



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1.	RESUMEN	2
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	4
3.1	Características generales	5
3.1.1	Fenotípicas	5
3.1.2	Genotípicas	7
3.2	Epidemiología	8
3.2.1	Ciclo de infección	8
3.3	Transmisión de <i>CD</i>	9
3.3.1	Incidencia en el medio ambiente	11
3.3.2	Incidencia de <i>CD</i> en animales de producción:	12
3.3.3	Incidencia de <i>CD</i> en animales silvestres	12
3.3.4	Incidencia de <i>CD</i> en mataderos	12
3.3.5	Incidencia de <i>CD</i> en alimentos	13
3.4	Crecimiento de <i>CD</i> en los alimentos	15
4.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	16
5.	METODOLOGÍA:	17
5.1	Fuentes bibliográficas consultadas	17
5.2	Metodología de búsqueda bibliográfica	18
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1	Control de <i>CD</i> por disminución de la temperatura	23
6.2	Control de <i>CD</i> por reducción de la actividad de agua (<i>aw</i>)	25
6.3	Inhibición de <i>CD</i> con compuestos químicos	26
6.4	Otras estrategias de control basadas en la inhibición del crecimiento y/o germinación de <i>CD</i>	27
6.5	Inactivación por tratamientos térmicos	27
6.6	Inactivación por tratamientos térmicos aplicados con microondas	32
6.7	Otros tratamientos de inactivación de <i>CD</i>	32
7.	CONCLUSIONES	33
8.	CONCLUSIONS	34
9.	VALORACIÓN PERSONAL	35
10.	BIBLIOGRAFIA	36
	ANEXOS	40

1. RESUMEN

Clostridiodes (Clostridium) difficile es un microorganismo patógeno de interés en la seguridad alimentaria en España para el que no existe regulación específica, según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición Española

Siempre ha sido un microorganismo relacionado con personas de edad avanzada, el ámbito hospitalario y el consumo de antibióticos de amplio espectro, pero se observa una ampliación del impacto a una población cada vez mayor y en individuos más jóvenes, incluso sin exposición a antibióticos. Esto se debe a su capacidad de transmisión por otras fuentes, gracias a su naturaleza esporulada, que le confiere una gran resistencia y le permite habitar en multitud de ambientes, desde suelos, aguas, aire, animales, humanos asintomáticos, entre otros, por lo que cada vez más se le relaciona como un patógeno de transmisión alimentaria.

Este trabajo se ha centrado en la línea de *CD* transmitido por los alimentos. Se presenta una revisión de la incidencia de *CD* en el ambiente, los animales de producción, los animales silvestres, los mataderos, y los alimentos, vías por las cuales puede llegar al alimento y de ahí al ser humano. Asimismo, se ha llevado a cabo una revisión de la capacidad de crecimiento del mismo en alimentos, para finalmente realizar una revisión sobre distintas técnicas de control e inactivación de este microorganismo patógeno, como el almacenamiento a bajas temperaturas, la reducción de a_w , el uso de compuestos químicos, los tratamientos térmicos y no térmicos. Para esta revisión se han consultado las bases de datos *Web of Science*, *Science Direct* y *SCOPUS*.

2. ABSTRACT

Clostridiodes (Clostridium) difficile is a pathogenic microorganism of interest in food safety in Spain without an specific regulation, according to the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition

It has always been a microorganism related to the elderly, the hospital environment and broad-spectrum antibiotics consumption, but the impact on younger individuals has been growing up, even without exposure to antibiotics. This is due to its ability to be transmitted by other sources, thanks to its sporulated nature, which gives it great resistance and allows it to be found in many environments: soil, water, air, animals, asymptomatic humans, etc., so that is increasingly associated with it as a foodborne pathogen.

This work focuses on the *CD* line transmitted by food. Therefore, it is a review of the incidence of *CD* in the environment, production animals, wild animals, slaughterhouses, and food, routes through which can reach food and hence the human being is presented. In addition, to make a review of the growth capacity of food, to finally conduct a review on different techniques of control and inactivation of this pathogenic microorganism, such as storage at low temperatures, the reduction of *a_w*, the use of chemical compounds, thermal and non-thermal treatments. The *Web of Science*, *Science Direct* and *SCOPUS* databases were consulted for this review.

3. INTRODUCCIÓN

Según el Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2018) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España, existen peligros de interés en seguridad alimentaria para los que no existe una regulación específica que pueden ser objeto de programas de estudio con el fin de obtener datos que permitan realizar una evaluación del riesgo. El Comité Científico ha revisado e identificado algunos peligros biológicos, señalando aquellos alimentos o condiciones que, a priori, podrían implicar un mayor riesgo para el consumidor (Tabla 3.1). En este trabajo nos centraremos únicamente en *Clostridioides difficile*, (conocido como *Clostridium difficile*, CD).

Tabla 3.1. Peligros biológicos. CD como un potencial zoonótico transmitido por lo alimentos (AESAN, 2018).

Virus de transmisión alimentaria	<ul style="list-style-type: none"> - Norovirus, virus de la Hepatitis A y virus de la Hepatitis E en moluscos bivalvos y vegetales frescos - Virus de la Hepatitis E en productos derivados de carne de cerdo
Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Yersinia enterocolitica</i> en carne de porcino - <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en productos de la pesca y moluscos bivalvos, - <i>E. coli</i> (patotipos no Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> “STEC”) en vegetales frescos, - <i>Clostridium difficile</i> en carne fresca.
Parásitos	<ul style="list-style-type: none"> - Protozoos (<i>Toxoplasma</i> y <i>Cryptosporidium</i>) en carne fresca y vegetales frescos.

CD es una especie bacteriana antigua (1,1 – 85 millones de años) (He et al., 2010), que fue descrita por primera vez en heces de neonatos por Hall y O’Toole en 1935; se le asignó de nombre *Bacillus difficile* por su gran resistencia a los iniciales intentos de cultivar y aislar la especie. Más adelante, por ser anaerobio estricto formador de esporas se le transfirió a la Clase *Clostridia*. El encuadre clásico de esta especie es Dominio *Bacteria*; División *Firmicutes*; Clase *Clostridia*; Orden *Clostridiales*; Familia *Clostridiaceae*; Género *Clostridium*; Especie *Clostridium difficile* (Båverud, 2002).

CD tiene varias similitudes con *Clostridium perfringens*, entre ellas, su hábitat primario que es el tracto intestinal, están asociados con el consumo de carne y la diarrea es su mayor síntoma de infección. Sin embargo, a nivel genético ambos Clostridios están relacionados de manera distinta, por lo que se propuso una reclasificación de la especie,

moviendo *CD* a la familia *Peptostreptococcaceae*, cambiando así el nombre del patógeno a *Peptoclostridium difficile* (Yutin y Galperin, 2013). Recientemente, basándose en el análisis fenotípico, quimiotaxonómico y filogenético, se propuso su reclasificación como *Clostridioides difficile* (Lawson et al., 2016), y así el nuevo encuadre de la especie pasó a ser Dominio *Bacteria*; División *Firmicutes*; Clase *Clostridia*; Orden *Clostridiales*; Familia *Peptostreptococcaceae*; Género *Clostridioides*; Especie *Clostridioides difficile*. (Lawson et al., 2016).

CD se reconoció como patógeno para los seres humanos al final de los años 70, pudiendo causar un espectro de enfermedades, denominado “infección por *Clostridium difficile*” (*ICD*) que va desde un cuadro leve de diarrea hasta colitis pseudomembranosa y, en ocasiones, sepsis, y que suele estar asociado a la administración de antibióticos (González-García, Gómez-Pavón y Martínez-Porras, 2005; Asensio y Monge, 2012). Históricamente, se han asociado un amplio rango de antimicrobianos a los casos de diarrea relacionados con infecciones nosocomiales producidas por *CD*: clindamicina, cefalosporina y fluoroquinolonas. Actualmente, las infecciones causadas por *CD* (*ICD*) están principalmente asociadas a centros hospitalarios debido al frecuente uso de antibióticos, a la contaminación del ambiente con esporas de esta especie bacteriana, y a la elevada densidad de población pertenecientes a grupos de alto riesgo (Andrés-Lasheras, 2016). Pero como se indica en el Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2018), también se comienza a considerar un peligro de seguridad alimentaria, y así lo vamos a tratar en este trabajo.

3.1 Características generales

3.1.1 Fenotípicas

CD es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, catalasa y oxidasa negativa, que mide entre 0,5x3-6 μm . Las células son generalmente peritricas, lo que significa que son móviles en los cultivos de caldo debido a que tienen flagelos distribuidos en la célula (Båverud, 2002). El olor de las colonias de *CD* se compara con el del estiércol de caballo o elefante, debido a las sustancias volátiles que sintetizan como el p-cresol, por la fermentación de la tirosina (Songer et al., 2009). La temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C. Sin embargo, se ha demostrado que también puede llegar a crecer en un rango de 25 a 45°C, pero hay falta de información sobre las temperaturas mínimas y máximas que permiten su crecimiento.

Crece en medios de cultivo enriquecido como agar sangre. Tal y como se muestra en las Figuras 3.1 y 3.2, las colonias de *CD* cultivadas en agar sangre durante 24 horas a 37°C, en condiciones de anaerobiosis, tienen un diámetro de 2-5 mm, son circulares o rizoides, planas o poco convexas, con el borde irregular, opacas, grisáceas o blanquecinas y tienen una superficie mate brillante. Las cepas de *CD* tras su incubación durante 48 horas, emiten fluorescencia de tono verde pálido bajo la luz ultravioleta (Andrés-Lasheras, 2016).



Figura 3.1. *CD* en agar sangre. (Alba-Alderete, 2011)

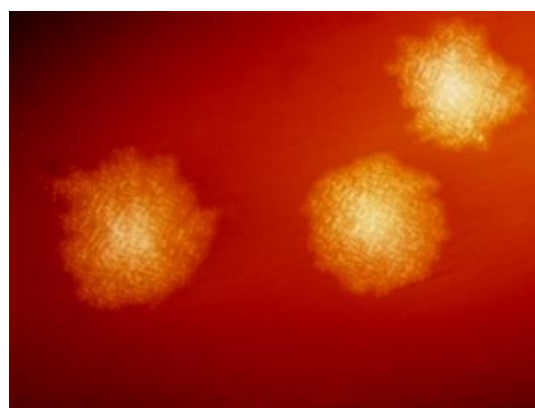


Figura 3.2. Detalle de *CD* en agar sangre. Obtenida de: <http://slideplayer.es/slide/120277/>

Una de las características más importantes de *CD* es su capacidad de formar esporas ovales y subterminales. La formación de esporas le permite persistir bajo condiciones adversas durante mucho tiempo (Becerra et al., 2011 y Båverud, 2002), resiste a la desecación, químicos y temperaturas extremas, incluso después de haber sido tratadas a 71°C durante 121 minutos, como se discutirá más adelante.

Como la mayoría de las endoesporas, la germinación se mejora a través de un choque térmico aplicado durante un corto período (10 min entre 60-100°C). Se asumió que *CD* seguiría los mismos mecanismos de germinación que otros Clostridios como *C. perfringens*, en los cuales los receptores detectan la presencia de aminoácidos y se inicia la cascada de germinación. Sin embargo, *CD* es diferente, la cascada de germinación no solo es provocada por la presencia de aminoácidos, sino que requiere bilis o productos de degradación de la bilis (Warriner, et al., 2016). Esta cascada de germinación se encuentra representada en la Figura 3.3. En términos evolutivos, esto tendría sentido dado que la presencia de bilis sería un desencadenante ambiental, por lo que las esporas de *CD* germinaron dentro del tacto intestinal (Warriner, et al., 2016).

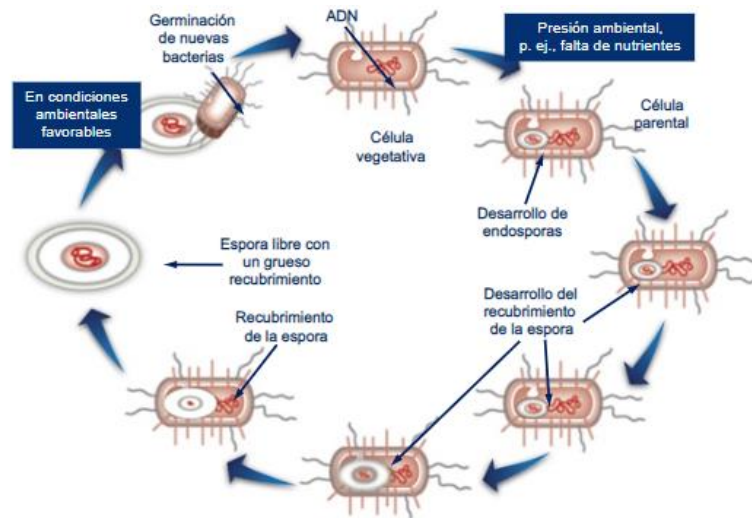


Figura 3.3. Ciclo vital de *CD*. Obtenida de <https://slideplayer.es/slide/1061056/>

3.1.2 Genotípicas

Otra característica de *CD* es su genoma de gran tamaño, por ser altamente plástico y diverso (genoma mosaico), con una alta proporción de elementos móviles que contribuyen a la plasticidad genética. Se ha estimado que el ratio evolutivo de *CD* es de 1-2 mutaciones/genoma/año (Andrés-Lasheras, 2016). Fenotípicamente esto ha permitido una rápida diversificación y adaptabilidad a diferentes entornos. Genéticamente, posee una estructura clonal y está compuesto por un gran número de cepas divididas entre seis Clados filogenéticos (1-5, C-I). El Clado 1 es el más heterogéneo de todos, en él se encuentran tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas (Andrés-Lasheras, 2016). El Clado 4 se conoce como A-B+ ya que posee cepas productoras solo de toxina B, pero no de toxina A; las cepas pertenecientes a este ribotipo normalmente son resistentes a la clindamicina y las fluoroquinolonas, y a pesar de poseer sólo la toxina B, han sido asociadas a brotes de infecciones por *CD* (ICD) en Europa, América del Norte y Argentina (Andrés-Lasheras, 2016). El Clado 5 ha sido principalmente aislado del humano y otras especies animales, principalmente del ganado vacuno y porcino. El Clado C-I está compuesto únicamente por cepas no toxigénicas. Desde el punto de vista clínico, el *CD* más significativo proviene del Clado 2 y Clado 5 que contienen los ribotipos 027 y 078 respectivamente, que son extremadamente virulentos por el mecanismo de hiperproducción de toxinas y por tanto son los más relacionados con los brotes de enfermedades. La mayoría de la literatura hasta la fecha se ha centrado en los ribotipos 027 y 078, debido a su importancia clínica. Sin embargo, sería demasiado simplista sugerir que estos dos ribotipos abarcan todas las cepas

virulentas encontradas (Warriner et al., 2016). En la Figura 3.4, que se encuentra en el Anexo 1, se encuentra representado el árbol filogenético, en él se muestran los diferentes clados de los que está compuesto la población de *CD* (1-5, C-I). Los clados se encuentran ordenados y diferenciados por colores, y se muestra como las cepas toxigénicas y no toxigénicas no tienen un patrón ordenado.

3.2 Epidemiología

3.2.1 Ciclo de infección

En condiciones normales, el tracto gastrointestinal (TGI) de la especie humana posee una microbiota indígena característica que le proporciona el equilibrio necesario para poder inhibir el crecimiento de ciertos patógenos para él, lo que se ha llamado “resistencia a la colonización” (Donskey, 2004). *CD*, al no ser un microorganismo invasivo y un mal competidor, necesita que la microbiota intestinal estable del individuo se vea comprometida para poder establecerse y comenzar así a colonizar las mucosas intestinales (Keel y Songer, 2006; Denève et al., 2009). Mientras que las condiciones ambientales no sean favorables, permanece en forma de spora a la espera de que éstas cambien, momento en el cual comienza a germinar (Andrés-Lasheras, 2016). Sin embargo, las patologías de carácter intestinal asociadas a *CD* suelen estar ligadas a elementos que originan una disrupción en la microbiota intestinal y “vacío” de nichos (Beaugerie, 2004). Existen diversos factores que pueden alterar la microbiota intestinal normal de un individuo, pero el uso de antibióticos de amplio espectro sigue siendo el factor desencadenante más frecuente (Gerding, 2004).

Existen cepas toxigénicas y no toxigénicas, y solo las toxigénicas causan enfermedades en los humanos, por lo que la infección es consecuencia de la ingestión de esporas y células vegetativas de *CD* toxigénico. La dosis de infección *CD* es desconocida, pero se considera que es baja (100-1000 esporas) y es muy dependiente de los factores relacionados con el huésped (Kansau et al. 2016).

Las Figuras 3.5 y 3.6, muestran el ciclo de infección de *CD*. La mayoría de las células vegetativas son eliminadas en el estómago, pero las esporas tienen capacidad de resistir a la acción del ácido gástrico (Poutanen y Simor, 2004). Las esporas pueden germinar en el intestino delgado, tras su exposición a los ácidos biliares, y colonizar el colon gracias a los flagelos que facilitan su movimiento (Poutanen y Simor, 2004; Rodríguez-Pardo, Mirelis y Navarro, 2013). También pueden germinar directamente en el colon en

presencia de factores favorables (aumento de taurocolato y/o glicina). Una vez germinadas, si la microbiota se encuentra alterada, *CD* aprovecha este desequilibrio para replicarse y adherirse a la capa mucosa del enterocito (Denéve et al., 2009). Finalmente, se establece, tras las fases de adherencia y multiplicación de las células vegetativas, y si la cepa es toxigénica, comenzará con el proceso infeccioso mediante la síntesis y liberación de sus dos principales factores de virulencia: las toxinas A y B (Voth y Ballard, 2005). En general, la secreción de las toxinas A y B ocurre cuando *CD* alcanza la fase estacionaria de crecimiento (Andrés-Lasheras, 2016). Estas se unen a los receptores de las células epiteliales de la mucosa intestinal, y penetran en los enterocitos, además destruyen las uniones intercelulares del tejido, lo que provoca una pérdida del contacto célula-célula, un aumento de la permeabilidad de la superficie de las mucosas, tumefacción celular y, eventualmente, muerte de las mismas por apoptosis (Keel y Songer, 2006; Furuya-Kanamori et al., 2015). Como consecuencia, se produce infiltración de neutrófilos, lo que resulta en una fuerte y extensa respuesta inflamatoria. Este daño en el tejido intestinal e inflamación se traduce en una colitis, que junto con el aumento de la permeabilidad del colon, contribuye a la aparición de diarrea acuosa (Andrés-Lasheras, 2016). La formación de pseudomembranas (placas amarillo-blanquecinas), en el caso de llegar a este punto, se da por la acumulación de neutrófilos, fibrina, mucina y restos celulares en el tejido (Poxton et al., 2001; Keessen et al., 2011).

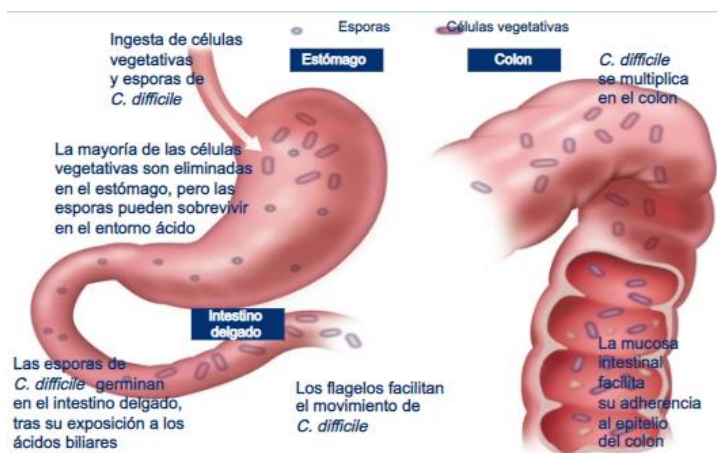


Figura 3.5. Ciclo de infección de *CD*. Imagen obtenida en: <https://slideplayer.es/slide/1061056/>

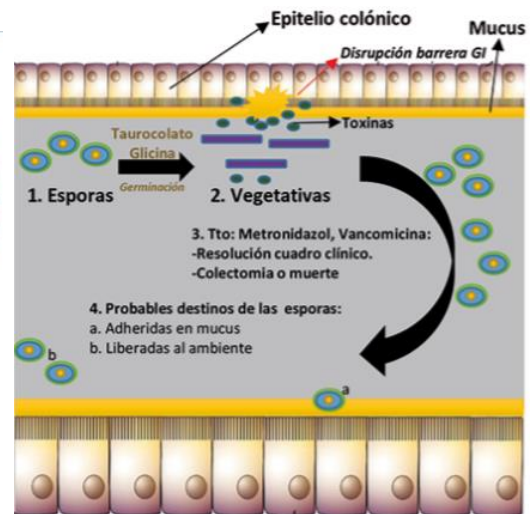


Figura 3.6. Ciclo de infección de *CD* (Barra-Carrasco et al., 2014).

3.3 Transmisión de *CD*

CD es ubicuo, se encuentra en las heces de animales domésticos, en el tracto intestinal de muchos tipos de animales (tanto animales de compañía como de especies ganaderas),

y se ha encontrado en una amplia gama de alimentos que incluye la carne (cruda y procesada), mariscos y productos frescos, y como se muestra en la Figura 3.7 está distribuido en una gran variedad de localizaciones. Incluso puede estar presente de forma natural en el intestino grueso de las personas y no presentar síntomas de infección.

Source	N	Toxigenic <i>Clostridium difficile</i> (%)
Domestic animals	200	3 (1.5)
Farm animals	524	4 (0.8)
Fish	107	0
Soil	104	9 (8.6)
Hospitals	380	72 (18.9)
Nursing homes	275	4 (1.5)
Houses	350	3 (0.9)
Dorms	200	3 (1.5)
Water	110	36 (32.7)
Vegetables	300	5 (1.7)
Total	2580	140 (5.4)

Figura 3.7. Prevalencia de *CD* toxigénico. Extraído de Al-saif y Brazier (1996).

La infección asociada a *CD* (IACD) es una de las principales infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) en el mundo con la inducción de enfermedades entéricas graves en la especie humana y animal, y es la causa más frecuente de diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosas.

La fuente de las ICD, siempre se ha visto relacionada con el ámbito hospitalario, en individuos de edades superiores a los 65 años, debido principalmente al agotamiento de la flora intestinal protectora, así como por el uso de antibióticos de amplio espectro (como ampicilina y cefalosporinas). Y su principal vía de transmisión era la vía fecal-oral, por el personal sanitario o a partir de pacientes sintomáticos con ICD. Según Knight et al. (2015), la proporción de ICD adquiridas en entornos clínicos es inferior al 35% del total de casos informados. Esto se observa en el incremento del impacto a una población comunitaria cada vez mayor y en individuos más jóvenes, incluso sin exposición a antibióticos. Además, la fuente implicada en las ICD adquirida en la comunidad permanece abierta a la especulación, aunque se ha propuesto un vínculo alimentario dada la ruta de transmisión fecal-oral. Ruta que otros *Clostridium* patógenos alimentarios siguen, como *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* (Warriner et al., 2016). Otro punto de diferenciación entre las infecciones adquiridas en el hospital y en la comunidad se relaciona con el genotipo implicado, las infecciones adquiridas en el hospital se asocian comúnmente con la cepa hipervirulenta ribotipo 027.

A continuación, se proporciona una revisión de la incidencia de *CD* en relación con el medio ambiente, los animales de producción, los animales silvestres, los mataderos, y los alimentos. Según la definición de patógeno transmitido por los alimentos "Un patógeno que puede encontrarse o crecer en los alimentos a un nivel suficiente para causar una enfermedad y ha tenido una asociación histórica con enfermedades transmitidas por los alimentos" (Warriner et al., 2016). Al igual que esta definición se ajusta *C. perfringens* y *C. botulinum*, en este contexto, *CD* se puede clasificar dentro del grupo de agentes no especificados que se recuperan en los alimentos, pero la capacidad de causar enfermedad a través de esta ruta sigue siendo desconocida (Scallen et al., 2011).

3.3.1 Incidencia en el medio ambiente

La capacidad de formar esporas, le confiere ventajas ecológicas a la hora de favorecer su dispersión y la colonización de nuevos nichos ecológicos (Andrés-Lasheras, 2016). Dado que es un microorganismo ambiental, puede ser aislado de prácticamente cualquier tipo de nicho ecológico relacionado o no con individuos colonizados o enfermos, habiéndose encontrado muestras de suelo, agua (potable, ríos, mar, lagos, piscinas) y aire, en ocasiones con elevada frecuencia (Al-saif y Brazier, 1996). Así por ejemplo, en el sur de Ontario, el 92% del *CD* recuperado de los sedimentos de los ríos fue toxigénico (Xu et al., 2014). Pero más preocupante fue la recuperación del ribotipo 078 de muestras de agua municipal tomadas de viviendas domésticas, lo que sugiere que las endosporas de *CD* pueden sobrevivir con tratamientos de agua potable (Bizaid, 2013). Estudios para determinar la incidencia de *CD* en el suelo se han restringido a áreas de alto riesgo donde el estiércol se ha aplicado directa o indirectamente a la tierra. Por ejemplo, del suelo muestreado de una granja de sementales se aisló del 11% (14/132) de las muestras (Baverud et al., 2003). Y se recuperó del 22% de las muestras de suelo tomadas de un mercado de agricultores en Zimbabwe (Simango y Mwakurudza, 2008). También se encontró *CD* en muestras de superficie ambiental tomadas de pisos, mesas, superficies de contacto, ventana, drenaje de pisos, tazón de alimentación y alrededor de dispositivos de riego. Se aisló del 21% (22/104) de las muestras de suelo suburbano de parques públicos, jardines, patios de recreo y campos de Gales del Sur (Al-saif y Brasier 1996). En el interior de un hospital, la carga de *CD* puede oscilar entre 53-426 UFC/cm³, y aunque el recuento pueda ser tan bajo como 1-5 UFC/100mL en muestras de agua (Al-saif y Brasier 1996), se ha observado que la contaminación ambiental es mayor en las proximidades de personas o animales con *ICD* o simplemente colonizados asintómicamente por lo que

el ambiente podría ser una fuente más de cepas toxigénicas para los seres humanos y otras especies animales (Andrés-Lasheras, 2016).

3.3.2 Incidencia de *CD* en animales de producción:

El *CD* se encuentra con frecuencia en una amplia gama de animales que incluye mascotas y aquellos destinados a la producción de carne, como se indica en la Figura 3.8. El ribotipo principal, es el 078 que representa el 75-90%, aunque el ribotipo 027 también se ha aislado en animales (cerdos, ganado vacuno y aves de corral). Según estudios de secuenciación de ADN, el ribotipo 078 aislados en cerdos muestra grandes similitudes con los aislados de casos clínicos, lo que confirma la transmisión de animal a humano, pero también de humano a animal (Hawken et al., 2013b; Knight et al., 2015; Warriner et al., 2016).

Animal	Prevalence (%)	Country	Source
Piglets	66.7	Belgium	Rodriguez et al. (2012)
Piglets	100	Holland	Hopman et al. (2011)
Piglets	94.4	Spain	Peláez et al. (2013)
Pig	91	Canada	Weese et al. (2010c)
Pig	83	Canada	Keel et al. (2007)
Pig	67	Canada	Weese et al. (2011)
Pig	78	Holland	Koene et al. (2012)
Pig	31	Holland	Keessen et al. (2011)
Calves	75	Belgium	Rodriguez et al. (2012)
Calves	67	Canada	Costa et al. (2011)
Calves	94	Canada	Keel et al. (2007)
Calves	17	Germany	Schneeberg et al. (2013)
Calves	94	United States	Hammitt et al. (2008)

Figura 3.8. Prevalencia de *CD* ribotipo 078 en alimentos (Warriner et al., 2016).

3.3.3 Incidencia de *CD* en animales silvestres

Los animales silvestres se consideran un vector de diseminación de patógenos entéricos entre granjas y centros urbanos, por lo que, se ha planteado la hipótesis de que actúen como vectores de *CD*. Por otro lado, un estudio de Andrés-Lasheras (2016) indica que una granja de cerdos positiva en *CD* toxigénico, también se encontraron roedores y palomas que también dieron positivo a *CD*. Incluso su presencia en las heces de los roedores fue 10 veces más altas que en las muestras fecales de cerdos, por lo que los hallazgos sugieren que roedores pueden transmitir *CD* toxigénico en granjas.

3.3.4 Incidencia de *CD* en mataderos

La alta prevalencia de *CD* en animales puede dar lugar a la transmisión del patógeno a los alimentos, debido a que se produzca contaminación cruzada durante el proceso de

sacrificio y/o instalaciones de procesado de la carne (Warriner et al., 2016). Así, en un estudio realizado por Hawken et al. (2013a) en un matadero de cerdos, se recuperó *CD* del 80% de las muestras de estiércol tomadas del área de espera, del 15% de las canales en la etapa posterior al sangrado y del 1-5% de las canales en la posvisceración. En un estudio similar realizado en EE.UU., a pesar de que hubiera una prevalencia de hasta el 30% en cerdos a nivel de producción, solo se recuperó *CD* en 3 canales (después del enfriamiento) de más de 1500 muestras. Sin embargo, el *CD* recuperado era toxigénico y resistente a antibióticos (Susick et al., 2012 y Warriner et al., 2016). En un matadero de carne de cerdo en Corea dos canales de 659 dieron positivo, que representa una prevalencia del 0,3%. Además, ambos aislamientos se identificaron como 078 (Cho et al., 2015). En Bélgica se recuperó del 8% de las carnes de ternera y del 7% de las carnes de cerdo. A través de la tipificación de los aislamientos, se identificaron 19 ribotipos que incluían el hipervirulento 078. De manera más significativa, los ribotipos recuperados de las canales podrían emparejarse con casos clínicos humanos en Bélgica (Rodríguez et al., 2013).

A través de los estudios realizados en mataderos, se puede concluir que el transporte de *CD* en las canales es bajo, por el hecho de que no hay contaminación cruzada durante el proceso de sacrificio o por la eficiencia de los métodos de descontaminación de la canal.

3.3.5 Incidencia de *CD* en alimentos

En los últimos años se han realizado otros estudios para determinar la incidencia de *CD* en distintos productos, ya bien sea en carnes, carnes procesadas, pescado o vegetales. Figura 3.9. Los informes de la prevalencia de *CD* toxigénicos en muestras de carne al por menor y, con menor frecuencia, en otros alimentos, han sido resumidos por Hensgens et al. (2012). Los datos representados no se pueden considerar como prevalencia verdadera dado al limitado tamaño de las muestras, junto con diferentes metodologías y tendencias para los estudios que no lograron recuperar el patógeno que no se publicó (Warrier et al., 2016).

Product	Country	% Positive for <i>C. difficile</i>	% Toxigenic	Source
Ground beef	Canada	6-1	80-0	Visser et al. (2012)
Ground beef	Canada	12-2	100	Weese et al. (2009)
Ground veal	USA	8-0	Not tested	Houser et al. (2012)
Ground pork	USA	<1	0-3	Mooyottu et al. (2015)
Ground pork	USA	9-5	100	Harvey et al. (2011)
Chicken meat	USA	44-4	100	Songer et al. (2009)
Chicken meat	Canada	12-5	100	Weese et al. (2010b)
Processed vegetables	Canada	4-5	100	Metcalf et al. (2010)
Raw vegetables	UK	2-3	71-4	Bakri et al. (2009)
Leafy greens	Iran	5-7	16-6	Yamoudy et al. (2015)
Lettuce	USA	4-6	100	Rodríguez-Palacios et al. (2014)
Lettuce	USA	13-8	100	Han (2016)
Lettuce	France	2-9	100	Eckert et al. (2013)
Molluscs	Italy	3-9	2	Troiano et al. (2015)
Shellfish	USA	4-5	100	Norman et al. (2014)
Seafood (general)	Canada	4-8	100	Metcalf et al. (2011)

Figura 3.9. Incidencia de *CD* en carne, vegetales y marisco (Warriner et al., 2016).

Se han notificado en América del Norte tasas de prevalencia relativamente altas en productos cárnicos crudos, de hasta un 42% en carne de ternera, 41% carne de cerdo y 44% en pavo. Mientras que en Europa las tasas de prevalencia son más bajas, de hasta un 4,3% en carne picada de ternera/cerdo y un 2,7% en carne picada de pollo (Lund y Peck, 2015). La toxina *CD* se encontró en el 23-50% de las carnes crudas de América del Norte, en el 14% de las salchichas de verano listas para comer, y en el 63% de las salchichas alemanas brunschweiger listas para comer (Songer, 2009). Además, se detectaron los ribotipos 027 y 078. La mayoría de las cepas aisladas de los alimentos tienen un genotipo idéntico al de las aisladas en los humanos y animales. En un estudio canadiense, de 230 muestras de carne picada de ternera y de cerdo, se aislaron 28 muestras de *CD* toxigénico, es decir, se aisló en un 12% de las muestras (Weese et al., 2009). En muestras de carne de pollo, *CD* toxigénico se aisló en un 12,8% de las muestras. Las diferencias en la prevalencia informada pueden deberse en parte al uso de diferentes metodologías (Lund y Peck, 2015).

También se han analizado otros alimentos propensos a estar contaminados con contaminación fecal. Los peces bivalvos son filtradores, por lo que pueden acumular patógenos entéricos al criarse en aguas contaminadas. En los estudios realizados, se aisló *CD* toxigénico, por lo que pueden considerarse una fuente potencial (Metcalf et al., 2011). Los orígenes de *CD* asociados con la verdura es probable que provengan del agua, el estiércol, el compost y/o los biosólidos, pero aún no está claro. Esta hipótesis se apoya en el hallazgo de que *CD* puede sobrevivir al tratamiento de aguas potables y recuperarse

con una alta prevalencia en los biosólidos de los efluentes (Bizaid, 2013; Xu et al., 2014; Warriner et al., 2016).

En resumen, en carne fresca y derivados cárnicos es donde más se detecta, aunque en otros alimentos como bivalvos y vegetales también es posible encontrarlos (Figura 3.10).

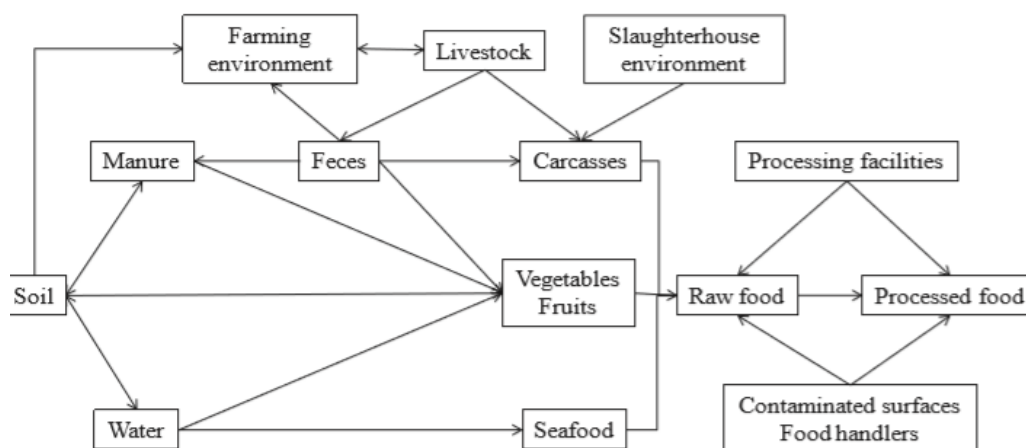


Figura 3.10. Diagrama de flujo de las principales vías de contaminación de los alimentos por esporas de *CD* (Candel-Pérez, Ros-Berrueto y Martínez-Gracia, 2019).

3.4 Crecimiento de *CD* en los alimentos

Se conoce el crecimiento de *C. perfringens* y *C. botulinum* en los alimentos, pero se necesita más investigación para establecer si la infección con *C. difficile* puede ser causada por la transmisión en los alimentos.

Las esporas de *CD*, como las de *C. perfringens* y *C. botulinum*, pueden aparecer en la carne y sobrevivir a temperaturas y tiempos recomendados para cocinar. La germinación de las esporas de *C. perfringens* y el crecimiento vegetativo pueden ocurrir en las carnes cocidas si se mantienen a temperaturas de 12°-52°C, y luego puede ocurrir una gastroenteritis. Se necesita información sobre las condiciones en las cuales las esporas sobrevivientes de *CD* germinarían y las bacterias vegetativas se multiplicarían en los platos de carne cocida, o si las esporas persistirían, y si las esporas o bacterias vegetativas darían como resultado una infección asintomática o sintomática después del consumo de carne (Lund y Peck, 2015).

Un estudio comparativo determinó los límites de crecimiento de los ribotipos 078 y 027 (Le Lay et al., 2016; Lim, Foster y Riley, 2016), indicando que ambos crecieron en un rango de pH= 7-9. A pH<6-5 se redujo la tasa de crecimiento y a concentraciones de sal > 4%. A temperatura de 4°C no se observó crecimiento, pero sí a 22°C siendo 37°C su temperatura óptima.

Se podría concluir que el crecimiento de *CD* es poco frecuente y que los obstáculos aplicados para controlar *C. perfringens* y *C. botulinum* también serían efectivos contra los patógenos entéricos (Lund y Peck, 2015). Por otro lado, cabe destacar que si bien en otros microorganismos como *C. perfringens* se considera que una concentración de 10^5 células por gramo en un alimento puede producir una toxiinfección alimentaria (Heredia y Labbé, 2013), en el caso de *C. difficile* la dosis infectiva tanto a nivel de esporas como de célula vegetativa es desconocida (Lund y Peck, 2015).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Clostridioides difficile (conocido como *Clostridium difficile*, *CD*) es una bacteria patógena formadora de esporas, asociada con la inducción de enfermedades entéricas graves en la especie humana y animal, y es la causa más frecuente de diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosa.

CD satisface una serie de criterios que designan al patógeno como un peligro de interés en seguridad alimentaria para el cual no existe una regulación específica (AESAs, 2018). Es de interés en el ámbito de la seguridad alimentaria, ya que es un patógeno ubicuo, y se encuentra en las heces de animales domésticos, e incluso puede estar presente de forma natural en el intestino grueso de personas que no presenten síntomas de infección. No obstante, se considera muy importante el hecho de que se transmita por los alimentos. Específicamente, *CD* se encuentra en alimentos como la carne fresca, carnes procesadas y puede sobrevivir al proceso de cocción. También se puede encontrar en otros alimentos frescos, como son los mariscos y vegetales, que se procesan mínimamente, y por tanto, las bacterias pueden mantenerse hasta el consumo del alimento (Warriner et al., 2016).

La mayoría de las infecciones causadas por este patógeno (*ICD*) en la especie humana se han relacionado con el ámbito hospitalario en individuos de edades superiores a los 65 años, debido principalmente al agotamiento de la microbiota intestinal protectora, así como por el uso de antibióticos. Sin embargo, con la aparición de nuevas cepas, la *ICD* adquirida está aumentando y representa el 65% de los casos notificados, y probablemente se está subestimando el número real (Warriner et al., 2016). Esto quiere decir que se ha ampliado el impacto de *CD* a una población comunitaria cada vez mayor, e individuos más jóvenes, incluso sin exposición a antibióticos. Todo ello hace que se considere un patógeno emergente y que no solo se relacione con el ámbito hospitalario, sino también con la alimentación.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre distintos aspectos relacionados con este microorganismo, en una primera parte asociados a su patogenicidad, toxicidad y prevalencia, con especial atención a su presencia en alimentos y, en una segunda, a las posibles estrategias para su control o eliminación en alimentos mediante el uso de distintos procesos de conservación de alimentos como el calor y disminución de la temperatura, entre otras.

5. METODOLOGÍA:

El trabajo de revisión bibliográfica es una etapa fundamental de una investigación científica y se debe garantizar la obtención de información más relevante en el campo de estudio (Gómez-Luna et al., 2014). Dado que en la actualidad hay mucha información y su crecimiento es exponencial, para manejar la información se han seguido los pasos recomendados en el curso online de “Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2018-2019” (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018), documento aportado por la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria y en las pautas publicadas por Gómez-Luna et al. (2014).

5.1 Fuentes bibliográficas consultadas

Alcorze, que según la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018) es una herramienta de búsqueda que permite acceder a la mayoría de los recursos de información disponibles en la colección de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, tanto fuentes internas (catálogo de la biblioteca, repositorio institucional Zaguán) como externas (bases de datos). También localiza publicaciones en acceso abierto.

Science Direct, que según Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018) es una base de datos de investigación científica y médica. Es un portal de la empresa Elsevier y permite la búsqueda y recuperación de artículos de las revistas y libros de la propia editorial. Alberga más de 12 millones de publicaciones, contiene más de 2500 revistas y 11000 libros.

Web of Science es una plataforma que recoge las referencias de las principales publicaciones científicas de cualquier disciplina del conocimiento, tanto científico como tecnológico, humanística, y sociológico desde 1945, esenciales para el apoyo a la investigación y para el reconocimiento de los esfuerzos y avances realizados por la comunidad científica y tecnológica (Fundación Española para la Ciencia y Tecnología, 2019).

SCOPUS, que según la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018) es una base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas de áreas de ciencias, tecnología, medicina y ciencias sociales. Está editada por Elsevier. Las búsquedas en *Scopus* incorporan búsquedas de páginas web científicas, también de Elsevier, y bases de datos de patentes.

5.2 Metodología de búsqueda bibliográfica

La búsqueda bibliográfica se hizo desde una perspectiva estructurada por lo que se han seguido tres etapas (Gómez-Luna et al., 2014; Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018):

- Búsqueda inicial, para conseguir tener una visión general del tema y buscar qué y cuánto se ha escrito sobre temática en cuestión. Para ello, se han consultado manuales generales e Internet, utilizando las herramientas de búsqueda que la Universidad de Zaragoza que nos aporta, como *AlcorZe* (buscador de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza) y en el catálogo ROBLE. Seguidamente, para realizar una búsqueda más avanzada, utilicé bases de datos científicas como *Science Direct*, *Web of Science* y *SCOPUS*, así como otros organismos relacionados con la seguridad alimentaria como AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), para encontrar obras especializadas y monográficos, y artículos de revistas. De las distintas bases de datos, gracias a la opción de búsqueda avanza, se han recabado distintos datos en relación a los años de investigación, países donde más se ha investigado, personas que más han publicado, etc. En las siguientes figuras (Figuras 5.1, 5.2, 5.3), se muestra el número de artículos publicados en las distintas bases de datos buscando la palabra clave “*Clostridium difficile*”. Como se observa en ellas hay un aumento progresivo a lo largo de los primeros años y un crecimiento exponencial en la última década. En *Science Direct*, se han encontrado se han encontrado 26.810 publicaciones, desde 1940 con 1 publicación hasta 2019 con 1.365 publicaciones. Para *Web of Science*, las publicaciones suman 18.522 desde 1962 con 1 publicación hasta 2019 con 548 publicaciones. Y en *SCOPUS*, se han encontrado 22.165 resultados, desde 1962 con 2 publicaciones hasta 2019 con 589 publicaciones

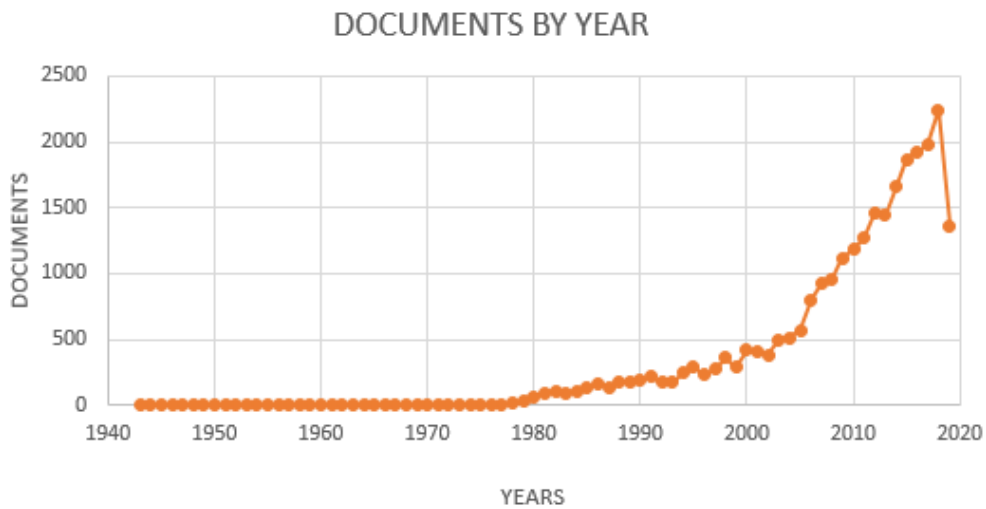


Figura 5.1. Búsqueda de la palabra clave “*Clostridium difficile*” en la base de datos *Science Direct*.

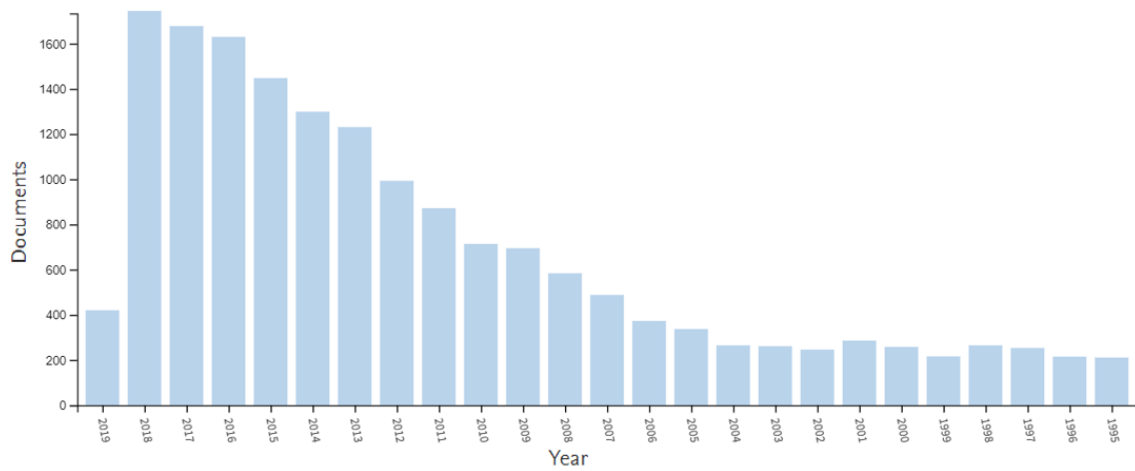


Figura 5.2. Búsqueda de la palabra clave “*Clostridium difficile*” en la base de datos *Web of Science*.

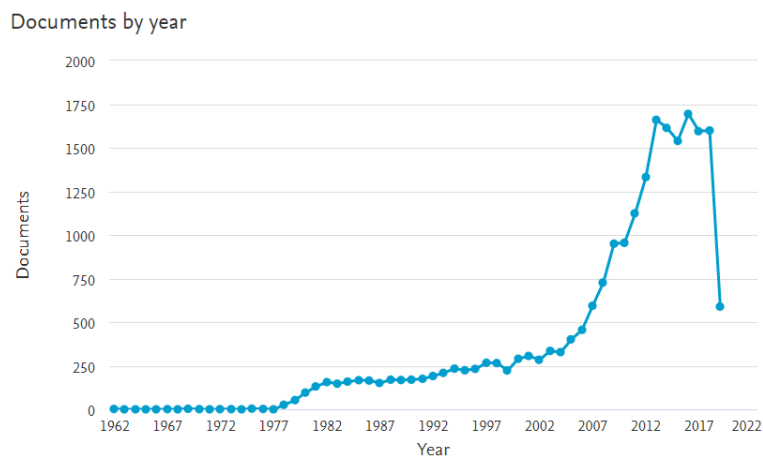


Figura 5.3. Búsqueda de la palabra clave “*Clostridium difficile*” en la base de datos *SCOPUS*.

- Para la búsqueda sistemática, se establecieron descriptores o palabras clave y el campo y el periodo de búsqueda. La estructura de la búsqueda se fundamentó en los distintos apartados de los que se compone el estudio, es decir, se utilizaron distintos descriptores o palabras clave y el campo y el periodo de búsqueda, dependiendo de para qué apartado del estudio estuviese buscando información. Las Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 muestran las palabras claves utilizadas.
- Finalmente, se llevó a cabo una búsqueda interna, es decir, de los artículos y libros que se seleccionaron, se han utilizado las citas que nombraban para buscar algún otro artículo de interés relacionado con el tema.

Inicialmente, en todas las bases de datos empleadas, se comenzó utilizando la opción “búsqueda avanzada”, usando el campo de búsqueda “Find articles with this terms” e introduciendo como palabra clave “*Clostridium difficile*”. Como se ha indicado, en el caso de *Science Direct*, los resultados obtenidos fueron 26.810 desde 1940 hasta 2019. Debido a la gran cantidad de resultados, se modificó el campo de búsqueda a “Title, abstract or keywords” e, introduciendo nuevamente como palabra clave “*Clostridium difficile*”, los resultados disminuyeron a 4.782. La inclusión de nuevas palabras clave así como del tipo de documento (artículo o revisión), tipo de acceso (abierto - “open access” - o de pago) o el año de publicación (indicado con * en las tablas), permitió reducir el número de artículos encontrados. En los Anexos 2, 3 y 4 se encuentran las Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 que muestran las palabras clave utilizadas en la búsqueda utilizando las bases *Science Direct*, *Web of Science* y *SCOPUS*, respectivamente, así como la fecha en la que se realizaron las búsquedas, el número de documentos encontrados para esas palabras clave y los que se consideraron de interés para el trabajo realizado, el campo de búsqueda elegido y el periodo de búsqueda. El número de artículos de interés indicados en las tablas corresponden a los artículos que se han considerado más apropiados para consultar a la hora de realizar el presente trabajo.

Como se observa en las Tablas, cada una tiene palabras clave diferentes aunque bastante similares. Esto se debe a que en cada buscador la información y la manera de interpretarla cambiaba, por lo que se tuvo que variar dichas palabras para obtener así una mayor visión.

A modo de curiosidad, se realizó un análisis de los países que estaban más implicados en la publicación de documentos de *CD* (Figura 5.4) utilizando como bases de datos *SCOPUS* y *Web of Science*. Como se ve en la gráfica, la mayoría de las publicaciones son de EE.UU., seguido por Inglaterra con una gran diferencia de publicaciones. España también se encuentra entre los países que realizan publicaciones, destacando los trabajos de Candel-Pérez, Ros-Berruezo y Martínez-Gracia, 2019; Rodríguez-Pardo, Mireles y Navarro, 2013; Andrés-Lasheras, 2016 y Alba-Alderete, 2016, entre otros.

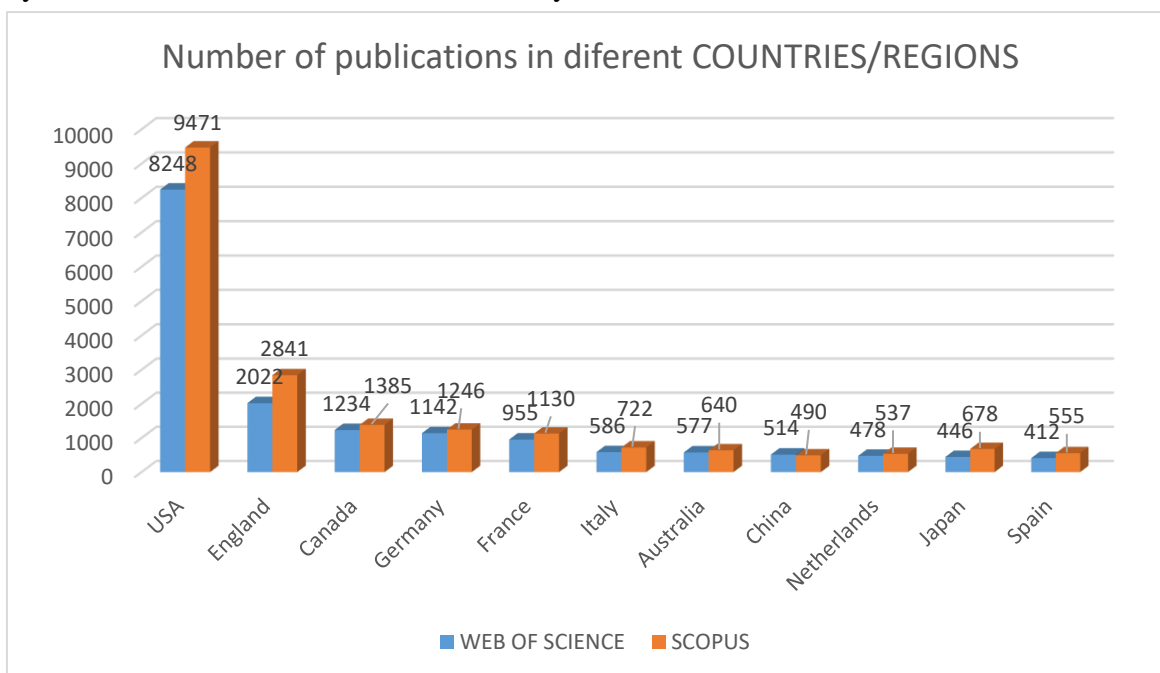


Figura 5.4. Número de publicaciones en diferentes países/regiones.

La organización de la información fue un paso fundamental para clasificar de manera sistemática la información. Inicialmente, se fue ordenando la información en carpetas, según la temática o interés que podía aprovechar de ellas. Posteriormente, cuando ya se comenzaba a tener una gran cantidad de información, además de una gran cantidad de bibliografía, se usó un gestor bibliográfico “RefWorks”. Se trata de una aplicación multilingüe vía web que ayuda a gestionar la información de una investigación como importar referencias desde múltiples fuentes de información, incluir citas a la hora de redactar un documento, crear bibliografía en una amplia gama de formatos, compartir la información, etc.

Tras la búsqueda y la organización de la información, se realizó un análisis indagando los documentos más útiles relacionados con la temática de trabajo. Es la tarea que más tiempo conlleva ya que hay que realizar una intensa lectura de toda la información encontrada, y comenzar a redactar.

Así, tras el análisis de toda la información recopilada, para la sección “Introducción” de este TFG, la mayoría de la información se obtuvo de los documentos de Andrés-Lasheras (2016); Alba-Alderete (2016); Warriner et al. (2016) y Lund y Peck (2015), entre otros. Y para la sección de “Resultados y Discusión” del TFG, la mayoría de la información se extrajo de autores como Rodríguez-Palacios et al. (2010); Rodríguez-Palacios y LeJeune (2011); Deng et al. (2015); Ojha et al. (2016) y Deng et al. (2017), entre otros.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo se ha dividido en dos partes. En una primera se han tratado los temas relativos a las características de *CD*, su epidemiología, patogenia, etc. y esta se va a centrar en las distintas estrategias de conservación de los alimentos utilizadas para el control de *CD* en alimentos. Como ya se ha mencionado en la introducción, las infecciones asociadas a *CD* son comunes de los centros hospitalarios, pero su número está incrementando fuera de esta comunidad debido a una mayor presencia de *CD* en animales de abasto, así como en las carnes de consumo.

Los alimentos, por su composición, se hallan sometidos a la acción de agentes, tanto físicos como químicos, que pueden alterarlos. Sin embargo, en la inmensa mayoría de los casos, son los agentes biológicos (los enzimas de los propios alimentos, pero especialmente los de los microorganismos contaminantes) los principales responsables de su alteración. Además, y como en este caso, los alimentos puede estar contaminados con microorganismos patógenos que al consumirlos con los alimentos, son responsables de toxiinfecciones alimentarias. Por ello, los métodos de conservación actualmente empleados tienen como objetivo el control de la acción sobre los alimentos de los agentes biológicos que pueden, no sólo alterarlos, sino provocar, tras su consumo, graves alteraciones para la salud. Los métodos de conservación persiguen, por tanto, un doble objetivo: el objetivo tecnológico de evitar su alteración y el higiénico de asegurar su salubridad.

Son diversas las estrategias de conservación de los alimentos. De forma general se pueden distinguir tres estrategias generales de lucha contra los microorganismos. Unas están centradas en impedir que lleguen al producto mediante el envasado de los alimentos o por separación de los mismos (filtración, decantación, centrifugación, etc.); destruirlos si lo han alcanzado (mediante el uso del calor, radiaciones ionizantes o nuevos sistemas térmicos o no térmicos de conservación) o impedir su multiplicación estableciéndose

condiciones disgenésicas mediante modificaciones ambientales (reducción de la temperatura, control de la actividad de agua (a_w), uso de atmósferas protectoras, reducción del pH, uso de conservantes químicos, etc.). En esta parte del trabajo, se va a hacer una revisión de los trabajos publicados sobre el uso de estas estrategias para controlar *CD* en alimentos. Destacar en este sentido que son pocas las publicaciones encontradas y que, por tanto, es un campo de gran interés para investigar. La mayoría de los trabajos están centrados en la inactivación microbiana por calor de *CD*, aunque hay datos sobre el efecto de las bajas temperaturas y de la reducción de la actividad de agua para su control. También se han encontrado trabajos evaluando el efecto letal o en la germinación de esporas tratadas por tecnologías más novedosas como los microondas, las altas presiones hidrostáticas o la luz UV.

6.1 Control de *CD* por disminución de la temperatura

Las bajas temperaturas comúnmente se usan para aumentar la vida útil de alimentos. Entre estas técnicas, se encuentra la congelación (almacenamiento del producto a temperaturas de entre -18 y -20°C) y la refrigeración (almacenamiento a unos 4°C). Como cualquier microorganismo, el descenso de la temperatura produce la reducción parcial (temperaturas de refrigeración) o total (congelación) de la actividad metabólica. Como ya se ha descrito, *CD* es capaz de crecer entre 22 y 45°C con una temperatura óptima de 37°C , por lo que cualquier reducción de la temperatura por debajo de estos valores limita su actividad (Candel-Pérez, Ros-Berruezo y Martínez-Gracia, 2019). Sin embargo, los resultados existentes sobre el efecto de esta estrategia en *CD* son diversos. En esta línea, es de destacar el trabajo de Deng et al., (2015) que llevaron a cabo distintos estudios en dos cepas de *CD* con el fin de evaluar la capacidad de supervivencia de sus esporas a bajas temperaturas. En cuanto a la congelación, comprobaron los efectos que tenía el almacenamiento (hasta 4 meses) de esporas de *CD* a -80 y -20°C en tampón PBS (*Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino) así como en carne de ternera picada almacenada a -20°C durante 2 meses (Figura 6.1) utilizando para ello dos cepas distintas, la R20291 (cepa 1) y la M120 (cepa 2). Como se observa en la Figura 6.1A, el almacenamiento a -80°C produjo la reducción de $0,7$ y $1,7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/ml}$ en la viabilidad de las esporas de las cepas 1 y 2, respectivamente, y cuando se realizó a -20°C (Figura 6.1B), la reducción fue de $1,2$ y $1,7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/ml}$, respectivamente. En el caso de la carne, se observó una pequeña, pero significativa disminución en el número de esporos en la cepa 2, de $6,7$ a $6,3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/ml}$, mientras que en cepa 1 no fue significativa la

reducción. Estos resultados indican que las esporas de *CD* resisten la congelación y aunque el almacenamiento a largo plazo a temperaturas de congelación produzca una reducción del número de esporas, estas reducciones son insignificantes cuando se analizan desde una perspectiva de seguridad alimentaria. Por otro lado, destacar que ambas cepas mostraron una mayor viabilidad en la carne que en PBS. Estos resultados indican que la matriz de la carne proporciona una cierta protección a bajas temperaturas.

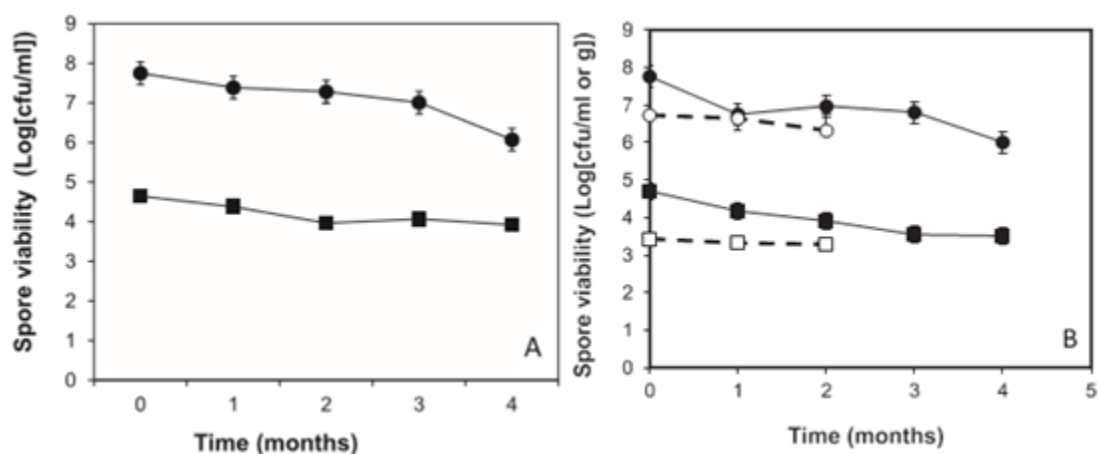


Figura 6.1. Efecto del almacenamiento a temperaturas de congelación sobre la viabilidad de las esporas de las cepas R20291 (cepa 1, ■) y la M120 (cepa 2, ●) de *CD*. (A) Esporas suspendidas en PBS e incubadas a -80°C durante 4 meses. (B) Esporas suspendidas en PBS (■, ●) o en carne de vacuno (□, ○) e incubadas a -20°C durante 4 meses.

En el caso de la refrigeración, estos mismos autores estudiaron la capacidad de supervivencia de las esporas de *CD* almacenadas a temperatura de 4°C (Figura 6.2) en PBS. Como se observa, en la cepa 2 la refrigeración causó una disminución de 7,8 a 6,2 Log₁₀ UFC/ml, mientras que en la cepa 1 no hubo reducción de la viabilidad de las esporas, es decir la resistencia al efecto de las bajas temperaturas varió con la cepa.

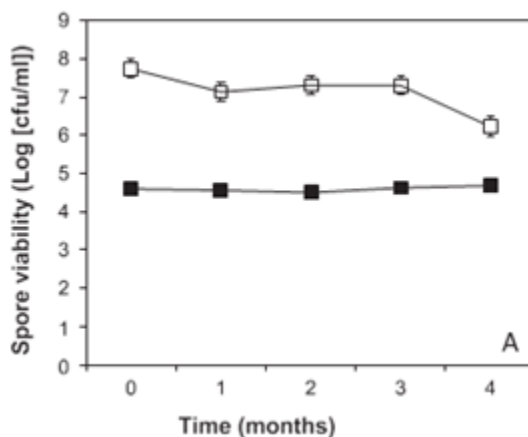


Figura 6.2. Efecto del almacenamiento a temperatura de 4°C de esporas de las cepas R20291 (cepa 1, ■) y la M120 (cepa 2, ●) de *CD* suspendidas en PBS.

Según estos resultados parecería que la disminución de la temperatura podría incluso producir una reducción del número de esporos. Comparado con otros microorganismos, las esporas bacterianas son capaces de sobrevivir en almacenamiento a temperaturas de congelación incluso durante décadas (Hughes y Nobbs, 2004). No obstante, Li y McClane (2006) también observaron hasta 1,6 ciclos logarítmicos de reducción de esporas de *C. perfringens* almacenadas durante 6 meses a 4 y -20°C; y Cronin y Wilkinson (2008) hasta 2 log para esporas de *Bacillus cereus* almacenadas 1 mes a 4°C. En cualquier caso, en estos estudios también habría que valorar si en estos resultados se podría estar dando una super-latencia (*superdormancy*) de una parte de los esporos observándose una reducción en los recuentos por no germinar las esporas cuando se avalúa la viabilidad, no produciéndose por tanto la inactivación de las esporas. La super-latencia es un estado donde las esporas experimentan un período de retraso antes de iniciar la germinación a pesar de la presencia de agentes germinadores. El período de retraso puede variar de horas a semanas en algunos casos y este estado es responsable de falsos negativos en pruebas diagnósticas (Rodríguez-Palacios y LeJeune 2011).

Si bien nos centramos en el desarrollo de *CD*, en el caso de las toxinas que producen, hay algunos trabajos que indican que son estables en un rango de temperaturas desde los -20 hasta los 37°C durante 4 semanas de almacenamiento en medios modelo (Candel-Pérez, Ros-Berruezo y Martínez-Gracia, 2019).

6.2 Control de *CD* por reducción de la actividad de agua (a_w)

La reducción del agua disponible para el desarrollo de los microorganismos es una de las estrategias más antiguas utilizadas para prolongar la vida útil de los alimentos. Las bacterias patógenas no pueden crecer por debajo de una a_w de 0,85 a 0,86, mientras que las levaduras y los mohos son más tolerantes a una a_w reducida de 0,80, pero generalmente no hay crecimiento por debajo de una a_w de aproximadamente 0,62. Los límites críticos de la a_w también pueden cambiarse a niveles más altos o más bajos por otros factores, como el pH, la sal, los agentes antimicrobianos, el tratamiento térmico y la temperatura, hasta cierto punto. En el caso de las esporas, estas pueden permanecer viables largos periodos de tiempo, pudiendo germinar cuando las condiciones son favorables.

En el caso de *CD* son pocas las publicaciones sobre el efecto de la a_w en su viabilidad. Deng et al. (2017) estudiaron la capacidad de germinar de esporas de distintas cepas de *CD* (R20291, M120 y DK1) en PBS ($a_w \sim 1,00$), carne seca comercial ($a_w \sim 0,82 / 0,72$)

y PBS ajustada a_w ($a_w \sim 0.82 / 0.72$) tras tres meses de almacenamiento. Como en el caso de la reducción de la temperatura, el comportamiento fue distinto según la cepa investigada. Así, se observó una reducción de alrededor 1 Log_{10} de esporas de las cepas M120 y DK1 en PBS, no detectándose ninguna reducción cuando se mantuvo en carne seca sugiriendo un efecto protector de la matriz del alimento. En el caso de las esporas de la cepa R20291 se detectó un incremento tanto en PBS ($\sim 2 \text{Log}_{10}$) como en carne seca ($\sim 1 \text{Log}_{10}$), lo que indicaría una cierta pérdida de super-latencia de las esporas.

Según estos resultados, se necesitan más estudios para determinar los mecanismos moleculares de supervivencia y el aumento de la eficiencia de germinación de las esporas de las cepas de *CD* como R20291 para reducir el riesgo de transmisión de *CD* a través de los alimentos. Es más, debido a la interacción entre la a_w y otros factores como el pH, la sal, etc. en la determinación de los límites de crecimiento y germinación microbiana, sería de interés evaluar el efecto de estas interacciones.

6.3 Inhibición de *CD* con compuestos químicos

El crecimiento de *CD* es inhibido con conservantes normalmente utilizados para el control de otras esporas del género *Clostridium* como nitritos, nitratos, metabisulfito de sodio y nisina. Si bien no hay evidencias claras, esto indicaría que aquellos compuestos o procesos combinados basados en los mismos (antimicrobiano y refrigeración, antimicrobiano combinado con pH, etc.) utilizados frente a *C. botulinum* o *C. perfringens* podrían emplearse como sistemas adecuados para el control de *C. difficile* (Lund y Peck, 2015).

Un trabajo reciente de Aljarallah (2016) evaluando el efecto antimicrobiano de compuestos naturales, como el aceite de semilla de *Nigelle sativa* (ajenuz o falso comino), extracto de agua de las semillas de *Nigella sativa* y de *Commiphora myrrha* (de su resina se obtiene la mirra), mostró la inhibición del crecimiento de *CD* así como de otros microorganismos Gram + y -. Los resultados concluían que la aplicación de aceite de semillas de *Nigelle sativa* a una concentración de un 2% así como el extracto acuoso de mirra producían la inhibición no sólo de *CD*, sino también de *Bacillus cereus*. Sin embargo, en el estudio no se determina el/los compuestos responsables de la acción inhibidora ni el mecanismo de acción de dichos compuestos.

A pesar del efecto inhibidor de distintos antimicrobianos y al igual que para otras esporas, las de *CD* son resistentes a determinados compuestos químicos. Así concentraciones de

cloro de más de 3000 ppm durante 15 min o 30% v / v de vapor de peróxido de hidrógeno (Pérez, Springthorpe y Sattar, 2005; Barbut et al., 2009) no son eficaces para reducir su número. Es decir, es probable que las esporas de *CD* sobrevivan a los regímenes de saneamiento estándar aplicados en la industria lo que podría favorecer su ubicuidad así como la contaminación cruzada de alimentos.

6.4 Otras estrategias de control basadas en la inhibición del crecimiento y/o germinación de *CD*

De forma general, el crecimiento de los Clostridios se previene con la presencia de bajos niveles de oxígeno. *C. perfringens* es uno de los anaerobios más fácilmente cultivables debido a su menor sensibilidad a la presencia de oxígeno en comparación con otros anaerobios. En el caso de *CD*, tiene unos requerimientos mucho más estrictos en cuanto a anaerobiosis. En una atmósfera de N₂:H₂:CO₂, 84:10:5, la sola presencia de un 0,79% de oxígeno y un potencial redox de +250 mV a pH 7 hizo necesaria una concentración inicial superior a 10⁴ esporas para que se detectase crecimiento en 5 días a 37°C. Cuando la concentración oxígeno fue inferior a un 0,21% y un potencial redox de -400 mV, el crecimiento se produjo a partir de una sola espora en 2 días (Lund y Peck 2015).

En cuanto al pH, se considera que el pH de 4,5 es lo suficientemente bajo como para prevenir tanto el crecimiento como la formación de toxinas. pH inferiores a 6 y la presencia de sal por encima del 4% reducen notablemente su crecimiento (Warriner et al., 2016). En base al efecto inhibitorio del pH, estudios recientes han mostrado el potencial del uso de agua electrolizada ácida (AEA) para destruir esporas de este microorganismo. Así la suspensión de esporas a una concentración de 10³ esporas/mL en AEA produjo su total eliminación. El efecto antimicrobiano del AEA se achaca a una reducción considerable del potencial de óxido reducción así como a un descenso del pH que en ocasiones puede reducirse hasta un pH de 2 (Tkhawkho et al., 2017).

6.5 Inactivación por tratamientos térmicos

Entre las técnicas de inactivación de microorganismos, el calor es una de las principales estrategias utilizadas para la conservación de los alimentos. Estos tratamientos basados en la aplicación de una temperatura durante un cierto tiempo, puede ir desde los tratamientos de pasteurización, cuyo objetivo es la destrucción de células vegetativas de microorganismos patógenos requiriendo un posterior tratamiento de control de los microorganismos no destruidos que normalmente suele ser la refrigeración, hasta los de

esterilización con los que se obtienen productos estables a temperatura ambiente durante su almacenamiento al destruir células vegetativas y formas esporuladas. Aunque no es un tratamiento de conservación en sí, el cocinado de los alimentos con calor podría considerarse una etapa previa al consumo de los alimentos que permitiría reducir la carga microbiana ofreciendo un producto más seguro si el tratamiento ha sido suficientemente elevado. Este es un aspecto que se destacará en los estudios realizados sobre *CD*.

De entre las estrategias de conservación, es la basada en los tratamientos térmicos donde más bibliografía se ha encontrado. Sin embargo, la mayoría está centrada en la eficacia letal de tratamientos térmicos culinarios más que en aquellos basados en tratamientos de conservación. Quizás ello se deba a que, como ya se ha descrito, la contaminación de la carne con esporas de *CD* no implica un verdadero riesgo de inducción de la enfermedad, ya que es difícil que se produzca la germinación en el propio alimento antes de su consumo (Warriner et al., 2016). Además, de haber toxina, su termorresistencia es baja ya que tratamientos de 56°C durante 6 minutos producen la pérdida de un 99% de la actividad de la toxina, por lo que un tratamiento térmico moderado eliminaría el peligro de padecer una intoxicación (Sullivan, Pellet y Wilkins, 1982). Sin embargo, esta circunstancia tiene poco sentido ya que el peligro es la ingestión de las esporas que encontrarán en el tracto digestivo un ambiente favorable para germinar y producir la toxina. Es más, el tratamiento térmico culinario podría incluso estimular la germinación de las esporas ingeridas ya que actuaría a modo de choque térmico como se ha indicado, un tratamiento de 10 minutos entre 60 y 100°C favorece la germinación de esporas de los *Clostridium* incluidas las de *CD* (Warriner et al., 2016). Esta circunstancia junto con la presencia de aminoácidos (L-alanina), pero a diferencia de otros Clostridios, de sales biliares (principalmente colato, taurocolato y glicolato) favorecería la germinación en el tracto gastrointestinal y, posteriormente, la producción de la toxina (Allegretti et al., 2016).

Por todo ello, es interesante conocer la termorresistencia de *CD* y compararla con la de otros microorganismos más conocidos para determinar los tratamientos térmicos que se requerirían aplicar y reducir el posible riesgo de padecer una toxiinfección alimentaria por este microorganismo. Así por ejemplo, en base a los estudios realizados por Rodríguez-Palacios et al, (2010, 2011) evaluando la eficacia letal de tratamientos culinarios a temperaturas entre 71 y 85°C, se pudo determinar la resistencia al calor de *CD* tanto en un medio de laboratorio como en carne picada de ternera. Utilizaron una

temperatura inicial de 71°C porque es la mínima recomendada por agencias gubernamentales para mejorar la seguridad alimentaria y es la temperatura interna de cocción mínima más válida para inactivar patógenos comunes que se pueden encontrar en la carne (Food Standards Agency UK, 2007; Canadian Food Inspection Agency, 2009; United States Department of Agriculture, 2011). La Figura 6.3 muestra las gráficas de supervivencia obtenida para varias cepas de *CD* a esta temperatura hasta un tiempo de 120 minutos. Como se observa, tras 60 minutos el número de esporas se había reducido en casi 2 ciclos logarítmicos, alcanzándose estos a las 2 horas de tratamiento. Según estos resultados el $D_{71^\circ\text{C}}$ (tiempo necesario a 71°C para reducir 1 unidad logarítmica o el 90% de la población de *CD*) de este microorganismo sería de alrededor de 30 minutos, resistencia mucho más elevada que cualquiera de las células vegetativas de bacterias patógenas, como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, y que las esporas de *CD* soportan con creces las temperas de cocción recomendadas para carne molida (71°C). Es de destacar que estos datos son referidos a la media de 20 cepas investigadas, pero como se observa en la Figura 6.3, la variabilidad entre cepas es considerable, detectándose menos de 1 ciclo logarítmico de inactivación tras 60 minutos de tratamiento para unas cepas y más de 2 para otras. Finalmente, en la misma Figura 6.3, se muestra el porcentaje de esporas supervivientes a un segundo tratamiento a 85°C. Como se observa, incluso tras este segundo tratamiento en el que podrían haber germinado algunas esporas, se detectaron supervivientes tras 10 minutos de tratamiento. Es decir, la termorresistencia de *CD* es superior a la de una célula vegetativa patógena, pero no tan elevada como la de otros esporulados como *C. botulinum* proteolítico ($D_{121^\circ\text{C}}=0,21'$).

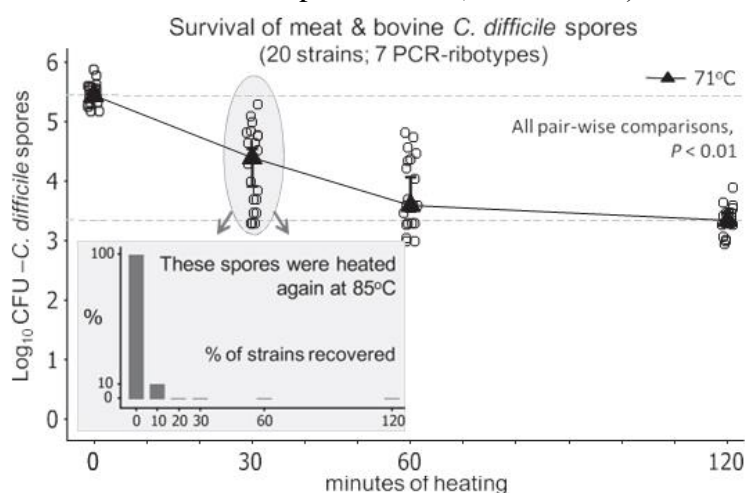


Figura 6.3. Gráficas de supervivencia de 20 cepas de *CD* tratadas a 71°C. Los círculos abiertos corresponden a cepas individuales y los triángulos al valor medio para cada tiempo de tratamiento. La gráfica en barras corresponde al porcentaje de esporas supervivientes tras un segundo tratamiento a 85°C durante distintos tiempo. Figura extraída de Rodríguez-Palacios et al., (2010).

Como se ha indicado, estos autores ampliaron el rango de estudio hasta los 95°C (Rodríguez-Palacios y LeJeune, 2011). A partir de dicho estudio, se han calculado los valores D_t a otras temperaturas tanto en un medio de laboratorio como en carne picada de ternera. En base a estos estudios y los anteriores mostrados, se ha construido la Figura 6.4 donde se presenta el Log_{10} de los valores D_t de *CD* frente a la temperatura de los tratamientos térmicos (gráficas de termodestrucción) en ambos medios. Como era de esperar existe una relación exponencial entre los valores D_t y la temperatura tanto en medio de laboratorio como en carne lo que permite calcular el valor z (incremento de la temperatura necesario para reducir la resistencia al calor de un microorganismo, valor D_t , a la 10 parte o en un 90% o una unidad logarítmica) para *CD*. Así se han determinado unos valores z de 13,04°C y 13,87°C en medio de laboratorio y carne, respectivamente. Es de destacar que prácticamente no hay diferencias en los valores D_t independientemente del medio de tratamiento y es por lo que las rectas obtenidas son paralelas y se obtienen unos valores z similares.

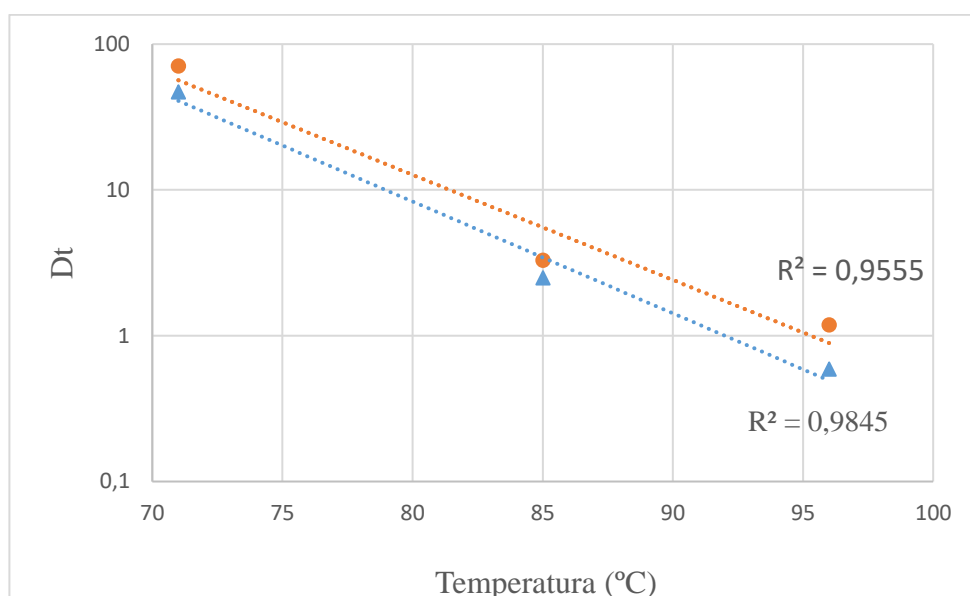


Figura 6.4. Gráficas de termodestrucción de *CD* en medio de laboratorio (▲) y en carne picada de ternera (●). Gráfica construida a partir de los datos de Rodríguez-Palacios et al. (2010, 2011).

Con el fin de comparar la termoresistencia de *CD* con la de otros microorganismos esporulados de interés, entre ellos, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* proteolítico y *Clostridium botulinum* no proteolítico, se ha construido la Figura 6.5. Los datos de *CD* proceden de Rodríguez-Palacios et al. (2010, 2011) ya mostrados en la figura anterior, los de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* de un trabajo de Byrne, Dunne y Bolton (2006) y los de *Clostridium botulinum* no proteolítico de la página web ComBase (2019).

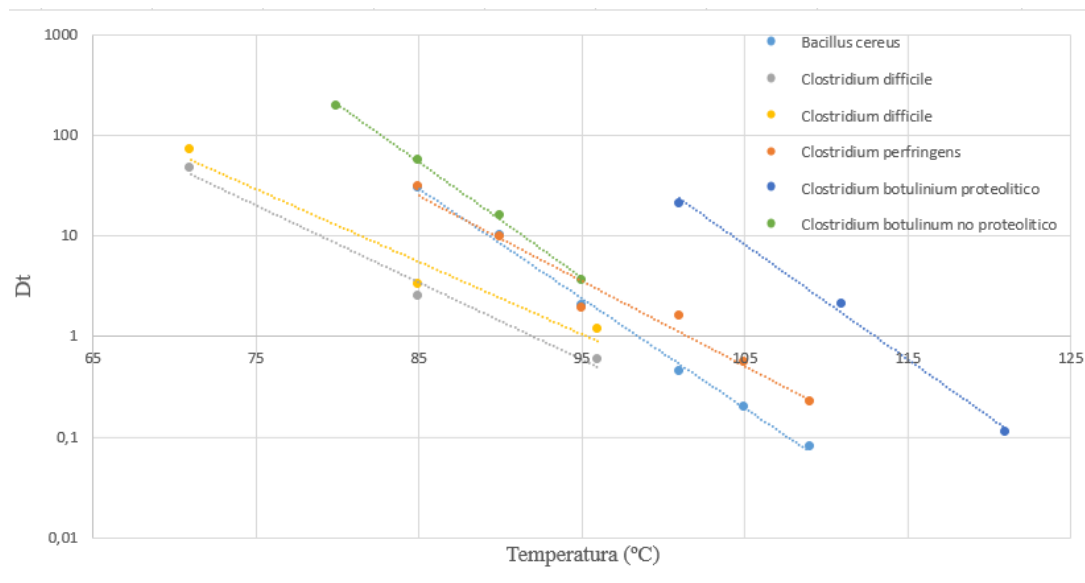


Figura 6.5 Gráficas de termodestrucción de distintos microorganismos esporulados: *C. difficile*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* proteolítico y *Clostridium botulinum* no proteolítico.

Como se observa en la gráfica, el más termorresistente son las esporas de *Clostridium botulinum* proteolítico que es el microorganismo tomado como referencia para aplicar los tratamientos de esterilización cuando el pH de los alimentos es superior a 6.5. Con menor resistencia al calor y siendo similar entre ellos se encuentran las esporas de *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* no proteolítico. Finalmente, las esporas de *CD* presentarían una termorresistencia inferior a la de los microorganismos mostrados con lo que cualquier tratamiento definido para los anteriores, sería suficiente para conseguir destruir a *CD*. Por ejemplo, en el caso de productos de origen marino, cuando se les aplica un tratamiento de pasteurización se toma como referencia a *C. botulinum* no proteolítico tipo E requiriéndose inactivar 6 ciclos logarítmicos para lo que se define un tratamiento $F_{90^{\circ}\text{C}/7-10^{\circ}\text{C}}$ de 10 minutos. Este tratamiento por tanto, garantizaría también la destrucción de al menos 6 ciclos logarítmicos de *CD*. Los resultados aquí mostrados estarían en línea con las conclusiones de Nakamura et al. (1985) que indicaban que las esporas de *CD* mostrarían una resistencia similar o ligeramente inferior a *C. perfringens*, si bien habría que tener en cuenta la gran variación que existe entre cepas de *CD* a la resistencia al calor.

A partir de la gráfica anterior, también se pueden calcular los valores z de los distintos microorganismos determinándose unos valores 10, 8,7, 9,2 y 11,8°C para *C. botulinum* proteolítico, *C. botulinum* no proteolítico, *B. cereus* y *C. perfringens*, respectivamente. En comparación con los valores calculados para *CD* ($z = 13,0 - 13,9^{\circ}\text{C}$), los de aquellos

son algo inferiores. De ser válidos estos valores z de *CD*, este microorganismo a temperaturas más elevadas a las mostradas en la Figura 6.5 (por encima de 95°C) podría ser más termorresistente y ser tenido en consideración: según la Figura 6.5, a partir de 103°C sería mayor su termorresistencia que la de *C. botulinum* no proteolítico. Independientemente de los resultados mostrados, es conveniente obtener más datos de termorresistencia a temperaturas superiores a los 95°C así como de otras cepas con el fin de conocer con mayor precisión la resistencia al calor de *CD*.

6.6 Inactivación por tratamientos térmicos aplicados con microondas

Las radiaciones microondas se encuentran entre las radiaciones electromagnéticas y tienen diferentes usos, desde los cotidianos para el procesamiento doméstico de alimentos, hasta industriales y técnico-sanitarios para el control de contaminaciones bacterianas en instrumentos hospitalarios, esterilización de desechos y procesamiento industrial de alimentos. En un estudio reciente de Ojha et al. (2016), se evaluó el efecto letal de radiaciones microondas sobre un total de 15 cepas de *CD* aisladas de humanos (5), animales (6) y alimentos (4) inoculadas en una solución acuosa. La eficacia letal de las microondas (2450 MHz y 800W), se comparó con un calentamiento conductivo tradicional. Los microondas permitieron reducir hasta 10^7 esporas/mL con un tratamiento de 60 segundos a 800W. En el caso del tratamiento conductivo, los tratamientos se tuvieron que prolongar hasta los 120 segundos para no detectar crecimiento de las esporas tratadas. Si bien el trabajo concluye que las preparaciones de esporas podrían inactivarse por microondas, no queda claro la forma de medir la temperatura en cada uno de los tratamientos ya que a los 30 segundos se registraron en ambos sistemas temperaturas de 98°C. Según estos resultados, no sería sólo el efecto térmico el responsable de la inactivación. Por otro lado, habría que valorar la uniformidad del calentamiento por un sistema u otro para asegurar que todo el volumen del producto recibe al menos la temperatura letal. Según los resultados, con los microondas se conseguiría antes esta mayor uniformidad de la temperatura que con un calentamiento conductivo tradicional.

6.7 Otros tratamientos de inactivación de *CD*

Además de las estrategias descritas, se han encontrado otras investigaciones utilizando tecnologías alternativas a los actuales tratamientos térmicos con el fin de eliminar esporas de *CD*. Así Doona et al., (2016) evaluaron el efecto de la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) en la germinación de las esporas de este microorganismo así como

de *C. perfringens*. Es bien sabido que las APH a temperatura ambiente no producen la inactivación de esporas. Sin embargo, en este trabajo se describe que la aplicación de APH puede favorecer la germinación de las esporas aumentando su sensibilidad a un tratamiento posterior al calor. En el caso de *CD*, tratamientos a 150 MPa no producían su germinación no detectándose un aumento de la sensibilidad al calor. En el caso de *C. perfringens*, se producía la germinación de una parte de la población aumentando su sensibilidad al calor. Resultados similares se obtuvieron con tratamientos a 550 MPa, si bien en este caso, una parte de la población de las esporas de *CD* germinaron, pero sin afectar a su posterior sensibilidad al calor. En cambio, prácticamente toda la suspensión de esporas de *C. perfringens* germinó mostrándose sensibles al calor.

Finalmente, y si bien no es una aplicación en alimentos, se ha descrito ampliamente el uso de la luz UV-C para la descontaminación de superficies, pero sobre todo de ambientes hospitalarios. Así varios trabajos demuestran la eficacia letal de la luz UV-C aplicada tras un tratamiento de limpieza y desinfección estándar para descontaminar habitaciones o material cuando no había pacientes en las habitaciones de hospital detectándose una reducción de un 25% la incidencia de infecciones por *CD* en nuevos pacientes que ocupaban dichas habitaciones en comparación con otras habitaciones en las que no se había utilizado luz UV-C (Harvey, 2016; Liscynesky et al., 2017; Masse et al., 2018).

Sería interesante evaluar el efecto de la luz UV-C para la inactivación de esporas en alimentos tanto sólidos como líquidos ya que se ha visto que es una tecnología eficaz para destruir esporos en matrices alimentarias (Gayán, Álvarez y Condón, 2013).

7. CONCLUSIONES

1. *CD* es un patógeno causante de enfermedades entéricas graves, habitualmente relacionado con el ámbito hospitalario e individuos de edades superiores a los 65 años, pero que cada vez más se está relacionado su presencia en el medio ambiente, en los animales (domésticos y silvestres), mataderos, alimentos, etc., como una causa de toxiinfección alimentaria, por lo que ha comenzado a ser de interés en la seguridad alimentaria ya que no existe regulación específica. Se necesita más investigación para comprender mejor la dinámica y los factores de riesgo para el desarrollo de la *ICD* entre las personas de la comunidad y la posible importancia de la transmisión por alimentos.
2. Se debería investigar una serie de aspectos que se siguen desconociendo de *CD* como

la dosis infectiva de *CD* para humanos, la frecuencia de transmisión de animales a humanos, o viceversa. Se necesitan estudios para desarrollar métodos de análisis de *CD* en carne u otros alimentos.

3. Con el almacenamiento a -20°C y -4°C , y el efecto de la a_w , se llegó a la conclusión de que el efecto variaba dependiendo de la cepa y que la matriz alimentaria proporcionaba una protección. También es posible inhibir *CD* con el uso de compuestos antimicrobianos naturales, con la presencia de O_2 y con un pH por debajo de 4,5.
4. Las radiaciones microondas podrían aplicarse como tratamiento para la inactivación de esporas, y no sería sólo el efecto térmico el responsable de la inactivación hecho que queda aún por investigar. Además, en esta línea no se han encontrado datos de la eficacia letal de las radiaciones ionizantes sobre esporas de este microorganismo.
5. Las esporas de *CD* muestran una termorresistencia inferior a la de *Clostridium botulinum* proteolítico, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* no proteolítico con lo que cualquier tratamiento definido para los anteriores, sería suficiente para conseguir destruir a *CD*.
6. Son necesarios más estudios con todas las estrategias de conservación evaluadas con el fin de confirmar los resultados, así como para evaluar el posible efecto de diversos factores ambientales en la eficacia de dichas estrategias para controlar o destruir las esporas de *CD*. Sería interesante evaluar el efecto de procesos combinados entre las tecnologías a distintos pH, a_w , etc.

8. CONCLUSIONS

1. *CD* is a pathogen that causes serious enteric diseases, usually related to the hospital environment and individuals older than 65 years, but whose presence in the environment is increasingly related to animals (domestics and wild animals)), slaughterhouses, food, etc., as a cause of food poisoning, which is why it has begun to be paid attention in food safety since there is no specific regulation. Further research is needed to better understand the dynamics and risk factors for the development of *ICD* among people in the community and the possible importance of food transmission.
2. A number of aspects that are still unknown from *CD* should be investigated, such as the infective dose of *DC* for humans, the frequency of transmission from animals to

humans, or vice versa. Studies are needed to develop *CD* analysis methods in meat or other food.

3. With storage at -20°C and -4°C, and the effect of *aw*, it was concluded that the effect varied depending on the strain and that the food matrix provided protection. It is also possible to inhibit *CD* with the use of natural antimicrobial compounds, with the presence of O₂ and with a pH below 4.5.
4. Microwave radiations could be applied as a treatment for the inactivation of spores, and it would not be only the thermal effect that is responsible for the inactivation that remains to be investigated. In addition, no data on the lethal efficacy of ionizing radiation on spores of this microorganism have been found in this line.
5. *CD* spores show a thermoresistance lower than that of *Clostridium botulinum* proteolytic, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* and non-proteolytic *Clostridium botulinum*, so any treatment defined for the above, would be sufficient to destroy *CD*.
6. Further research is required in all the conservation strategies evaluated in order to confirm the results, as well as to evaluate the possible effect of various environmental factors on the effectiveness of said strategies to control or destroy *CD* spores. It would be interesting to evaluate the effect of combined processes between technologies at different pH, *aw*, etc.

9. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este estudio me ha parecido muy interesante y enriquecedor para mi futuro, ya que he aprendido a recopilar, seleccionar y analizar información tanto inglés como en español, mejorando mis conocimientos sobre el tema. La mayor dificultad que me he encontrado ha sido la realización de las búsquedas bibliográficas en distintas bases de datos, ya que gestionar y analizar toda la información es una parte muy dura y fundamental de un estudio. Además, con este estudio he aumentado mi capacidad de trabajar de forma autónoma y responsabilizarme de desarrollar mi propio trabajo. Aunque, no habría sido posible sin la ayuda de Dr. Ignacio Álvarez y Dra. Rosa María Bolea.

10. BIBLIOGRAFIA

- Alba-Alderete, P. (2011). “*Clostridium difficile*”: Prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje. Memoria para optar al Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid.
- Aljarallah, K.M. 2016. “Inhibition of *Clostridium difficile* by natural herbal extracts”. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(5), pp. 427-431. DOI: 10.1016/j.jtumed.2016.05.006
- Allegretti, J.R., Kearney, S., Li, N., Bogart, E., Bullock, K., Gerber, G.K., Bry, L., Clish, C.B. Alm, E., y Korzenik, J.R. (2016). “Recurrent *Clostridium difficile* infection associates with distinct bile acid and microbiome profiles”. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 43(11), pp. 1142–1153. DOI: 10.1111/apt.13616
- Al-Saif, N., y Brazier, J.S. (1996). “The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales”. *Journal of Medical Microbiology*, 45(2), pp. 133-137. DOI: [10.1099/00222615-45-2-133](https://doi.org/10.1099/00222615-45-2-133)
- Andrés-Lasheras, S. (2016). *Clostridium difficile: Presencia y diversidad en humanos, animales domésticos y silvestres*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Asensio, A., y Monge, D. (2012). “Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(6), pp. 333-337. DOI: [10.1016/j.eimc.2011.09.010](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.010)
- Barbut, F., Menuet, D., Verachten, M. y Girou, E. (2009). “Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide drymist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of *Clostridium difficile* spores”. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 30(6), pp. 507–514. DOI: 10.1086/597232
- Barra-Carrasco, J., Hernández-Rocha, C., Ibañez, P., Guzmán-Durán, A.M., Álvarez-Lobos, M. y Paredes-Sabja, D. (2014). “Esporas de *Clostridium difficile* y su relevancia en la persistencia y transmisión de la infección”. *Revista Chilena de Infectología*, 31(6), pp. 694-703. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182014000600010 [Consultado 21-03-2019].
- Båverud, V. (2002). “*Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review”. *Veterinary Quarterly*, 24 (4), pp. 203-219. DOI: [10.1080/01652176.2002.9695137](https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695137)
- Baverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspan, A. y Gunnarsson, A. (2003). “*Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility”. *Equine Veterinary*, 35(5), pp. 465–471. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875324> [Consultado 0.-0.4-2019]
- Beaugerie, L. (2004). “Antibiotic-associated diarrhoea”. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), pp. 337–352. DOI: [10.1016/j.bpg.2003.10.002](https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.002).
- Becerra, M.G., Ospina, S., Atehortúa, S.L. y Berbesi, D.Y. (2011). "Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*". *Infectio*, 15(4), pp. 220-226 DOI: 10.1016/S0123-9392(11)70735-4.
- Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018). Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los alimentos 2018-19. Disponible en: <https://moodle2.unizar.es/add/course/view.php?id=26154> [Consultado 07-04-2019].
- Bizaid, F. (2013). “*Distribution and sources of Clostridium difficile present in water sources*”. Tesis. Universidad de Guelph.
- Byrne, B. Dunne, G., y Bolton. (2006). “Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll”. *Food Microbiology*, 23, pp. 803-808. DOI: 10.1016/j.fm.2006.02.002
- Canadian Food Inspection Agency (2013) Food thermometer food safety tips: preventing foodborne illness. Disponible en: <http://publications.gc.ca/site/eng/278090/publication.html> [Consultado 16-06-2019]
- Candel-Pérez, C., Ros-Berruazo, G., y Martínez-Gracia, C. (2019). “A review of *Clostridioides [Clostridium] difficile* occurrence through the food chain”. *Food Microbiology*, 77, pp. 118–129. DOI: 10.1016/j.fm.2018.08.012

Cho, A., Byun, J.W., Kim, J.W., Oh, S.I., Lee, M.H. y Kim, H.Y. (2015). "Low prevalence of *Clostridium difficile* in slaughter pigs in Korea". *J Food Prot*, 78(5), pp. 1034–1036. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-14-493](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-493)

ComBase (2019). Combase. Disponible en: https://browser.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx?model=2 [Consultado 02-06-2019].

Cronin, U.P., y Wilkinson, M.G. (2008). "*Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage". *Food Microbiology*, 25(2), pp. 235-243. DOI: [10.1016/j.fm.2007.11.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.11.004)

Denève, C., Janoir, C., Poilane, I., Fantinato, C., y Collignon, A. (2009). "New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(1), pp. 24-8. DOI: [10.1016/S0924-8579\(09\)70012-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70012-3)

Deng, K., Plaza-Garrido, A., Torres, A., y Paredes-Sabja, D. (2015). "Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures". *Food Microbiology*, 46, pp. 218-221 DOI: [10.1016/j.fm.2014.07.022](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.022).

Deng, K., Talukdar, P.K., Sarker, M.R., Paredes-Sabja, D., y Torres, J.A. (2017). "Survival of *Clostridium difficile* spores at low water activity". *Food Microbiology*, 65, pp. 274-278. DOI: [10.1016/j.fm.2017.03.013](https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.013)

Dingle, K.E., Elliott, B., Robinson, E., Griffiths, D., Eyre, D.W., Stoesser, N., Vaughan, A., Golubchik, T., Fawley, W.N., Wilcox, M.H., Peto, T.E., Walker, A.S., Riley, T.V., Crook, D.W., Didelot, X. (2014). "Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus". *Genome Biology and Evolution*, 6(1), pp. 36-5. DOI: [10.1093/gbe/evt204](https://doi.org/10.1093/gbe/evt204)

Donskey, C.J. (2004). "The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens". *Clinical Infectious Diseases*, 39(2), pp. 219-26. DOI: [10.1086/422002](https://doi.org/10.1086/422002)

Doona, C.J., Feeherry, F.E., Setlow, B., Wang, S., Li, W., Nichols, F.C., Talukdar, P.K., Sarker, M.R., Li, Y.Q., Shen A., y Setlow, P. (2016). "Effects of High-Pressure Treatment on Spores of *Clostridium* Species". *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), pp. 5287-5297. DOI: [10.1128/AEM.01363-16](https://doi.org/10.1128/AEM.01363-16)

ELSEVIER (2019). Science Direct. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/> [Consultado: 12 – 06 – 2019].

ELSEVIER (2019). SCOPUS. Disponible en: <https://www.scopus.com/home.uri?zone=header&origin=NO%20ORIGIN%20DEFINED> [Consultado: 12 – 06 – 2019].

Food Standards Agency, United Kingdom (2007). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food: report on the safe cooking of burgers. Disponible en: <https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/acmsfburgers0807.pdf> [Consultado 16-06-2019].

Fundación Española para la Ciencia y Tecnología (2019). Web of Science. Disponible en: <https://www.fecyt.es/es/recurso/web-science> [Consultado: 12 – 06 – 2019].

Fundación Española para la Ciencia y Tecnología (2019). Web of Science. Disponible en: https://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=F5SBR7IBwRG7sYmH7F1&preferencesSaved= [Consultado: 12 – 06 – 2019].

Furuya-Kanamori, L., Marquess, J., Yakob, L., Riley, T.V., Paterson, D.L., Foster, N.F., Huber, C.A., Clements, A.C. (2015). "Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications". *BMC Infectious Diseases*, 15, pp. 1-11. DOI: [10.1186/s12879-015-1258-4](https://doi.org/10.1186/s12879-015-1258-4)

Gayán, E., Álvarez, I., y Condón, S. (2013). "Inactivation of bacterial spores by UV-C light". *Innovative food science & emerging technologies*, 19, pp. 140-145. DOI: [10.1016/j.ifset.2013.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.007)

Gerding, D.N. (2004). "Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem". *Clinical Infectious Diseases*, 38(5), pp. 646-648. DOI: [10.1086/382084](https://doi.org/10.1086/382084)

- Gómez-Luna, E., Fernando-Navas, D., Aponte-Mayor, G., Betancourt-Buitrago, L.A. (2014). "Metodología para la revisión bibliográfica y la gestión de información de temas científicos, a través de su estructuración y sistematización". *DYNA*, 81(184), pp. 158-163. DOI: 10.15446/dyna.v81n184.37066
- González-García, N., Gómez-Pavón, J. y Martínez-Porras, J.L. (2005). "Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile*". *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 40(5), pp. 310-319. DOI: 10.1016/S0211-139X(05)74875-7
- Guarin, O. (2014). *Microbiología y epidemiología de la infección por Clostridium difficile (ICD)*. Disponible en: <https://slideplayer.es/slide/1061056/> [Consultado: 19-02-2019]
- Hall, I.C., y O'Toole, E. (1935). "Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*". *American Journal of Diseases of Children*, 49, pp. 390-402.
- Harvey, J. (2016). *UV Light Disinfection Significantly Reduces Clostridium difficile Incidence*. Shea Healthcare for all. Disponible en: <https://www.shea-online.org/index.php/journal-news/press-room/press-release-archives/494-uv-light-disinfection-significantly-reduces-clostridium-difficile-incidence> [Consultado 16 Jun. 2019].
- Hawken, P., Weese, J.S., Friendship, R. and Warriner, K. (2013a). "Carriage and dissemination of *Clostridium difficile* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pork processing". *Food Control*, 31(2), pp. 433-437. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.10.031
- Hawken, P., Weese, J.S., Friendship, R. y Warriner, K. (2013b). "Longitudinal study of *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with pigs from weaning through to the end of processing". *Journal Food of Protection*, 76(4), pp. 624-630. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-330.
- He, M., Sebahia, M., Lawley, T.D., Stabler, R.A., Dawson, L.F., Martin, M.J., Holt, K.E., Seth-Smith, H.M., Quail, M.A., Rance, R., Brooks, K., Churcher, C., Harris, D., Bentley, S.D., Burrows, C., Clark, L., Corton, C., Murray, V., Rose, G., Thurston, S., van Tonder, A., Walker, D., Wren, B.W., Dougan, G. y Parkhill, J. (2010). "Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), pp. 7527-7532 DOI: 10.1073/pnas.0914322107.
- Hensgens, M.P.M., Keesen, E.C., Squire, M.M., Riley, T.V., Koene, M.G.J., de Boer, E., Lipman, L.J.A., Kuijper, E.J. y European Society for Clinical Microbiology and Infectious diseases Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD). (2012). "*Clostridium difficile* infection in the community: A zoonotic disease?" *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), pp. 634-645. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x
- Heredia, N.L. y Labbé, R.G (2013). "*Clostridium perfringens*". En: Labbé, R.G., Garcia, S. (Eds.). *Guide to Foodborne Pathogens*. UK: John Wiley and Sons Ltd, pp. 82-90.
- Hughes, K., y Nobbs, S.J. (2004). "Long-term survival of human faecal microorganisms on the Antarctic Peninsula". *Antarctic Science*, 16(3), pp. 293-297. DOI: 10.1017/S095410200400210X
- Kansau, I., Barketi-Klai, A., Monot, M., Hoys, S., Dupuy, B., Janoir, C. y Collignon, A. (2016). "Deciphering adaptation strategies of the epidemic *Clostridium difficile* 027 strain during infection through in vivo transcriptional analysis". *PLoS ONE*, 11(6), e0158204. DOI: 10.1371/journal.pone.0158204
- Keel, M.K. y Songer, J.G. (2006). "The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease". *Veterinary Pathology*, 43(3), pp. 225-240. DOI: 10.1354/vp.43-3-225
- Keessen, E.C., Gastra, W., Lipman, L.J. (2011). "*Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities". *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), pp. 205-217. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.03.020
- Knight, D.R., Elliott, B., Chang, B.J., Perkins, T.T., y Riley, T.V. (2015). "Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*". *Clinal Microbiol Review*, 28(3), pp. 721-41. DOI: 10.1128/CMR.00127-14.
- Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L. y Finegold, S.M. (2016). "*Clostridium difficile*: Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938". *Anaerobe*, 40, pp. 95-99. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008

- Le Lay, C., Dridi, L., Bergeron, M.G., Ouellette, M. y Fliss, I. (2016). "Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination". *Journal of Medical Microbiology*, 65(2), pp. 169–175. DOI: 10.1099/jmm.0.000202
- Li, J., y 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), pp.4561-4568. DOI: 10.1128/AEM.00177-06
- Lim, S.C., Foster, N.F. y Riley, T.V. (2016). "Susceptibility of *Clostridium difficile* to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite". *Anaerobe*, 37, pp. 67–71. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2015.12.004
- Liscynesky, C., Hines, L.P., Smyer, J., Hanrahan, M., Orellana, R.C., Mangino, J.E. (2017). "The Effect of Ultraviolet Light on *Clostridium difficile* Spore Recovery Versus Bleach Alone". *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 38(9), pp. 1116-1117. DOI: 10.1017/ice.2017.126
- Lund, B.M. y Peck, M.W. (2015). "A Possible Route for Foodborne Transmission of *Clostridium difficile*". *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(3), pp. 177-182 DOI: 10.1089/fpd.2014.1842
- Masse, V., Hartley, M.J., Edmond, M.B., y Diekema, D.J. (2018). "Comparing and optimizing ultraviolet germicidal irradiation systems use for patient room terminal disinfection: an exploratory study using radiometry and commercial test cards". *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 29, pp. 7. DOI:10.1186/s13756-018-0317-1
- Metcalfe, D., Avery, B.P., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith R. y Weese, J.S. (2011). "*Clostridium difficile* in seafood and fish". *Anaerobe*, 17(2), pp. 85–86. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.02.008
- Nakamura, S., Yamakawa, K., Izumi, J., Nakashio, S., y Nishida, S. (1985). "Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains". *Microbiology and Immunology* 29(2), pp. 113–118. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1985.tb00809.x
- NCBI (2016). Taxonomy Browser. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1496&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> [Consultado 28-02-2019].
- Ojha, SC., Chankhamhaengdecha, S., Singhakaew, S., Ounjai, P., y Janvilisri, T. (2015). "Inactivation of *Clostridium difficile* spores by microwave irradiation". *Anaerobe*, 38, pp. 14-20. DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.10.015
- Pérez, J., Springthorpe, V.S. y Sattar, S.A. (2005). "Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control". *American Journal of Infection Control*, 33(6), pp. 320–325. DOI: 10.1016/j.ajic.2005.04.240
- Poutanen, S.M., y Simor, A.E. (2004). "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults". *Canadian Medical Association journal*, 171(1), pp. 51-58. DOI: 10.1503/cmaj.1031189
- Poxton, I.R., McCoubrey, J. y Blair, G. (2001). "The pathogenicity of *Clostridium difficile*". *Clinical Microbiology and Infection*, 7(8), pp.421-427. DOI: 10.1046/j.1198-743x.2001.00287.x
- Rodríguez, C., Avesani, V., van Broeck, J., Taminiau, B., Delmee, M. y Daube, G. (2013). "Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium". *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), pp. 256–262. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.017
- Rodríguez-Palacios, A., Reid-Smith, R.J., Staempfli, H.R., y Weese, J.S. (2010). "*Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats". *Anaerobe* 16, pp. 540–542. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2010.05.004
- Rodríguez-Palacios, A., y LeJeune, J.T. (2011). "Moist-heat resistance, Spore Aging, and Superdormancy in *Clostridium difficile*". *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), pp. 3085-3091. DOI:10.1128/AEM.01589-10
- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B. y Navarro, F. (2013). "Infecciones producidas por *Clostridium difficile*". *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica.*, 31(4), pp. 254-263. DOI: 10.1016/j.eimc.2012.12.010

- Santos Buelga, J.A., Giner Pons, R.M., González Fandos, M.E., Guix Arnau, S., Palop Gómez, A. y Rodríguez Lázaro, D. (2018). "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el papel de la nutrición en las enfermedades autoinmunes". *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 28, pp. 11-67. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/revistas_comite_cientifico/comite_cientifico_28.pdf [Consultado 13-04-2019]
- Scallen, E., Griffin, P.M., Angulo, F.J., Tauxa, R.V. y Hoekstra, M. (2011). "Foodborne illness acquired in the United States- unspecified agents". *Emergency Infection Disease*, 17(1), pp. 16-22. DOI: 10.3201/eid1701.P11101
- Sevilla Acosts, F.J., Ramírez Cisneros, L.B., Coto Chinchilla, K. y Jiménez Delgado, J. (2014). *Test de detección de la Toxina A de Clostridium difficile*. Disponible en: <http://slideplayer.es/slide/120277/> [Consultado:17-02-2019].
- Simango, C. y Mwakurudza, S. (2008) "Clostridium difficile in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility". *International Journal of Food Microbiology* 124(3), pp. 268–270. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.020
- Songer, J.G., Trinh, H.T., Killgore, G.E., Thompson, A.D., McDonald, L.C., y Limbago, B.M. (2009). "Clostridium difficile in retail meat products, USA, 2007". *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), pp. 819-821. DOI: 10.3201/eid1505.081071
- Sullivan, N.M., Pellet, S., y Wilkins, T.D. (1982). "Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile". *Infection and Immunity*, 35(3), pp. 1032-1040. DOI: 10.1016/0168-6445(94)90100-7.
- Susick, E.K., Putnam, M., Bermudez, D.M. y Thakur, S. (2012). "Longitudinal study comparing the dynamics of Clostridium difficile in conventional and antimicrobial freepigs at farm and slaughter". *Veterinary Microbiology*, 157, pp. 172–178. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.017
- Tkhawkho, L., Jackson, K., Nitzan, O., y Peretz, A. (2017). "Destruction of Clostridium difficile spores colitis using acidic electrolyzed water". *American Journal of Infection Control*, 45(9), pp. 1053. DOI: 10.1016/j.ajic.2017.06.026
- United States Department of Agriculture—Food Safety and Inspection Service (2016). Food safety education—is it done yet? Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/teach-others/fsis-educational-campaigns/is-it-done-yet/is-it-done-yet> [Consultado 16-06-2019]
- Voth, D.E. y Ballard, J.D. (2005). "Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease". *Clinical microbiology Review*, 18(2), pp. 247-263. DOI: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S. y Weese, S.J. (2016). "Dissemination of Clostridium difficile in food and the environment: Significant sources of C. difficile community-acquired infection?" *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), pp. 542-553. DOI: 10.1111/jam.13338
- Weese, J.S., Avery, B.P., Rousseau, J., Reid-Smith, R.J. (2009). "Detection and enumeration of C. difficile spores in retail beef and pork". *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), pp. 5009–5011. DOI: 10.1128/AEM.00480-09
- Xu, C., Weese, J.S., Flemming, C., Odumeru, J. y Warriner, K. (2014). "Fate of Clostridium difficile during waste water treatment and incidence in Southern Ontario watersheds". *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), pp. 891-904. DOI: 10.1111/jam.12575
- Yutin, N., y Galperin, M.Y. (2016). "A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia". *Environmental Microbiology*, 15(10), pp. 2631-2641. DOI: 10.1111/1462-2920.12173
- Zea, J.W. y Salazar, C.L. (2012). "Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio". *Infectio*, 16(4), pp. 211–222. DOI: 10.1016/S0123-9392(12)70016-4

ANEXOS