecto, cepas que no pueden formar esporas

durante ICD son incapaces de persistir en el tracto del colon del huésped y realizar transmisión horizontal (Deakin et al., 2012).

El ambiente del hospital se ha estudiado extensamente como una fuente externa para la adquisición de *C. difficile*. Las esporas de *C. difficile* contaminan el ambiente hospitalario de los pacientes hospitalizados con ICD y pueden persistir allí por al menos 5 meses, contribuyendo con la posterior transmisión y enfermedad, requiriendo prácticas de limpieza esporicida (lejía, vapor de peróxido de hidrógeno y tecnología UV, etc.) para una eliminación adecuada (Shaughnessy et al., 2016). La incidencia de ICD varía ampliamente en diferentes estudios según el tipo de hospital, tipo de cuidado (cuidado agudo vs. largo plazo), población de pacientes (ancianos frente a los jóvenes) y la presencia o ausencia de brotes nosocomiales (Yousef & Nazer, 2014). Por el contrario, se sabe poco sobre la posible presencia de esporas de *C. difficile* en el ambiente fuera de los hospitales y en el ambiente familiar de pacientes con ICD, incluido el entorno físico y los habitantes humanos y animales. Un estudio canadiense de los hogares en los que ningún individuo tenía antecedentes de ICD encontró *C. difficile* en 5.3% de los sitios en 31% de los hogares; el ribotipo 027 fue la variante más común de *C. difficile* (25% de los aislados) (Shaughnessy et al., 2016).

C. difficile tiene numerosas adaptaciones que le permite crecer y sobrevivir en el intestino de los mamíferos, incluyendo la capacidad de tolerar los ácidos biliares y degradar etanolamina, un compuesto importante que proporciona carbono y nitrógeno para el crecimiento. Además, *C. difficile* puede sintetizar y tolerar altos niveles de un compuesto bacteriostático llamado p-cresol (que contribuye al olor del estiércol de caballo) que se considera como un compuesto que puede mejorar su competitividad contra otros microorganismos intestinales (Bomers et al., 2012).

Entre las personas inmunocompetentes y que no han recibido tratamiento con antibióticos, *C. difficile* no causa problemas debido en parte a la flora comensal del intestino e inmunidad mediada por anticuerpos; sin embargo, en el ambiente de una flora de mucosa anormal o alterada, las esporas colonizan el intestino y luego germinan y las bacterias vegetativas comienzan a producir toxinas (Yousef & Nazer, 2014). Debido a que la

germinación de la espora es necesaria para la patogénesis, los compuestos que previenen la germinación de las esporas podrían ser una forma atractiva de prevenir las infecciones primarias o recurrentes (Bhattacharjee et al., 2016).

C. difficile produce dos toxinas principales, TcdA y TcdB, que afectan las reacciones fisiológicas normales en las células intestinales, resultando en colitis y diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) (Voth & Ballard, 2005). Algunas cepas hipervirulentas de *C. difficile* son capaces de producir, además de toxinas A y B, una toxina binaria (CDT) codificada por los genes *cdtA* y *cdtB* (Pasquale et al., 2012). Las toxinas A y B se sintetizan principalmente durante la fase log tardía y la fase estacionaria de crecimiento. Las toxinas TcdA y TcdB entran en las células por endocitosis mediada por receptor (Papatheodorou et al., 2010). Tanto las toxinas TcdA como TcdB son glicosiltransferasas (GTPasas) que atacan y alteran las vías de señalización intracelular reguladas por la familia Rho de pequeñas GTPasas, provocando la alteración del citoesqueleto de actina, lo que da como resultado la apoptosis e induce la secreción de una variedad de citocinas proinflamatorias. Esto produce la pérdida de la barrera epitelial intestinal al abrir las articulaciones entre las células, aumentando la permeabilidad del intestino y la acumulación de líquido, seguida de la aparición de diarrea (Jank & Aktories, 2008; Voth & Ballard, 2005). La función celular alterada interrumpe la integridad de la mucosa, activa apoptosis de células epiteliales y potencian el reclutamiento de polimorfonucleares neutrófilo (PMN) al sitio de la acción de la toxina. La infiltración de PMN es el sello distintivo de la colitis pseudomembranosa. No hay correlación entre la gravedad de la enfermedad y los niveles de toxina en materia fecal (Bobak et al., 2008).

Algunos datos demuestran que los niveles de TcdA se correlacionan bien con síntomas de la enfermedad, mientras que los anticuerpos dirigidos específicamente contra esta toxina ejercen un efecto protector. TcdA actúa principalmente en el epitelio intestinal, causando secreción de líquido, inflamación y necrosis tisular, mientras que TcdB con su tropismo celular amplio actúa como una potente citotoxina (Bobak et al., 2008). La importancia de las toxinas A y B para la patogenidad de la ICD ha suscitado controversias. Anteriormente, se creía que la toxina A era el principal factor de virulencia en la ICD, sin embargo, estudios recientes con cepas mutantes de *C. difficile* (que producen solo la toxina A o B) mostraron

que solo la TcdB es esencial para la virulencia (Lyras et al., 2009). En estudios adicionales, con los modelos de infección en hámsteres y cepas mutantes de *C. difficile*, se observó que las cepas TcdA- / TcdB + y TcdA + / TcdB- fueron capaces de causar la enfermedad (Kuehne et al, 2010; Kuehne, Cartman & MINTON, 2011).

El efecto de la toxina binaria en la patogenia no se entiende bien, pero se encuentra asociada con cepas hipervirulentas y parece aumentar la actividad de la toxina A y B en un mecanismo que se cree que interrumpe la respuesta inmune del huésped (Janoir 2016). En un estudio que involucró a 265 pacientes, aquellos infectados con cepas capaces de producir la toxina binaria tuvo una mayor tasa de letalidad que aquellos infectados con cepas que no producen esta toxina (Bacci et al., 2011). Cepas de *C. difficile* que albergan la toxina binaria pero que carecen de Toxina A y B también se han recuperado de pacientes con ICD; esto sugiere que las dos últimas toxinas no son necesariamente requeridas para causar síntomas de infección (Eckert et al., 2015). Las cepas que producen la toxina binaria, en ausencia de TcdA y TcdB, se observaron en casos de ICD en individuos inmunodeprimidos (Androga et al., 2015; Eckert et al., 2015; Grandesso et al., 2016). La toxina binaria está compuesta por dos cadenas: una molécula tiene actividad ADP-ribosiltransferasa (CDTA) y el segundo componente (cdtB) participa en la unión de la toxina a la célula huésped y es responsable de la translocación de la enzima en el citosol. La toxina binaria actúa sobre la G-actina inhibiendo la polimerización de la actina, lo que facilita la colonización por inducción de la formación de protuberancias de las células (Gerding et al., 2014).

Además de estos factores, *C. difficile* es capaz de formar una biopelícula en una superficie abiótica, pero la robustez de la biopelícula formada varía entre las cepas. Las células bacterianas se incrustan en una matriz compuesta de ADN, proteínas y polisacáridos, que incluye varias proteínas y toxinas de la pared celular (TCDA) (Janoir, 2016; Pantalón et al., 2015; Semenyuk et al., 2014). La formación de biofilm por *C. difficile* es modulada por los reguladores centrales (Spo0A y Luxs), y componentes de la superficie tales como flagelos y la cisteína proteasa Cwp84 (Dawson et al, 2012; Pantalón et al, 2015).

Existe una fuerte evidencia de la capacidad de *C. difficile* para formar biopelículas *in vivo*. En un estudio con ratas, se observó que las células de *C. difficile* formaban agrupaciones en asociación con tejido dañado, lo que podría sugerir la formación de micro-colonias (Lawley et al., 2009). La investigación demuestra que las células de *C. difficile* se asignan a comunidades multicelulares en asociación con la mucosa del huésped (Semenyuk et al., 2015). Se sabe que las biopelículas contribuyen con la resistencia a antibióticos de *C. difficile*, así como al estrés por el oxígeno (Dawson et al., 2012; Semenyuk et al., 2014) y promueven la persistencia de esporas resistentes (Crowther et al., 2014). Se hace necesario definir el papel de la formación de biopelículas en ICD y sus recurrencias.

1.1.3 Estructura de la spora, esporulación y germinación

Las bacterias colonizan ecosistemas increíblemente diversos y a menudo toleran grandes fluctuaciones dentro de un entorno particular. Una estrategia altamente exitosa que permite a una célula o población escapar de condiciones que amenazan la vida es la producción de esporas. Las endosporas bacterianas, por ejemplo, se han descrito como las células más duraderas en la naturaleza (Nicholson et al., 2000). Estas células altamente resistentes y latentes pueden soportar una variedad de tensiones, incluidas la exposición a temperaturas extremas, agentes que dañan el ADN y enzimas (Errington, 2003). La capacidad de formar endosporas parece restringida a los Firmicutes (Traag et al., 2010), uno de los primeros filos bacterianos ramificados (Ciccarelli et al., 2006). Especies formadoras de esporas están representadas en la mayoría de las clases, incluyendo las Bacilia, Clostridia, Erysipelotrichi y Negativicutes (aunque evidencia convincente para excluir esta clase ha sido presentada [Yutin & Galperin, 2013]). Las endosporas son encontradas más comúnmente en los bacilos, pero también aparecen en células filamentosas y cocos (Hutchison et al., 2016).

La diversidad de bacterias productoras de endosporas y sus variados estilos de vida sugieren que la vía de esporulación es finamente acoplada a la vida en un entorno particular, y es una ventaja de supervivencia celular, dispersión y, en algunos casos, reproducción (Hutchison et al., 2016). El modo sencillo y más conocido de esporulación implica una división celular asimétrica que conduce a la formación de una célula madre y una spora más

pequeña (Yudkin & Clarkson, 2005; Piggot & Hilbert, 2004). El inicio de la esporulación en *Bacillus subtilis* se desencadena por la falta de nutrientes y por una alta densidad celular (Errington, 2003; Piggot & Hilbert, 2004). Sin embargo, la decisión de esporular está estrictamente regulada, porque este proceso intensivo en consumo de energía sirve como último recurso para estas células hambrientas. En las primeras etapas de esporulación, la regulación genética depende principalmente del factor sigma de fase estacionaria σ^H y el regulador maestro transcripcional Spo0A (Britton *et al*, 2002; Hilbert & Piggot, 2004). Antes de la división celular asimétrica, el cromosoma se replica y cada origen de la replicación migra rápidamente a un polo diferente de la célula (Webb *et al*, 1997). Posteriormente, las regiones proximales al origen se unen a los polos opuestos y el ADN cromosómico se extiende de un polo a otro para formar un filamento axial (Kay & Warren, 1968; Ryter *et al*, 1966). La remodelación del peptidoglucano septal permite la migración de la membrana de la célula madre alrededor de la espora (Errington, 2003; Hilbert & Piggot, 2004; Gutierrez *et al*, 2010; Meyer *et al*, 2010). Eventualmente, el borde líder de la membrana migratoria de la célula madre se encuentra, y la fisión establece la doble membrana de la espora de la célula madre. Al final, la célula madre sufre muerte celular programada y lisis, lo que libera la endospora madura (Hosoya *et al*, 2007, Nugroho *et al*, 1999.).

La estructura de la espora es mucho más compleja que la de la célula vegetativa debido a sus múltiples capas. La capa exterior es el exosporium, una delgada y delicada capa hecha de proteína. Dentro de esta se encuentran las cubiertas compuestas por capas de proteínas específicas de las esporas. Dentro de estas se encuentra el cortex el cual consiste en peptoglicano de enlaces cruzados y dentro de esta se encuentra el protoplasto con la membrana celular usual y todas las demás organelas (Mandigan *et al*, 2003).

Una espora puede permanecer dormida por años, pero puede convertirse en una célula vegetativa relativamente rápido. Este proceso involucra tres fases: activación, germinación y crecimiento. La activación ocurre durante una señalización adecuada por nutrientes específicos. Las características de muchos de los genes *ger* que se requieren para la óptima germinación de las esporas de *Bacillus* sugieren que son receptores de nutrientes germinantes particulares y/o proteínas de transporte (Moir & Smith, 1994; Moir *et al*, 1990). Las proteínas

de transporte son las más probables que se involucren centralmente en la germinación de endosporas, ya que hay flujos significativos de Na^+ , K^+ y H^+ hacia el exterior, así como la posterior recaptación de K^+ en las primeras etapas de la germinación (Swerdlow et al, 1981).

Normalmente moléculas de nutrientes como aminoácidos y azúcares sirven como germinantes, actuando como iniciadores de la germinación de esporas. Además de la germinación inducida por nutrientes, hay productos químicos como la dodecilamina y el Ca^{2+} DPA que pueden inducir la germinación, y también desencadenantes físicos, incluida la alta presión hidrostática y la abrasión, pueden iniciar la germinación (Black et al, 2005; Gould, 1969; Jones et al, 2005; Moir y Smith, 1990; Moir, 2006; Paidhungat y Setlow, 2002; Setlow B., 2003; Setlow P., 2003). Después del primer contacto de la espora con el germinante, la espora se compromete a germinar en cuestión de segundos. El primer evento es el reconocimiento del germinante por una familia de proteínas de membrana tripartita que actúan como receptores (de la familia Ger). Dichas proteínas están codificadas, en general, como operones tricistrónicos que contienen tres genes de proteínas distintos, las subunidades A, B y C que forman un complejo receptor en la membrana de la espora (Paredes-Sabja et al., 2011). Aparte de utilizar metabolitos, las endosporas también pueden germinar detectando fragmentos de peptidoglicano. Esta vía de germinación es independiente de los receptores Ger, pero usa como receptor una quinasa de membrana Ser/Thr de tipo eucariótico (PrkC) (Shah et al., 2008).

Después de la activación del receptor de germinación, el núcleo de la endospora se rehidrata y los cationes del núcleo de la endospora, incluyendo el depósito grande del complejo Ca^{2+} / DPA, se liberan al ambiente (Moir, 2006). Otro proceso importante que ocurre durante la germinación es la descomposición de proteínas específicas (por ejemplo, las SASP) y de ciertas estructuras (por ejemplo, la corteza). Se cree que los metabolitos liberados durante estos procesos de degradación sirven como materias primas para la célula en desarrollo (Trunet et al., 2017).

A medida que las secuencias completas del genoma se hicieron disponibles, los estudios comparativos para buscar genes conservados de esporulación se hicieron factibles. Se han

identificado 45 genes específicos para la esporulación y además se encontraron diferencias en el contenido de genes de esporulación entre los genomas de *Clostridia* y *Bacillis*, y dificultades para identificar exactamente los genes de esporulación de *Clostridia* utilizando las secuencias de *B. subtilis* (Onyenwoke et al, 2004).

A pesar del importante papel que juegan las esporas de *C. difficile* en ICD, nuestro conocimiento de la biología de este grupo es menos que el de otros organismos bien estudiados como *B. subtilis*, el grupo *Bacillus anthracis* y *Clostridium perfringens*. Esto se debe, en parte, a la observación de que menos del 25% de las proteínas de la capa de esporas de *B. subtilis* tienen homólogos en *C. difficile*, haciendo las predicciones difíciles (Henriques & Moran, 2007). Por otra parte, no hay ortólogos de la familia de receptores de germinación GerA (GR) predichos para *C. difficile*, e incluso los componentes conservados de las vías de germinación y esporulación parecen estar reguladas diferencialmente en *C. difficile* en relación con *C. perfringens* y *B. subtilis*. La superficie de la spora de *C. difficile* es más divergente. La capa de la spora está recubierta por una capa superficial adicional, el exosporium, donde solo el grupo de ortólogos similares al colágeno BclA de *B. cereus* se conservan en cierta medida (Paredes-Sabja et al., 2014). Las señales que desencadenan la esporulación de *C. difficile* *in vivo* o *in vitro* no han sido identificadas, pero podrían estar relacionados a los estímulos ambientales, como la inanición de nutrientes, el quórum sensing y otros factores de estrés no identificados (Higgins & Dworkin, 2012).

Edwards et al (2016) demostraron que las esporas poseen alta resistencia al etanol, al peróxido de hidrógeno y al cloroformo, mientras que las células vegetativas de *C. difficile* se destruyeron rápidamente ante estos agentes.

En muchas especies de *Bacillus* y *Clostridium*, la decisión de entrar en la esporulación está regulada por varias histidinas quinasas huérfanas que pueden fosforilar el principal regulador transcripcional Spo0A. El genoma de la cepa 630 de *C. difficile* codifica cinco histidina quinasas huérfanas (CD1352, CD1492, CD1579, CD1949 y CD2492). Aunque el mecanismo por el cual Spo0A se fosforila durante el inicio de la esporulación de *C. difficile* no está clara, la ausencia de proteínas de *B. subtilis* implicadas en la transferencia del grupo

fosforilo de las histidinas quinazas a Spo0A (es decir, Spo0F y Spo0B), sugiere que el grupo fosforilo se transfiere directamente de las histidina quinazas a Spo0A, como observado en *Clostridium acetobutylicum* (Steiner et al., 2011).

La estructura general y la morfología de las esporas de *C. difficile* es similar a lo que se ha visto en otras bacterias formadoras de endosporas, pero las capas más externas son particularmente diferentes y los componentes que gobiernan el ensamblaje de la capa de esporas son divergentes a los definidos para *B. subtilis* y/o el grupo *B. cereus* (Paredes-Sabja et al., 2014). Aunque las funciones de las capas más externas (es decir, capa de esporas y exosporium) en ICD y la patogénesis no están claras, informes recientes indican sobre sus posibles funciones. Se demostró que la superficie de la spora de *C. difficile* interactúa con los receptores de superficie no identificados de las células del epitelio intestinal. Análisis TEM de células Caco-2, modelo de adenocarcinoma de colon han demostrado que las proyecciones similares a pelos presentes en la superficie de las esporas de *C. difficile* R20291 estaban cerca de la membrana plasmática y microvellosidades de monocapas diferenciadas e indiferenciadas de células Caco-2, lo que sugiere que estas proyecciones de exosporas de *C. difficile* favorecen la aproximación de esporas y células epiteliales intestinales (Mora-Uribe et al., 2016). La infección *in vitro* de macrófagos con esporas de *C. difficile* reveló que las esporas se vuelven citotóxicas para los macrófagos posiblemente al alterar la membrana fagosomal por medio de las interacciones superficie-membrana de las esporas. También se demostró que la capa de exosporium confiere hidrofobicidad a la superficie de las esporas afectando su adherencia a superficies inertes (Paredes-Sabja et al., 2014).

La germinación de esporas de *C. difficile* es iniciada por ciertos ácidos biliares (presumiblemente una señal del huésped) y glicina como co-germinante (presumiblemente una señal de nutrientes). Los ácidos biliares son ácidos pequeños y esteroides que la vesícula biliar libera en el tracto digestivo para ayudar a la absorción de las grasas y el colesterol. El hígado sintetiza dos familias de ácidos biliares: derivados del ácido cólico y derivados del ácido quenodesoxicólico (CDCA). Cada una de estas familias está conjugada con una taurina (ácido taurocólico [TA] o ácido taurochenodesoxicólico) o una glicina (ácido glicocólico o ácido glicohemodesoxicólico). La germinación de esporas de *C. difficile* es estimulada por el

ácido cólico, mientras que los derivados de CDCA inhiben la germinación mediada por ácido cólico. Según estudios previos, las esporas de *C. difficile* pueden tener una interacción más estrecha con los inhibidores de la germinación que con los activadores de la germinación (Bhattacharjee et al., 2016). Sin embargo, algunas cepas de *C. difficile* son capaces de germinar en medio rico en nutrientes sin taurocolato, sugiriendo que los mecanismos y / o la especificidad de los receptores de germinante (RG) son complejos.

C. difficile no codifica el receptor germinante clásico, embebido en membrana, tipo *ger*, en cambio, la germinación de esporas de *C. difficile* procede a través de una novedosa ruta de germinación que implica la estimulación directa de la hidrólisis de la corteza y la posterior liberación de CaDPA del núcleo de la spora (opuesta a la germinación mediada por receptor germinativo en *B. subtilis* o *Clostridium perfringens*) (Bhattacharjee et al., 2016), para lo cual se sabe que la SleC es vital para este proceso (Gutelius et al., 2014). De hecho, un estudio reciente de Francis et al. (2013) demostró que CspC, una de las tres serinas proteasas Csp codificadas por *C. difficile*, actúa como RG de sal biliar. Curiosamente, la CspC (y CspA) de *C. difficile* se piensa que no tiene acción catalítica y una única mutación puntual en CspC (G457R) altera la especificidad germinativa de las esporas de *C. difficile* y permite que las esporas germinen en presencia de quenodesoxicolato, que es el inhibidor competitivo de la germinación mediada por taurocolato (Sorg & Sonenshein, 2009). En particular, se requiere CspC para la liberación de Ca-DPA de las esporas en respuesta a la glicina y taurocolato, pero no es claro si la liberación de Ca-DPA inducida por CspC se debe a la activación directa de los canales de DPA o activación de la maquinaria de hidrólisis de la corteza (Francis et al., 2013).

La maquinaria implicada en la degradación de la corteza de esporas de *C. difficile* es similar a la encontrada en las esporas de *C. perfringens* en que las Csps y SleC son todas esenciales para la germinación de esporas en *C. difficile*. Sin embargo, la vía de señalización que conduce a la activación de SleC en respuesta al germinante difiere significativamente entre estas dos especies. La vía de señalización precisa por la cual se activa la maquinaria de hidrolización del cortex empezando por CspC no es clara (Francis et al., 2013).

1.1.4 Clasificación de *C. difficile*

Para clasificar las diferentes variedades de *C. difficile* los tres métodos más comunes son toxinotipado, fingerprinting (mediante el uso de electroforesis en gel de campo pulsado para obtener el patrón NAP) y ribotipado. Toxinotipado se basa en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Rupnik, 2008) en fragmentos A3 (Toxina A) y B1 (Toxina B) del PaLoc en comparación con la secuencia de la cepa de referencia VPI 10463 (Carroll & Bartlett, 2011). Actualmente, hay 28 toxinotipos conocidos. Sin embargo, el PCR para ribotipado es el método dominante para tipar *C. difficile* (Indra et al., 2009).

El ribotipado utiliza primers específicos complementarios a los sitios dentro del operón de ARN y se aplicó por primera vez a *C. difficile* por Gurtler (1993), que se dirigió al proceso de amplificación en la región espaciadora entre las regiones 16S y 23S rRNA. Se demostró que *C. difficile* posee múltiples copias de los genes de rRNA, que no solo variaban en número entre las cepas sino también en tamaño entre diferentes copias en el mismo genoma. Este enfoque fue simplificado por Cartwright et al. (1995) quien lo aplicó a 102 aislamientos obtenidos de 73 pacientes sintomáticos. Usando los mismos primers que Gurtler, sus fragmentos de PCR de rango de tamaño similar podrían separarse mediante electroforesis directa en gel de agarosa en lugar de geles de PAGE desnaturalizantes. Además, demostraron que los patrones de bandas no se vieron afectados por la cantidad de ADN utilizada en la reacción, y que el marcador ribotipo PCR era estable y su expresión reproducible. El poder discriminatorio se comparó con los serogrupos de Delmée y dio diferentes patrones de bandas para cada uno de los 19 serogrupos (Brazier, 2001).

El fingerprint se realiza por medio de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) que permite analizar todo el genoma después de la digestión con endonucleasas de restricción de corte raro, como SmaI, KspI, SacII o NruI, que producen hasta 10 polimorfismos de longitud de fragmento por cepa. PFGE se ha aplicado con éxito a muchos géneros diferentes y se utilizó para investigar 22 aislamientos de *C. difficile* de un brote en una instalación de atención a personas mayores y 30 aislamientos no relacionados epidemiológicamente. Este método es muy discriminatorio, pero entre las desventajas se encuentran el costo inicial del

equipo, la lentitud del procedimiento de electroforesis y su complejidad. Bidet et al. (2000) comparó los tres métodos y concluyó que la ribotipificación de la PCR, aunque marginalmente menos discriminatoria que la PFGE, ofrecía la mejor combinación de ventajas. Se han encontrado aislamientos no tipificables por PFGE debido a la degradación del ADN extraído, los cuales se han demostrado pertenecen al serogrupo G, que corresponde al ribotipo 1 de la PCR en la biblioteca de Stubbs et al. (Brazier, 2001).

En un estudio se analizó el contenido genómico de 48 cepas de *C. difficile* que representan 21 ribotipos diferentes. El cálculo de dendrogramas basados en distancia de matriz utilizando el método de unión de vecinos para 14 genes conservados (genes estándar de marcadores filogenéticos) de los genomas de las cepas de *C. difficile* demostraron que los genes de cepas con el mismo ribotipo generalmente se agrupan juntos. Además, ciertos ribotipos siempre se agrupan y forman grupos de ribotipos, es decir, ribotipos 078, 033 y 126, así como los ribotipos 002 y 017, lo que indica su relación. Comparaciones, de los contenidos de genes de genomas de ribotipos que se agruparon de acuerdo con el análisis de genes conservados, revelaron que el número de genes comunes de los pertenecientes a cada uno de estos tres grupos de ribotipos, fueron muy similares para el grupo 078/033/126 (a lo sumo 69 genes específicos entre las diferentes cepas con el mismo ribotipo) pero menos similar para el grupo 002/017 (86 genes diferencia). Parece que el ribotipo es indicativo no solo de un patrón específico del espaciador intergénico ARNr 16S-23S amplificado pero también refleja diferencias específicas en las secuencias de nucleótidos de los genes conservados analizados en este estudio (Kurka et al., 2014). Lemee et al. (2004) determinó que *C. difficile* tiene una población clonal y la correlación entre la ribotipificación y el toxinotipado es muy alto. Un método de tipado adicional usa el análisis de endonucleasa de restricción.

De acuerdo con el análisis de microarrays, hay 4 clades principales de cepas de *C. difficile*: el hipervirulento, el toxina defectuoso (toxina A neg pero toxina B posit.), el HA1 (principalmente aislamientos humanos) y HA2 (principalmente aislamientos de animales). Los genomas de algunas cepas hipervirulentas presentan varias deleciones en comparación con la cepa de referencia 630, el genoma del cual ha sido secuenciado (Stabler et al., 2006).

Recientes estudios genómicos comparativos sobre *C. difficile* se centran en cepas con PCR-ribotipo 027, 078 y cepas relacionadas con estos ribotipos. Aproximadamente el 50% de todas las infecciones por *C. difficile* en América del Norte y el Reino Unido pertenecían al PCR-ribotipo 027 durante 2003 a 2005, mientras que, por otro lado, solo el 5% de todas las ICD en 34 hospitales europeos se tipificaron como PCR-ribotipo 027 en 2008. Los ribotipos PCR más comunes en Europa son 014/020 (16%), 001 (9%) y 078 (8%) (Kurka et al., 2014).

1.1.5 Epidemiología del ICD

C. difficile infecta tanto a los animales como a los humanos, y las diferencias y similitudes en estas infecciones fueron revisadas recientemente. Los ribotipos predominantes de *C. difficile* varían con las especies animales y la ubicación geográfica, pero existe una superposición entre las cepas animales y las humanas.

C. difficile causa diarrea en lechones y caballos. Algunos aislamientos de cerdos y terneros diarreicos son indistinguibles de una cepa patogénica humana importante, el ribotipo 078. La presencia de *C. difficile* en animales utilizados como alimento es una indicación del potencial de transferencia de este patógeno a la carne durante el sacrificio y el procesamiento de los animales. Algunos estudios informan la presencia de esta bacteria en 3-5% de ganado de engorde en Canadá, 6.6% de rumiantes (bovinos y caprinos) en 30 granjas suizas, 8.6% de cerdos holandeses en sacrificio, 4.9% de pavos en Italia, 2.3% de pollos de engorde en Texas, y en ciervos de cola blanca criados en 36.7% de granjas evaluadas en Ohio. *C. difficile* también se ha detectado en muestras fecales de ovejas en los Países Bajos (Doyle, 2014).

En los últimos años se ha reportado que la epidemiología de ICD en humanos ha manifestado cambios importantes. Recientemente datos de Canadá, Europa y los Estados Unidos revelan un aumento en la incidencia y gravedad de la enfermedad. Esto ha sido atribuido a múltiples factores, incluyendo cambios en la situación demográfica, aumento del uso de antibióticos de espectro amplio y aparición de una cepa hipervirulenta conocida como

NAP1 / BI / 027. Esta variedad es caracterizada por una mayor producción de esporas y niveles más altos de toxinas A y B, la presencia de toxina binaria y resistencia a antibióticos fluoroquinolónicos más nuevos, como la moxifloxacina. La propagación mundial de esta cepa ha sido confirmada y esto puede ser explicado por el movimiento de personas, animales, vectores y objetos inanimados en fronteras internacionales (Yousef & Nazer, 2014). El ribotipo 078, que se ha asociado con alimentos de animales y humanos, es una variedad emergente adicional de *C. difficile* en Europa y EE. UU (Indra et al., 2015).

Otros datos revelan que la prevalencia del ribotipo hipervirulento 027 ha ido disminuyendo en algunos países. Desde la aparición y propagación del ribotipo 027, los datos de Europa en el año 2010 reportaban que la prevalencia de esta cepa estaba disminuyendo. Inglaterra vio una disminución dramática en la prevalencia del ribotipo 027 desde el establecimiento de una red nacional de ribotipificación en 2007. El ribotipo 027 disminuyó significativamente entre 2007 y 2010, pasando del 55% al 21% de prevalencia, coincidiendo con una disminución significativa en la incidencia de ICD y la mortalidad relacionada. La disminución en la prevalencia de 027 probablemente se debió a reducciones significativas en el uso de fluoroquinolonas durante este período, aunque el aumento en la conciencia y el control de la infección también pudieron haber afectado la incidencia de la enfermedad (Wilcox et al., 2012).

Otro de los cambios importantes es la aparición de casos de infección con *C. difficile* en personas que no poseen los factores de riesgo clásicos. Antes, la ICD se consideraba una enfermedad nosocomial de personas mayores y ahora se presentan casos en personas más jóvenes que no han tenido contacto con ambientes hospitalarios. En un estudio reciente en los Estados Unidos, un 32% de todos los casos de ICD fueron clasificados como adquiridos en la comunidad (Lessa, 2013). Además, se ha visto un incremento en diagnósticos en personas jóvenes con ningún historial de uso de antibióticos (Gladys et al, 2014).

En un estudio para determinar la prevalencia de *C. difficile* en casas de personas con ICD recurrente (R-ICD), los sitios más comunes con *C. difficile* positivo fueron la aspiradora (41%), el inodoro (27%) y el lavabo del baño (17%). Nueve (90%) de 10 hogares con

múltiples muestras positivas para *C. difficile* tenían un solo genotipo presente cada uno. Sin embargo, a pesar de la presencia de la bacteria, se desconoce si se encontró como causa o consecuencia de R-ICD (Shaughnessy et al., 2016).

La dosis infecciosa de *C. difficile* requerida para causar la enfermedad depende de las características de virulencia de una cepa y la susceptibilidad del huésped. No hay datos de dosis infecciosa para humanos, pero un experimento con ratones demostró que la exposición a <7 esporas / cm² de espacio en la jaula durante 1 hora seguida de una dosis de clindamicina fue suficiente para causar enfermedad de forma reproducible en animales sanos. Si bien no es seguro cómo esto se relaciona con las infecciones humanas, indica que la dosis infecciosa puede ser bastante baja, particularmente en aquellos que están siendo tratados con antibióticos (Lawley & Young, 2013).

1.1.6 Casos comunitarios de *C. difficile*

Las infecciones asociadas con la comunidad se definen como aquellas que ocurren en pacientes sin hospitalización en los últimos 3 meses y se diagnosticaron en una clínica para pacientes ambulatorios o se diagnosticaron dentro de las 48 horas posteriores al ingreso en el hospital. Si los síntomas aparecen después de 48 horas, es probable que la infección haya sido adquirida en el hospital. Aparentemente, algunos casos supuestos de CA no tienen los factores de riesgo tradicionales para la infección, pero es posible que una investigación posterior revele que el paciente haya tomado antibióticos o haya tenido un contacto cercano con un paciente hospitalizado. Sin embargo, para otros no hay fuentes de infección reconocidas ni factores de riesgo obvios. (Hensgens et al., 2012).

En los últimos años, *C. difficile* ha causado un número cada vez mayor de casos fuera de los hospitales, entre personas más jóvenes y sanas sin antecedentes recientes de uso de antibióticos. La epidemiología y la transmisión de esta infección adquirida en la comunidad no se conocen bien. Aunque el uso de antibióticos y supresores de ácido gástrico parece estar relacionado con la ICD asociada a la comunidad (CA-ICD), el 27% de los casos de CA-ICD en un estudio estadounidense no recibió antibióticos durante los 6 meses previos a la

enfermedad y el 17% no tiene factores de riesgo generalmente asociados con ICD (Kuntz et al, 2011). En comparación con los pacientes con ICD adquirido en el hospital (HA-ICD), los pacientes con ICD comunitaria (CA-ICD) tiene una mortalidad más baja y hospitalizaciones más cortas, pero algunos pueden tener un peor pronóstico (Jeneau et al., 2013).

Se han producido incrementos en CA-ICD en los Estados Unidos y en Europa. Los informes de la CDC en 2005 describieron por primera vez infecciones graves en 4 estados en personas consideradas con bajo riesgo de infección (Centers for Disease Control and Prevention, 2005). El sistema de vigilancia en Connecticut en 2006 encontró que aproximadamente el 25% de los casos de ICD no tenían factores de riesgo establecidos (Rabatsky et al., 2008). Se examinaron los registros de casos de ICD que ocurrieron durante aproximadamente 15 años en Olmstead Co., Minnesota, para detectar diferencias entre los casos de CA y HA. La incidencia de ambos tipos de casos aumentó significativamente durante este tiempo. Los casos CA-ICD representaron alrededor del 41% del total y eran más jóvenes, más propensos a ser mujeres, y tenían infecciones menos graves y menos condiciones comórbidas (Khanna et al., 2012).

Los datos recientes del Reino Unido indican que las tasas de ICD en general han disminuido desde aproximadamente 2006-2007, pero la proporción de casos adquiridos en la comunidad han aumentado (Jen et al., 2008). Un estudio intensivo de 3 meses en los Países Bajos en 2007-2008 de inicio comunitario de ICD encontró que el 26% de los pacientes no habían usado antibióticos durante los 6 meses previos a la infección ni habían sido ingresados en una institución de salud el año anterior. Se detectaron 13 ribotipos de PCR diferentes, y algunos de ellos nunca se habían detectado en brotes hospitalarios (Bauer et al., 2009).

La aparición de casos comunitarios de ICD hace surgir la pregunta acerca de las posibles fuentes de contaminación en el ambiente fuera del hospital. Los humanos y las mascotas pueden portar *C. difficile* de forma asintomática. Las tasas de prevalencia de portadores varían según el grupo, por ejemplo, de 6 a 13% para adultos sanos, de 20 a 30% para pacientes recientemente hospitalizados y de 51% para residentes de centros de atención a largo plazo durante un brote de ICD, lo que concuerda con el aumento de portadores como resultado de

la exposición a la contaminación ambiental y una mayor exposición a antimicrobianos en hospitales y centros de atención a largo plazo (Galdys et al., 2014). Para el caso de los recién nacidos y bebés sanos se reporta hasta 70% de colonización por *C. difficile*. La colonización por *C. difficile* se ha demostrado en 10% de los perros domésticos sanos y en hasta 40% de los gatos y perros en clínicas veterinarias, aunque se desconoce si esto se relaciona con la transmisión de ICD a humanos. En un estudio de perros domésticos, en los pocos casos en que se detectó en un hogar cepas caninas y ambientales de *C. difficile*, los aislamientos exhibieron diferentes ribotipos, aunque la mayoría de las cepas de *C. difficile* representaban cepas toxigénicas previamente reportadas en humanos (Shaughnessy et al., 2016).

En los Países Bajos, se observa una superposición entre la ubicación de las granjas porcinas y la aparición de infecciones por *C. difficile* ribotipo 078 en humanos, que aumentan en prevalencia. El hecho de que las infecciones con ribotipo 078 en humanos ocurrieron en una población más joven y fueron más frecuentemente adquiridas en la comunidad que las infecciones con ribotipo 027, junto con el hecho de que 078 es el ribotipo de PCR predominante en lechones, sugiere una fuente común (Goorhuis et al., 2008).

1.1.7 Recuperación de *C. difficile* en medios de cultivo

Una consideración importante en el estudio de la transmisión de *C. difficile* y las fuentes ambientales es la eficiencia de métodos para la germinación óptima de las esporas y el crecimiento de bacterias vegetativas. Varios medios de cultivo y técnicas se han utilizado para investigar la prevalencia del microorganismo. Por ejemplo, esporas de 108 cepas de *C. difficile* (69 toxigénicos, 39 no toxigénicos) no calentadas y esporas calentadas a 80 °C durante 10 minutos mostraron baja germinación en un medio sin lisozima, pero esta aumentó en mil veces en presencia del compuesto (5 µg / ml) y en otras 100 veces (dando 100% de germinación) después del tratamiento con tioglicolato de sodio y la inoculación en un medio que contiene lisozima (Lund & Peck, 2015).

También se ha reportado que la adición de la sal biliar de taurocolato de sodio a un medio selectivo aumenta la recuperación de esporas de *C. difficile* aisladas de muestras clínicas,

después de aplicar un choque térmico a 56 ° C durante 10 minutos para inactivar células vegetativas de bacterias (Lund & Peck, 2015). Se informó que el taurocolato (y otros colatos) y la glicina actúan como co-germinantes para las esporas de *C. difficile* (Lund & Peck, 2015), pero las esporas de diferentes aislamientos clínicos difieren en respuesta a las sales biliales, según el método empleado (Heeg et al., 2012). Por ejemplo, en agar infusión cerebro-corazón la germinación se produjo y no aumentó con la inclusión de taurocolato. Por otro lado, la inclusión de lisozima (5 µg / ml) en un medio selectivo que contiene colato de sodio (una alternativa menos costosa a taurocolato), aumentó la recuperación de *C. difficile* de ambientes de sala de hospital, mientras que la exposición previa de hisopos con tioglicolato alcalino no aumentó aún más la recuperación. En una evaluación de los métodos de cultivo para la recuperación de la cepa toxigénica *C. difficile* ATCC 9689 de heces y muestras de hisopo, el método más sensible fue el choque térmico (80 C por 10 min) seguido de enriquecimiento en un medio que contiene caldo de ciclosporina-cefoxitina manitol con taurocolato, lisozima (5 µg / ml) y cisteína, seguido de plateo en un medio nutritivo con 5% de sangre de oveja (Hink et al., 2013). En general, se ha observado que el uso del tratamiento químico con lisozima resulta en un daño subletal a las capas propias de la spora y sus enzimas asociadas favoreciendo el crecimiento en presencia de sales biliares (Permpoonpattana et al., 2011, 2013). Por ejemplo, la eliminación del exosporium de las esporas de *C. difficile* resulta en un aumento de formación de colonias en un medio que contiene taurocolato (Escobar-Corte's et al., 2013). El uso de lisozima y taurocolato en un medio de cultivo puede dar una recuperación máxima de esporas de *C. difficile*. Se ha visto también que la adición de sangre a los medios de cultivo es ventajosa ya que esta puede ser una fuente adicional de lisozima (Lund & Peck, 2015).

De acuerdo con Limbago et al. (2012), la mejor recuperación de una cepa de *C. difficile* de muestras de carne es por medio de enriquecimiento en caldo infusión cerebro-corazón seguido de plateo en agar sangre o en medios de agar selectivos con taurocolato. Tyrrell et al. (2013) informaron que el tratamiento con alcohol seguido de plateo en un medio selectivo que contiene sangre de caballo y taurocolato dio la mayor recuperación de muestras fecales positivas para toxina. En el mismo estudio, un medio de enriquecimiento selectivo que contiene lisozima y taurocolato, sin pretratamiento con alcohol, seguido de un plateado en

medio selectivo que contenía sangre de caballo y taurocolato, permitió la recuperación de *C. difficile* del 9% de muestras toxina positiva que fueron negativas en el plateo directo. Otro estudio demostró que el pre-enriquecimiento en caldo de carne cocida antes del plateo en un medio selectivo mejoró la recuperación; sin embargo, algunas muestras fueron positivas en cultivo directo pero no después del enriquecimiento (Lund & Peck, 2015).

Se necesita tomar en consideración las condiciones anaeróbicas estrictas utilizadas para cultivo de *C. difficile* (Singer, 2010). Las esporas de muchos *Clostridium* spp. pueden sobrevivir y germinar en condiciones aeróbicas, pero las bacterias vegetativas serán inactivadas en tales condiciones. De hecho, el inicio del crecimiento de clostridios puede prevenirse mediante presencia de bajos niveles de oxígeno. Necesariamente una detección sensible de bajos números de esporas viables de algunos *Clostridium* spp. por medio de cultivo requiere de condiciones estrictamente anaeróbicas (Lund & Peck, 2015). Pese a todo esto, se ha logrado el aislamiento exitoso de *C. difficile* en medio de cultivo sin incubación en una cámara anaeróbica (Cadnum et al., 2014), utilizando medio con cisteína como agente reductor y que fue hervido antes de utilizar para eliminar el oxígeno; no hubo ninguna demostración de que un número muy bajo de *C. difficile* se lograra aislar, y la sensibilidad del medio no fue determinada lo cual es necesario para determinar la incidencia de la bacteria (Lund & Peck, 2015).

Pese a las dificultades técnicas para el cultivo en el laboratorio y la naturaleza fastidiosa de *C. difficile*, ningún estudio se ha dado a la tarea de realizar una evaluación sistemática de los factores que pueden afectar el crecimiento de este microorganismo. Los estudios de aislamiento a partir de alimentos se han enfocado en aplicar los mismos métodos de cultivo que se utilizan en clínica, sin tomar en cuenta el efecto que diferentes factores intrínsecos y extrínsecos asociados con alimentos podrían tener sobre *C. difficile*. La optimización de metodologías de cultivo es crucial para la posterior evaluación del comportamiento de *C. difficile* en alimentos, de manera que se pueda generar mayor conocimiento acerca del eventual papel de esta bacteria como patógeno de transmisión alimentaria.

1.2 Productos cárnicos

Históricamente el sector cárnico a través de todo su proceso, desde la crianza del animal hasta el consumo del producto, provee una serie de actividades relacionadas que generan trabajo y contribuyen a la economía del país. En el 2019 se estima que en Costa Rica había 1 023 953 cabezas ganado vacuno y 385 373 cabezas de ganado porcino destinados para la producción de carne. Debido a la necesidad de utilizar el 100% de la canal, muchos de los empresarios dedicados a este sector se asocian o fundan empresas de producción de embutidos y de esta forma aprovechan al máximo los recortes (INEC, 2021).

Por otro lado, el consumo de carne y de productos cárnicos se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como la obesidad, el cáncer y los accidentes cerebrovasculares. Los cambiantes requisitos de los consumidores y la creciente competencia ha impulsado la búsqueda de nuevos ingredientes y nuevas tecnologías para el procesamiento de los productos cárnicos (Weiss et al., 2010). Por otra parte, factores como menos tiempo para elaborar alimentos, incorporación de la mujer a la fuerza laboral, la preferencia de productos fáciles y rápidos de preparar, productos de precio accesible y productos con buen sabor han hecho de los embutidos un producto de consumo masivo (Aguilar et al, 2001).

En Costa Rica, la industria de los embutidos y el procesamiento de carne ha venido evolucionando desde operaciones manuales hasta la situación actual, con el establecimiento de plantas procesadoras con diferentes dimensiones, diversos grados de automatización en sus procesos y condiciones de infraestructura específicas para asegurar productos de calidad e inocuos. En los últimos años, esta preocupación por la calidad de los productos es lo que les ha permitido a las empresas del sector cárnico costarricense experimentar un aumento tanto en el volumen de producción de los alimentos como en la variedad de los embutidos ofrecidos a nivel nacional, entre los que se pueden citar mortadela, salchichón, salchichas, paté, salame, chorizo y jamones (Guillén, 2007).

Costa Rica produce, por mes, más de 5 mil toneladas de embutidos por mes, junto con jamón prensado, *bacon*, y mortadela. Dos empresas grandes costarricenses producen más del 70% de la producción nacional. Además, hay tres o cuatros empresas medianas y muchos micro negocios de carnicerías donde elaboran el famoso "salchichón" que no falta en la mayoría de los restaurantes del país tico. Este embutido se elabora con carne de res en trozos, lo que le brinda una mordida cárnica y se usa funda curva 40 milímetros (Escoto, 2019).

Centroamérica es una región que año a año va incrementando su producción y, también, las intraexportaciones entre sus países. En esta balanza, Costa Rica y Guatemala son los que más exportan aprovechando sus cadenas de comercialización en toda la región. Esta situación permite que sea un sector atractivo para la inversión y para la atención de los grandes fabricantes mundiales de maquinaria, equipos y consumibles así como productores de materias primas y aditivos (Escoto, 2019).

En Costa Rica el Reglamento técnico RTCR 411:2008 Productos Cárnicos Embutidos: Salchicha, Salchichón, Mortadela y Chorizo (Especificaciones N° 35079-MEIC-MAG-S) es el que define las condiciones para la preparación de los embutidos. Los embutidos son productos elaborados a base de una mezcla de carnes y menudencias, aditivos alimentarios, especias, con o sin agregados de origen vegetal, enfundados en envolturas naturales o artificiales de tal manera que se obtiene un producto inocuo, agradable y apto para el consumo humano.

Los aditivos utilizados en este tipo de productos tienen funciones tanto de sabor como de características sensoriales. A continuación, se detallan aquellos más comunes:

- Sal: ayuda en la conservación, sabor, acentúa el color, fija el agua, favorece la emulsificación. Se utiliza a concentraciones del 2%.
- Fosfatos: aumentan la fijación de agua en la carne, influyen indirectamente en su suavidad, disminuye la pérdida de proteínas, emulsiona las grasas, reduce el encogimiento. La carne aumenta de 16 a 96% en volumen, el corte del embutido es parejo y liso, se usa alrededor del 6-7% de concentración.

- Nitritos y nitratos: Le da el color al embutido y evita el crecimiento de microorganismos patógenos. Se permite hasta 365 mg/kg residual de nitrito.
- Eritorbato de sodio: funciona como antioxidante y estabilizante permitiendo mantener el color y sabor natural de los alimentos y prolongar el tiempo de almacenamiento sin ningún tipo de toxicidad ni efectos secundarios. Actúa como acelerador del curado en embutidos, además de que les proporciona una coloración más uniforme y un sabor más agradable.
- Lactato: las sales de lactato se usan ampliamente en la industria de la carne por su capacidad para mejorar el sabor, la seguridad y la vida útil, y varios estudios han informado sobre la actividad antimicrobiana contra varios microorganismos patógenos de deterioro y transmitidos por los alimentos (Aymerich et al., 2005).
- A parte de estos aditivos se les adiciona especias para conferirle sabor al embutido.

Las operaciones que se utilizan para la elaboración de productos cárnicos varían dependiendo el tipo de embutido, sin embargo, ninguna de ellas excepto la cocción, tienen efecto sobre la microbiota de la mezcla. Para los embutidos cocidos se les aplica un tratamiento térmico que alcance en su punto más frío 72°C por el tiempo que garantice la inocuidad del producto.

En este sentido, se han realizado estudios sobre la resistencia de las esporas de *C. difficile* a diferentes condiciones. Lim et al. (2016) realizaron un estudio sobre la resistencia de las esporas a los aditivos utilizados en embutidos, al probar nitrito de sodio (250 ppm), nitrato de sodio (4000 ppm) y metasulfito de sodio (1000 ppm) no observándose ningún tipo de efecto bactericida. Rodríguez-Palacios y LeJeune (2011) determinaron la resistencia al calor en diferentes condiciones encontrando que a 85°C por 15 min o 96°C por 2 min se reduce la probabilidad de recuperación de las esporas en carne.

Respecto al comportamiento de *C. difficile* en alimentos, no existen estudios formales sobre su capacidad de crecimiento o sobrevivencia en el producto terminado durante el almacenamiento. El uso de modelos predictivos se constituye en una opción práctica para este tipo de estudios. Para realizar modelos predictivos en productos cárnicos se utilizan los

métodos de análisis basados en medios de cultivos ya que permiten tener una estimación del número de bacterias presentes en el producto alimenticio (USDA, 2018).

1.3 Presencia de *C. difficile* en alimentos

C. difficile se ha aislado de varios animales y una gran variedad de alimentos derivados de estos, pero no hay pruebas suficientes para confirmar la hipótesis de una enfermedad transmitida por alimentos o zoonosis. El cuadro 1 muestra un resumen de la detección de *C. difficile* en los alimentos.

Probablemente, la primera descripción de *C. difficile* en los alimentos fue hecha en 1996 por Broda et al. En este estudio, el microorganismo se aisló de muestras descompuestas de carne envasada al vacío. Sin embargo, *C. difficile* se ha encontrado también en el tracto intestinal de muchos tipos de animales comestibles, incluyendo ganado, cerdos, ovejas y aves de corral (Hensgens et al., 2012; Koene et al., 2012). Ribotipos encontrados en bovinos, porcinos y aves de corral son los que causan enfermedades en humanos. Informes de la prevalencia de *C. difficile* toxigénico en muestras de carne van desde 75 al 100% de las muestras analizadas (Hensgens et al., 2012). En América del Norte tasas relativamente altas de prevalencia han sido reportadas en productos de carne cruda; en algunos estudios se ha reportado la presencia de *C. difficile* hasta en un 42% de carne de vacuno, un 41% de carne de cerdo y un 44% de muestras de pavos. Además, *C. difficile* toxigénico se encontró en 23-50% de carnes crudas en los Estados Unidos, en 14% de las salchichas de verano listas para comer y en 63% de braunschweiger listas para el consumo (Songer et al., 2009). Ribotipos 078 y 027, que se encuentran comúnmente en infecciones humanas, fueron detectados. La mayoría de las cepas aisladas de alimentos tienen un genotipo idéntico al de los aislamientos humanos y animales de la misma área geográfica u otras partes del mundo (Rupnik & Songer, 2010).

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile*.

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Productos cárnicos (salchicha, ternera / cerdo / pavo molido, chorizo y salchicha de hígado de cerdo)	88	42,00	73% de los aislamientos identificados como ribotipo 078 y 27% de los aislamientos identificados como ribotipo 027	Tuscon (EUA)	Songer et al. (2009)
Carne de res, cerdo y pollo	84	0		Austria	Indra et al. (2009)
Ensalada lista para comer	40	7,50	75% de los aislamientos identificados como ribotipo 017 (A- / B +) y 25% de los aislamientos identificados como ribotipo 001	Escocia	Bakri et al. (2009)
Carne molida mixta (muestras compuestas por cerdo y ternera)	70	4,29	66,67% de los aislamientos identificados como ribotipo AI-57 (AI se refiere al aislado en Austria) y 33,33% de los aislamientos identificados como ribotipo 053	Austria	Jöbstl et al. (2010)
Carne de vacuno envasada al vacío	13	15,38	Se analizaron 8 muestras deterioradas y 5 muestras no deterioradas	Estado de São Paulo, Brasil	Marques (2010)

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile* (continuación).

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Carne de pollo	203	12,80	Aislamientos identificados como ribotipo 078	Canadá	Weese et al. (2010)
Productos cárnicos (venta minorista)	40	7,50	Muestras de carne de cerdo molida, salchicha ahumada cerdo y pavo molido	Texas (EUA)	Harvey et al. (2011)
Pescados y mariscos	119	4,80	80% de los aislados identificados como ribotipo 078 y 20% mostró perfil toxigénico A- / B-	Canadá	Metcalf et al. (2011)
Carne (carne molida, ternera, cerdo y de pollo)	147	11,50	6.25% de los aislados presentaron al menos un gen de virulencia evaluados (A- / B +), 35% de los aislamientos presentó los genes tcdA y tcdB (A + / B +) y el 58,75% de los aislamientos no presentó los genes tcdA y tcdB (A- / B-)	Campinas (Brasil)	Tsuchiya (2012)
Productos cárnicos	102	2,00	Aislamientos identificados como ribotipo 078	Pittsburgh (EUA)	Curry et al. (2012)

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile* (continuación).

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Productos de carne Cerdo	31	35,48	Aislamientos identificados como ribotipo 078	Pittsburgh (EUA)	Curry et al. (2012)
Carne molida	956	0		EUA	Kalchayanand et al. (2013)
Carne	200	2	Aislamientos positivos para genes <i>tcdA</i> y <i>tcdB</i> pero negativos para la delección de los genes <i>tcdC</i> y <i>cdtB</i> .	Costa Rica	Quesada et al. (2013)
Productos cárnicos	133	2,30	El 25% de los aislamientos como ribotipo 078, 50% de aislamientos identificados como ribotipo 014, 12,5% de los aislados identificado como ribotipo UCL57 y 12,5% de los aislados identificado como ribotipo UCL378	Bélgica	Rodríguez et al. (2014)
Productos cárnicos listo para el consumo (riñón bovino estofado y ternera cocido)	395	12,40		Costa de Marfil	Kouassi et al. (2014)

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile* (continuación).

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Carne (búfalo, caprino, ovino, bovino de ganado vacuno joven y ganado lechero adulto)	660	2,00	53,9% de los aislados identificados como ribotipo 078, 30,8% de los aislados presentaron los genes tcdA y tcdB, y 7.7% de los aislados mostró el gen tcdB	Irak	Rahimi, Jalali, Weese (2014)
Pescado y mariscos	67	4,50	Cepas aisladas de mejillones y salmón presentaron el perfil toxigénico V y la cepa aislada de camarón presentó el perfil toxigénico XII	Texas (EUA)	Norman et al. (2014)
Productos cárnicos (carne de res, hamburguesa después modelada y hamburguesa después congelación)	100	7,0	28,5% de los aislamientos identificados como cepas toxigénicas	Irak	Esfandiari et al. (2014)
Carne de cerdo	100	2,00	Aislado muestra el perfil toxigénico A- / B-	Connecticut (EUA)	Mooyottu et al. (2015)
Comida para el consumo doméstico	188	0,53	Aislar identificado como ribotipo 078	Bélgica	Rodríguez et al. (2015)

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile* (continuación).

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Alimentos árabes listos para el consumo	368	1,36	20% de los aislamientos tenían la genes tcdA, tcdB y cdtB; 80% de los aislados presentaron el gen tcdA y tcdB	Irak	Rahimi, Afzali, Baghbadorani (2015)
Moluscos bivalvos	925	3,90	22,2% de los aislados identificados como ribotipo 078/126, 8,3% de aislamientos identificados como ribotipo 010 y 19,4% de los aislados identificado como ribotipo 001	Sur de Italia	Troiano et al. (2015)
Carne de pollo (75 muestras de muslo con muslo, 75 muestras mama, 60 muestras de ala, 60 muestras muslo y 40 muestras de hígado)	310	8,06	20% de los aislamientos presentados gen tcdB y 32% de los aislamientos presentó el gen tcdA. Ninguno aislado presentado gen para la toxina binaria	Turquía	Guran, Ilhak (2015)
Productos cárnicos (carne de hamburguesa carne molida, pepita de pollo, chorizo y carne enlatada)	570	1,20	83,3% (5/6) de los aislados identificados como cepas toxigénicas	Irak	Rahimi, Khaksar (2015)

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile* (continuación).

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Carne (vacuno, ovino y cabra)	600	1,50	61,1% de los aislamientos identificados como ribotipo 078. No detectado contaminación en muestras de carne cabra	Jazan (Arabia Saudita)	Bakri (2016)
Alimentos para el consumo en el hospital (gelatina y verduras / pan / cereales)	1.871	0,22	Aislado de muestra de gelatina identificado como ribotipo 001 y el aislado de la muestra de verduras / pan / cereales identificados como ribotipo 027	Saint Louis (EUA)	Kwon et al. (2016)
Comida casera	188	1,06	Aislamientos identificados como ribotipo 078	Ohio (EUA)	Rodriguez-Palacios, Ilic, Lejeune (2017)
Productos cárnicos de cerdo listos para consumo (colon / piel / oreja / cuero, cocido a fuego lento)	65	23,00	20% de los aislamientos tenían el gen tcdA y tcdB	Taiwan	Wu et al. (2017)
Productos cárnicos de cerdos crudos (carne suelo y piel)	62	27,00	9% de los aislamientos tenían el gen tcdA y tcdB	Taiwan	Wu et al. (2017)

Cuadro 1. Prevalencia de la contaminación de los alimentos por *C. difficile* (continuación).

Alimento	Cantidad de muestras	Prevalencia de <i>C. difficile</i> (%)	Observaciones	Local	Referencia
Raíces vegetales de cultivo convencional y orgánico (papa, remolachas, cebollas y zanahoria)	100	30,00	51,2% de los aislamientos identificados como cepas toxigénicas, siendo el 81,8% de las aislamientos identificados con perfil A + B + CDT- (81,8%) y 2,3% de los aislados presentó perfil A + B + CDT +	Australia	Lim et al. (2018)
Verduras de hoja y raíces (patatas, e jengibre, rúcula, hojas diente de león, lechuga y achicoria)	154	28,00	El 8,7% de los aislamientos (10/115) fueron identificadas como cepas toxigénicas, ribotipo 014/020	Eslovenia	Tkalec et al. (2019)
Alimentos cocinados para consumo hospitalario (pasta, arroz, sopa, patata, espinaca, zanahoria, guisante, calabacín y carne de pollo / ternera / cerdo)	296	0,30	Aislar identificado como ribotipo 014/020, perfil toxigénico 0 (tcdA + tcdBcdtA- cdtB-)	Italia	Primavilla et al. (2019)
Ensalada para consumo en el hospital (tomate y lechuga)	54	1,90	Aislar identificado como ribotipo 126, perfil toxigénico V (tcdA-tcdB- cdtAc dtB-)	Italia	Primavilla et al. (2019)

Por otro lado, las tasas de prevalencia más bajas (de hasta 4.3% y 2.7% en carne de res molida/cerdo y carne de pollo, respectivamente) han sido reportados en Europa. A diferencia de muchos informes de América del Norte, una encuesta de 1755 muestras de carne al por menor, incluida la carne de res molida, aves de corral molidas, pechuga de pollo, y chuletas de cerdo, probadas por los laboratorios estatales de salud pública de los Estados Unidos y 60 muestras analizadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, no detectó *C. difficile* (Limbago et al., 2012).

Las diferencias en la prevalencia informada pueden deberse en parte al uso de diferente metodología. Por ejemplo, en un estudio canadiense, se aisló *C. difficile* toxigénico en 28 de 230 (12%) de las muestras de carne molida de venta al por menor y carne de cerdo molida. De 28 muestras positivas, 20 fueron positivas por enriquecimiento, pero no por plateo directo. El límite de detección del método de enriquecimiento fue declarado como ≤ 10 esporas/g. En cuatro muestras de carne molida vendida al por menor que fueron positivas por cultivo directo, se encontraron entre 20-240 esporas/g y en cuatro muestras de carne de cerdo molida que fueron positivas por cultivo directo se reportaron 20-60 esporas/g. *C. difficile* se detectó en 12.8% de muestras de carne de pollo, pero solo pudo ser detectado por enriquecimiento, lo que indica que los números presentes fueron ≤ 10 esporas/g (Weese et al., 2010). Estos informes indican que *C. difficile* toxigénico puede estar presente en productos cárnicos, generalmente a baja concentración.

En Costa Rica se realizó un estudio en donde se aisló un genotipo toxigénico regional de *C. difficile* encontrado previamente en personas que presentan la infección. En el estudio se logró aislar a *C. difficile* en (2%) muestras de carne para el consumo humano: 1 de 67 muestras de carne de res, 2 de 66 de carne de cerdo y 1 de 67 de carne de aves de corral. Estos cuatro aislamientos fueron positivos para los genes *tcdA* y *tcdB*, pero negativos para la delección de los genes *tcdA* y *tcdB* (Quesada-Gómez et al., 2013). Este estudio demuestra que en nuestro país las esporas de esta bacteria también pueden ser encontradas en carnes y ser un riesgo de contagio para el consumidor a nivel comunitario.

En otros estudios se ha encontrado *C. difficile* en vegetales. En un estudio realizado en Francia se encontró que un 2.9% de las muestras dieron positivo para cepas toxigénicas (Eckert et al., 2013) y en Canadá la prevalencia fue de 4,5% en vegetales donde el 60% de los aislamientos eran ribotipo 078 el cual posee las tres toxinas (Metcalf et al., 2010). En Australia, un estudio analizó raíces vegetales de cultivos orgánicos y tradicionales (papas, remolachas, cebollas y zanahorias), y se observó la incidencia de contaminación por *C. difficile* en el 30% de las muestras. Los resultados positivos de *C. difficile* presentados son 55,6% de las muestras de papa orgánica, 50% de las muestras de papa cultivada convencionalmente, 22,2% de las muestras de remolacha orgánica, 5,6% de las muestras de cebolla orgánica y 5,3% de zanahoria orgánica. El 51,2% (22/43) de los aislamientos se identificaron como cepas toxigénicas, predominantemente TcdA +/ TcdB + /CDT- (81,8%). Un aislamiento mostró un perfil TcdA +/ TcdB +/ CDT + (2,3%) (Lim et al., 2018).

En Eslovenia, una investigación analizó la prevalencia de *C. difficile* en 154 muestras de verduras de hoja y raíces (64 muestras de lechuga de cordero, 22 muestras de lechuga, 11 muestras de hojas de diente de león, 2 muestras de lechuga tierna, 2 muestras de rúgula, 2 muestras achicoria, 1 muestra mezcla vegetales de hoja, jengibre y 15 muestras de 75 muestras de papa). Los resultados positivos de presencia de *C. difficile* se encontraron en el 18,2% de las muestras (28% de las muestras de papa, 9,4% de las muestras de hortalizas de hoja y 6,7% de las muestras de jengibre). Se aislaron 115 cepas de *C. difficile*, la incidencia de cepas toxigénicas fue del 8.7% de los aislamientos, predominantemente el ribotipo 014/020 (Tkalec et al., 2019).

De esta forma se evidencia la presencia de esta bacteria en alimentos de origen animal y vegetal lo cual puede representar un riesgo mayor de contaminación para aquellas personas susceptibles a la enfermedad (Kwon et al., 2016).

1.3.1 Estrategias para la prevención de *C. difficile* en alimentos

Los alimentos de origen animal han sido una fuente importante de enfermedades y las intervenciones para prevenir la exposición y los brotes posteriores de infecciones de los

patógenos conocidos transmitidos por los alimentos existen (Hoorfar et al., 2011). Estos patógenos son diseminados por reservorios animales a través de las heces al suelo y al pasto. Esto puede provocar rebaños infectados; contaminar la granja, productos agrícolas, el agua y el medio ambiente. Además, los patógenos entéricos de los animales destinados al consumo pueden contaminar la carcasa durante el procesamiento y transmitirse al consumidor.

Según Hoorfar et al. (2011), con el fin de prevenir la exposición a microorganismos patógenos en los alimentos, determinar la presencia y entendiendo el comportamiento de los microorganismos objetivo es un requisito previo. Después de esto, agregar intervenciones en varias etapas puede ayudar a reducir o prevenir la transmisión a lo largo de la cadena alimentaria. Además, a pesar de la introducción de nueva información científica, novedosos métodos de detección e intervenciones en la cadena alimentaria, se deben incorporar medidas a lo largo de toda la cadena alimentaria para garantizar la inocuidad de los alimentos.

Para los patógenos zoonóticos y transmitidos por los alimentos conocidos, la bioseguridad, el manejo de las granjas y las estrategias de biocontención pueden reducir la exposición del ganado a los patógenos. Además, se sabe que el HACCP en granjas ha tenido éxito para *E. coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, con la información actual, fabricando intervenciones e implementando esquemas amplios a lo largo de la cadena alimentaria no parece factible. Además, la viabilidad económica de tales intervenciones limita su uso (Hoorfar et al., 2011).

Basado en estudios realizados con patógenos alimentarios conocidos (por ejemplo, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) 71°C es la temperatura de cocción recomendada para carne molida y mezclas de carne (carne molida de res, cerdo, cordero y ternera, hamburguesas, salchichas, albóndigas, pasteles de carne, etc.) y carne de cerdo. La letalidad necesaria para inactivar suficientemente estos patógenos se logra instantáneamente a esta temperatura (Servicio de inspección y seguridad alimentaria de los Estados Unidos, 1999).

La $D_{100^{\circ}\text{C}}$ para las esporas de *C. difficile* osciló entre 2,5 a 33,5 min, en comparación con $D_{100^{\circ}\text{C}}$ de 6 a 17,6 min para las esporas de *C. perfringens* (Nakamura et al., 1985). Se logra una reducción de las esporas de cepas de *C. difficile* que representan distintos ribotipos cárnicos y bovinos por 2 \log_{10} después de calentar a 71°C durante 120 min (Rodríguez-Palacios et al., 2010). Además, informaron una supervivencia de esporas del 10 % cuando las muestras calentadas a 71°C durante 30 minutos se recalentaron a 85°C durante 10 min. Sin embargo, se observó una inactivación total cuando las muestras se calentaron a 71°C durante 30 min seguido de recalentamiento a 85°C durante 20 min. Una limitación importante de este estudio es la determinación de la cinética de inactivación se realizó en un medio tampón.

Otro estudio determinó los efectos del calentamiento a cuatro temperaturas diferentes: 63, 71, 85 y 96°C (Rodríguez-Palacios y Lejeune, 2011). La matriz utilizada (3% carne molida, 30% de carne molida y salsa de carne (0% de grasa) se inoculó con una mezcla 1:1:1:1 de *C. difficile* PCR ribotipos 027, 078, 077 y ATCC 9689 y se realizaron los estudios térmicos. Dichos estudios revelaron que el envejecimiento de las esporas afecta la resistencia térmica de las esporas a 63°C . A una temperatura de 63°C se logró reducir la concentración de esporas en 1 \log_{10} durante 30 minutos, si las esporas estaban frescas. Sin embargo, para las esporas envejecidas, el tratamiento térmico durante 30 minutos a esta temperatura aumentó la concentración de esporas en un 30%. Este aumento se debió a la reactivación de esporas superdormidas debido a tratamiento térmico subletal. Además, se observó una reducción de 5 a 6 \log_{10} en la concentración de esporas observado después de 15 minutos de calentamiento a 85°C independientemente de la edad de las esporas. Además, calentar a 96°C durante 1 a 2 min condujo a una reducción de 6 \log_{10} . Además, el porcentaje de grasa en la carne molida posiblemente puede afectar los valores D de las esporas de *C. difficile*. La sugerencia al final del estudio fue cocinar los alimentos a más de 85°C para asegurar la destrucción adecuada de las esporas de *C. difficile* en alimentos.

Redondo-Solano et al. (2016) probaron la resistencia térmica de cuatro cepas de esporas de *C. difficile* (tres hipervirulentas y una no hipervirulenta) en agua peptonada (AP) y carne de cerdo individualmente a 70, 75, 80, 85 y 90°C utilizando dos métodos de recuperación

(taurocolato y lisozima). Se observó una mayor resistencia térmica de las esporas de *C. difficile* en la carne que en el agua peptonada utilizando el método de la lisozima. La hipervirulencia de las cepas de *C. difficile* no se asoció con una mayor resistencia térmica en la carne. Los valores z para las esporas de *C. difficile* en la carne estuvieron entre 6,21 y 7,21°C, y fueron 11,24 y 12,12°C utilizando los métodos de recuperación de taurocolato y lisozima, respectivamente. Los valores D y z de las esporas de *C. difficile* fueron mayores tanto en AP como en cerdo que los otros valores reportados en la literatura.

Un choque térmico subletal puede seleccionar más organismos resistentes de la población de esporas. Por citar un ejemplo, la $D_{100^{\circ}\text{C}}$ para esporas de 9 de cada 10 cepas de *C. perfringens* aumentaron significativamente ($p < 0,05$) después de un choque de calor subletal a 75°C durante 20 minutos (Juneja et al., 2003). Además, el choque térmico puede inducir mayor resistencia en esporas parcialmente activadas de *B. stearothermophilus* ATCC 7953 a 100°C que esporas latentes (Beaman et al., 1988). La resistencia de *Salmonella* Thompson a 54 y 60°C aumenta si las células se sometieron a un tratamiento térmico a 48°C durante 30 minutos antes de realizar el estudio térmico (Mackey y Derrick, 1987). Este efecto se observó en todos los medios de calentamiento (caldo de soja trípico, huevo entero líquido, leche reconstituida al 10% y 40% y carne molida). Para *Listeria monocytogenes*, un tratamiento térmico a 48°C durante 120 minutos antes de la realización de estudios térmicos aumentó el $D_{64^{\circ}\text{C}}$ en 2,4 veces; sin embargo, no hubo cambios significativos en el aumento observado cuando las células se calentaron a 48°C durante 30 o 60 minutos (Farber y Brown, 1990). Otra posible razón de las diferencias en las resistencias reportadas puede asignarse a diferentes cepas. Por ejemplo, para *C. perfringens*, variaciones significativas en la resistencia al calor de cepas se han reportado.

De igual forma se puede utilizar las bajas temperaturas para controlar bacterias patógenas en alimentos. Un estudio indicó que las esporas de *Clostridium welchii*, uno de los principales organismos que deterioran la carne y los productos cárnicos, pueden sobrevivir al almacenamiento en congelación a -5 y -20 °C durante hasta 26 semanas (Barnes et al., 1963). Los primeros trabajos sobre congelación de alimentos citados por Georgala y Hurst (1963) demostraron que las esporas pueden permanecer viables más de 100 días a -2-20 °C.

Al revisar los estudios de congelación y descongelación, Young et al. (1968) concluyeron que *Bacillus* y *Clostridium* spp. sobrevivirían a ciclos diarios de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en hielo seco seguidos de 4,5 horas de descongelación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un estudio sobre el efecto del almacenamiento de endosporas de *Bacillus cereus* a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en PBS durante hasta 1 mes mostró una pérdida de viabilidad (Cronin y Wilkinson, 2008). Otro estudio sobre *C. perfringens* encontró reducciones de menos de 1,3 y 1,6 log en la viabilidad en medio de esporulación de esporas de algunas cepas de *C. perfringens* después de un almacenamiento de hasta 6 meses a 4 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Li y McClane, 2006).

Deng et al. (2015) determinó la sobrevivencia de las esporas de *C. difficile* a bajas temperaturas. Aunque la viabilidad de las esporas disminuyó, todavía se observó una viabilidad significativa después de 4 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, es decir, 3,5 y 3,9 log UFC/ml y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, es decir, 6,0 y 6,1 log UFC/ml para las cepas R20291 y M120, respectivamente. La misma tendencia se observó para M120 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que para R20291 el cambio de viabilidad no fue significativo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pero aumentó significativamente a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p > 0,05$). Después de 10 ciclos de congelación-descongelación, la viabilidad de ambas cepas disminuyó, pero una fracción significativa permaneció viable (4,3 y 6,3 log UFC/ml para la cepa R20291 y M120, respectivamente). Sorprendentemente, ambas cepas mostraron una mayor viabilidad en un modelo de carne que en solución salina fosfato tampón. Se observó una disminución pequeña pero significativa ($p < 0,05$) de 6,7 a 6,3 log UFC/ml en la viabilidad de M120 después de 2 meses de almacenamiento en el modelo de carne, mientras que la disminución desde un inicio de 3,4 log UFC/ml observada para R20291 no fue significativa. ($p = 0,12$). Por lo que las de *C. difficile* pueden sobrevivir en condiciones de baja temperatura hasta por 4 meses.

Otras estrategias es el posible uso de antimicrobianos en los alimentos para lograr el control de esta bacteria. En este sentido las carnes listas para el consumo producidas comercialmente, incluidas las carnes no tratadas térmicamente, a menudo contienen conservantes alimentarios para evitar el deterioro y prolongar la vida útil. El nitrito de sodio y el nitrato son conservantes alimentarios muy utilizados en combinación en carnes listas para el consumo. El nitrito ayuda a desarrollar el sabor, reacciona con la mioglobina para

producir nitrosil-hemocromo, que da el color rosado característico de la carne procesada e inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y de deterioro como *Clostridium botulinum* (Sindelar & Milkowski, 2012). El nitrato actúa como reservorio para la producción de nitrito a través de la enzima nitrato reductasa producida por microorganismos como estafilococos y lactobacilos. El metabisulfito de sodio es un conservante alimentario que se utiliza en embutidos crudos. En un estudio Lim et al (2016) determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) y concentraciones mínimas bactericidas (CBM) de nitrito de sodio, nitrato de sodio y metabisulfito de sodio contra *C. difficile*. Los valores de CIM para nitrito de sodio, nitrato de sodio y metabisulfito de sodio fueron 250 µg/ml, >4000 µg/ml y 1000 µg/ml, respectivamente. No se observó actividad bactericida para los tres conservantes alimentarios. Este estudio demostró que *C. difficile* puede sobrevivir en presencia de conservantes alimentarios en concentraciones superiores a los niveles máximos permitidos actualmente en las carnes listas para el consumo lo que hace necesario investigar que este tipo de alimentos actúen como fuente de *C. difficile*. La concentración mínima de nitrito que inhibe el crecimiento de *Clostridium botulinum* es 4×10^{-5} – 8×10^{-5} g/g (Rivera et al., 2019) lo cual es inferior a lo encontrado para *C. difficile* en este estudio.

Contrario a lo observado para la bacteria *C. difficile*, estudios han demostrado el efecto inhibitorio y hasta bactericida del nitrito en otros esporulados de importancia en alimentos (Beuchat et al, 2001). Redondo et al (2013) evaluaron el efecto del nitrito y eritorbato sobre la germinación y crecimiento de esporas de *Clostridium perfringens* en jamón durante un enfriamiento abusivo (15 h), obteniendo que para las muestras que contenían concentraciones bajas de NaNO₂ y se almacenaron durante 3 h, se observaron poblaciones de *C. perfringens* de 5,22 y 2,83 log UFC/g con o sin eritorbato de sodio, respectivamente.

Li y McClane (2016) confirman la capacidad del nitrito para inhibir el crecimiento y la supervivencia de las esporas de *C. perfringens* aunque encontraron que las células vegetativas de los aislados de C-cpe son particularmente resistentes a los nitritos tanto para su crecimiento como para su supervivencia lo que puede conllevar a la posibilidad que estas cepas han modificado factores y enzimas como la ferredoxina que son los targets para el nitrito lo que conlleva a una mejor tolerancia y supervivencia.

Otros aditivos antimicrobianos que se han probado en carnes listas para consumir son aceites o ácidos orgánicos. Patarata et al. (2020) investigaron los efectos del vino tinto y el ajo sobre el comportamiento de *C. sporogenes* (utilizado como sustituto de *C. botulinum*) y *Salmonella* en un chorizo curado en seco, y encontraron que el vino tinto (7,5%) y el vino tinto más el ajo (7,5% + 1%, respectivamente) podría destruir *Clostridium sporogenes* y *Salmonella* durante el procesamiento del chorizo. Khatib et al. (2020) utilizaron componentes del lúpulo para reemplazar el nitrito en la preparación de salchichas de res cocidas mediante nanoliposomas (XLN) cargados de lupulón-xantohumol utilizados en el proceso de producción; los resultados indicaron que $1,5 \times 10^{-4}$ XLN y 3×10^{-5} nitrito podrían producir bacteriostasis durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. El rábano en polvo y el aceite esencial de orégano pueden producir nitrito en salchichas de cerdo y ternera cocidas fermentadas, inhibiendo así las bacterias mesófilas (Ozaki et al., 2020). Kim y Chin (2021) descubrieron que la adición de oleorresina de pimentón, aceite de semilla de girasol y nitrito de sodio ($7,5 \times 10^{-5}$ NaNO₂ + solución de oleorresina de pimentón al 0,1 % [oleorresina de pimentón al 1 % + aceite de semilla de girasol al 99 % o oleorresina de pimentón al 5 % +95 % de aceite de semilla de girasol]) podría disminuir los recuentos totales en placa de muestras de salchichas de cerdo emulsionadas.

Dias et al (2022) evaluaron los efectos de la adición de mezclas de aceites esenciales y la reducción del contenido de nitrito de sodio (75 ppm) sobre *C. difficile* inoculado en mortadelas. En dicho estudio encontraron que las concentraciones mínimas bactericidas encontradas fueron 1,2 % para *Ocimum basilicum*, 0,3 % para *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* y 0,15 % para *Litsea cubeba*. Las combinaciones de aceites no previnieron la esporulación, sin embargo, se observó un efecto sinérgico in vitro.

Se sabe desde hace mucho tiempo que varios ácidos grasos libres (AG), así como sus derivados monoglicéridos, ejercen efectos antimicrobianos sobre numerosos patógenos bacterianos (Galbraith et al., 1971; Kabara et al., 1972). Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el ácido acético, propiónico y butírico, exhiben actividad antibacteriana contra diversos patógenos, incluidos *Vibrio parahaemolyticus*, *C.*

perfringens, *Salmonella* y *Helicobacter pylori* (Thompson y Hinton, 1997; Namkung et al., 2011; Immanuel et al., 2012; Yonezawa et al., 2012). De todos los ácidos grasos de cadena media (AGCM) probados in vitro, se ha demostrado que el ácido láurico (ácido dodecanoico, C12:O) y el ácido cáprico (ácido decanoico, C10:O) tienen el efecto más potente contra diversas bacterias, hongos, y patógenos virales (Kabara et al., 1972; Bartolotta et al., 2001; Bergsson et al., 2001; Rouse et al., 2005; Huang et al., 2011). Se ha revelado que el ácido láurico, en particular, exhibe actividad antibacteriana contra patógenos Gram positivos y Gram negativos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli*, *H. pylori* y muchos otros (Kabara et al., 1972; Rouse et al., 2005). Un estudio reciente demostró los efectos bactericidas de los AGCM (ácido caprílico, cáprico y láurico) combinados con aceites esenciales de plantas comestibles (carvacrol, eugenol, ácido β -resorcílico, transcinamaldehído, timol y vainillina) contra *E. coli* O157:H7 (Kim y Rhee, 2016). Como el principal AG del aceite de coco es el ácido láurico (45–53%), es de gran interés utilizar aceite de coco como fuente de ácido láurico. Chelín et al. (2013) informaron que los AGCM pueden inhibir el crecimiento de la cepa ATCC 9689 de *C. difficile* in vitro y que el ácido láurico exhibe la mayor potencia. Yang et al (2018) demostraron que el ácido láurico exhibe potentes actividades antimicrobianas contra múltiples aislados toxigénicos de *C. difficile* in vitro. El efecto inhibitor del ácido láurico se debe en parte a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y al daño de la membrana celular.

Los extractos vegetales solos o en combinación con otros ingredientes muestran capacidades prometedoras para controlar los microorganismos en la carne o los productos cárnicos, pero las sustancias químicas específicas que producen el efecto antimicrobiano no se comprenden bien. Por lo tanto, se deben realizar más investigaciones para identificar los procesos subyacentes responsables del efecto antimicrobiano de los extractos vegetales en la carne o los productos cárnicos (Dias et al, 2022).

Estos estudios demuestran que el control de *C. difficile* en carnes listas para consumir es un reto para la industria de alimentos y este estudio pretende caracterizar el comportamiento de este microorganismo con otras variables propias del proceso de la industria cárnica.

CAPITULO II. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar el efecto de factores intrínsecos y extrínsecos asociados con productos cárnicos procesados sobre la capacidad de germinación y crecimiento de distintas cepas de *Clostridioides difficile in vitro* y en un modelo cárnico cocido.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Optimizar la cantidad de taurocolato utilizada en medios líquidos de enriquecimiento para la germinación y crecimiento de esporas de *C. difficile*.
- 2.2.2 Determinar el efecto de aditivos propios de la producción de productos cárnicos (nitrito, eritorbato de sodio, cloruro de sodio y lactato de potasio) sobre la capacidad de cepas de *C. difficile* para germinar y crecer en medio de cultivo.
- 2.2.3 Determinar el efecto de la congelación previa de las esporas en la germinación y crecimiento de *C. difficile* en medio de cultivo.
- 2.2.4 Determinar el efecto de la prereducción del medio en la germinación y el crecimiento de *C. difficile*.
- 2.2.5 Determinar el efecto de variaciones en la concentración de nitrito sobre la capacidad de cepas de *C. difficile* para germinar y crecer en un modelo cárnico cocido con el fin de construir un modelo predictivo que sirva de referencia para la industria.

CAPITULO III. METODOLOGÍA

3.1. Cepas utilizadas y obtención de suspensiones de esporas

Para este estudio se utilizaron 3 cepas de *C. difficile* de 3 pulsotipos diferentes que son LIBA-5751 (NAP_{CR1}-448), LIBA-5758 (NAP1/RT027) (aislamientos clínicos en hospitales de Costa Rica), LIBA-6340 (NAP7/RT078) (aislamiento de lechón enfermo con colitis pseudomembranosa) y 1 cepa de referencia (VPI10463).

A partir de cada una de las cepas se prepararon suspensiones de esporas. Estas suspensiones se realizaron utilizando los *stocks* congelados de cada una de las cepas las cuales se rayan con torunda estéril en 10 placas de agar Infusión cerebro corazón, de manera que se obtuvieron extendidos de cada cepa; las placas se incubaron en anaerobiosis (cámara de anaerobiosis Bactron IV, ShellLab, Cornelius, OR) por 5 días a 37 °C. Una vez concluido el periodo de incubación se procedió a raspar toda la población bacteriana con asa de Drigalski la cual se resuspendió en 1 mL de Solución Buffer Salina de Fosfatos (PBS); este proceso se repitió una vez más y la suspensión final se almacenó en microtubos de 1.5 mL. A cada suspensión se le realizó un *shock* térmico a 60°C por 10 minutos y se colocó en un baño de hielo para eliminar las células vegetativas. A esta suspensión se le realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y centrifugación a 140 000 rpm por 4 minutos. Después del lavado, la cantidad de esporas viables se evaluó microscópicamente realizando una tinción de Gram y por medio de un recuento en Agar Brucella después de aplicar un choque térmico a una pequeña alícuota y realizando un recuento por esparcimiento con diluciones decimales.

3.2. Optimización de una metodología para estimular la germinación y crecimiento de *C. difficile* en Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC)

Tomando en cuenta los valores de taurocolato y temperaturas de activación indicadas por Barbosa et al (2020) se procedió a optimizar una metodología de enriquecimiento para la recuperación de esporas de *C. difficile* utilizando CICC. La optimización se realizó valorando

el efecto de diferentes combinaciones de un germinante (taurocolato de sodio) y temperaturas de activación de las esporas por medio de un diseño central compuesto con 4 repeticiones en el punto central. El modelo, el cual se diseñó por medio del paquete estadístico JMP, se presenta a continuación.

Cuadro 2. Diseño central compuesto para la optimización de la cantidad de taurocolato y la temperatura de activación de las esporas de *C. difficile*.

T (°C)	Cn (%)				
	0,02	0,1	0,3	0,5	0,6
44			1		
50		1		1	
65	1		4		1
80		1		1	
86			1		

El rango de concentración de taurocolato entre 0,02 y 0,6 ppm y la temperatura de activación entre 44 y 86 °C se estableció a partir de la literatura (Barbosa et al, 2020), y son los más utilizados para el aislamiento de *C. difficile* en alimentos. Los valores axiales de las variables codificadas como $-\alpha$ y $+\alpha$ (Cuadro 3) representaron los niveles más bajos y más altos probados para cada compuesto. Los niveles factoriales se codificaron como -1 y 1 y se establecieron según la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{(X_1 - X_0)}{(2^k)^{1/4}}$$

donde X_i es el valor adimensional de una variable, X_1 es el valor real de una variable, X_0 es el valor real en el punto central y k es el número de factores independientes.

Cuadro 3. Variables independientes y su nivel para el diseño central compuesto.

Variable	$-\alpha$	-1	1	+1	$+\alpha$
Cn	0,02	0,1	0,3	0,5	0,6
T	44	50	65	80	86

La variable dependiente del modelo fue absorbancia a 600 nm medida en un espectrofotómetro a las 12 y 24 horas.

De esta forma se prepararon los tubos con CICC a las diferentes concentraciones de taurocolato y se colocaron 3 mL en tubos de 5 mL. Cada solución de esporas se sometió a la temperatura indicada en el modelo por 10 minutos y una vez terminado el calentamiento se enfriaron en un baño con hielo. A continuación, se procedió a inocular las distintas suspensiones de CICC ajustado con taurocolato con una población baja de esporas precalentadas (1.0 - 2.0 Log UFC/ml) de cada una de las cepas. Los tubos se incubaron en una cámara de anaerobiosis a 37°C por 24 horas, y utilizando un espectrofotómetro se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm del crecimiento a las 12 horas y las 24 horas. Al final del proceso, se procedió a identificar la combinación de factores que promueve la germinación más rápida de cada uno de los aislamientos por medio de la construcción de un gráfico de superficie de respuesta utilizando el paquete estadístico JMP.

3.3. Determinación del efecto de varios aditivos propios de la producción de productos cárnicos sobre la capacidad de germinación y crecimiento de *C. difficile* en medio de cultivo.

Para esta sección, la 4.4 y la 4.5 se utilizó CICC suplementado con la concentración de taurocolato y temperatura de activación identificadas en el objetivo 1 como óptima para el enriquecimiento de *C. difficile*. Los aditivos y las concentraciones a evaluar fueron: nitrito (200 ppm), eritorbato de sodio (500 ppm), NaCl (1,74%), lactato de potasio (2%) y todos los aditivos juntos en esas mismas concentraciones. Los ingredientes a evaluar se incorporaron

directamente sobre el CICC usado para el enriquecimiento. Se utilizaron las suspensiones de esporas de las 4 cepas descritas anteriormente en la sección 4.1. Como control negativo del experimento se utilizó un tubo sin ingredientes. De esta forma se trabajó con un diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial 6×4 (6 niveles del factor aditivo y cuatro niveles del factor cepa).

Cada uno de los tubos de enriquecimiento, se incubó en anaerobiosis a 37°C y a diferentes intervalos de tiempo (12 y 24 horas) se tomaron alícuotas para medir la absorbancia a 600 nm.

Todos los experimentos se realizaron tres veces con las 4 cepas seleccionadas para el estudio. Los datos obtenidos (absorbancia) se promediaron y se analizaron por medio de un Análisis de Varianza (ANDEVA); las posibles diferencias significativas entre los promedios se determinaron por medio de la prueba de Tukey con el paquete estadístico JMP (versión 17).

3.4. Determinación del efecto de la congelación previa en la germinación y crecimiento de *C. difficile* en medio de cultivo.

El primer factor extrínseco que se evaluó fue el efecto del tiempo de congelación previa en un medio líquido (24 horas, 1 semana y 1 mes) sobre la capacidad de las esporas para germinar durante el enriquecimiento. Se utilizaron las suspensiones de esporas de las 4 cepas descritas anteriormente en la sección 4.1. Como controles del experimento se utilizó un tubo control donde las esporas no fueron congeladas. De esta forma se trabajó con un diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial 4×3 (4 niveles del factor cepa y tres niveles del factor tiempo de congelación previa).

Después de la congelación, las esporas se enriquecieron en tubos con CICC suplementado con taurocolato (definido anteriormente) que se incubaron en anaerobiosis a 37°C . A diferentes intervalos de tiempo (12 y 24 horas) se tomaron alícuotas para medir el nivel de absorbancia a 600 nm.

Estos experimentos se realizaron tres veces y los datos obtenidos (absorbancia) se promediaron y se analizaron por medio de un Análisis de Varianza (ANDEVA); las posibles diferencias significativas entre los promedios se determinaron por medio de una prueba de Tukey con el paquete estadístico JMP.

3.5. Determinación del efecto de la prereducción del medio en el crecimiento y la germinación de *C. difficile*

El segundo factor extrínseco que se evaluó fue la prereducción del medio de cultivo. El factor de prereducción se evaluó en dos niveles diferentes: se comparó la prereducción de una alícuota de 1 mL con la suspensión de esporas (donde se almacena la muestra por un mínimo de 3 horas dentro de la cámara de anaerobiosis antes de proceder con la etapa de enriquecimiento) contra una solución no prereducida. Se utilizaron las 4 cepas descritas anteriormente en la sección 4.1. De esta forma se trabajó con un diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial 4×2 (4 niveles del factor cepa y 2 niveles de prereducción).

Cada uno de los tubos de enriquecimiento, se incubó en anaerobiosis a 37°C y a diferentes intervalos de tiempo (12 y 24 horas) se tomaron alícuotas para medir el nivel de absorbancia a 600 nm.

Estos experimentos se realizaron tres veces y los datos obtenidos (absorbancia) se promediaron y se analizaron por medio de un Análisis de Varianza (ANDEVA); las posibles diferencias significativas entre los promedios se determinaron por medio de una prueba de Tukey con el paquete estadístico JMP versión 17.

3.6. Determinación del efecto de variaciones en los factores intrínsecos y extrínsecos más significativos sobre la capacidad de cepas de *C. difficile* para germinar y crecer en un producto cárnico modelo.

La capacidad de las esporas de las cepas de *C. difficile* para crecer en un producto cárnico modelo se evaluó utilizando carne de cerdo procesada formulada con diferentes concentraciones de nitrito. Se utilizó carne de cerdo debido a la incidencia reportada de esta bacteria en carne de cerdo (Curry et al., 2012; Mooyottu et al., 2015; Wu et al., 2017 y Primavilla et al., 2019), además de ser materia prima de muchos embutidos o carne lista para consumir. Se decidió utilizar nitrito debido a que la literatura reporta que el *C. difficile* puede sobrevivir a concentraciones mayores que las permitidas para embutidos o carnes listas para consumir (Lim et al., 2016), lo que concuerda con lo obtenido en el objetivo 3 de este estudio. A pesar que ya se conoce que la bacteria en estudio resiste concentraciones superiores a lo permitido para embutidos se decide utilizar en este estudio valores menores a 250 ppm para determinar lo que sucedería en realidad en un embutido o carne lista para consumir con las esporas de este microorganismo.

Se utilizó posta de cerdo para obtener una carne lo más magra posible y que la cantidad de grasa no fuera un factor variable en la formulación. Dicha carne se adquirió en un distribuidor local. La carne fue molida finamente y se le adicionó la cantidad de nitritos formulando 5 concentraciones de nitrito (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppm). A partir de cada tratamiento, se prepararon muestras de 5 gramos que fueron inoculadas con niveles bajos de esporas (1,0 - 2,0 Log₁₀ UFC/g) de 2 cepas de *C. difficile* (de los genotipos NAP1/RT027 y NAP7/RT078) debido a que las otras cepas no mostraron resultados satisfactorios en las pruebas preliminares. Las muestras inoculadas se empacaron al vacío en un empaque de polipropileno de alta densidad, se le realizó un tratamiento térmico de 72°C por 18 segundos y se incubaron bajo condiciones de abuso de temperatura (37°C) durante 5 días. Se realizó un recuento de esporas de *C. difficile* al inicio del proceso, a las 24, 48, 72 y 96 horas. A cada una de las muestras se le realizó un tratamiento térmico de activación para las esporas y la eliminación de células vegetativas. El recuento se realizó resuspendiendo la muestra en 45

ml de APE y posteriormente realizar diluciones decimales del homogenizado en el mismo substrato. Un volumen pequeño de cada dilución (100 μ L) de cada una de las muestras se esparció en platos de Agar Brucella suplementados con vitamina K y hemina que posteriormente se incubaron en anaerobiosis durante 48 horas. Las colonias de *C. difficile* se cuantificaron después de la incubación.

Los datos obtenidos se utilizaron para construir un modelo matemático predictivo y se construyó un modelo primario utilizando diferentes niveles de la cantidad de nitritos en la muestra.

Los datos de crecimiento de *C. difficile* a diferentes concentraciones de nitrito (ppm) se utilizaron para construir el modelo primario según Baranyi debido a que este modelo es ampliamente utilizado para describir el crecimiento microbiano bajo condiciones ambientales estáticas (Baranyi and Roberts, 1994). Dicho modelo se describe en la siguiente ecuación:

$$y(t) = y_{0 + \mu_{max} F(t) - l_0} e^{\left(1 + \frac{e^{\mu_{max} F(t)} - 1}{e^{(y_{max} - y_0)}}\right)}$$

$$\text{donde } F(t) = t + \frac{1}{\nu} \log_e(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{(-\nu t - h_0)});$$

$y(t)$ es $\log_e \frac{UFC}{g}$ al tiempo, t ; y_0 es población inicial expresada como $\log_e \frac{UFC}{g}$; y_{max} es la máxima concentración de *C. difficile* expresada como $\log_e \frac{UFC}{g}$; μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento específica expresada como $\log_e \frac{UFC}{g}$ en 1 h; ν es la tasa de crecimiento del substrato limitante que se asume que es igual a μ_{max} ; h_0 es igual a $\mu_{max} \lambda$; λ es la duración de la fase lag en h.

Los datos de dicho modelo se obtuvieron al construir curvas de crecimiento de la cepa de *C. difficile* seleccionada, en la matriz inoculada con niveles bajos de las esporas. Los datos de crecimiento se graficaron contra el tiempo para determinar y_0 , y_{max} , h_0 y μ_{max} .

Los datos experimentales se ajustaron utilizando la herramienta DMFit del software ComBase. El ajuste del modelo fue evaluado mediante el parámetro pseudo-R² y RMSE (error cuadrático medio).

Los parámetros cinéticos proporcionados por DMFit para los datos de crecimiento se utilizaron para la construcción de un modelo secundario. La tasa máxima de crecimiento de *C. difficile* obtenidas del modelo primario a diferentes concentraciones de nitrito se ajustaron a diferentes modelos matemáticos utilizando EXCELL. Se realizó un análisis de regresión de primer y segundo orden para probar la relación entre el parámetro tasa y la concentración de nitrito (ppm). Se evaluó el rendimiento y nivel de ajuste del modelo secundario empleando pseudo-R² (Schabenberger, 2005) y RMSE.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de una metodología para estimular la germinación y crecimiento de *C. difficile*.

Generalmente, la prevalencia de *C. difficile* en los alimentos es baja y no existe una metodología estándar para su aislamiento. Los métodos disponibles se han optimizado para muestras clínicas en lugar de alimentos.

En la mayoría de los estudios se ha utilizado un medio de cultivo base similar y además se añaden diferentes compuestos selectivos y de enriquecimiento, lo que, en ocasiones, resulta controversial sobre todo tomando el carácter fastidioso de *C. difficile*. A pesar del uso extensivo de cicloserina y cefoxitina, así como de moxalactama y norfloxacina, muchos autores creen que el uso de estos suplementos selectivos tiene un efecto adverso en la recuperación de *C. difficile* y solo permite la recuperación de aislamientos resistentes en muestras de alimentos. Otro ejemplo es el uso de taurocolato de sodio para potenciar la germinación de esporas de *C. difficile*; hay estudios que informan que la adición de este componente en el medio de enriquecimiento no ejerció un efecto beneficioso sobre la recuperación de *C. difficile*. Las variaciones en las cantidades de muestra, los factores de dilución y los tiempos de incubación, entre otros, también pueden afectar la recuperación de *C. difficile* de los alimentos (Barbosa *et al.*, 2020).

Recientemente han surgido numerosos estudios, ya que existe un interés creciente en *C. difficile* como patógeno potencialmente transmitido por los alimentos, razón por la cual en este experimento se quería optimizar la cantidad de taurocolato y temperatura de activación de esporas de diferentes cepas de *C. difficile* con el fin de determinar el efecto de estas variables sobre la recuperación de esta bacteria. Para esto se planteó un central compuesto y se generaron los gráficos de contorno. Las superficies de respuesta se presentan cuando los valores se encuentran dentro del rango.

El gráfico de contorno de diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de taurocolato y las probabilidades de los efectos para la cepa de *C. difficile* C30 se presentan en la Figura 1 y Cuadro 4.

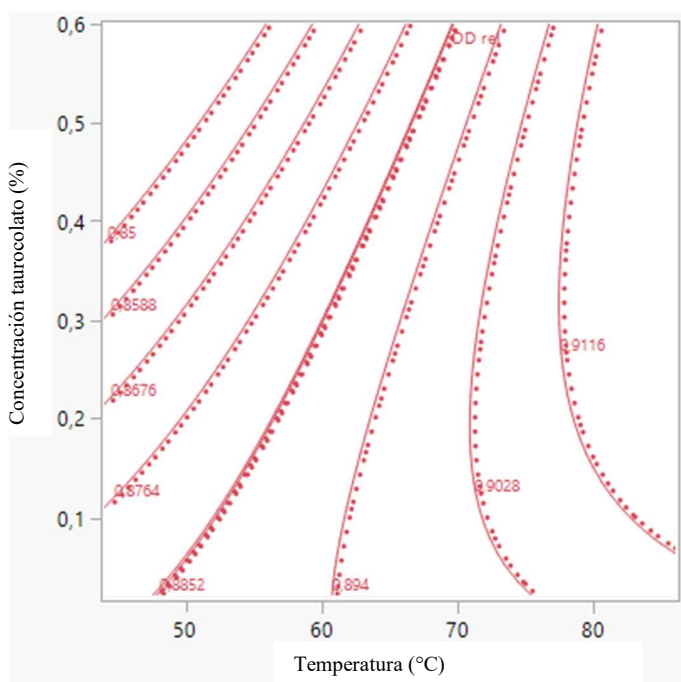


Figura 1. Gráfico de contorno de diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de *C. difficile* C30.

Cuadro 4. Análisis estadístico del diseño central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de *C. difficile* C30.

Fuente	Estimación	Prob > F
Modelo	0,8033709	<,0001*
Temperatura	0,0015544	<,0001*
Concentración	-0,038775	0,0021*
Temperatura*Temperatura	-0,000003	0,7090
Temperatura*Concentración	0,0033333	0,0035*
Concentración*Concentración	-0,087799	0,0750

Nota: Aquellas probabilidades con asterisco son las significativas.

Para esta cepa se puede observar que el modelo es significativo ($p < 0,001$) y se puede determinar que conforme aumenta la temperatura, aumenta la absorbancia observada pero sucede el fenómeno contrario conforme aumenta la concentración de colato. Esto hace que el efecto de la concentración no sea el mismo a diferentes temperaturas lo que se puede concluir al ver la interacción significativa. De esta forma, al trabajar con las temperaturas altas, el aumento de concentración de taurocolato no aporta significativamente al aumento de la densidad óptica. Por otro lado, a temperaturas bajas, al aumentar la concentración de taurocolato, disminuye la densidad óptica. En caso de que se desee obtener densidades ópticas más bajas entonces se tendría que trabajar con temperaturas bajas y concentraciones altas del germinante. Para esta cepa en particular la solución fue punto de silla por lo que no se encontró el mínimo en el rango de temperaturas y concentraciones estudiadas.

En el caso de la cepa de *C. difficile* NAP7/078, el gráfico de contorno de diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de taurocolato y las probabilidades de los efectos se presentan en la Figura 2 y el Cuadro 5.

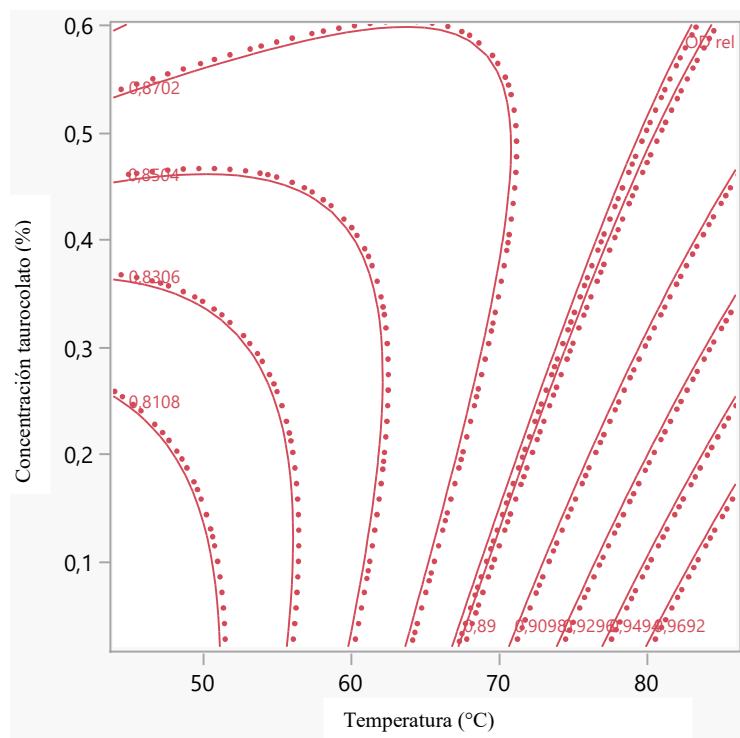


Figura 2. Gráfico de contorno de diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de *C. difficile* NAP7/078.

Cuadro 5. Análisis estadístico del modelo central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de *C. difficile* NAP7/078.

Fuente	Estimación	Prob > F
Modelo	0,6771437	<,0001*
Temperatura	0,0028547	0,0005*
Concentración	-0,014785	0,6446
Temperatura*Temperatura	4,6937e-5	0,1826
Temperatura*Concentración	-0,009245	0,0190*
Concentración*Concentración	0,1870085	0,3013

Nota: Aquellas probabilidades con asterisco son las significativas.

Para este caso el comportamiento es similar a la cepa C30, donde el modelo es significativo ($p < 0.0041$) dando a su vez la interacción significativa que es lo que aporta al modelo. El efecto de la concentración sobre la absorbancia no es la misma a una temperatura fija. De esta forma podemos ver que, a temperaturas mayores a 70°C , un aumento de la temperatura significa un aumento en la concentración y a temperaturas menores se comporta de forma uniforme. Este modelo se encuentra fuera de rango y es una conformación de silla por lo que, igual que la cepa anterior, no se encontró el mínimo en el rango de temperaturas y concentraciones estudiadas.

En el caso de la cepa de *C. difficile* NAP1/027, el gráfico de contorno y la superficie de respuesta (tomando en cuenta diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de taurocolato) y las probabilidades de los efectos se presentan en la Figura 3 y el Cuadro 6.

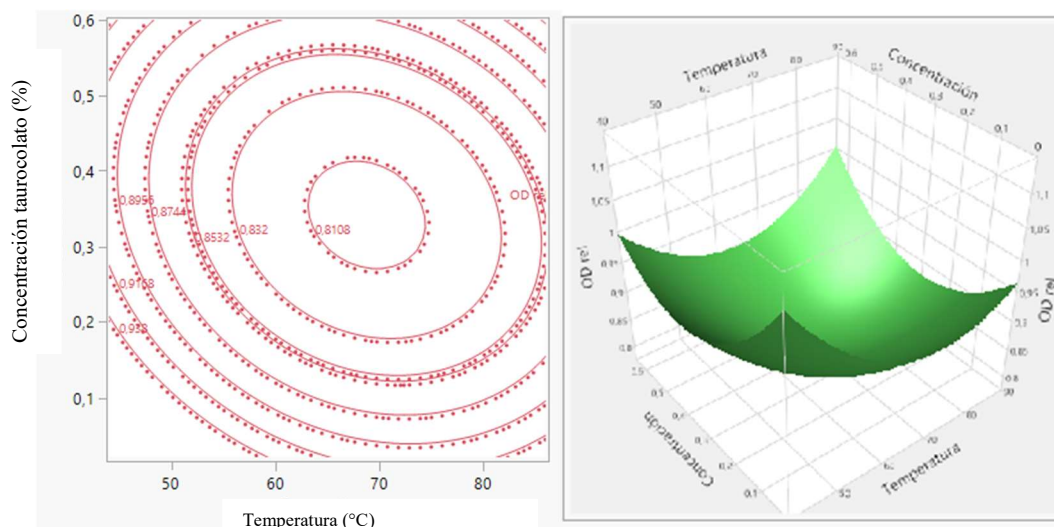


Figura 3. Gráfico de contorno y superficie de respuesta a diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de *C. difficile* NAP1/027.

Cuadro 6. Análisis estadístico del modelo central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de *C. difficile* NAP1/027.

Fuente	Estimación	Prob > F
Modelo	0,9309496	0,1763
Temperatura	-0,001402	0,2370
Concentración	-0,097609	0,2613
Temperatura*Temperatura	0,0001616	0,0915
Temperatura*Concentración	0,0045179	0,5693
Concentración*Concentración	1,0092351	0,0562

Nota: Aquellas probabilidades con asterisco son las significativas.

En el gráfico de esta cepa se puede observar que en la muestra se identifica un mínimo, sin embargo, el modelo no fue significativo ($p=0.1733$) y ninguno de los factores en estudio mostró significancia. De esta forma, hay una probabilidad que exista una combinación de concentración taurocolato y temperatura para esta cepa donde se alcance el óptimo de densidad óptica, pero se necesitan más repeticiones para poder confirmarlo. Debido al

comportamiento estadístico que se observa no se puede generalizar que se va a comportar de la misma forma en igualdad de condiciones.

El caso de la cepa de *C. difficile* VP1/10463, el gráfico de contorno y la superficie de respuesta (tomando en cuenta diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de taurocolato) y las probabilidades de los efectos se presentan en la Figura 4 y el Cuadro 7.

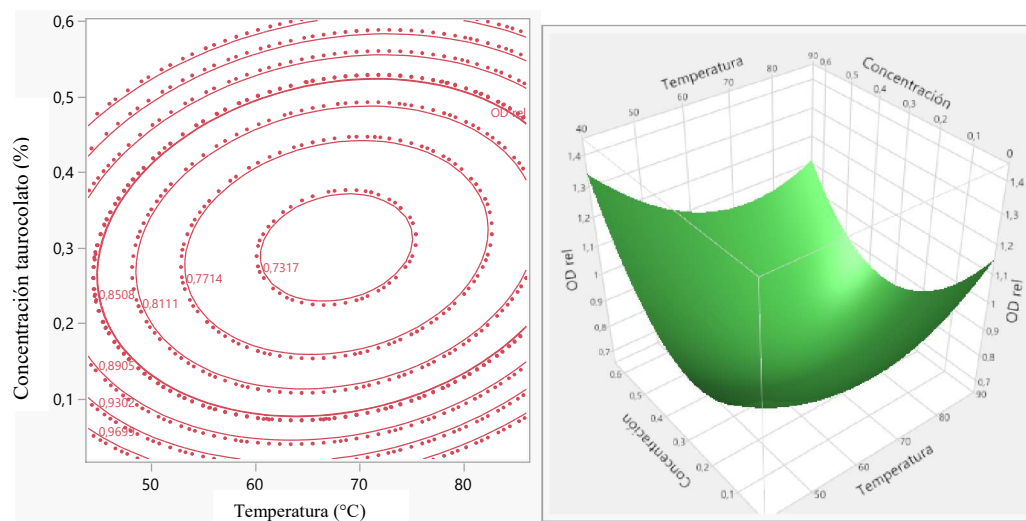


Figura 4. Gráfico de contorno y superficie de respuesta a diferentes concentraciones de taurocolato (%) y temperaturas (°C) de activación para la cepa de *C. difficile* VP1/10463.

Cuadro 7. Análisis estadístico del modelo central compuesto a diferentes concentraciones de taurocolato y temperaturas para la cepa de *C. difficile* VP1/10463.

Fuente	Estimación	Prob > F
Modelo	0,8048688	<,0001*
Temperatura	-0,001469	0,1630
Concentración	0,0363596	0,6130
Temperatura*Temperatura	0,0002585	0,0100*
Temperatura*Concentración	-0,008935	0,2185
Concentración*Concentración	2,7249864	0,0003*

Nota: Aquellas probabilidades con asterisco son las significativas.

A diferencia de la cepa NAP1/027, el modelo de VP1/10463 es significativo ($p < 0,0001$). En este caso no se presenta significancia en la interacción ni en los efectos simples, pero sí en los efectos cuadráticos ($p = 0,01$ y $p = 0,0003$). El valor predicho mínimo para este modelo es 0.7182 y se puede generalizar debido a la significancia del modelo. Este valor predicho se puede lograr con diferentes combinaciones dentro del gráfico, como por ejemplo 65°C y 0.24 % de taurocolato. El óptimo de densidad óptica se obtiene en un rango de valores entre 0,22% y 0,30% de taurocolato y 60°C y 72°C.

Existen parámetros importantes para el aislamiento y recuperación de un microorganismo esporulado como lo es la temperatura y las concentraciones del germinante. El estudio y la selección de los valores correctos para cada uno de ellos resultan de vital importancia para mejorar el rendimiento y disminuir los costos. Para poder lograr este objetivo se utilizan métodos estadísticos de optimización que permiten encontrar los valores adecuados que minimizan costos y mejoran la productividad (Liporace & Quevedo, 2020). Entre estos la metodología de superficie de respuesta (RSM) es la más conocida y ampliamente utilizada para optimizar concentraciones en procesos de fermentación. Esto es debido a que su objetivo es el de hallar las condiciones óptimas del proceso, a diferencia de los diseños experimentales simples que pretenden hallar las mejores condiciones entre las ensayadas. RSM es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que permiten modelar y analizar situaciones en las que una variable (respuesta) se encuentra influenciada por otras (factores) (Myers et al., 2016). Consiste en llevar a cabo el diseño de un experimento que permita hallar valores de la respuesta para así determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los mismos y, luego, establecer cuáles son los valores de los factores que maximizan dicha respuesta (Liporace & Quevedo, 2020).

Aunque las optimizaciones para procesos de fermentación son muy comunes, no se encontró un estudio donde se haya utilizado esta metodología para optimizar la cantidad de aditivos en medios de cultivo para alguna bacteria. Estos estudios se deberían realizar con aquellos compuestos o medios de cultivo de suponen una gran inversión al laboratorio, de

esta forma se optimizarían los recursos y se aseguraría la recuperación de la mayor cantidad de cepas de una bacteria.

Al analizar todos los resultados para las cuatro cepas estudiadas se ven diferencias en los modelos en donde algunas soluciones se encuentran fuera del rango. Esto se puede deber a que no se utilizaron las concentraciones y las temperaturas apropiadas para dar una solución al modelo. Las concentraciones y las temperaturas utilizadas para diseñar el modelo se definieron tomando como base las concentraciones de taurocolato y la temperatura de activación utilizados en los métodos que se encuentran en la literatura. Dado que todavía no existe una metodología estándar para el aislamiento y/o enumeración de *C. difficile* en alimentos, diferentes investigadores han utilizado otros protocolos desarrollados con éxito para muestras de heces (Barbosa *et al.*, 2020). Esta situación puede provocar que la concentración de taurocolato o la temperatura de activación que se usan según la literatura no se hayan optimizado para la generalidad de las cepas y para una matriz como alimentos.

Con estos resultados se pueden observar diferencias fenotípicas importantes para las cepas de *C. difficile* utilizadas. El taurocolato (y otros colatos) y la glicina actúan como cogermiñantes de las esporas de *C. difficile* (Sorg y Sonensheim, 2008), pero las esporas de diferentes aislados clínicos difieren en respuesta a las sales biliares (Heeg *et al.*, 2012). En el trabajo de Paredes-Sabja *et al.* (2008), la germinación se produjo en un medio de infusión cerebro-corazón y no aumentó con la inclusión de taurocolato. Darkoh *et al.* (2013) determinaron que algunas cepas de *C. difficile* crecen mejor que otras en presencia de taurocolato pero ninguna presentó defectos de viabilidad después de una incubación de 12 horas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, debido a que todas las cepas crecieron, pero con diferencias en su crecimiento a diferentes concentraciones de taurocolato. Diferencias en la recuperación en presencia de taurocolato entre cepas toxigénicas y no toxigénicas también se ha probado. Se observó que el número de cepas con una tasa de recuperación superior al 70%, fue mayor en las cepas toxigénicas que en las no toxigénicas, lo que sugiere una recuperación más abundante de las cepas toxigénicas de *C. difficile* en presencia de taurocolato de sodio (Kamiya *et al.*, 1987).

Anteriormente, se ha demostrado que el taurocolato no inhibe el crecimiento de *C. difficile* y aumenta la recuperación de las esporas (Foster & Riley, 2012). Sin embargo, en un estudio realizado por Nerandzic & Donskey (2009), se probó reducir la concentración de taurocolato de 0,1% a 0,05% para tratar de bajar los costos del aislamiento de esta bacteria y fue posible determinar que no hay diferencia significativa en la recuperación de la bacteria con esta modificación. De esta forma y tomando en cuenta los resultados obtenidos se podrían realizar más estudios de optimización intentando concentraciones de taurocolato no comunmente utilizadas para ver si se encuentra significancia para la cepa NAP1/027 o se logra obtener una concentración optimizada para las cepas estudiadas.

En lo que respecta al efecto de la activación por calor para la recuperación de las esporas, hay estudios que demuestran que las esporas no calentadas de *C. difficile* o las esporas calentadas a 80°C durante 10 minutos muestran una germinación muy baja en un medio sin lisozima, pero esta aumentó mil veces en presencia de 5 µg/mL lisozima y dando un 100% de germinación después del tratamiento con tioglicolato de sodio y la inoculación en un medio que contiene lisozima (Ionesco, 1978). De manera similar, la recuperación completa de las esporas de la mayoría de 108 cepas de *C. difficile* (69 toxigénicas, 39 no toxigénicas) calentadas a 80°C durante 10 minutos requirió tratamiento con tioglicolato de sodio e inoculación en un medio que contenía lisozima (Nakamura et al. 1985). La adición de la sal biliar taurocolato de sodio a un medio selectivo aumentó la recuperación de esporas de *C. difficile* aisladas de muestras clínicas y sometidas a choque térmico a 56 °C durante 10 minutos, para inactivar las bacterias vegetativas (Wilson et al., 1982). Estos estudios demuestran no solo la variabilidad de la eficacia del tratamiento de activación de las esporas según el medio de cultivo que se utilice a continuación, si no las diferentes respuestas de diferentes cepas a estos estímulos, resultados que concuerdan con nuestros resultados.

Esta diferencia entre el comportamiento fenotípico entre las cepas de *C. difficile* de este estudio refuerza el hecho de la complejidad detrás de la estandarización de un método de aislamiento o la predicción del comportamiento de todas las cepas de la misma. Sumado a esta problemática, la no selectividad de los medios para el aislamiento de esta bacteria ya fue probada por Rodriguez et al. (2016) en donde encontraron 24 bacterias pertenecientes a 10

géneros aparte de *C. difficile* que no fueron inhibidos por los métodos selectivos para esta bacteria. Esta situación hace que se busquen otras metodologías más exactas para el análisis de esta bacteria y Biasizzo et al. (2018) validaron métodos por medio de tecnologías moleculares para detectar y recuperar *C. difficile* en carnes.

De esta forma, tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, no se puede recomendar un valor estándar para todas las cepas estudiadas pero se podría indicar que el uso de concentraciones de taurocolato de 0,2% y temperaturas de activación de 75 a 85°C permitiría recuperar la mayoría de las cepas.

Debido a que las diferencias metodológicas hacen muy difícil la comparación de los datos entre estudios de prevalencia, estos datos sirven para caracterizar las cepas estudiadas y valorar diferencias en su comportamiento con el fin de determinar la mejor forma de manejarlas en el laboratorio, sin embargo, debido a que algunos modelos no son significativos se tienen que seguir estudiando los parámetros para optimizarlos de la mejor forma.

4.2. Efecto del nitrito, eritorbato de sodio, cloruro de sodio y lactato de potasio sobre la capacidad de cepas de *C. difficile* para germinar y crecer en medio de cultivo

La presencia de esporas de *C. difficile* en alimentos (principalmente en carne de cerdo) y vegetales (debido al uso de desechos de cerdo como fertilizante) (Usui et al., 2017) y su resistencia al calor a 71°C, que es la temperatura de uso más común en las carnes listas para consumir (embutidos), hace que los embutidos tengan el riesgo de ser un vector de infecciones en humanos (Rodríguez-Palacios et al., 2010).

En este sentido, se determinó el efecto de aditivos de uso común en embutidos sobre las esporas de *C. difficile*. Estos aditivos deberían ser la única barrera para que esta bacteria crezca en los embutidos ya que Redondo (2014) confirmó que esta bacteria es capaz de crecer en la carne de cerdo y la prevalencia de las esporas en distintas partes de animales de consumo

humano (intestino, piel, carne) (Gould y Limbago, 2010; Vengust, Arroyo, Weese y Baird, 2003) aumenta el riesgo de que la bacteria pueda sobrevivir y multiplicarse en productos derivados de estos animales. Si los aditivos no detienen el crecimiento de esta bacteria, puede producir más esporas que son la forma infecciosa y ser una fuente potencial de enfermedades transmitidas por los alimentos. El Cuadro 8 muestra los resultados de los experimentos de crecimiento en medios de cultivo para las 4 cepas de *C. difficile*.

Cuadro 8. Valores de absorbancia (nm) de cuatro cepas de *C. difficile* expuestas a diferentes ingredientes cárnicos y su combinación después de 12 horas de incubación.

Aditivos	Cepa			
	NAP1/027	NAP7/078	VPI/10463	C30
Nitrito	0,171±0,056 ^{hijk}	0,013±0,002 ^{jk}	0,450±0,050 ^{def}	0,410±0,070 ^{efg}
Eritorbato	0,800±0,059 ^a	0,351±0,104 ^{fg}	0,597±0,093 ^{bcd}	0,594±0,043 ^{bcd}
Lactato	0,156±0,045 ^{hijk}	0,028±0,031 ^{jk}	0,263±0,050 ^{ghi}	0,308±0,086 ^{fgh}
Sal	0,166±0,044 ^{hijk}	0,016±0,012 ^{jk}	0,389±0,090 ^{efg}	0,408±0,036 ^{efg}
Todos	0,109±0,010 ^{ijk}	0,006±0,003 ^k	0,175±0,050 ^{hij}	0,175±0,043 ^{hij}
Ninguno	0,747±0,031 ^{ab}	0,422±0,040 ^{efg}	0,551±0,031 ^{cde}	0,623±0,022 ^{bc}

Nota: Los valores de absorbancia seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes según el análisis de Tukey. Se determinó que el tipo de aditivo es dependiente del tipo de cepa por lo que la interacción es significativamente diferente ($p < 0,05$).

Después de la exposición a diferentes ingredientes cárnicos, se observaron diferencias significativas para cada cepa. En general, la combinación de los cuatro ingredientes cárnicos resultó en una inhibición significativa del crecimiento. Se observaron valores de absorbancia más bajos para las cepas epidémicas (NAP1/RT027 y NAP7/RT078) en comparación con los otros aislamientos. En el caso del efecto de los ingredientes individuales, se reportó inhibición significativa para nitrito, lactato y sal en el caso de todas las cepas a excepción del aislamiento de referencia VPI/104693; para esta cepa de referencia se informó una inhibición significativa solo en el caso del lactato. Curiosamente, el eritorbato de sodio fue el único ingrediente que no provocó ninguna inhibición. Después de 24 horas de incubación (datos

no mostrados), se observó alguna reducción en los valores de absorbancia probablemente debido a la esporulación.

Solo existe un estudio que evaluó el efecto de ingredientes cárnicos sobre las células vegetativas de *C. difficile* en el que se probó la susceptibilidad de once cepas de esta bacteria frente a conservantes alimentarios de uso común (nitrito de sodio, nitrato de sodio y metabisulfito de sodio). En este caso no se observó actividad bactericida y se demostró que el patógeno puede sobrevivir en presencia de estos conservantes incluso en un nivel más alto permitido en carnes listas para consumir (Lim et al, 2016).

En esta investigación, se probó la susceptibilidad de esporas de cuatro cepas a cuatro conservantes de alimentos de uso común y la observación fue la misma que Lim et al (2016) porque todas las cepas sobrevivieron a los cuatro ingredientes. El efecto observado fue que todas las cepas se inhibieron con todos los conservantes alimentarios y por la combinación de todos ellos, pero la inhibición presenta niveles diferentes entre conservantes y cepas. Lim et al (2016) encontraron que la MIC general era de 250 ppm de nitrito pero hay una diferencia entre las cepas y algunas de las cepas se inhiben a concentraciones más bajas; esto está en concordancia con nuestro estudio porque encontramos inhibiciones a 200 ppm de nitrito de sodio en tres de las cuatro cepas probadas.

En general, las cepas epidémicas fueron más inhibidas que los aislamientos del ambiente clínico y la carne. Esto puede estar relacionado con la exposición a productos químicos antimicrobianos y la adaptación de estas cepas específicas con mecanismos de resistencia a diferentes tipos de preservantes. En un estudio Malyshev et al. (2023) se comprobó la resistencia de las esporas de *C. difficile* al hipoclorito de sodio por una sobreexposición a estas sustancias y aún si sufren cambios en su composición por la exposición. De esta forma se puede sugerir que los embutidos no son un vehículo de transmisión para estas cepas.

De las cuatro cepas probadas, la C30 es la que más preocupa. Esta cepa fue menos inhibida por todos los aditivos probados y llama la atención la falta de inhibición por parte del nitrito de sodio que se usa comúnmente en los embutidos para inhibir la germinación y el

crecimiento de esporas de cepas patógenas. El mecanismo de inhibición del nitrito de sodio es por la inhibición del sistema fosforoclástico que provoca una disminución de la concentración de ATP intracelular y la acumulación de piruvato (Wood et al, 1981) lo que se discutirá más adelante en este trabajo. Con estas cepas, este mecanismo no incide en el crecimiento y por tratarse de una cepa procedente de cultivo animal supone un riesgo en la transmisión alimentaria.

El lactato y el cloruro de sodio tienen el mismo efecto inhibitorio en todas las cepas. Los lactatos se utilizan como humectantes y potenciadores del sabor en productos cárnicos y avícolas y contribuyen a aumentar la cocción y la retención de agua, pero también tienen efecto antimicrobiano en el crecimiento de microorganismos y su efecto ha sido probado en diferentes productos incluyendo productos cárnicos. Este efecto antimicrobiano se debe a que el lactato tiene la capacidad de disminuir la actividad del agua (a_w) y se ha demostrado que funciona en anaerobios (Shelef, 1994). Se ha demostrado que la incorporación de lactatos en carne de pavo y cerdo, independientemente del tipo (sales de Ca, Na o K), inhibe la germinación y crecimiento de las esporas de *C. perfringens* en concentraciones menores al 4,8%.

El aumento de las concentraciones de los antimicrobianos da como resultado una mayor inhibición de la germinación y el crecimiento de las esporas en los productos (Velugoti et al., 2007). Aran (2001) encontró que se necesitaba un 3% de lactato de sodio para inhibir el crecimiento de *B. cereus* y *C. perfringens* a 20°C en un goulash de res “sous vide”. Houtsma et al. (1994) demostraron que el lactato de sodio (2%) inhibía la germinación de las esporas de *C. botulinum*, lo que explica parcialmente el efecto inhibitorio del lactato de sodio sobre el crecimiento y la formación de toxinas y además este efecto era no relacionado con el a_w logrado. Estos hallazgos son similares a los resultados encontrados en este experimento con *C. difficile* que fue inhibida al 2% de lactato de sodio pero aún tiene crecimiento.

Es importante que en este estudio se utiliza la concentración más común utilizada en la industria alimentaria para embutidos y aunque este aditivo se ha utilizado como natural en embutidos no es una barrera eficaz para controlar completamente la germinación y

crecimiento de *C. difficile* en productos cárnicos. Si se desea conocer la CMI (concentración mínima inhibitoria) de *C. difficile* para estos aditivos, se debe realizar otro experimento.

La sal (NaCl) es un ingrediente esencial en los productos cárnicos procesados y contribuye a la capacidad de retención de agua, el color, las propiedades de retención de grasas, el sabor y la textura. Además, la sal disminuye la actividad del agua (a_w) y esto afecta significativamente la vida útil (Aliño et al, 2010). En el cuadro 8 es evidente que la sal (1,74%) tiene un efecto sobre la germinación y el crecimiento de las cuatro cepas de *C. difficile* analizadas. Estudios como el de Kim et al (2016) que encontraron que *B. cereus* disminuyó al aumentar la concentración de NaCl (5 – 15 %) y el tiempo de almacenamiento a 10 °C o el de Houtsma et al. (1994) que no encontraron efecto del NaCl al 2% sobre el crecimiento de *C. botulinum* y no observaron un efecto sinérgico claro entre el lactato y el NaCl para esta inhibición, son importantes para comparar el comportamiento diferente entre *B. cereus*, *C. botulinum* y *C. difficile*. Se puede apreciar que la sal tiene un efecto inhibitorio significativo sobre *C. difficile* a concentraciones más bajas que para *B. cereus* y *C. botulinum*.

En el caso de *C. perfringens* una concentración de NaCl de > 3% detiene completamente el crecimiento y una concentración > 2% logra un crecimiento de 1 log₁₀ UCF/g en un tiempo de enfriamiento de 15 horas según lo probado por Zaica (2003). Estos resultados son más acordes con lo observado para *C. difficile* que indica que a la concentración evaluada hay una inhibición pero no un cese completo de crecimiento y se tendrían que realizar más estudios para determinar si *C. difficile* se podría inhibir completamente a valores de NaCl mayores a 3%, ya que esto conllevaría a tener una opción viable para la industria de embutidos con un inhibidor del crecimiento que es natural.

El eritorbato (isoascorbato) se usa como potenciador del curado y fue reconocido como un factor relevante para el control antimicrobiano en productos cárnicos (Robinson et al., 1982). Tompkin et al. (1978) demostraron cómo la presencia de pequeñas cantidades de isoascorbato de sodio mejoraba el efecto antibotulínico de los nitritos, incluso en las concentraciones más bajas. De hecho, en un estudio realizado por Redondo et al. (2013) se observó que el crecimiento de *C. perfringens* disminuía a concentraciones de 200 ppm de

nitrito al adicionar 547 ppm de eritorbato. El mecanismo propuesto es la capacidad del isoascorbato para secuestrar hierro en la carne, no haciéndolo disponible para el crecimiento bacteriano (Tompkin, 2005). Esto respalda los hallazgos de este experimento porque para todas las cepas probadas no se inhibió con el uso de eritorbato solo, pero cuando se usa con todos los demás aditivos es posible que se produzca el efecto de sinergia. Este comportamiento se puede deber al poder reductor del eritorbato que, aunque no potencia el crecimiento de *C. difficile*, propicia un ambiente adecuado para su germinación y crecimiento si se usa por sí sólo, lo que demuestran los resultados obtenidos al no encontrar diferencias significativas en el crecimiento obtenido en el control que no contiene ningún aditivo y la solución con eritorbato. Para la industria de embutidos o carnes listas para el consumo, este debería ser tomado en consideración debido a que en Costa Rica se comercializan embutidos a los cuales no se les adiciona nitritos y esto puede conllevar un problema respecto al crecimiento de *C. difficile* en estos productos. A estos productos se les adiciona apio (fuente natural de 2,7% de nitrito cuando se comercializan en polvo) o sales ricas en nitrito, también hay nuevos productos como polifenoles de origen natural los cuales actúan sobre la membrana de los microorganismos liberando los componentes celulares y afectando al microorganismo (Hernandes, 2021). Estos productos que contienen polifenoles han demostrado que pueden mantener la misma vida útil de un embutido que a los que se les adicionan nitritos (Nikolić et al, 2020) y se inoculan con *C. botulinum* (Reddy et al, 1982). Sin embargo, a la luz de nuestros resultados es importante demostrar que estos compuestos podrían tener un efecto inhibitorio en *C. difficile* y tener el mismo poder antimicrobiano por sí solo o en combinación con eritorbato. Es importante realizar más estudios tomando en cuenta estos embutidos como modelo con el fin de determinar el potencial riesgo en salud pública que puede significar el no uso de nitritos y sus sustitutos y la presencia de *C. difficile* en ellos.

4.3. Determinación del efecto de la congelación previa en la germinación y el crecimiento de *C. difficile*

Un creciente conjunto de trabajos sugiere que los productos cárnicos pueden ser un reservorio importante de esporas de *C. difficile* (Rodríguez-Palacios et al., 2009, Rodríguez-

Palacios et al., 2007, Rupnik, 2007, Songer et al., 2009, Weese et al., 2009). Aunque comúnmente se utilizan temperaturas bajas para aumentar su vida útil, incluidas temperaturas de congelación (es decir, $<-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y refrigeración (es decir, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), la capacidad de las esporas de *C. difficile* para sobrevivir a estas condiciones de almacenamiento no está clara (Deng et al, 2015).

También es importante tomar en cuenta que algunos embutidos requieren de un control de temperatura durante el proceso de emulsificación de menos de 15°C para lograr una máxima estabilidad de la emulsión y evitar alteraciones sensoriales. Esto hace que las materias primas (carne y grasa) utilizadas en este proceso necesitan estar refrigeradas o congeladas para poder lograr este control de temperatura y por esa razón puede ser que dichas materias primas se encuentren congeladas o refrigeradas por lo que podría ser un largo periodo de tiempo.

Por otra parte, la refrigeración y la congelación son los métodos más comunes utilizados para maximizar y/o extender la vida útil de los productos alimenticios. Las esporas de *C. difficile* sobreviven a bajas temperaturas durante largos períodos de tiempo. Freeman y Wilcox (2003) informaron la supervivencia en condiciones de almacenamiento congelado (-4 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante casi 2 meses y varios ciclos de congelación/refrigeración/descongelación en una solución tampón. Deng et al. (2015) también informaron que las esporas de *C. difficile* eran viables después de 4 meses en una solución tampón y en carne molida a temperatura ambiente (definida por estos autores como $23\text{ }^{\circ}\text{C}$), refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), congelación (-20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) y después de múltiples ciclos de congelación/descongelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}/23\text{ }^{\circ}\text{C}$). Atribuyeron esta observación, al menos en parte, al efecto protector de la matriz cárnica (Deng et al., 2015, 2017).

Debido a esto la determinación del efecto de la congelación en la germinación y crecimiento de *C. difficile* es importante para determinar si esta condición de almacenamiento de las materias primas o producto terminado podría generar un beneficio para la inocuidad de los embutidos, que tienen una posibilidad de tener esporas de esta bacteria. Asimismo, es relevante en términos de valorar posibles efectos de las condiciones de almacenamiento de

algunos alimentos sobre la respuesta de *C. difficile* a los métodos de aislamiento en el laboratorio. Los datos de absorbancia de cada una de las cepas utilizadas después de encontrarse congeladas por 1, 7 y 30 días se encuentran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Valores de absorbancia de cuatro cepas de *C. difficile* expuestas a diferentes tiempos de congelación después de 12 horas de incubación.

Cepa	Tiempo de congelación (días)			
	30	7	1	0
NAP1/027	0,085 ± 0,004 ^{cde}	0,010 ± 0,001 ^e	0,014 ± 0,011 ^e	0,418 ± 0,068 ^{fg}
NAP7/078	0,060 ± 0,041 ^{de}	0,010 ± 0,004 ^e	0,012 ± 0,003 ^e	0,465 ± 0,049 ^{fg}
VPI/10463	0,280 ± 0,017 ^{ab}	0,180 ± 0,098 ^{bcd}	0,362 ± 0,139 ^a	0,560 ± 0,037 ^f
C30	0,236 ± 0,020 ^{abc}	0,286 ± 0,075 ^{ab}	0,355 ± 0,010 ^a	0,633 ± 0,020 ^f

Nota: Los valores de absorbancia seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes según el análisis de Tukey. Se determinó que el tipo de aditivo es dependiente del tipo de cepa por lo que la interacción es significativamente diferente ($p < 0,05$).

Como se observa en el cuadro las cepas NAP1 (027), NAP7 (078) y C30 no presentan diferencia significativa en los diferentes tiempos de congelación pero presenta diferencia significativa con el tiempo 0 y por esta razón se puede afirmar que la congelación tiene un efecto en la germinación y crecimiento de *C. difficile* pero no una inhibición completa y que para estas cepas no hay diferencia entre el tiempo de congelación.

Para el caso de la cepa VPI (10463) se encuentra diferencia significativa en el tiempo y esto se muestra al observar que a los 7 días y al día 1 hay diferencia significativa lo que conlleva a que la interacción sea significativa. Sin embargo, el comportamiento no tiene lógica ya que no se observa diferencia significativa entre 30 días y 1 día. En este caso al igual que las cepas anteriores si se observa una diferencia significativa entre el tiempo 0 y los demás tiempos de congelación por lo que podemos decir que cualquier tiempo de congelación influye negativamente en la germinación y crecimiento y viabilidad de las esporas de *C. difficile*.

Al observar los datos se puede evidenciar que de forma general las cepas NAP1 (027) y NAP7 (078) crecen menos que las VPI (10463) y C30 para todos los tiempos estudiados. En un estudio que evalúa la viabilidad de cepas de *C. difficile* (*C. difficile* M120/078 y *C. difficile* R20291/027) a temperaturas de congelación realizado por Deng et al. (2015) los resultados muestran que el almacenamiento de 4 meses a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ causó solo reducciones decimales de 0,7 y 1,7 en la viabilidad de las esporas de *C. difficile* R20291 y M120, respectivamente. Después de 4 meses de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la reducción en la viabilidad de las esporas fue de 1,2 y 1,7 log UFC/ml para R20291 y M120, respectivamente. Estos resultados indican que las esporas de *C. difficile*, aunque se inactivan hasta cierto punto tras un almacenamiento de 4 meses a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pueden persistir a temperaturas de almacenamiento bajo cero durante periodos de tiempo prolongado. Estos resultados concuerdan con observaciones anteriores de Freeman y Wilcox (2003) sobre esporas de *C. difficile* en muestras fecales e informes sobre la supervivencia a bajas temperaturas de esporas de *C. welchii*, *C. perfringens* y *B. cereus* (Barnes et al., 1963, Cronin y Wilkinson, 2008, Li y McClane, 2006). De esta forma se puede afirmar que la congelación de la carne tiene efecto sobre la viabilidad de las esporas de *C. difficile*, presentando diferencias entre cepas de este mismo microorganismo en cuanto al porcentaje de esporas viables que se obtienen después del tratamiento.

Deng et al (2015) también evaluó el efecto de múltiples ciclos de congelación y descongelación sobre la viabilidad in vitro de las esporas de *C. difficile*. Las esporas de *C. difficile* se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descongelaron a temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$) diez veces. Se observó una reducción significativa de la viabilidad de las esporas de 0,9 log UFC/ml de 7,2 a 6,3 log UFC/ml ($p < 0,01$) para las esporas M120/078, mientras que se observó una reducción no significativa de 4,6 a 4,3 log UFC/ml ($p = 0,07$). para esporas de R20291/027. Estos resultados indican que, a pesar de que múltiples ciclos de congelación y descongelación podrían inactivar algunas esporas, es probable que muchas sobrevivan y persistan en carnes contaminadas con *C. difficile*.

Los resultados obtenidos en las investigaciones y en este estudio demuestran que la congelación tiene un efecto en la viabilidad de las esporas de *C. difficile* y esto eventualmente se podría utilizar como un método de control de este microorganismo en la industria cárnica. Como se indicó anteriormente la congelación es común en el procesamiento de productos cárnicos debido a las bajas temperaturas necesarias para hacer la emulsión y esto podría ser la razón por la que las incidencias de este microorganismo en diferentes productos cárnicos son bajas (8% a 42%) (Candel-Pérez et al, 2019). Debido a que la dosis infectante de este microorganismo no es conocida, es difícil determinar si los resultados en este estudio demuestran que la cantidad de *C. difficile* reducida es suficiente para declararlo seguro, pero si se continúan los estudios, esta podría ser una medida preventiva para la incidencia de este microorganismo en embutidos.

4.4. Determinación del efecto del tiempo de pre-reducción en la germinación y el crecimiento de *C. difficile*

Como anaerobio obligado, *C. difficile* puede sobrevivir pero no crecerá en presencia de oxígeno atmosférico. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas estas bacterias se multiplicarán cuando haya suficiente disponibilidad de nutrientes y otros factores favorables como el pH, el agua disponible (aw) y la temperatura (Jump et al., 2007).

Durante y después del sacrificio, que se considera post mortem, se producen muchos cambios químicos y estructurales que afectarán la calidad y el funcionamiento de la carne. Estos cambios se conocen como la conversión de músculo en carne. En el animal vivo, el glucógeno (almidón animal) se transporta desde el hígado hasta el músculo. Cuando se necesita energía para la contracción, el glucógeno se convierte en ATP. Para que se produzca esta reacción es necesario que haya oxígeno en el sistema. La mioglobina es la encargada de almacenar el oxígeno en el músculo que puede usarse para crear ATP. Después de la muerte, la reacción descrita anteriormente continúa mientras haya oxígeno en el sistema. Cuando el oxígeno se agota y no se puede reponer debido a la extracción de sangre durante el sacrificio, esto genera un ambiente libre de oxígeno por lo que la carne se convierte en una matriz reducida (MacDougall, 1982; Belitz & Grosch 1992; Fennema, 1996). Se puede incorporar

oxígeno (del aire) al producto cárnico procesado durante la molienda, picado y otros procesos similares cuando se realizan en condiciones ambientales. El oxígeno residual podría reducirse por el poder reductor inherente de la carne y/o la actividad reductora de agentes reductores como ascorbato y eritorbato, ingredientes cárnicos comunes añadidos durante la formulación y preparación del producto (Andersen et al., 1990). Además la carne de res primaria, subprimal y cortes minoristas a menudo se almacenan en paquetes al vacío que extienden la vida útil al minimizar las concentraciones de oxígeno, inhibiendo así las bacterias aeróbicas de deterioro como *Pseudomonas* spp. (Mills et al., 2014) y por otra parte el oxígeno residual en los productos cárnicos disminuye durante almacenamiento y se estima que las concentraciones de oxígeno inferiores a 0,1% se necesitan para evitar la decoloración de los productos curados (Moller et al., 2000). Se ha informado una concentración de oxígeno residual del 0,1% en carnes empacadas al vacío inmediatamente después del empacado (Smiddy et al., 2002). De esta forma la carne es un ambiente reducido y con una baja cantidad de oxígeno, sin embargo, puede haber concentraciones residuales de oxígeno que podrían afectar la germinación y crecimiento de *C. difficile*, similar a lo que sucede en los medios de cultivo utilizados en los laboratorios. Por otra parte, tanto el pH (aproximadamente entre 5,5 y 6,5) como el alto contenido de nutrientes de la carne de vacuno favorecerían la germinación y crecimiento de *C. difficile* si no se mantuvieran las temperaturas de almacenamiento refrigeradas (Bouttier et al., 2010).

C. difficile tiene una temperatura de crecimiento óptima de 37 °C, pero puede sobrevivir en productos cárnicos durante períodos prolongados a temperaturas frías (Flock et al., 2016). Por lo tanto, la carne envasada al vacío puede presentar un riesgo particular de infección por *C. difficile* si estas bacterias pueden sobrevivir y/o crecer a las temperaturas de almacenamiento que se encuentran en las condiciones domésticas o de venta al por menor o puede ser una contaminación cruzada si se utiliza como materia prima para un proceso de embutido. Por esta razón se evaluó el efecto que tiene una pre-reducción del medio de cultivo antes de la incubación en la germinación y el crecimiento de *C. difficile* como modelo para simular las posibles condiciones a las que se somete las esporas en la industria cárnica. Los resultados se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Valores de absorbancia de cuatro cepas de *C. difficile* expuestas a diferentes tiempos de pre-reducción después de 12 horas de incubación.

Cepa	Tiempo de prereducción (horas)	
	0	3
NAP1/027	0,418 ± 0,068 ^c	0,465 ± 0,083 ^{bc}
NAP7/078	0,465 ± 0,049 ^{bc}	0,434 ± 0,019 ^{bc}
VPI/10463	0,560 ± 0,037 ^{ab}	0,558 ± 0,058 ^{ab}
C30	0,633 ± 0,020 ^a	0,456 ± 0,045 ^{bc}

Nota: Los valores de absorbancia seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes según el análisis de Tukey. Se determinó que el tipo de aditivo es dependiente del tipo de cepa por lo que la interacción es significativamente diferente ($p < 0,05$).

Como se observan en los resultados todas las esporas de las cepas germinaron y crecieron aún cuando el medio no estaba prereducido (0 horas) y no se encontró diferencia significativa para los tiempos de 0 y 3 horas para ninguna de las cepas con excepción de la C30, resultados que no era lo que se esperaba según la literatura. En un estudio realizado por McSharry *et al* (2021), se estudió el comportamiento de las esporas de *C. difficile* a diferentes concentraciones de oxígeno (ambiente y vacío) a 20°C, demostrando que *C. difficile* no crece en condiciones aeróbicas debido a que es un anaerobio obligado y las células vegetativas son sensibles incluso a niveles bajos de oxígeno (Deng *et al.*, 2017; Holy & Chmelar, 2012). Por este motivo el crecimiento de *C. difficile* debería ser menor en el tiempo de 0 horas de prereducción, ya que el medio tiene una concentración de oxígeno en el momento en que se inocula. En otro estudio realizado por Redondo *et al.* (2013) utilizando esporas de *C. perfringens* en condiciones anaeróbicas, demostraron que la inhibición en la germinación y el crecimiento de las esporas de *C. perfringens* es más evidente durante las primeras etapas posteriores a la preparación y envasado de las muestras de carne. Después de 24 horas de almacenamiento, se observó una menor inhibición en las muestras preparadas. Contrario al *C. difficile*, el *C. perfringens* es tolerante al oxígeno (en el aire), y este estudio demuestra que la exposición continua al oxígeno o las especies reactivas del oxígeno en la carne preparada

y envasada al vacío pueden inhibir germinación y crecimiento de esporas, por lo que se esperaba una reacción más marcada en la inhibición de la germinación y el crecimiento de *C. difficile*.

Para la cepa C30 se observa diferencia significativa en ambos tiempos de prereducción (0 y 3 horas) pero presenta un crecimiento menor a las 3 horas de prereducción lo que no es lo que se esperaba ya que la menor concentración de oxígeno debería potenciar el crecimiento. En el estudio de McSharry et al (2021) donde se observó un aumento inicial de las esporas de *C. difficile* empacadas en bolsas con baja barrera al oxígeno seguido por una disminución hasta una concentración final de 1,0 log₁₀ ufc/g después de 8 días. Como explican Lund y Peck (2015), las esporas de *C. difficile* pueden germinar en condiciones con presencia de bajos niveles de oxígeno que impiden el crecimiento posterior de las células vegetativas. Luego, estas células se inactivan, lo que puede explicar la disminución observada en el experimento de McSharry et al (2021). Para poder hacer una estimación real del efecto de la prereducción se tendría que medir crecimiento y no absorbancia como se hizo en este estudio, ya que la absorbancia no se puede relacionar con las unidades formadoras de colonia, lo que hace difícil la comparación con otros estudios.

Por otra parte, Weiss et al. (2021) demostraron que *C. difficile* se adapta al crecimiento en un ambiente con poco oxígeno a través de cambios transcripcionales, aunque la estrategia específica empleada varía entre cepas. En este estudio dos cepas de *C. difficile* (630 y CD196) se cultivaron a 1,5% de oxígeno y se observó la activación de genes protectores al estrés oxidativo como las rubretrinas y rubredoxinas, además de genes implicados en la homeostasis de los metales. Algunas de estas respuestas fueron similares entre las dos cepas, se encontraron diferencias en los transcritos involucrados en amino ácidos y metabolismo de carbohidratos. En el caso del estudio realizado por Yuille et al. (2020) se demostró que el potencial redox no afecta el crecimiento de *C. difficile* 027 al agregar ferricianuro de potasio al medio de cultivo para modificar el potencial redox y medir la absorbancia a las 48 horas. Estos estudios demuestran la capacidad de *C. difficile* de adaptarse a ambientes con pequeñas cantidades de oxígeno y variaciones del potencial redox (ΔE_h -200 y -400), lo que concuerda

con nuestros resultados y demuestra que el *C. difficile* a pesar de ser un anaerobio obligado, puede adaptarse.

Tomando en cuenta todos los resultados en un modelo donde un medio de cultivo se prereduce antes de ser inoculado con esporas de *C. difficile*, no hay diferencia significativa en su germinación y crecimiento por lo que esta práctica no debería de afectar la germinación y crecimiento de las esporas.

4.5. Determinación del efecto de variaciones en la concentración de nitrito sobre la capacidad de cepas de *C. difficile* para germinar y crecer en un producto cárnico modelo

Aunque la transmisión de *C. difficile* a través de alimentos requiere más investigación, el aumento de los casos de *C. difficile* adquiridos en la comunidad, junto con los crecientes informes de este patógeno en todas las etapas de la cadena alimentaria, incluidos tubérculos, verduras de hojas verdes, mariscos, carnes y lácteos sugiere que los alimentos pueden ser una fuente importante. Además, su resistencia a los conservantes alimentarios y a las bajas temperaturas de almacenamiento facilita la supervivencia a lo largo de la cadena alimentaria y sobretodo tomando en cuenta que las esporas de *C. difficile* son la forma infectante y las presentes en el producto final se remontan a la contaminación de las materias primas en la granja. Los alimentos listos para el consumo son motivo de especial preocupación, ya que no existe la posibilidad de eliminar o destruir *C. difficile* antes del consumo (Marcos *et al.*, 2023).

Para controlar el riesgo de enfermedades derivadas del consumo de alimentos contaminados, es fundamental estudiar las intervenciones, como la cocción, que puedan reducir o eliminar las esporas de *C. difficile* en los alimentos. Los estudios indican que temperaturas suaves, como 60 °C o 70 °C, no inactivarán las esporas de *C. difficile*, lo que requiere temperaturas mínimas de 80–85 °C (Marcos *et al.*, 2023). Aunque existen varios estudios de inactivación térmica y del efecto de aditivos alimentarios, estos no han sido validados en matrices alimentarias reales y, por lo tanto, es posible que no proporcionen un

modelo adecuado para evaluar el comportamiento de este patógeno (Redondo-Solano et al., 2016).

Por lo anterior en este estudio se evaluó el efecto de una matriz cárnica formulada con diferentes concentraciones de nitrito y el tratamiento térmico recomendado para embutidos, sobre la germinación y crecimiento de dos cepas de *C. difficile* (NAP1/027 y NAP7/078) para construir un modelo que permita observar el comportamiento a travez del tiempo. Se realizaron pruebas preliminares de recuperación de esporas de las 4 cepas de este estudio, en el modelo que se iba a utilizar en el experimento.

Una vez realizadas las pruebas preliminares no se pudo recuperar esporas de las cepas C30 y VP1 por lo que se decidió no utilizarlas en este estudio. Ya se ha hablado anteriormente de las diferencias entre cepas y en este caso se prueba una vez las diferencias en el comportamiento relacionado con el tratamiento térmico de las 4 cepas. En este estudio se utilizó un medio de cultivo enriquecido con taurocolato y en los estudios realizados por Kamiya et al (1989) ya se había comprobado que era mejor la utilización de un medio con tioglicolato y lisozima para la recuperación de esporas tratadas térmicamente. Por lo anterior este experimento se podría repetir con las dos cepas que no se utilizaron tratando de recuperarlas con un medio de cultivo que contenga lisozima.

Se elaboró un modelo cárnico en donde carne de cerdo se molió y se le añadió la concentración de nitrito correspondiente. Una vez realizado el tratamiento térmico y la incubación a diferentes tiempos, se realizó el recuento de esporas y se construyeron los modelos primarios utilizando Baranyi y Roberts por medio del Combase[®]. La representación gráfica se observan en las Figuras 5 y 6.

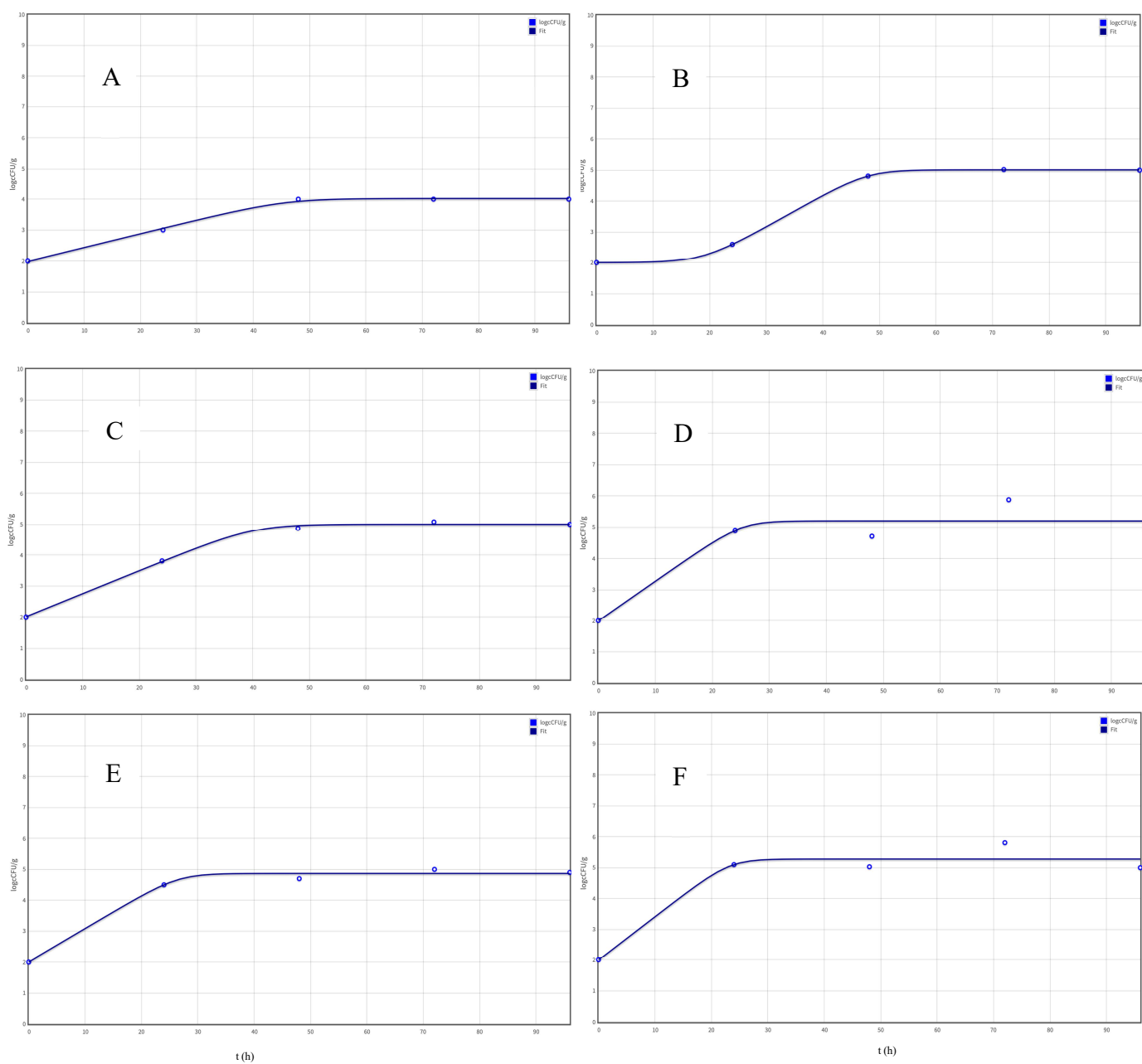


Figura 5. Modelos primarios de NAP1/027 a diferentes concentraciones de nitrito (A: 0 ppm, B: 50 ppm, C: 100 ppm, D: 150 ppm, E: 200 ppm y F: 250 ppm) y diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) en un modelo de carne de cerdo.

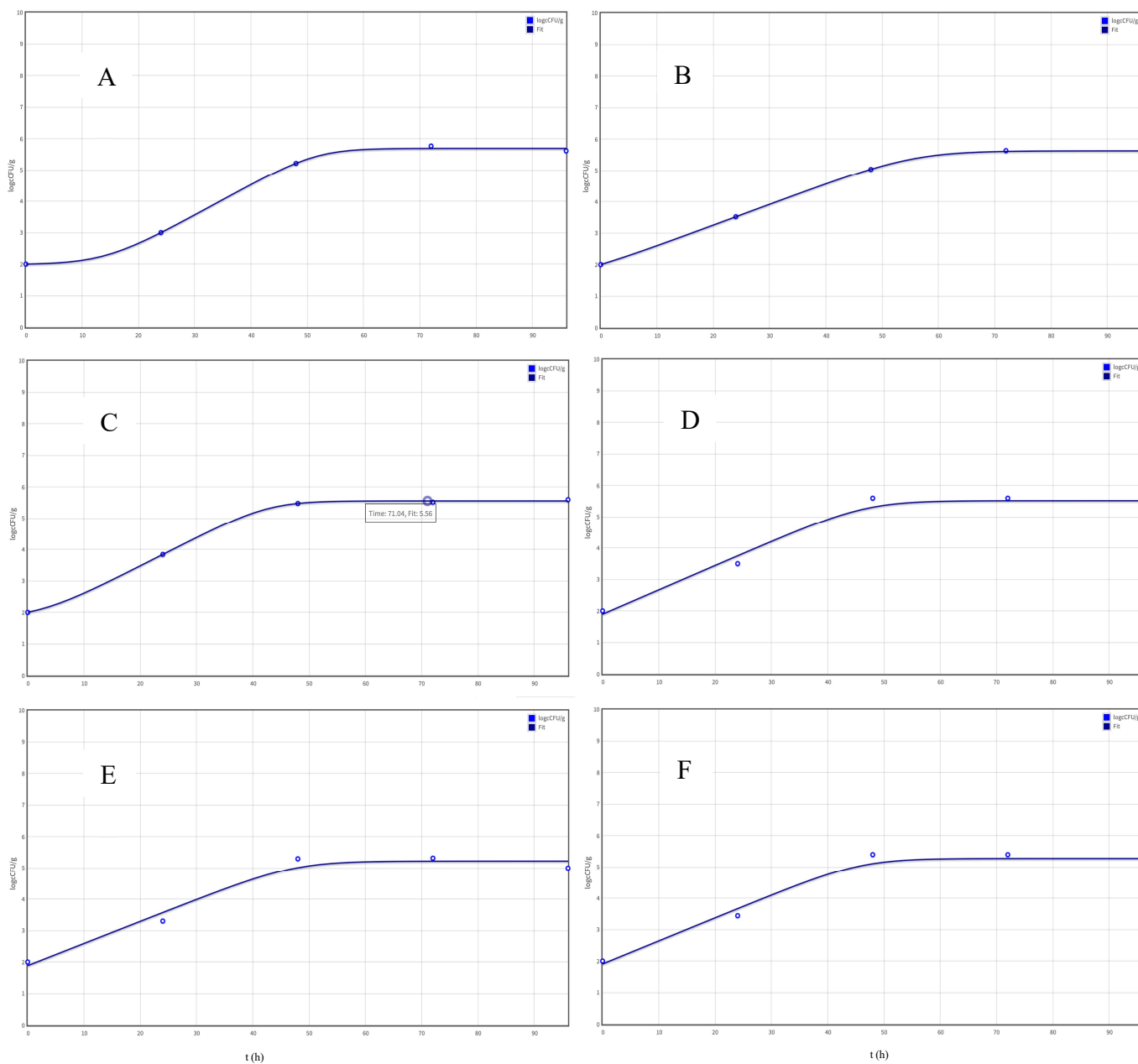


Figura 6. Modelos primarios de NAP7/078 a diferentes concentraciones de nitrito (A: 0 ppm, B: 50 ppm, C: 100 ppm, D: 150 ppm, E: 200 ppm y F: 250 ppm) y diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) en un modelo de carne de cerdo.

En las Figuras 5 y 6 se observan que en todas las concentraciones de nitrito hay germinación y crecimiento para ambas cepas y en las concentraciones más bajas se observa una fase lag (0, 50 ppm) mientras que para las concentraciones más altas la germinación y el crecimiento es más acelerado. Este comportamiento era de esperarse con los resultados que se habían obtenido en el objetivo 2, en donde aunque en la concentración más alta de nitrito se ve una inhibición sigue presentando germinación y crecimiento. No hay datos reportados para esta bacteria en estas condiciones sin embargo se realizó un estudio en donde se inoculó mortadela formulada con nitrito a 150 ppm y diferentes concentraciones de aceites esenciales, en donde se encuentra que a pesar de la concentración de nitrito y los diferentes aceites esenciales no hay inhibición de *C. difficile* en la mortadela (NMP/g) (Dias et al, 2022).

Los datos de las tasas de crecimiento y los R^2 para las figuras presentadas se encuentran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Tasas de crecimiento y R^2 para los modelos primario de dos cepas de *C. difficile* en carne de cerdo a diferentes concentraciones de nitrito y empacada al vacío.

Concentración de nitrito (ppm)	NAP1/027		NAP7/078	
	Tasa de crecimiento (\log_{10} UFC/h)	R^2	Tasa de crecimiento (\log_{10} UFC/h)	R^2
0	0,055±0,016 ^a	0,995	0,099±0,008 ^a	0,996
50	0,104±0,016 ^b	1,000	0,066±0,003 ^{ab}	0,999
100	0,074±0,005 ^a	0,996	0,092±0,014 ^b	0,999
150	0,123±0,045 ^{bc}	0,819	0,077±0,014 ^{ab}	0,961
200	0,108±0,012 ^b	0,983	0,071±0,016 ^{ab}	0,947
250	0,132 ±0,036 ^c	0,899	0,073±0,016 ^{ab}	0,950

Nota: Los valores de absorbancia seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes según el análisis de Tukey ($p < 0,05$).

En este cuadro se puede observar que lo R^2 para todos los modelos de Baranyi son aceptables. Tomando las tasas de crecimiento se puede observar que ambas cepas se comportan de forma diferente. Para la cepa NAP1/027 se observan diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las concentraciones de nitrito en donde el valor que no sigue una tendencia ascendente es el de 100 ppm. Para NAP7/078 los valores que presentan una diferencia significativa es 0 y 100 ppm. Para el caso del NAP1/027 se podría decir que presenta tasas de crecimiento mayores conforme aumenta la concentración de nitritos, mientras que para NAP7/078 las tasas de crecimiento se mantienen relativamente constantes.

Estas diferencias entre cepas de *C. difficile* se han encontrado en otro estudio en donde identificaron la flexibilidad metabólica de 13 cepas de *C. difficile*, donde se vieron diferencias significativas en la absorción de aminoácidos aromáticos y las vías de fermentación asociadas al metabolismo del carbono (Ridel et al, 2017). Esta flexibilidad metabólica es lo que sienta las bases para la adaptación de la bacteria en el curso de la infección y a condiciones cambiantes del medio que se desarrolla como podría ser un modelo cárnico.

En otros estudios se han reportado tasas de crecimiento para *C. difficile* y otros microorganismos a diferentes condiciones a las evaluadas en este experimento. Por ejemplo, Juneja & Marks (1999) determinaron las tasas de crecimiento de *C. botulinum* a temperaturas de 12°C hasta 48°C, obteniendo valores de 0,061 hasta 1,17 \log_{10} UFC/h. Juneja et al. (2008) determinaron las tasas de crecimiento de *C. perfringens* a temperaturas desde los 13°C hasta 51°C, obteniendo valores de 0,02 hasta 2,84 \log_{10} UFC/h. Redondo-Solano (2014) determinó las tasas de crecimiento de dos cepas *C. difficile* (12 y 27) a cinco temperaturas (20, 25, 30, 37 y 40°C) obteniendo valores de 0,1459 a 0,3030 \log_{10} UFC/h. Se puede observar que de forma general las tasas de crecimiento de este estudio se encuentran entre las más bajas observadas para este microorganismo y para otros esporulados, lo que supone que el nitrito tiene un efecto mayor en la tasa de crecimiento de *C. difficile* que la temperatura.

El nitrito se conoce por la inhibición que ejerce en las bacterias Gram positivas esporuladas; dicha inhibición es el resultado de la interacción entre el óxido nítrico derivado

del nitrito y las proteínas clostridiales de hierro y azufre, como la ferredoxina y la ferredoxina-piruvato oxidorreductasa, lo que resulta en una rápida disminución del ATP intracelular y la acumulación de piruvato. Esta interacción es debido a la reacción del óxido nítrico y el hierro por lo que produce una reducción del hierro disponible en la matriz (Hospital et al, 2016). La adaptación a condiciones bajas de hierro en *C. difficile* se centra en un aumento de la importación de hierro, un reemplazo significativo de hierro que requieren las vías metabólicas y la reestructuración de la superficie celular para protección durante la compleja fase lag y solo es regulada directamente en parte por Fur (regulador de la absorción del hierro) (Berges et al, 2018).

Con la diferencia en el metabolismo y las diferentes vías de adaptación a la baja concentración de hierro es de esperar que ambas cepas estudiadas reaccionen diferente al nitrito y, como ya se ha probado antes en este estudio, el efecto del nitrito en esta bacteria parece no ser tan efectivo como para *C. botulinum* y *Bacillus cereus*. El efecto en estas bacterias depende de la naturaleza de la flora competidora, el hierro disponible en el producto y otros aditivos presentes como ascorbato, eritorbato y fosfato son otros factores adicionales. Para el caso del *C. botulinum* en sistemas de productos cárnicos procesados térmicamente el efecto se produce en dos etapas diferentes del ciclo de vida del microorganismo. El primer efecto del nitrito en *C. botulinum* es la inhibición de las células vegetativas que emergen de las esporas supervivientes. El segundo efecto es prevenir la división celular en cualquier célula vegetativa que surja de las esporas supervivientes (Sindelar & Milkowski, 2011). A diferencia del estudio realizado en este trabajo con medio de cultivo, es evidente que en una matriz cárnica puede haber factores de protección y más formas de adquirir hierro (por la hemoglobina de la sangre), que hacen que las tasas de crecimiento de esta bacteria se vean aumentadas o se mantengan aún a concentraciones muy altas del aditivo. Esto se puede deber a la acción de los sideróforos, que se excretan y reimportan después de la adquisición de hierro para hacer frente a la limitación del mismo (Huang y Wilks, 2017; Khan et al., 2018). Alternativamente, se excretan las reductasas férricas (Johnson et al., 2003).

En las bacterias patógenas, estos mecanismos de absorción de hierro adquieren el elemento directamente de las proteínas del huésped, incluidas las glicoproteínas que se unen al hierro, la transferrina en el suero y el líquido extracelular, la lactoferrina en las secreciones

mucosas y las proteínas que contienen hemo, como la hemoglobina, la haptoglobina y la hemopexina (Symeonidis, 2012).). *C. difficile* puede utilizar diferentes sales de hierro (FeCl₃, FeSO₄), citrato de hierro y ferritina como fuente de hierro (Cernat y Scott, 2012). En una investigación se determinó que la ferritina, las hemoproteínas y el hemo pudieron sostener el crecimiento de *C. difficile* en condiciones de limitación de hierro (Cernat y Scott, 2012), proteínas que se encuentran en la carne de cerdo utilizada en este experimento.

Los modelos primarios son curvas de crecimiento de esporas de las dos cepas de *C. difficile* estudiadas. Este crecimiento conlleva la activación de las esporas presentes en la matriz cárnica y ya anteriormente se había definido para *C. perfringens* un mecanismo de inducción de germinación mediada por nitrito que sugiere que la germinación puede implicar una interacción del nitrito de sodio como ácido nitroso con algún componente de la corteza (ANDO, 1980) y los resultados de este estudio sugieren que, para el caso de *C. difficile*, podría haber un mecanismo similar. Otro mecanismo podría ser una germinación medida por estrés oxidativo provocado por el nitrito. Estudios ya han demostrado la germinación mediada por estrés de *Bacillus cereus* en condiciones de alta presión y baja acidez debido al cambio de presión en el peptoglican (Paidhungat et al, 2002 y Zuber, 2009) por lo que podría ser mecanismos similares lo que conlleven a la germinación de *C. difficile* en este estudio.

Por otra parte, este modelo tiene poca flora competitiva debido al uso de nitritos y el tratamiento térmico asociado a productos cárnicos listos para consumir, lo que se sabe es un factor que promueve la germinación de esporas de *C. difficile* (Wilson & Perini, 1988; Leslie et al, 2021 y Britton & Young, 2014) pero nunca se ha estudiado este comportamiento en un modelo de alimento.

Lo anterior indica que el modelo cárnico utilizado en este estudio tiene muchos factores que pueden incidir positivamente en la germinación y crecimiento de *C. difficile* llegando a 4 log₁₀ UCF/g para todos los tratamientos después de 3 días de almacenamiento. Ya que este es el primer estudio que se hace con esta bacteria en donde se evalúa el crecimiento de esporas, es importante más estudios para entender este comportamiento debido a que la forma infectante de esta bacteria es la spora. Ya diversos estudios mencionados anteriormente

evidencian la incidencia de *C. difficile* en alimentos y se necesita conocer las implicaciones de que algunos alimentos, especialmente los productos cárnicos listos para consumir, tengan compuestos que puedan incidir en la germinación de esporas.

Para determinar el impacto de la concentración de nitrito en el tiempo de generación de *C. difficile* se contruyeron modelos secundarios de segundo orden para cada cepa utilizando las tasas de crecimiento obtenidas en el modelo primario y ajustado utilizando Excell. Para el caso de la cepa NAP7/078 no se pudo obtener un modelo con una R aceptable ($R=0,5602$) por lo que se necesitan más repeticiones del experimento para obtener un modelo con mejor ajuste. Para el caso de la cepa NAP1/027 el modelo se muestra en la Figura 7.

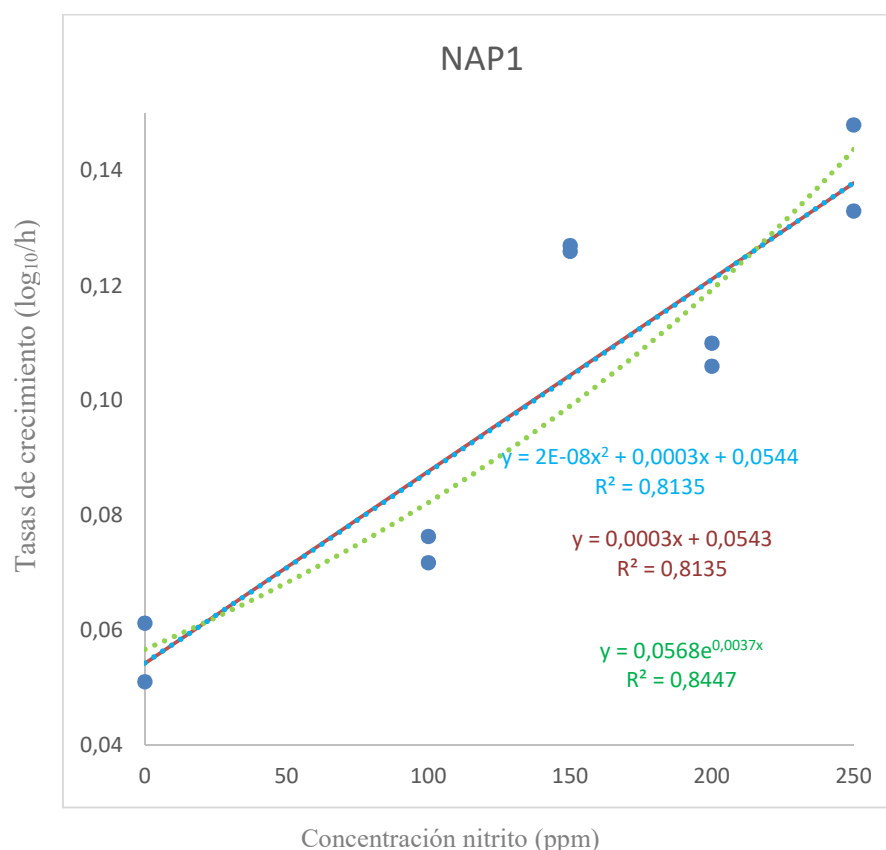


Figura 7. Representación gráfica y las ecuaciones obtenidas entre la tasa de crecimiento (\log_{10}/h) de *C. difficile* versus concentración de nitrito (ppm) para la cepa NAP1/027.

Se obtuvo una ecuación polinómica de segundo orden que mejor se ajusta, la cual se muestra en la Figura 7 y donde se puede observar una relación directamente proporcional ($p < 0,05$) entre la tasa de crecimiento y la concentración de nitrito (ppm). El coeficiente de correlación (R^2) de 0,8487 y los resultados confirman que hay un efecto entre la variable de concentración de nitrito y el crecimiento de *C. difficile* en carne de cerdo.

Hasta el momento no hay modelos de esta bacteria en ninguna matriz de alimento por lo que no se puede comparar con ningún otro modelo experimental. Sin embargo, estos estudios demuestran que el nitrito favorece la germinación, crecimiento y esporulación de las cepas de *C. difficile* estudiadas.

Este modelo es un primer acercamiento al comportamiento de esta bacteria en un modelo cárnico y su potencial como patógeno de origen alimentario.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- Al optimizar la cantidad de taurocolato y temperatura de activación para las cepas C30 y NAP7/078 se encontró que el modelo es significativo por lo que dependiendo de la temperatura que se quiera utilizar así será el efecto de la concentración de taurocolato, mientras que para NAP1/027 el modelo no fue significativo por lo que se necesitan más repeticiones para confirmar el mínimo que presenta el central compuesto. Para el VPI si se presenta un modelo significativo y presenta significancia en los efectos cuadráticos por lo que el valor predicho de 0,7182 se puede alcanzar con varias combinaciones dentro del modelo.
- Al analizar el efecto de la adición de nitrito, sal, eritorbato y lactato, la combinación de los cuatro ingredientes cárnicos resultó en una inhibición significativa del crecimiento. Se observaron valores de absorbancia más bajos para las cepas epidémicas (NAP1/027 y NAP7/078) en comparación con los otros aislados. En el caso del efecto de los ingredientes individuales, se reportó inhibición significativa para nitrito, lactato y sal en el caso de todas las cepas a excepción del aislado de referencia VPI/104693; para esta cepa de referencia se informó una inhibición significativa solo en el caso del lactato. Curiosamente, el eritorbato de sodio fue el único ingrediente que no provocó ninguna inhibición.
- Al analizar efecto del tiempo de congelación previo en el crecimiento de esporas de *C. difficile* se observa que las cepas NAP1 (027), NAP7 (078) y C30 no presentan diferencia significativa en los diferentes tiempos de congelación y por esta razón se puede afirmar que los diferentes tiempos evaluados no influyen en la viabilidad de las esporas de *C. difficile*. Para el caso de la cepa VPI (10463) se encuentra diferencia significativa en el tiempo al observar que a los 7 días y al día 1 hay diferencia significativa lo que hace la interacción significativa, sin embargo eso no tiene lógica ya que no se observa diferencia significativa entre 30 días y 1 día por lo que podemos decir que el tiempo de congelación no influye el crecimiento y viabilidad de las esporas de *C. difficile*.

- Al analizar el tiempo de prereducción del medio en el crecimiento de esporas de *C. difficile* todas las cepas crecieron aun cuando el medio no estaba prereducido (0 horas) y no se encontró diferencia significativa para los tiempos de 0 y 3 horas para ninguna de las cepas con excepción de la C30.
- Al realizar el modelo secundario con la cepa NAP1/027 con las tasas de crecimiento a diferentes concentraciones de nitrito se obtuvo una ecuación polinómica de segundo orden que mejor se ajusta y donde se puede observar una relación directamente proporcional ($p < 0,05$) entre la tasa de crecimiento y la concentración de nitrito (ppm). El coeficiente de correlación (R^2) de 0,8487 y los resultados confirman que hay un efecto entre la variable de concentración de nitrito y el crecimiento de *C. difficile* en carne de cerdo.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

- Realizar más repeticiones del punto central del diseño a diferentes temperaturas de activación y concentración de taurocolato para la cepa NAP1/027 con el fin de encontrar un modelo significativo que permita tener valores que se puedan utilizar en su aislamiento.
- Determinar el efecto del lactato, eritorbato y sal en un modelo cárnico como se realizó con el nitrito para determinar su efecto en el crecimiento de *C. difficile* en una matriz de alimento.
- Determinar el efecto de otros factores que afecten la viabilidad en las esporas de *C. difficile* y que estén presentes en modelos alimentarios con el fin de determinar su posible efecto en la viabilidad de estas esporas que pueda suponer un riesgo para la salud pública.
- Hacer un modelo cárnico en donde se incluyan otros aditivos para construir modelos más reales para la industria cárnica.
- Realizar más repeticiones con la bacteria NAP7/078 que permita construir un modelo con una R^2 más aceptable.
- Realizar la validación del modelo de NAP1/027 para determinar la viabilidad de utilizarlo como modelo.
- Realizar modelos en donde se utilicen matrices de los alimentos en donde se ha encontrado prevalencia de esporas de *C. difficile* para determinar el impacto que puede llegar a tener en la transmisión comunitaria de este patógeno.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, F.; Figueroa, J.; Ivankovich, C.; Fonseca, A. (2001). *Cárnicos 2001. Sistema de información sobre mercadeo alimentario*. Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos.
- Andersen, H.J., Bertelsen, G., Ohlen, A., Skibsted, H. (1990). Modified packaging as protection against photodegradation of the colour of pasteurized sliced ham. *Meat Sci.* 28, 77e83.
- Androga, G. O.; Hart, J.; Foster, N. F.; Charles, A.; Forbes, D.; Riley, T. V. (2015) Infection with toxin A-negative, toxin B-negative, binary toxin-positive *Clostridium difficile* in a young patient with ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, 3702-3704.
- ANDO, Y. (1980). Mechanism of nitrite-induced germination of *Clostridium perfringens* spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 49(3), 527-535.
- Archunan, G. (2004). *Microbiology*. Sarup & Sons. New Delhi, India. pp 257-265
- Atrih, A., & Foster, S. J. (2002). Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 217-223.
- Bakri, M. M.; Brown, D. J.; Butcher, J. P.; Sutherland, A. D. (2009). *Clostridium difficile* in Ready-to-Eat Salads, Scotland. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 817-818.
- Bakri, M. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw cow, sheep, and goat meat in Jazan, Saudi Arabia. (2016). *Saudi Journal of Biological Sciences*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.07.002>
- Barbosa, J., Campos, A., & Teixeira, P. (2020). Methods currently applied to study the prevalence of *Clostridioides difficile* in foods. *AIMS Agriculture and Food*, 5(1), 102-128.
- Bartolotta, S., Garcí, C. C., Candurra, N. A., & Damonte, E. B. (2001). Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid. *Archives of virology*, 146, 777-790.

- Barnes, E. M., Despaul, J. E., & Ingram, M. (1963). The behaviour of a food poisoning strain of *Clostridium welchii* in beef. *Journal of Applied Microbiology*, 26(3), 415-427.
- Beaman, T. C., Pankratz, H. S., & Gerhardt, P. H. I. L. I. P. P. (1988). Heat shock affects permeability and resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2515-2520.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1992). *Química de los alimentos*. Acribia.
- Berges, M., Michel, A. M., Lassek, C., Nuss, A. M., Beckstette, M., Dersch, P., ... & Jahn, D. (2018). Iron regulation in *Clostridioides difficile*. *Frontiers in microbiology*, 9, 3183.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, O., & Thormar, H. (2001). In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(11), 3209-3212.
- Beuchat, L. R., Doyle, M. P., & Montville, T. J. (Eds.). (2001). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM press.
- Biasizzo, M., Vadnjal, S., Henigman, U., Krizman, M., Kirbis, A., & Jamnikar-Ciglenecki, U. (2018). Development and validation of a new protocol for detecting and recovering *Clostridium difficile* from meat samples. *Journal of food protection*, 81(4), 561-568.
- Bouttier, S., Barc, M. C., Felix, B., Lambert, S., Collignon, A., & Barbut, F. (2010). *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerging infectious diseases*, 16(4), 733.
- Britton, R. A., & Young, V. B. (2014). Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, 146(6), 1547-1553.
- Candel-Pérez, C., Ros-Berruezo, G., & Martínez-Graciá, C. (2019). A review of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* occurrence through the food chain. *Food microbiology*, 77, 118-129.
- Cernat, R. C., & Scott, K. P. (2012). Evaluation of novel assays to assess the influence of different iron sources on the growth of *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 18(3), 298-304.

- Crowther, G. S.; Chilton, C. H.; Todhunter, S. L.; Nicholson, S.; Freeman, J.; Baines, S. D.; Wilcox, M. H. (2014). Comparison of planktonic and biofilm-associated communities of *Clostridium difficile* and indigenous gut microbiota in a triple-stage chemostat gut model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 2137-2147.
- Cronin, U. P., & Wilkinson, M. G. (2008). *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. *Food Microbiology*, 25(2), 235-243.
- Curry, S. R.; Marsh, J. W.; Schlackman, J. L.; Harrison, L. H. (2012). Relevance of *Clostridium difficile* in Uncooked Ground Meat Products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4183- 4186.
- Darkoh, C., Brown, E. L., Kaplan, H. B., & DuPont, H. L. (2013). Bile salt inhibition of host cell damage by *Clostridium difficile* toxins. *PLoS One*, 8(11), e79631.
- Dawson, L. F.; Valiente, E.; Faulds-Pain, A.; Donahue, E. H.; Wren, B. W. (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. *PLoS One*, 7, e50527.
- Dayrit, F. M. (2015). The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 1-15.
- Deng, K., Plaza-Garrido, A.; Torres, J.A.; Paredes-Sabja, D. (2015). Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures, *Food Microbiology*, Volume 46, Pages 218-221.
- Deng, K., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., Paredes-Sabja, D., & Torres, J. A. (2017). Survival of *Clostridium difficile* spores at low water activity. *Food microbiology*, 65, 274-278.
- Dias, N. A. A., Pinelli, J. J., Silva, M. S., Isidoro, S. R., de Abreu Martins, H. H., Gonçalves, M. C., & Piccoli, R. H. (2022). Viability of *Clostridium difficile* in mortadella with added essential oils and reduced sodium nitrite content. *Research, Society and Development*, 11(9), e22111931106-e22111931106.
- Eckert, C.; Emirian, A.; Le Monnier, A.; Cathala, L.; De Montclos, H.; Goret, J.; Berger, P.; Petit, A.; De Chevigny, A.; Jean-Pierre, H.; Nebbad, B.; Camiade, S.; Meckenstock, R.; Lalande, V.; Marchandin, H.; Barbut, F. (2015). Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infections*, 3, 12-17.

- Edwards, A. N.; Karim, S. T.; Pascual, R. A.; Jowhar, L. M., Anderson, S. E.; McBride, S. M. (2016). Chemical and stress resistances of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1698.
- Escoto, L. (2019). Panorama general sobre la producción de embutidos en Centroamérica. CARNETEC. Edición: 27/12/2019.
- Esfandiari, Z.; Weese, S.; Ezzatpanah, H.; Jalali, M.; Chamani, M. (2014). Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. *BMC Microbiology*, 14, 283.
- Farber, J. M., & Brown, B. E. (1990). Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1584-1587.
- Fennema, O. R. (1996). Food chemistry (Vol. 76). CRC Press.
- Flock, G., Chen, C. H., Yin, H. B., Fancher, S., Mooyottu, S., & Venkitanarayanan, K. (2016). Effect of chilling, freezing and cooking on survivability of *Clostridium difficile* spores in ground beef. *Meat Science*, (112), 161.
- Foster, N. F., & Riley, T. V. (2012). Improved recovery of *Clostridium difficile* spores with the incorporation of synthetic taurocholate in cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA). *Pathology*, 44(4), 354-356.
- Freeman, J., & Wilcox, M. H. (2003). The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *Journal of clinical pathology*, 56(2), 126-128.
- Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M., & Thompson, J. K. (1971). Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of applied Bacteriology*, 34(4), 803-813.
- Galdys, A.L., Nelson, J.S., Shutt, K.A., Schlackman, J.L., Pakstis, D.L., Pasculle, A.W., Marsh, J.W., Harrison, L.H. and Curry, S.R. (2014) Prevalence and duration of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage among healthy subjects in Pittsburgh, Pennsylvania. *J. Clin. Microbiol.*, 52(7): 2406-2409.

- Gerding, D. N.; Johnson, S.; Rupnik, M.; Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5, 15-57.
- Grandesso, S.; Arena, F.; Esemé, F. E.; Panese, S.; Henrici De Angelis, L.; Spigaglia, P.; Barbanti, F.; Rossolini, G. M. (2016). *Clostridium difficile* ribotype 033 colitis in a patient following broad-spectrum antibiotic treatment for KPC producing *Klebsiella pneumoniae* infection, Italy. *New Microbiology*, 39, 235- 236.
- Georgala, D. L., & Hurst, A. (1963). The Survival of Food Poisoning Bacteria in Frozen Foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 26(3), 346-58.
- Guillén, I. (2007). Propuesta de investigación preliminar sobre el Mercado de los Embutidos. MEIC. Recuperado de <http://reventazon.meic.go.cr/informacion/cpc/2007/IO-002-07.pdf>
- Guran, H. S.; Ilhak, O. I. (2015). *Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10, 359-364.
- Harvey, R. B.; Norman, K. N.; Andrews, K.; Norby, B.; Hume, M. E.; Scanlan, C. M.; Hardin, M. D.; Scott, H. M. (2011) *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 807-811.
- Heeg, D., Burns, D. A., Cartman, S. T., & Minton, N. P. (2012). Spores of *Clostridium difficile* clinical isolates display a diverse germination response to bile salts. *PloS one*, 7(2), e32381.
- Hernández, J. D. D., Castell, A., Arroyo-Manzanares, N., Guillén, I., Vizcaíno, P., López-García, I., & Viñas, P. (2021). Toward Nitrite-Free Curing: Evaluation of a New Approach to Distinguish Real Uncured Meat from Cured Meat Made with Nitrite. *Foods*, 10(2), 313.
- Hoorfar, J., Jordan, K., Butler, F., & Prugger, R. (Eds.). (2011). *Food chain integrity: a holistic approach to food traceability, safety, quality and authenticity*. Elsevier.
- Holý, O., & Chmelař, D. (2012). Oxygen tolerance in anaerobic pathogenic bacteria. *Folia microbiologica*, 57, 443-446.

- Hospital, X. F., Hierro, E., Stringer, S., & Fernández, M. (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 66-70.
- Houtsma, P. C., Heuvelink, A., Dufrenne, J., & Notermans, S. (1994). Effect of sodium lactate on toxin production, spore germination and heat resistance of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. *Journal of food protection*, 57(4), 327-330.
- Huang, W., & Wilks, A. (2017). Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 799-823.
- Huang, C. B., Alimova, Y., Myers, T. M., & Ebersole, J. L. (2011). Short-and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of oral biology*, 56(7), 650-654.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., & Palavesam, A. (2012). Antibacterial effect of short-chain fatty acids on gnotobiotic *Artemia franciscana* nauplii against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Research*, 43(4), 518-525.
- Indra, A.; Lassnig, H.; Baliko, N.; Much, P.; Fiedler, A.; Huhulescu, S.; Allerberger, F. (2009). *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr*, 121, 91-95.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2021). Actividad Pecuaria. Recuperado de <https://www.inec.cr/agropecuario/actividad-pecuaria>.
- Ionesco, H. (1978). Initiation de la germination des spores de *Clostridium docile* par le lysozyme. *CR Acad. Sci.[D]*, 287, 659-661.
- Jank, T.; Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends in Microbiology*, 16, 222-229.
- Janoir, C. (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 37, 13-24.
- Jöbstl, M.; Heuberger, S.; Indra, A.; Nepf, R.; Köfer, J.; Wagner, M. (2010). *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 172-175.

- Johnson, E., Schröder, I., & de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol. Rev*, 27, 427-447.
- Jump, R. L., Pultz, M. J., & Donskey, C. J. (2007). Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea?. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 2883-2887.
- Juneja, V. K., & Marks, H. M. (1999). Proteolytic *Clostridium botulinum* growth at 12–48° C simulating the cooling of cooked meat: development of a predictive model. *Food microbiology*, 16(6), 583-592.
- Juneja, V. K., Novak, J. S., Huang, L., & Eblen, B. S. (2003). Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. *Food Control*, 14(3), 163-168.
- Juneja, V. K., Marks, H., & Thippareddi, H. (2008). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. *Food microbiology*, 25(1), 42-55.
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2(1), 23-28.
- Kalchayanand, N.; Arthur, T. M.; Bosilevac, J. M.; Brichta-Harhay, D. M.; Shackelford, S. D.; Wells, J. E.; Wheeler, T. L.; Koohmaraie, M. (2013). Isolation and characterization of *Clostridium difficile* associated with beef cattle and commercially produced ground beef. *Journal of Food Protection*, 76(2), 256-264.
- Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H., & Nakamura, S. (1987). Effect of various sodium taurocholate preparations on the recovery of *Clostridium difficile* spores. *Microbiology and immunology*, 31(11), 1117-1120.
- Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H., & Nakamura, S. (1989). Recovery of spores of *Clostridium difficile* altered by heat or alkali. *Journal of medical microbiology*, 28(3), 217-221.

- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator–Siderophore: A review. *Microbiological research*, 212, 103-111.
- Khatib, N., Varidi, M. J., Mohebbi, M., Varidi, M., & Hosseini, S. M. H. (2020). Replacement of nitrite with lupulon–xanthohumol loaded nanoliposome in cooked beef-sausage: Experimental and model based study. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 2629-2639.
- Kim, G. H., & Chin, K. B. (2021). Evaluation of quality characteristics of low-nitrite pork sausages with paprika oleoresin solution during refrigerated storage. *Food Science of Animal Resources*, 41(3), 428.
- Kim, S. A., & Rhee, M. S. (2016). Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157: H7. *Food control*, 60, 447-454.
- Kuehne, S. A.; Cartman, S. T.; Heap, J. T.; Kelly, M. L.; Cockayne, A.; Minton, N. P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467, 711-713.
- Kuehne, S. A.; Cartman, S. T., Minton, N. P. (2011). Both, toxin A and toxin B, are important in *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, 2(4), 252-255.
- Kouassi, K. A.; Dadie, A. T.; N'guessan, K. F.; Dje, K. M.; Loukou, Y. G. (2014). *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in cooked beef sold in Côte d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility. *Anaerobe*, 28, 90-94.
- Kwon, J. H.; Lanzas, C.; Reske, K. A.; Hink, T.; Seiler, S. M.; Bommarito, K. M.; Burnham, C. D.; Dubberke, E. R. (2016). An evaluation of food as a potential source for *Clostridium difficile* acquisition in hospitalized patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 37(12), 1401-1407.
- Lawley, T. D.; Clare, S.; Walker, A. W.; Goulding, D.; Stabler, R. A.; Croucher, N.; Mastroeni, P.; Scott, P.; Raisen, C.; Mottram, L.; Fairweather, N. F.; Wren, B. W.; Parkhill, J.; Dougan, G. (2009). Antibiotic 101 treatment of *Clostridium difficile*

carrier mice triggers a supershedder state, sporemediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infection Immunity*, 77(9), 3661-3669.

Lawley, T. D.; Young, V. B. (2013). Murine models to study *Clostridium difficile* infection and transmission. *Anaerobe*, 24, 94–97. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.008>.

Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. (2016). *Anaerobe*, 40, 95-99.

Leslie, J. L., Jenior, M. L., Vendrov, K. C., Standke, A. K., Barron, M. R., O’Brien, T. J., ... & Young, V. B. (2021). Protection from lethal *Clostridioides difficile* infection via intraspecies competition for cogerminant. *Mbio*, 12(2), 10-1128.

Li, J., & McClane, B. A. (2006). Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4561-4568.

Lim, S. C.; Foster, N. F.; Riley, T. V. Susceptibility of *Clostridium difficile* to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite *Anaerobe*, 37 (2016), pp. 67-71

Lim, S. C.; Foster, N. F.; Elliott, B.; Riley, T. V. (2018). High prevalence of *Clostridium difficile* on retail root vegetables, Western Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 124, 585-590.

Liporace, F. A., & Quevedo, C. V. (2020). Optimización estadística del medio de cultivo de una bacteria del género *Pseudomonas* sp. para la producción de biosurfactantes. *AJEA*, (5).

Lund, B. M., & Peck, M. W. (2015). A possible route for foodborne transmission of *Clostridium difficile*?. *Foodborne pathogens and disease*, 12(3), 177-182.

Lyras, D.; O’Connor, J. R.; Howarth, P. M.; Sambol, S. P.; Carter, G. P.; Phumoonna, T.; Poon, R.; Adams, V.; Vedantam, G.; Johnson, S.; Gerding, D. N.; Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458, 1176-1179.

- MacDougall, D. B. (1982). Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*, 9(1-2), 75-88.
- Mackey, B. M., & DERRICK, C. M. (1987). The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella Thompson* in foods. *Letters in Applied Microbiology*, 5(6), 115-118.
- McSharry, S., Koolman, L., Whyte, P., & Bolton, D. (2021). An investigation of the survival and/or growth of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in beef stored under aerobic, anaerobic and commercial vacuum packaging conditions at 2° C and 20° C. *Food Control*, 119, 107475.
- Malyshev, D., Jones, I. A., McKracken, M., Öberg, R., Harper, G. M., Joshi, L. T., & Andersson, M. (2023). Hypervirulent R20291 *Clostridioides difficile* spores show disinfection resilience to sodium hypochlorite despite structural changes. *BMC microbiology*, 23(1), 59.
- Marcos, P., Glennon, C., Whyte, P., Rogers, T. R., McElroy, M., Fanning, S. & Bolton, D. (2023). The effect of cold storage and cooking on the viability of *Clostridioides difficile* spores in consumer foods. *Food Microbiology*, 112, 104215.
- Marques, A. R. S. (2010). *Clostridium* psicrotróficos em carnes embaladas a vácuo: enumeração, identificação, fontes e avaliação da habilidade de reprodução do defeito de estufamento. Tesis (doctorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- Metcalf, D.; Avery, B. P.; Janecko, N.; Matic, N.; Reid-Smith, R.; Weese, J. S. (2011). *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17, 85-86.
- Mills, J., Donnison, A., & Brightwell, G. (2014). Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: A review. *Meat science*, 98(1), 71-80.
- Moir, A. (2006). How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 526–530.

- Moller, J., Jensen, J., Olsen, M., Skibsted, L., Bertelsen, G., 2000. Effect of residual oxygen on colour stability during chill storage of sliced, pasteurized ham packaged in modified atmosphere. *Meat Sci.* 54, 399e405.
- Mora-Uribe, P.; Miranda-Cárdenas, C.; Castro-Córdova, P.; Gil, F.; Calderón, I.; Fuentes, J. A.; Rodas, P. L.; Banawas, S.; Sarker, M. R.; Paredes-Sabja, D. (2016). Characterization of the adherence of *Clostridium difficile* spores: the integrity of the outermost layer affects adherence properties of spores of the epidemic strain R20291 to components of the intestinal mucosa. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(99).
- Mooyottu, S.; Flock, G.; Kollanoor-Johny, A.; Upadhyaya, I.; Jayarao, B.; Venkitanarayanan, K. (2015). Characterization of a multidrug resistant *C. difficile* meat isolate. *International Journal of Food Microbiology*, 192, 111-116.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.
- Nakamura, S., Yamakawa, K., Izumi, J., Nakashio, S., & Nishida, S. (1985). Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. *Microbiology and immunology*, 29(2), 113-118.
- Namkung, H., Yu, H., Gong, J., & Leeson, S. (2011). Antimicrobial activity of butyrate glycerides toward *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium perfringens*. *Poultry science*, 90(10), 2217-2222.
- Nerandzic, M. M., & Donskey, C. J. (2009). Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, 47(2), 397-400.
- Nikolić, A., Đorđević, V., Parunović, N., Stefanović, S., Đurić, S., Babić, J., & Vasilev, D. (2020). Can polyphenols be used as natural preservatives in fermented sausages?. *Acta Veterinaria-Beograd*, 70(2), 219-237.

- Norman, K. N.; Harvey, R. B.; Andrews, K.; Hume, M. E.; Callaway, T. R.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2014). Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(6), 1127-1129.
- Ozaki, M. M., Dos Santos, M., Ribeiro, W. O., de Azambuja Ferreira, N. C., Picone, C. S. F., Domínguez, R., ... & Pollonio, M. A. R. (2021). Radish powder and oregano essential oil as nitrite substitutes in fermented cooked sausages. *Food Research International*, 140, 109855.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W. B., Hoover, D., Papafragkou, E., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3172-3175.
- Pantaléon, V.; Soavelomandroso, A. P.; Bouttier, S.; Briandet, R.; Roxas, B.; Chu, M.; Collignon, A.; Janoir, C.; Vedantam, G.; Candela, T. (2015) The *Clostridium difficile* protease Cwp84 modulates both biofilm formation and cell surface properties. *PLoS One*, 10(4), e0124971.
- Papatheodorou, P.; Zamboglou, C.; Genisyuerk, S.; Guttenberg, G.; Aktories, K. (2010). Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One*, 5(5), e10673.
- Paredes-Sabja, D., Bond, C., Carman, R. J., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2008). Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). *Microbiology*, 154(8), 2241-2250.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: Mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*, 19(2), 85–94.
- Patarata, L., Martins, S., Silva, J. A., & Fraqueza, M. J. (2020). Red wine and garlic as a possible alternative to minimize the use of nitrite for controlling *Clostridium sporogenes* and *Salmonella* in a cured sausage: Safety and sensory implications. *Foods*, 9(2), 206.
- Perlman, D. (1978). *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. 23, 245-248.

- Primavilla, S.; Farneti, S.; Petruzzelli, A.; Drigo, I.; Scuota, S. (2019). Contamination of hospital food with *Clostridium difficile* in Central Italy. *Anaerobe*, 5, 8-10.
- Quesada-Gómez, C., Mulvey, M. R., Vargas, P., del Mar Gamboa-Coronado, M., Rodríguez, C., & Rodríguez-Cavillini, E. (2013). Isolation of a toxigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. *Journal of food protection*, 76(2), 348-351.
- Rahimi, E.; Jalali, M.; Weese, J. S. (2014). Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *Public Health*, 14(119).
- Rahimi, E.; Afzali, Z. S.; Baghbadorani, Z. T. (2015). *Clostridium difficile* in ready- oeat foods in Isfahan and Shahrekord, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(2), 128-131.
- Rahimi, E.; Khaksar, F. (2015). Detection of toxigenic *Clostridium difficile* strains isolated from meat and meat products in Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 8(3), 277-281.
- Redondo-Solano, M. A. (2014). Thermal resistance of *Clostridium difficile* spores in ham and subsequent germination and outgrowth. The University of Nebraska-Lincoln.
- Redondo-Solano, M., Valenzuela-Martinez, C., Cassada, D. A., Snow, D. D., Juneja, V. K., Burson, D. E., & Thippareddi, H. (2013). Effect of meat ingredients (sodium nitrite and erythorbate) and processing (vacuum storage and packaging atmosphere) on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in ham during abusive cooling. *Food microbiology*, 35(2), 108-115.
- Redondo-Solano, M., Burson, D. E., & Thippareddi, H. (2016). Thermal resistance of *Clostridium difficile* spores in peptone water and pork meat. *Journal of Food Protection*, 79(9), 1468-1474.
- Reddy, N. R., Pierson, M. D., & Lechowich, R. V. (1982). Inhibition of *Clostridium botulinum* by antioxidants, phenols, and related compounds. *Applied and environmental microbiology*, 43(4), 835-839.
- Riedel, T., Wetzel, D., Hofmann, J. D., Plorin, S. P. E. O., Dannheim, H., Berges, M., ... & Neumann-Schaal, M. (2017). High metabolic versatility of different toxigenic and

- non-toxicogenic *Clostridioides difficile* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(6), 311-320.
- Rivera, N., Bunning, M., & Martin, J. (2019). Uncured-labeled meat products produced using plant-derived nitrates and nitrites: Chemistry, safety, and regulatory considerations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(29), 8074-8084.
- Rodriguez, C.; Taminiau, B.; Avesani, V.; Broeck, J. V.; Delmée, M.; Daube, G. (2014). Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. *Food Microbiology*, 42, 166-171.
- Rodriguez, C., Warszawski, N., Korsak, N., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., & Daube, G. (2016). Laboratory identification of anaerobic bacteria isolated on *Clostridium difficile* selective medium. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 63(2), 171-184.
- Rodriguez-Palacios, A.; Ilic, S.; Lejeune, J. T. (2017). Food indwelling *Clostridium difficile* in naturally contaminated household meals: data for expanded risk 111 mathematical predictions. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 38(4), 510-511.
- Rodriguez-Palacios, A., & LeJeune, J. T. (2011). Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3085-3091.
- Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. (2007) *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis*. 13:485–7.
- Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, Martin H, Thomspson AD, McDonald LC, Limbago B, Weese JS. (2009) Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerg Infect Dis*. May;15(5):802-5.
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staempfli, H. R., & Weese, J. S. (2010). *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe*, 16(5), 540-542.

- Rouse, M. S., Rotger, M., Piper, K. E., Steckelberg, J. M., Scholz, M., Andrews, J., & Patel, R. (2005). In vitro and in vivo evaluations of the activities of lauric acid monoester formulations against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3187-3191.
- Rupnik, M., Wilcox, M. & Gerding, D. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. (2009) *Nat Rev Microbiol* 7, 526–536.
- Semenyuk, E. G.; Laning, M. L.; Foley, J.; Johnston, P. F.; Knight, K. L.; Gerding, D. N.; Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS One*, 9, e87757.
- Semenyuk, E. G.; Poroyko, V. A.; Johnston, P. F.; Jones, S. E.; Knight, K. L.; Gerding, D. N.; Driks, A. (2015). Analysis of bacterial communities during *Clostridium difficile* infection in the mouse. *Infection Immunity*, 83, 4383- 391.
- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4), 172–180.
- Setlow, P.; Johnson E.A. (2007). Spores and their significance. M.P. Doyle, L.R. Beuchat (Eds.), *Food microbiology*. Fundamentals and frontiers (3ra ed), ASM Press, Washington, DC. pp. 35–67.
- Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L., & Dworkin, J. (2008). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Cell*, 135(3), 486–496.
- Shilling, M., Matt, L., Rubin, E., Visitacion, M. P., Haller, N. A., Grey, S. F., & Woolverton, C. J. (2013). Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*. *Journal of medicinal food*, 16(12), 1079-1085.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series*, 3, 1-14.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric oxide*, 26(4), 259-266.

- Smiddy, M., Fitzgerald, M., Kerry, J.P., Papkovsky, D.B., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. (2002). Use of oxygen sensors to non-destructively measure the oxygen content in modified atmosphere and vacuum-packed beef: impact of oxygen content on lipid oxidation. *Meat Sci.* 61, 285e290.
- Songer, J. G.; Trinh, H. T.; Killgore, G. E.; Thompson, A. D.; McDonald, L. C.; Limbago B. M. (2009). *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 819-821.
- Sorg, J. A., & Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of bacteriology*, 190(7), 2505-2512.
- Symeonidis, A., & Marangos, M. (2012). Iron and microbial growth. *Insight and control of Infectious disease in global scenario. InTech*, 289-330.
- Thompson, J. L., & Hinton, M. (1997). Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on Salmonellas in the crop. *British poultry science*, 38(1), 59-65.
- Tkalec, V.; Janezic, S.; Skok, B.; Simonic, T.; Mesaric, S.; Vrabic, T.; Rupnik, M. (2019). High *Clostridium difficile* contamination rates of domestic and imported potatoes compared to some other vegetables in Slovenia. *Food Microbiology*, 78, 194-200.
- Trunet, C.; Carlin, F.; Coroller, L. (2017). Investigating germination and outgrowth of bacterial spores at several scales. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 60–68.
- Tsuchiya, A. C. Avaliação de métodos e ocorrência de *Clostridium difficile* em carnes. (2012). Tesis (maestría) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- USDA, U. (2013). National nutrient database for standard reference, release 28. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory.
- Velugoti, P. R., Bohra, L. K., Juneja, V. K., & Thippareddi, H. (2007). Inhibition of germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores by lactic acid salts during cooling of injected turkey. *Journal of food protection*, 70(4), 923-929.

- Voth, D. E.; Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 247-263.
- Weese, J. S.; Reid-Smith, R. J.; Avery, B. P., Rousseau, J. (2010). Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Letters Applied Microbiology*, 50(4), 362-365.
- Weese, J. S., Avery, B. P., Rousseau, J., & Reid-Smith, R. J. (2009). Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), 5009-5011.
- Weiss, J.; Gibis, M.; Schuh, V.; Salminen, H. (2010). Review Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, 86, 196- 213.
- Weiss, A., Lopez, C. A., Beavers, W. N., Rodriguez, J., & Skaar, E. P. (2021). *Clostridioides difficile* strain-dependent and strain-independent adaptations to a microaerobic environment. *Microbial genomics*, 7(12).
- Wenisch, J. M., Schmid, D., Kuo, H. W., Simons, E., Allerberger, F., Michl, V., & Wenisch, C. (2012). Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: determinants for severe disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31, 1923-1930.
- Wilson, K. H., & Perini, F. (1988). Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infection and immunity*, 56(10), 2610-2614.
- Wilson, K. H., Kennedy, M. J., & Fekety, F. (1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, 15(3), 443-446.
- Wu, Y. C.; Chen, C. M.; Kuo, C. J.; Lee, J. J.; Chene, P. C.; Chang, Y. C.; Chen, T. H. (2017). Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from a pig slaughterhouse, pork, and humans in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 37-44.

- Yang, H. T., Chen, J. W., Rathod, J., Jiang, Y. Z., Tsai, P. J., Hung, Y. P., & Huang, I. H. (2018). Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in a mouse infection model. *Frontiers in microbiology*, 8, 2635.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Zaman, C., Woo, T. D. H., & Kamiya, S. (2012). Destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. *Journal of medical microbiology*, 61(4), 582-589.
- Young, R. S., Deal, P. H., & Whitfield, O. (1968). The response of spore-forming vs. nonspore-forming bacteria to diurnal freezing and thawing. *Space life sciences*, 1, 113-117.
- Yuille, S., Mackay, W. G., Morrison, D. J., & Tedford, M. C. (2020). Drivers of *Clostridioides difficile* hypervirulent ribotype 027 spore germination, vegetative cell growth and toxin production in vitro. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 941-e1.
- Zaika, L. L. (2003). Influence of NaCl content and cooling rate on outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in cooked ham and beef. *Journal of food protection*, 66(9), 1599-1603.
- Zuber, P. (2009). Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annual review of microbiology*, 63, 575-597.