

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS
DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EN EL COMPLEJO ENTERICO NEONATAL
PORCINO.**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 19 de Marzo

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS
DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EN EL COMPLEJO ENTERICO NEONATAL
PORCINO**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

CAROLINA ROSA COPPARI

Mariana Alegre
Evaluador

Sebastián José Marini
Evaluador

María Lorena Roldán
Evaluador

Med. Vet. (M. Phil.) Angel
Patitucci

Co-Director Interno

Dr. Mic. Fabrisio E.
Alustiza

Co-Director Externo

MSc. Med. Vet. Fernando
A. Bessone

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 19 de Marzo

ÍNDICE.....	Págs.
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
1.1- Historia de <i>Clostridium difficile</i>	8
1.2- Características de <i>Clostridium difficile</i>	9
1.3- Patogenicidad.....	10
1.4- Factores de patogenicidad de C. difficile.....	11
1.5- Cuadros patológicos en producción porcina.....	12
1.6- Cultivo Toxigénico de <i>Clostridium difficile</i>	14
1.7- Contaminación ambiental por <i>Clostridium difficile</i>	15
1.8- Importancia en Salud Pública y Orígenes Zoonóticos.....	17
1.9- Diagnóstico, Tratamiento y Prevención.....	19
1.10- <i>Clostridium difficile</i> en Argentina.....	19
OBJETIVOS.....	21
1.1- Objetivo general.....	22
1.2- Objetivo específico.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1.1- Descripción de granjas y toma de muestras.....	24
1.2- Aislamiento de <i>Clostridium difficile</i>	24
1.3- Identificación molecular.....	27
1.3.1- Templados para reacción de PCR.....	27
1.3.2- Reacción de PCR.....	27
1.4- Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXO.....	55

RESUMEN

Clostridium difficile es un bacilo grampositivo, anaerobio estricto, al que se reconoce como agente causal de diferentes patologías de carácter intestinal que afectan al ser humano y animales, las más importantes de las cuales son la diarrea asociada al consumo de antibióticos y la colitis pseudomembranosa.

Los principales factores de patogenicidad de *C. difficile* son las toxinas A (tcdA) y B (tcdB), secretadas por la mayoría de las cepas y codificadas en el mismo locus de patogenicidad. Éstas ejercen su acción tóxica sobre diversos tipos celulares de la mucosa intestinal, principalmente enterocitos, provocando daño en la mucosa intestinal e inflamación que deriva en diarrea, colitis o colitis pseudomembranosa. Algunas cepas presentan, además, la toxina binaria (CDT), que actúa sinérgicamente con las otras dos, como en el caso de la cepa hipervirulenta 027. Sin embargo, en el estudio de este microorganismo faltan detalles importantes para esclarecer su ciclo infectivo, como conocer su reservorio y sus interacciones en el ecosistema intestinal.

El complejo entérico neonatal porcino, es una patología multifactorial y poli-etiológica constituida por grupos de microorganismos bacterianos y agentes virales, dentro de los cuales se incluye a *Clostridium difficile*. Típicamente, *C. difficile* afecta a los lechones de 1 a 7 días de edad y se presenta con una diarrea temprana y raramente cursa con dificultad respiratoria.

Las bacterias se transmiten a través de la ruta fecal-oral, y son especialmente resistentes ya que pueden formar esporas resistentes a la adversidad ambiental. A diferencia de las células vegetativas, las esporas son resistentes al ambiente ácido del estómago y pueden pasar al intestino delgado, donde la exposición a los ácidos biliares induce la germinación.

El objetivo del trabajo fue aislar, identificar y tipificar molecularmente cepas de *C. difficile* (CDI) obtenidas a partir de materia fecal de lechones neonatos de granjas porcinas.

Se muestrearon 120 cerdos (de 1, 2 y 3 semanas de vida). El cultivo de CDI se basó en el aislamiento utilizando un medio cromogénico y selectivo-diferencial CHROMagar™. La identificación molecular se realizó mediante PCR utilizando los

primers dirigidos a los genes *tcdA* y *tcdB* para las toxinas A y B y los primers correspondiente a la toxina binaria *cdtA* y *cdtB*. Se realizó un estudio de corte transversal evaluando estadísticamente la tasa de detección en las semanas de vida de los cerdos y si hay asociación entre la detección y presencia de diarreas. A partir de las 120 muestras tomadas de lechones se pudo aislar CDI en 74 (61,66%) muestras, lo que indica que hay una alta circulación de la bacteria en las granjas. La mayor circulación se da en las granjas de producción intensiva de más de 2000 madres (entre 60%-80%) comparado con granjas de menos de 300 madres (43,33%). Se detectó la presencia de las tres toxinas, con una prevalencia incrementada de la toxina B, seguida de la toxina binaria. Se vio que en los aislamientos negativos para la toxina B, fueron negativos para la toxina A o la toxina Binaria. Mientras que los aislamientos positivos para las toxinas B fueron positivos al menos para la toxina A o Binaria (ambas en algunos casos). En la gran mayoría de los aislamientos positivos para las toxinas, los lechones no presentaban ningún síntoma de la presencia de CDI.

Conclusión: el presente es el primer informe que compara la prevalencia de CDI en un gran número de lechones, con y sin diarrea, en Argentina. La PCR es una herramienta útil para la detección de CDI en muestras fecales en cerdos (enfermos y asintomáticos). No se identificó un vínculo claro entre el aislamiento de esta bacteria y la diarrea neonatal porcina.

INTRODUCCIÓN

1.1- Historia de *Clostridium difficile*

Éste microorganismo fue descrito por primera vez por Hail y O'Toole en 1935, y fue entonces llamado *Clostridium difficil*, debido a su morfología bacilar, por ser anaerobio y formar esporas y, sobre todo, porque su cultivo, aislamiento y estudio metabólico presenta mucha dificultad, por un lado tiene un crecimiento lento *in vitro* y, por otro, en su caracterización bioquímica no es posible distinguir una característica fisiológica que resulte destacable (Hall & O'Toole, 1935). Estos investigadores también lograron demostrar que producía una toxina que era extremadamente letal en ratones, siendo únicamente del orden de 10 a 100 veces menos letal que la toxina botulínica, por lo que hipotetizaron sobre el posible papel de esta toxina en las diarreas del recién nacido. Esto fue confirmado por Snyder, que volvió a aislar el microorganismo en otros dos estudios posteriores apreciando, además, que existen cepas toxigénicas y cepas no toxigénicas (Snyder, 1937; Hafiz & Oakley, 1976).

En 1938, *Bacillus difficilis* fue rebautizado como *Clostridium difficile*, por Prévot (ICSB, 1976) y por tanto, trasladado al género *Clostridium*.

El interés por este microorganismo empezó a incrementarse a partir de 1974, cuando Hafiz centró su tesis doctoral en la caracterización de *C. difficile*, su morfología macro y microscópica, y sus características bioquímicas más prominentes (Hafiz, 1974), publicando dos artículos: uno en 1975 en el que expuso el aislamiento de *C. difficile* del tracto genital tanto de hombres como de mujeres (Levett, 1984) y otro en 1976, donde describió los resultados de su tesis (morfología y fisiología) (Hafiz & Oakley, 1976). En un estudio independiente, Modaber (1975) aisló *C. difficile* de heces humanas y de diversos animales. En esa misma época comenzaron a aparecer los primeros artículos que relacionan diarrea y colitis, incluso colitis pseudomembranosa, con el consumo de antibióticos a mediados de los años 70 (Knoop *et al.*, 1993). Green (1974) estudió la citotoxicidad producida por las heces de diarrea inducida por antibióticos, concluyendo que debería estar producida por un virus.

1.2- Características de *Clostridium difficile*

Clostridium difficile es una especie bacteriana del género *Clostridium*, son bacilos Gram positivos, que miden aproximadamente 0,5x3-6 µm, formadores de esporas y anaerobios estrictos. Están que están asociados con diarrea en cerdos recién nacidos y en otras especies animales y cuentan con potencial zoonótico. Las infecciones en humanos por *C. difficile* representan la mayoría de los casos de diarreas asociadas con antibióticos (Bartlett *et al.*, 1978; Bartlett, 1992; Borriello & Wilcox, 1998; Johnson *et al.*, 1999).

Una de sus características más importantes es la formación de spora. Bajo el microscopio se ven como palillos de fósforos con el abultamiento localizado en un extremo terminal. Esta constituye una estructura de resistencia ante las condiciones ambientales adversas, principalmente frente a la deshidratación, el calor, la presencia de oxígeno y los agentes tóxicos (Kuijper & Tüll, 2006; Kramer *et al.*, 2006), lo que le permite permanecer meses en la superficie de objetos o en el suelo. Además estas estructuras de resistencia también facilitan su dispersión de forma aérea (Roberts *et al.*, 2008). El único compuesto químico capaz de eliminar las esporas ha sido el hipoclorito de sodio, demostrando una gran capacidad para reducir las tasas de infección por este microorganismo (Hacek *et al.*, 2010).

Las esporas germinan en el íleon, ciego y colon; las células vegetativas llenan los nichos liberados de la microbiota por acción de los antimicrobianos y estas condiciones favorecen la producción de toxinas (Kelly *et al.*, 1984). La enfermedad se presenta como diarrea, colitis, colitis pseudomembranosa o colitis fulminante (Kelly *et al.*, 1984). Esto último puede ser acompañado de íleo-megacolon tóxico y perforación intestinal. Infecciones por *C. difficile* también ocurren en hámsteres tratados con antibióticos (Libby *et al.*, 1982), conejillos de Indias y potros neonatos (Jones *et al.*, 1988), y ha emergido como un tipo de enteritis en cerdos recién nacidos. Casi dos tercios de los lechones con enteritis en las principales zonas productoras de los Estados Unidos posee *C. difficile* (Songer *et al.*, 2000). Las

prevalencias en rodeos individuales pueden ser del 100%, y pueden llegar al 50% por camada en sistemas de producción intensiva porcina.

La característica más peculiar de *C. difficile* es el olor que se encuentra en establos de caballos, debido a las sustancias volátiles que sintetizan, como el p-cresol (Songer *et al.*, 2009).

1.3- Patogenicidad

La acción patógena se desarrolla en el intestino del hospedador. Las esporas de *C. difficile*, previamente ingeridos por el hospedador, germinan para dar lugar a las células vegetativas (Beaugerie, 2004). Pero *C. difficile* es un mal competidor (Wilson & Perini, 1988; Keel & Songer, 2006), es decir, en presencia de la microbiota normal intestinal, no es capaz de multiplicarse y por tanto de secretar las toxinas necesarias para producir algún tipo de patología, por lo que permanece en forma de spora hasta que las condiciones ambientales son adecuadas para su germinación (Sorg & Sonenshein, 2008). Por ello, las patologías de carácter intestinal asociadas a *C. difficile* suelen estar ligadas a elementos que originan una disrupción en la microbiota intestinal y “vaciado” de nichos (Beaugerie, 2004). Los más comunes son los antibióticos (Songer, 1996), aunque también se sospecha de otros fármacos como puedan ser los inhibidores de la bomba de protones (Dial *et al.*, 2005) y de la concurrencia de algún otro factor no identificado (Baines *et al.* 2009).

El proceso patogénico comienza cuando se produce una sobrepoblación de *C. difficile* en el tracto intestinal, y esto sólo se produce si no hay microorganismos competidores para *C. difficile*. La falta de microorganismos totalmente adaptados al intestino (mejores competidores) ocurre durante su sucesión ecológica primaria o secundaria. La sucesión ecológica primaria es el proceso ecológico por el cual se establece por primera vez una comunidad en un hábitat dado. En el caso del intestino, ocurre en los primeros meses de vida (Mackie *et al.*, 1999) del hospedador, cuando llegan muchos microorganismos diferentes y nuevos, algunos

de los cuales podrán colonizar la mucosa y otros no. Si las poblaciones están adaptadas a las condiciones específicas del intestino (interacciones con el hospedador y con el resto de la flora) se perpetuarán; si no lo están, se sustituirán por otras nuevas mejor adaptadas a ese hábitat hasta que formen una comunidad estable. La sucesión ecológica secundaria intestinal es el proceso de restablecimiento de la microbiota normal tras una disrupción de la misma. La causa principal de esta disrupción suele ser el consumo masivo de antibióticos y el desarrollo es similar al de la sucesión primaria, basado en competencias entre los microorganismos. En ambos momentos, la competencia para *C. difficile* no existe, por lo que si este microorganismo está presente, le resulta más sencillo multiplicarse y colonizar la mucosa ocupando los nichos vacíos que dejan los microorganismos eliminados. Su papel como patógeno neonatal depende de la especie, pues en algunos animales como el cerdo es uno de los principales agentes causales de la diarrea neonatal (Songer, 1996), mientras que en neonatos humanos aparece con una prevalencia del 80% (Kuijper & Tüll, 2006; Barbut & Petit, 2001) y no está del todo clara su asociación a cuadros patológicos. Parece que esta diferencia se debe a la falta de receptores para las toxinas en el epitelio intestinal del neonato humano (Keel & Songer, 2006). Una vez aclimatado, secreta las toxinas mediante las cuales ejercerá daño en las células intestinales y, consecuentemente, en el hospedador.

1.4- Factores de patogenicidad de *C. difficile*

La patogenia de *C. difficile* asociada a enfermedad (CDAD – del inglés *Clostridium difficile associated disease*) en animales domésticos es probablemente mediada por la toxina A monomérica (TcdA, 308 kDa, enterotoxina), ya que su toxina B (TcdB, 270 kDa, una citotoxina y enterotoxina) aparentemente no se une a tejidos de cerdos neonatos (Keel & Songer, 2007; 2011), ni produce lesiones en explantos de intestino porcino. Por lo tanto, parece muy probable que la enfermedad natural en lechones esté mediada solo por TcdA. Existe cierto grado

de homología entre TcdA y TcdB, ya que son 45% idénticas entre sí a nivel de secuencia de aminoácidos (Songer, 2004). Si bien ambas toxinas son citotóxicas para varios tipos de células, TcdA es principalmente enterotóxica porque causa acumulación de líquido en el intestino y se cree que desempeña el papel dominante en la patogénesis de la enfermedad (Bartlett, 1994; Weese *et al.*, 2001; Poutanen & Simor, 2004; Yaeger *et al.*, 2007). La TcdB es hasta 1000 veces más citotóxica que la TcdA, pero no causa acumulación de fluido *in vivo* (Bartlett, 1994; Weese *et al.*, 2001). Sin embargo, existen evidencias crecientes de cepas virulentas con perfiles de toxinas TcdA- / B+, donde la toxina TcdB y no la toxina TcdA, es responsable de la virulencia; esto indica que se necesitan más trabajos de investigación para una comprensión más completa del rol de las toxinas en la patogenia de la bacteria (Drudy *et al.*, 2007; Lyras *et al.*, 2009).

Muchas cepas también producen una tercera toxina, conocida como toxina binaria (CDT) cuyo papel en la patogénesis de CDAD se desconoce (Genth *et al.*, 2008). No está relacionada genética ni estructuralmente con las toxinas A y B y se cataloga dentro del grupo de las toxinas binarias clostridiales (Gonçalves *et al.*, 2004). Como sucede en todas estas toxinas, CDT está formada por dos subunidades, ambas imprescindibles para ejercer el efecto tóxico, CDTa y CDTb. CDTa es el componente que se introduce en las células y ejerce la acción tóxica y CDTb es la parte que se une al receptor celular (Geric *et al.*, 2003). La toxina binaria es una ADP ribosiltransferasa específica de actina. Por tanto, ejerce la acción tóxica al catalizar la ribosilación de la actina, con la consiguiente desorganización del citoesqueleto de la célula diana. Esta acción la realiza la región C-terminal de la subunidad CTDa (Gülke *et al.*, 2001). En la célula afectada se observa un redondeamiento por la despolimerización de los filamentos de actina (Gonçalves *et al.*, 2004).

1.5- Cuadros patológicos en producción porcina

En los sistemas de producción porcina, uno de los cuadros patológicos de mayor presentación son los gastroentéricos en cerdos en crecimiento. Estos alteran la ganancia diaria de peso (GDP) y la conversión alimentaria (CA), lo que resulta en importantes pérdidas económicas. El complejo entérico neonatal porcino, es una patología multifactorial y poli-etiológica constituida por grupos de microorganismos bacterianos y agentes virales, dentro de los cuales se incluye a *Clostridium difficile*.

Típicamente, *C. difficile* afecta a los lechones de 1 a 7 días de edad, nacidos de cerdas adultas o multíparas. Se presenta como una diarrea temprana y raramente cursa con dificultad respiratoria (con hidrotórax y/o ascitis). Las lesiones macroscópicas, usualmente incluyen edema de mesocolon y el contenido intestinal puede ser de consistencia pastosa o acuosa con heces amarillentas. Estudios previos han mostrado que en piaras afectadas por *C. difficile* se pueden afectar dos tercios de las camadas, y más de un tercio de los cerdos individuales son positivos a la presencia de toxinas en una granja infectada. Los lechones sin signos entéricos pueden ser positivos al aislamiento y a la presencia de toxinas (Waters *et al.*, 1998; Yaeger *et al.*, 2002; Bakker *et al.*, 2010; Hunter *et al.*, 2010; Weese *et al.*, 2010). La lesión definitiva es la supuración focal en la lámina propia del colon; además, es común la presencia de edema de serosas y mesenterio del colon con frecuente infiltración de células mononucleares inflamatorias y neutrófilos en los tejidos edematosos. También puede ocurrir la erosión de segmentos de la mucosa colónica y del epitelio y las lesiones tipo volcán (exudación de neutrófilos y fibrina hacia el lumen intestinal) (Songer *et al.*, 2000).

Los pesos de destete en los cerdos afectados son de aproximadamente 450 a 900 gramos por debajo del promedio. El *C. difficile* también puede ser un problema subclínico importante, ya que la toxina puede detectarse en lechones aparentemente sanos (Lizer *et al.*, 2012). Se ha señalado que *C. difficile* es, posiblemente, la causa incontrolada más importante de diarrea neonatal en cerdos, y se ha documentado como una causa importante de enteritis en cerdos neonatos desde 2000 (Songer & Anderson, 2006).

Las bacterias se transmiten a través de la ruta fecal-oral, y son especialmente resistentes ya que, como se ha mencionado, pueden formar esporas ante la adversidad ambiental. A diferencia de las células vegetativas, las esporas son resistentes al ambiente ácido del estómago y pueden pasar al intestino delgado, donde la exposición a los ácidos biliares induce la germinación (Poutanen & Simor, 2004).

1.6- Cultivo Toxigénico de *Clostridium difficile*

El cultivo toxigénico de *C. difficile* se basa en el aislamiento de este microorganismo de muestras de heces y la determinación de la capacidad de producir toxina de la cepa aislada. Existe una gran variedad de técnicas, la esencia de todas las técnicas empleadas es el uso de un agar o caldo con distintos agentes selectivos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos que se encuentran en la microbiota fecal y que incrementan la recuperación de *C. difficile*. Hasta la fecha no existe un consenso sobre cuál es el mejor método para recuperar este microorganismo. Algunos investigadores han empleado un choque con calor o etanol para aumentar la recuperación de esporas de *C. difficile* en detrimento de los otros microorganismos (Riley *et al.*, 1987; Marler *et al.*, 1992). Independientemente del medio utilizado, los cultivos se incuban durante 24-48 horas en atmósfera anaerobia. Una vez que se aíslan colonias sospechosas de ser *C. difficile*, éstas se pueden identificar fácilmente por la tinción de Gram, por la morfología de la colonia y por el olor típico a caballeriza. También existen diversos métodos comerciales para su identificación, de forma más reciente también puede ser identificado por espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Una vez que la colonia ha sido identificada, se debe realizar una prueba de su capacidad para producir toxina.

Además de los métodos tradicionales de cultivo, se han desarrollado comercialmente medios cromogénicos para la detección de *C. difficile*; estos medios pueden impulsar la recuperación de *C. difficile* de las muestras fecales.

Los medios cromogénicos usualmente son más caros que otro tipo de medios. Sin embargo, los estudios hasta la fecha demuestran que son muy sensibles y que pueden acelerar la identificación presuntiva de *C. difficile*.

Estos medios de cultivo toxigénico son típicamente considerados como un método de referencia más que un método de diagnóstico. Siendo una metodología que tiene una alta sensibilidad y especificidad, consiste en el cultivo de la muestra en medios selectivos y enriquecidos, para luego determinar la toxicidad del aislamiento obtenido mediante el crecimiento de *C. difficile* en estos medios.

1.7- Contaminación ambiental por *Clostridium difficile*

La contaminación grave de granjas como las instalaciones de cerdos con esporas de *C. difficile* es un lugar común. Las esporas de *C. difficile* y las células vegetativas se depositan en el ambiente inmediato a las heces de los cerdos. *C. difficile* podría aislarse de las heces de los lechones 1 h después del nacimiento, presumiblemente ingeridos de su entorno. Según estudios realizados, 2 días posteriores al nacimiento, el 100% de los lechones pudieron adquirir *C. difficile* del mismo tipo molecular que el encontrado en las heces y tetinas de las cerdas, en las jaulas de parto y en el aire en la granja (Hopman *et al.*, 2011). Hay evidencia de que la transmisión vertical no ocurre en cerdos. Se ha demostrado que la diseminación aérea de *C. difficile* en una granja de cerdos se correlaciona con la actividad del personal dentro de las unidades de parto (Keessen *et al.*, 2011), lo que sugiere que el personal podría tener un mayor riesgo de ingerir esporas de *C. difficile* a partir del aire. La contaminación del ambiente de la granja de cerdos se confirmó en otro estudio donde la prevalencia de *C. difficile* en el ambiente aumentó de 0% a 61% de los sitios dentro de una instalación de partos solo 1 mes después de haber sido ocupada por cerdos (Squire *et al.*, 2011).

Los modos potenciales de diseminación de esporas de *C. difficile* ambiental de largo alcance incluyen aguas residuales tratadas, bioefluentes, transporte, agua de

riego residuales, compostaje, biosólidos, estiércol, césped, lodo de estuarios, sedimentos de ríos y carnicerías de cerdos (Warriner *et al.*, 2016) (Figura 1). Se han identificado esporas de *Clostridium difficile* en muestras de suelo de granjas de caballos, parques rurales y jardines, mercados de agricultores, suelo suburbano en Gales del Sur y céspedes municipales australianos (Simango & Mwakurudza, 2008). Las esporas de *Clostridium difficile* se identificaron en el 59% de los suelos de césped en Perth, Australia Occidental. Se pensó que la contaminación con esporas se debía a que los céspedes se cultivaban con estiércol de cerdo.

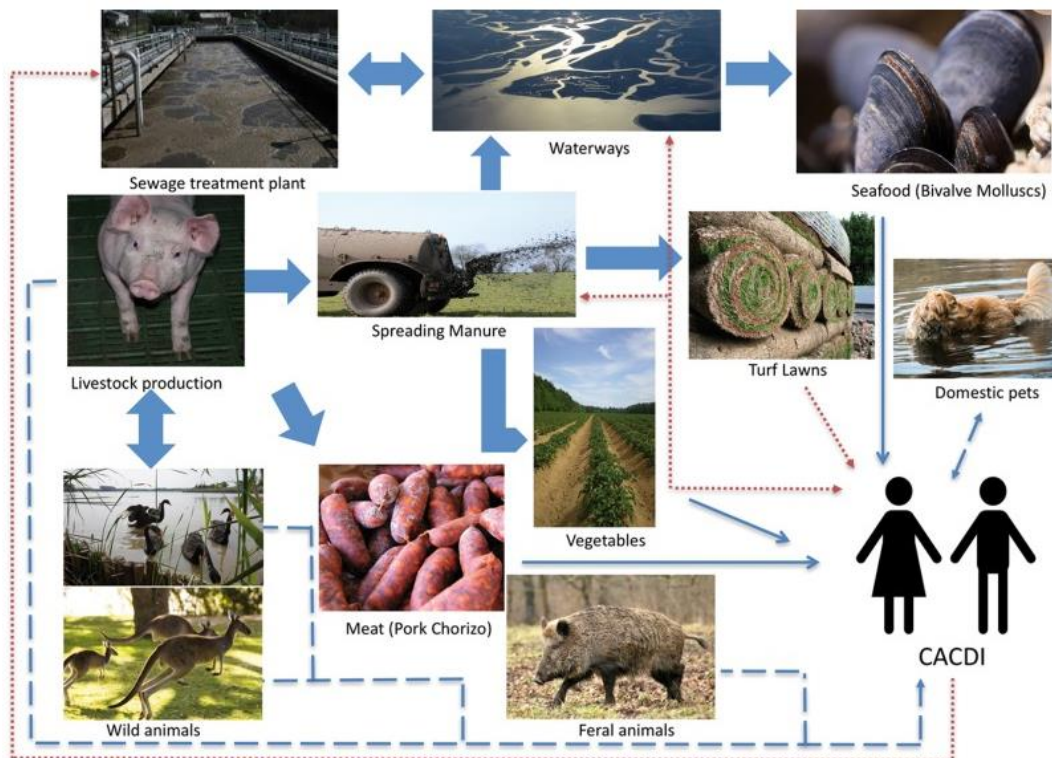


Figura 1: El ciclo y el reciclaje de *C. difficile* de fuentes zoonóticas (- - -), ambientales (.....) o transmitidas por los alimentos (___) implicadas en la infección por *C. difficile* asociada a la comunidad (CACDI). Adaptado de Warriner *et al.*, (2016)

Las esporas de *Clostridium difficile* son altamente resistentes a ambientes físicos o bioquímicos extremos. Existen en superficies duras de hasta 6 meses e incluso

más en superficies de concreto, madera o tierra (Kaatz *et al.*, 1988). La congelación (a -80°C), el calentamiento (a 85°C), el secado, la radiación ultravioleta, alcohol en gel y la mayoría de los desinfectantes han demostrado ser ineficaces en la erradicación (Deng *et al.*, 2015; Edwards *et al.*, 2016). Las esporas se propagan fácilmente por vía fecal-oral, manos contaminadas o dispersión en el aire en hospitales y hogares de ancianos. Estas instalaciones se colonizan rápida y extensamente, y las esporas se depositan en la mayoría de las superficies (Gerding *et al.*, 2008; Donskey, 2010). La presencia de esporas de *C. difficile* en los hospitales está bien establecida (Vonberg *et al.*, 2008).

1.8- Importancia en Salud Pública y Orígenes Zoonóticos

En la última década, *Clostridium difficile* se ha convertido en la causa principal de diarrea infecciosa asociada a antibióticos en pacientes hospitalizados (Lessa *et al.*, 2015). A diferencia de otros patógenos comunes asociados a la atención de salud, *C. difficile* produce esporas resistentes que facilitan la transmisión de huésped a huésped y permiten la supervivencia y la dispersión a largo plazo en el sistema de atención de salud y en el entorno en general (Leffler & Lamont, 2015). La aparición de la epidemia de *C. difficile* responsable de muchos brotes hospitalarios a gran escala en todo el mundo, se ha relacionado con la contaminación ambiental de esporas y la adquisición de resistencia a las fluoroquinolonas (Loo *et al.*, 2005; Kuijper *et al.*, 2006). La incidencia de la infección de *C. difficile* (CDI) que se produce fuera de las instalaciones sanitarias es significativamente menor (Noren *et al.*, 2004). Sin embargo, CDI adquirido en la comunidad representa una cuarta parte de todos los pacientes con CDI diagnosticados, lo que revela el subdiagnóstico del microorganismo.

El concepto “Una Salud” ó “*One Health*”, propuesto por la Organización Mundial de la Salud, que conecta la salud de los humanos con la salud de los animales y sus ambientes compartidos, representa un marco relevante para comprender la aparición y propagación de patógenos. En este marco, CDI adquiere un importante

protagonismo ya que se aísla comúnmente tanto de animales de producción como de seres humanos, remarcando el potencial zoonótico de la bacteria.

Entre los criterios de clasificación molecular de CDI, la ribo-tipificación se emplea con amplia frecuencia, por tratarse de una técnica de diagnóstico molecular. Su nombre deriva del ribosoma, los que se encuentran solamente en las células, por lo tanto la ribo-tipificación es un método de identificación de bacterias, no virus. Los ribosomas están formados por los genes que codifican el ARNr, los que son altamente variables. Esto quiere decir que ciertas secuencias son bien distintas de una especie a la otra, o incluso de una cepa bacteriana a otra. Estas regiones variables se pueden utilizar para identificar un tipo específico de bacteria. La ventaja de la ribo-tipificación como método de identificación de microorganismos infecciosos es que el procedimiento es completamente automático y se usa más comúnmente para tipificar cepas bacterianas (Johnson *et al.*, 1995).

El ribotipo 078 (RT078) de *C. difficile* se aísla comúnmente de humanos y animales de granja y se reconoce cada vez más como un agente causante de la infección asociada tanto a la atención médica como a la comunidad (Rupnik *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2011). Este ribotipo afecta típicamente a una población humana más joven y produce una mayor mortalidad que la infección por *C. difficile* RT027 (Walker *et al.*, 2013). Las herramientas estándar de genotipado han resaltado las similitudes genéticas entre humanos y animales de las cepas RT078 de *C. difficile*, lo que aumenta la posibilidad de transmisión zoonótica (Bakker *et al.*, 2010; Keessen *et al.*, 2011). Sin embargo, las relaciones evolutivas y epidemiológicas exactas entre las cepas RT078 humanas y animales de *C. difficile* siguen siendo desconocidas debido a la falta de poder discriminatorio de estos métodos de tipificación y la naturaleza clonal de los linajes de *C. difficile*. Recientemente, utilizando la filogenia de todo el genoma, se informó que los granjeros asintomáticos y sus cerdos pueden ser colonizados con aislados clonales de *C. difficile* RT078, demostrando evidencia de propagación entre animales y humanos (Knetsch *et al.*, 2014).

1.9- Diagnóstico, Tratamiento y Prevención

El estándar de oro para el diagnóstico de la CDAD porcina es la detección de TcdA y TcdB en heces o contenido de colon. El método de referencia es la medición de la citotoxicidad neutralizable en monocapas de células de ovario de hámster chino u otros tipos de células, pero la mayoría de los laboratorios ahora usan inmunoensayos enzimáticos disponibles comercialmente. El cultivo de *C. difficile* puede ser un tanto desafiante, ya que este organismo es más estrictamente anaeróbico que algunos clostridios (Post *et al.*, 2002; Songer *et al.*, 2000). La mayoría de los aislamientos son completamente toxigénicos, pero algunos producen solo TcdB o ninguna toxina. Las lesiones graves son mínimas, pero el examen microscópico cuidadoso del colon y el ciego revelan focos supurativos y resulta muy importante para poder dar confirmación al diagnóstico. La evaluación histopatológica de la mucosa intestinal es importante para confirmar la etiología de la diarrea, sumado al aislamiento de CDI (Songer *et al.*, 2016).

La inmunoprolifaxis de CDI en animales domésticos no se ha estudiado, pero los precedentes en otras especies sugieren que la inmunidad sería antitóxica. Los anticuerpos contra TcdA (Allo *et al.*, 1979) y TcdB (Viscidi *et al.*, 1983; Kink & Williams, 1998) previenen la unión de toxinas en modelos de ratón y hámster, eliminando la secreción, la inflamación y la enfermedad clínica. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* sugieren que la tilosina puede ser eficaz en el tratamiento de lechones.

1.10- *Clostridium difficile* en Argentina

En nuestro país es muy escasa y desactualizada la información en relación a este patógeno en cerdos, que a su vez, tiene alto potencial zoonótico. Al momento los reportes publicados en relación a CDI se resumen al diagnóstico por histopatología e inmunohistoquímica de algunos casos, marcando la importancia y

necesidad de ampliar los conocimientos en relación a éste patógeno. De hecho, no existen reportes del aislamiento de *C. difficile* a partir de materia fecal de lechones. Con los resultados del presente trabajo se amplía y actualizan los conocimientos sobre éste patógeno en piaras de la zona central de la Argentina. Además esta tesina da inicio a nuevas acciones de investigación en relación a CDI en cerdos.

OBJETIVOS

1.1- Objetivo general

Trabajar en el aislamiento, identificación y tipificación molecular de cepas de *C. difficile* obtenidas a partir de muestras de materia fecal de lechones neonatos con diarrea procedentes de granjas porcinas.

1.2-Objetivo específico

- Aislar cepas de *Clostridium difficile* a partir de materia fecal de lechones con/sin diarrea provenientes de granjas porcinas.
- Realizar análisis molecular de las cepas de *Clostridium difficile* para establecer la presencia del gen tcdA y tcdB (productores de toxina A y B respectivamente).
- Realizar análisis molecular de las cepas de *Clostridium difficile* para establecer la presencia de la toxina binaria (CDT) formada por las dos subunidades CDTa y CDTb que causan efecto tóxico.
- Evaluar la asociación entre la detección del agente en materia fecal y la presencia de cuadros clínicos.

MATERIALES Y

MÉTODOS

La toma de muestras se realizó en granjas porcinas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa fé. El trabajo de laboratorio se realizó en la Estación Experimental INTA Marcos Juárez, Ruta 12 km 3, dividiéndose el proyecto en 4 etapas, que se explicitan a continuación:

1.1- Descripción de granjas y toma de muestras

Se muestrearon 120 animales provenientes de 4 establecimientos de cerdos (30 por granja), con sistema “todo dentro-todo afuera”, de más de 500 madres en producción, con antecedentes de diarreas neonatales; localizados en la zona de mayor importancia productiva porcina de Argentina (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fé). En cada establecimiento se tomaron lechones de maternidad de primera (n=10), segunda (n=10) y tercera (n=10) semana de vida, preferentemente con diarrea. Este número de muestras permitió detectar al menos 1 animal positivo, en una población de 300 lechones por semana, para una prevalencia esperada del 20% y un 95% de nivel de confianza (Mitchell & Gardner, 2012). Las muestras de materia fecal fueron colectadas mediante estimulación ano-rectal y, en los casos donde la maniobra fue infructuosa se realizó hisopado rectal. La muestra se depositó en un crio-tubo con 1 ml de PBS estéril y se mantuvo refrigerada a 4 °C hasta la llegada al laboratorio donde fueron almacenadas a -70°C, hasta su posterior utilización.

1.2- Aislamiento de *Clostridium difficile*

Las muestras fueron pre-tratadas con shock etanólico (Borriello & Honour 1981), con la finalidad de activar la germinación de esporas. El tratamiento se basa en la incubación por 30 minutos a temperatura ambiente de una solución homogeneizada de 1 ml total, con 500 µl de la muestra de deposición/hisopo en PBS más 500 µl de etanol al 100%. Posteriormente se sembró, en medio

cromogénico y selectivo-diferencial CHROMagar™ *Clostridium difficile*. Se incubaron a 37°C en jarra de anaerobiosis (CO₂ al 5%), generada mediante sobres reductores (AnaeroPack®) (MITSUBISHI GAS CHEMICAL, Tokio, Japón). Figura 2.



Figura 2: A) Sobre reductor (AnaeroPack®), bolsa de cierre hermético y jarra de cultivo. B) Bolsa de cierre hermético, sobre reductor y placa para la siembra de las muestras con el medio de cultivo selectivo para *C. difficile*. C) Bolsa hermética con placa ya sembrada y sobre reductor. D) Jarra de cultivo, que va a la estufa, con bolsa hermética con placa sembrada.

La primera lectura de las placas de cultivo, verificando el desarrollo microbiano, se realizó a las 24 hs, en el caso negativo se repitió la lectura a las 48 y 72 hs. de incubación en las mencionadas condiciones. Estas lecturas se realizaron en transiluminador con luz UV, con la finalidad de observar la fluorescencia característica de las colonias de *C. difficile* en este medio de cultivo. En la figura 3 se observan aislamientos perteneciente a resultados obtenidos en las distintas granjas. Como controles positivos se utilizaron cepas de *Clostridium difficile* (CDC 20121308) y como control negativo cepas de *E. coli*.

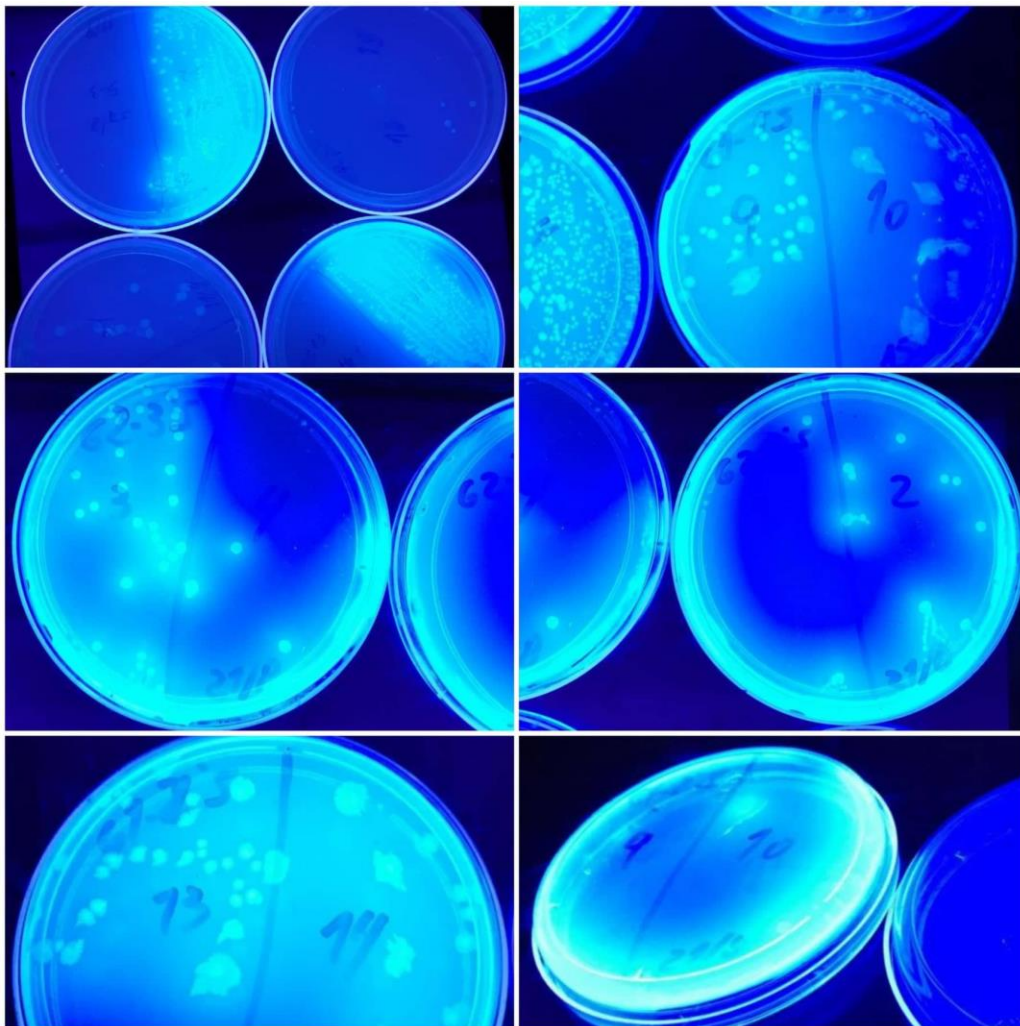


Figura 3: Imágenes de fluorescencia característica de las colonias de *C. difficile* perteneciente a muestras de las distintas granjas muestreadas.

1.3- Identificación molecular

1.3.1- Templados para reacción de PCR

Las colonias que crecieron en el medio CHROMagar™ *Clostridium difficile* fueron re-suspendidas en 300 µl de agua destilada estéril en microtubos Eppendorf (libres de DNasa y RNasas) y sometidas a calentamiento a 100 °C, por 10 minutos (*boiling*) (Holmes & Quigley, 1981), luego se enfriaron rápidamente por inmersión en hielo y se centrifugaron (4 minutos, a 12000 RPM). El sobrenadante resultante fue separado en microtubos Eppendorf (libres de DNasa y RNasas), mantenido a -20 °C hasta su evaluación, y empleado como templado de reacción de PCR (Millar *et al.*, 2001). Se utilizaron como control positivo cepas secuenciadas de *Clostridium difficile* (CDC 20121308), cedida gentilmente por el Dr. Diego Ruggeri del Laboratorio de Bacteriología Sanitaria (centro de referencia de diagnóstico) del INEI, ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”. Como control negativo se utilizaron cepas de *E.coli*.

1.3.2- Reacción de PCR

Para la reacción de PCR se utilizaron los *primers* descritos por Barbut *et al.* (2002), dirigidos a los genes *tcdA* y *tcdB* de *C. difficile* que codifican para las toxinas A y B respectivamente. Para la toxina binaria *cdtA* y *cdtB* se utilizaron los *primers* descritos por Stubbs *et al.* (2000) (Tabla 1).

La reacción de PCR se calculó para un volumen final de 25µl: Buffer 10X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Primers 50µM f y 50µM r, Taq ADN polimerasa 2,5U y extracto de ADN (templado de reacción). Se empleó el termociclador Applied Biosystems Veriti 96 well.

Tabla 1- Descripción de *primers*, secuencias y condiciones de ciclado de reacción de PCR.

Toxina	<i>Primers</i> -Secuencias	Ciclado	Producto esperado	Referencia
Toxina A	NK9: 5'CCACCAGCTGCAGCCATA3' NK11: 5'TGATGCTAATAATGAATCTAAAAT GGTAAC3'	<u>1 ciclo</u> : 94°C, 5min. 40 <u>ciclos</u> : 94°C, 20seg; 58°C, 45seg; 74°C, 40seg. <u>1 ciclo</u> : 72°C, 5min.	Tcd A: 1266 pb	Barbut <i>et al.</i> 2002.
Toxina B	NK104: 5'GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTT TACGC3' NK105: 5'CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCAC CT3'	<u>1 ciclo</u> : 94°C, 5min. 35 <u>ciclos</u> : 94°C, 20seg; 62°C, 45seg; 74°C, 40seg. <u>1 ciclo</u> : 72°C, 5min.	Tcd B: 270 pb	Barbut <i>et al.</i> 2002.
Toxina Binaria	cdtAf: 5'TGAACCTGGAAAAGGTGATG3' cdtAr: 5'AGGATTATTTACTGGACCATTTG3' cdtBf: 5'CTTAATGCAAGTAAATACTGAG3' cdtBr: 5'AACGGATCTCTTGCTTCAGTC3'	<u>1 ciclo</u> : 94°C, 5min. 40 <u>ciclos</u> : 94°C, 20seg; 50°C, 45seg; 74°C, 40seg. <u>1 ciclo</u> : 72°C, 5min.	Cdt A: 327 pb. Cdt B: 451pb	Stubbs <i>et al.</i> 2000.

Los productos de amplificación de las toxinas A y B (1200 pb y 270 pb, respectivamente) y de la toxina binaria (327 pb cdtA y 451 pb cdtB) se visualizaron en gel de agarosa al 2% (2 gr de agarosa y 100 ml Buffer TBE 1X), se corrieron por 35 minutos a 100 volts constantes y se visualizaron en el transiluminador UV TFX-20M. Las imágenes digitales de los geles fueron obtenidas mediante cámara Kodak EasyShare Z7590 acoplada a un equipo de captura de imágenes montados sobre el transiluminador.

1.4- Análisis estadístico

En el presente trabajo se realizó un estudio de corte transversal, se evaluó la tasa de detección en cada una de las edades (semanas). Posteriormente se determinó si hay asociación entre la detección mediante hisopado rectal y presencia de diarrea, utilizando el test de Chi cuadrado. Se trabajó con el software estadístico InfoSTAT versión 2015.

RESULTADOS

Con los resultados obtenidos lo primero que se analizó, en el total de las muestras de las cuatro granjas, fue la cantidad de animales con diarreas, como se detalla en la Figura 4, del total de las muestras, 26 fueron obtenidas de animales con diarrea al momento del muestreo y 94 de lechones sin sintomatología.

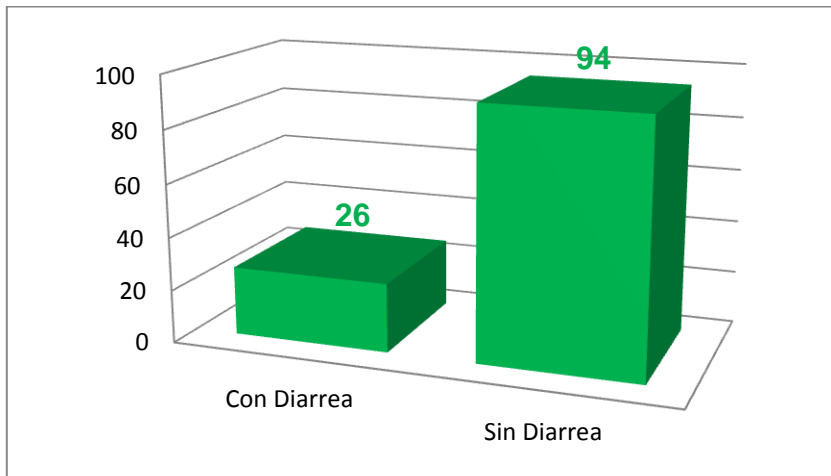


Figura 4: Animales totales con/sin diarrea en el total las granjas muestreadas.

Se determinó la cantidad de animales con y sin diarrea en cada una de las granjas (Figura 5A) y se evaluaron también la cantidad de lechones con diarrea en relación a la semana de vida (Figura 5B).

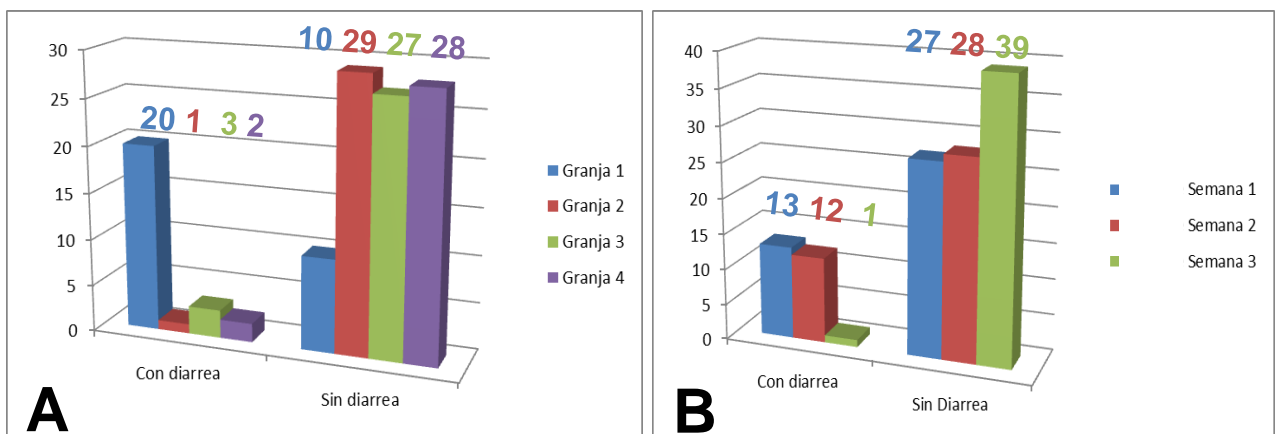


Figura 5: A)- Lechones con/sin diarrea en las distintas granjas (1, 2, 3 y 4). B)- Lechones con diarrea y sin en el total de granjas muestreadas según las semanas.

Se determinaron las cantidades de lechones con diarrea en cada granja a lo largo de las 3 semanas de muestreo (Figura 6). Se pudo evidenciar que en la granja 1 (Figura 6A) en las 2 primeras semanas de vida de los lechones es donde se encuentran concentrados la mayor cantidad de episodios de diarrea ($n=20$). En relación a la granja 2 (figura 6B) ($n=2$) solamente en la primer semana de vida de los animales se detectaron algunas diarreas ($n=1$). Para la granja 3 (Figura 6C) ($n=3$) se dieron algunos casos de diarrea en los lechones en la semana 1 y 2 ($n=1$ y $n=2$ respectivamente), mientras que para la granja 4 (Figura 6D) ($n=2$) los casos de diarrea que se detectaron fueron en la semana 1 y 3.

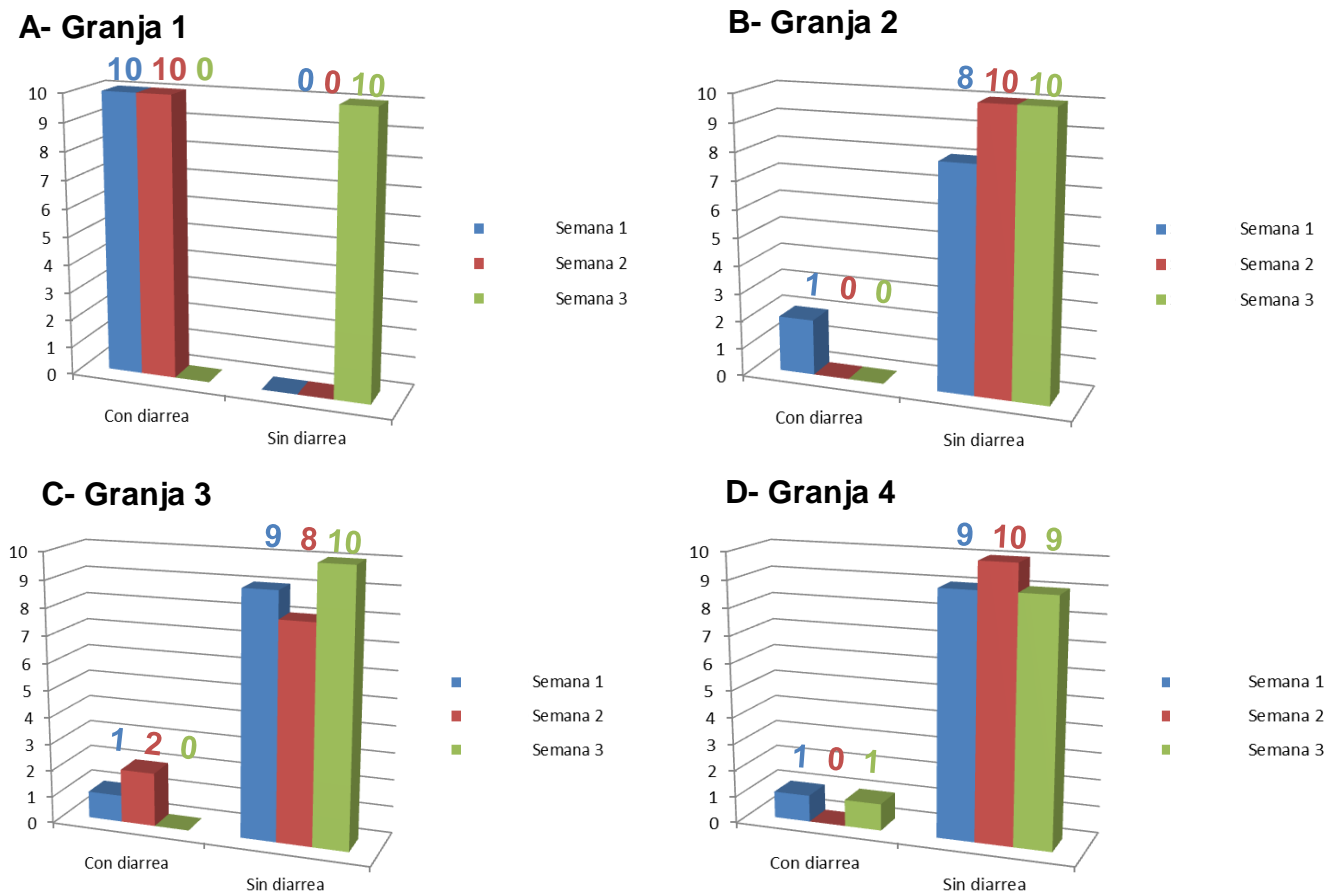


Figura 6: A) Granja 1. B) Granja 2. C) Granja 3. D) Granja 4.

Los aislamientos de *Clostridium difficile* obtenidos se muestran en la Figura 7, estos datos corresponden al desarrollo microbiano en las placas con el medio selectivo y diferencial para estas bacterias, en la totalidad de las granjas muestreadas. Se puede evidenciar una alta tasa de recuperación del microorganismo por medio de las técnicas empleadas (61,66%).

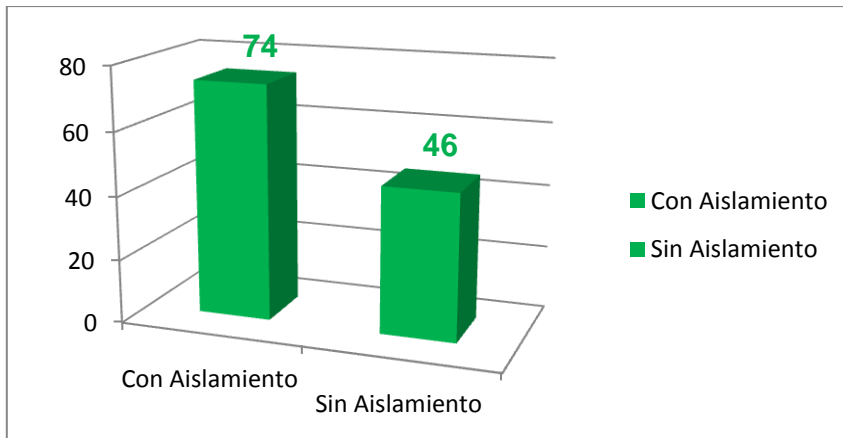


Figura 7: Aislamiento de *Clostridium difficile* en el total de granjas que se tomaron muestras.

Se muestran la cantidad de aislamientos en cada una de las granjas muestreadas (Figura 8).

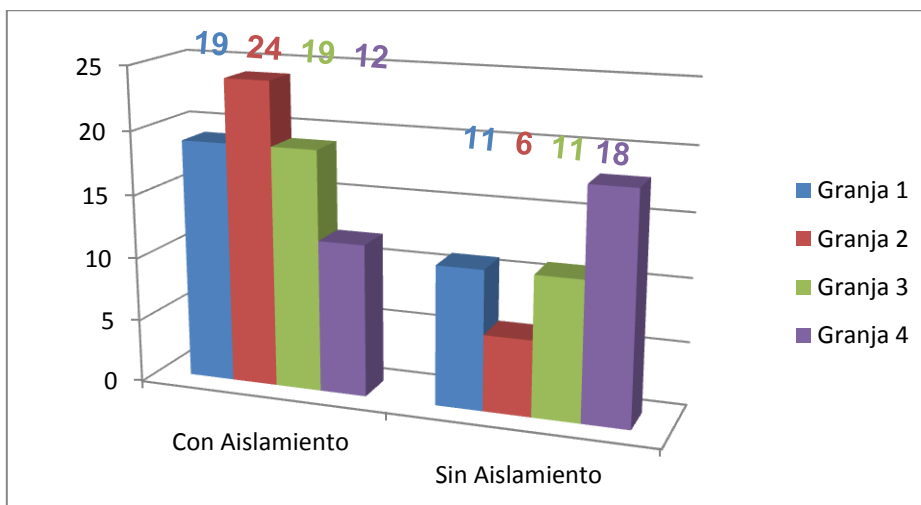


Figura 8: Aislamiento de *Clostridium difficile* en cada una de las granjas (1, 2, 3 y 4) muestreadas.

Para la caracterización molecular de las cepas aisladas se realizó la extracción de ADN por calentamiento a ebullición de la confluencia que desarrolló en la placa, para emplearlo como templado de reacción de PCR con la finalidad de evaluar la presencia de los genes que codifican para la toxinas (A, B y Binaria). Como se observa en las figuras 9 (A, B y C) y 10, la totalidad de los aislamientos presento al menos una de las toxinas características de *Clostridium difficile*.

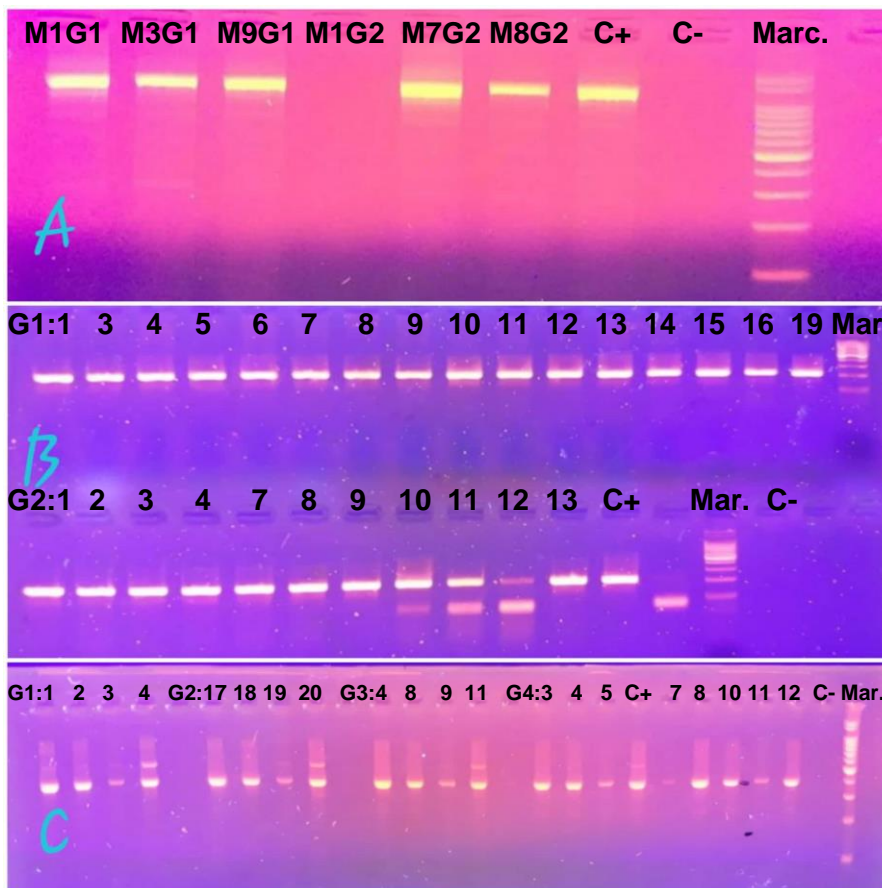


Figura 9: A) Gel toxina A, muestras de materia fecal 1, 3 y 9 de granja 1 (M1G1, M3G1 y M9G1) y muestras de materia fecal 1, 7 y 8 de granja 2 (M1G2, M7G2 y M8G2), control positivo (C+), control negativo (C-) y marcador (Marc.). B) Gel

toxina B, muestras de materia fecal (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 19) de granja 1 (G1), marcador (Mar.) y muestras de materia fecal (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) de granja 2 (G2), control positivo (C+), marcador (Mar.) y control negativo (C-). C) Gel toxina Binaria, muestras de materia fecal (1, 2, 3 y 4) de granja 1 (G1), (17, 18, 19 y 20) de granja 2 (G2), (4, 8, 9 y 11) de granja 3 (G3), (3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 y 12) de granja 4 (G4), control positivo (C+), control negativo (C-) y marcador (Mar.).

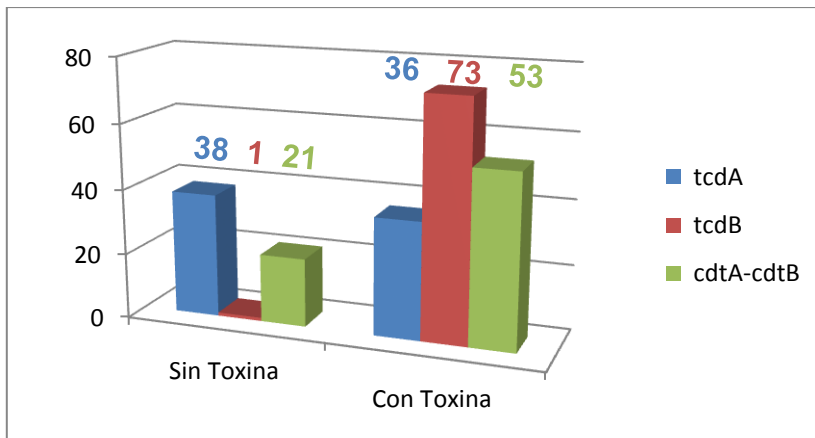


Figura 10: Toxinas tcdA, tcdB y cdtA y cdtB (binaria) de cada aislamiento en el total de granjas.

Para la evaluación individual de cada granja en relación a las toxinas que presentaban las cepas circulantes (Figura 11), se puso en evidencia que en las producciones más intensificadas (granjas de mayor número de madres en producción -más de 2000 madres, mayor hacinamiento y, en algunos casos, falta de higiene) como las granjas 1, 2, y 3; las cepas halladas resultaron más virulentas (presencia de toxina binaria) que en la granja con una producción con menor intensificación, granja 4 (menor de 300 madres).

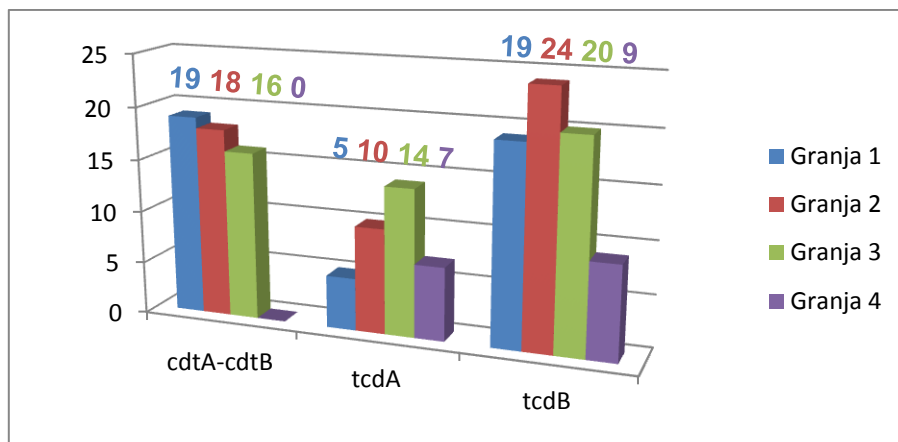


Figura 11: Análisis de cada toxina para cada granja.

Con la finalidad de caracterizar la virulencia de las cepas circulantes en cada granja, relacionando las asociaciones más frecuentes entre las toxinas de cada cepa, se encontraron diferentes frecuencias de aparición que se resumen en la Tabla 2, se muestra también el dato de la frecuencia de diarreas en cada granja, asociada a la caracterización antes mencionada.

Tabla 2: Asociaciones halladas entre toxinas en cada granja

Granja	Diarrea	Toxina A-Toxina B	Toxina A-Toxina Binaria	Toxina B-Toxina Binaria	Toxina A-Toxina B-Toxina Binaria
1	20	24	24	38	43
2	1	34	28	42	52
3	3	34	30	36	50
4	2	17	7	10	17

Los valores hallados no son aditivos

Siguiendo la finalidad de la Tabla 2, de evaluar la virulencia de las cepas circulantes en cada granja (presencia de toxina binaria), en la Figura 12 se caracterizó cada toxina según su aparición en la semana 1, 2 y 3. Se observó que la granja 4 es la que presenta menor circulación de las toxinas y que se encuentra

en total ausencia la toxina binaria (Figura 12D). Mientras que en el resto de las granjas se observa una circulación similar de las toxinas (Figura 12 A, B y C).

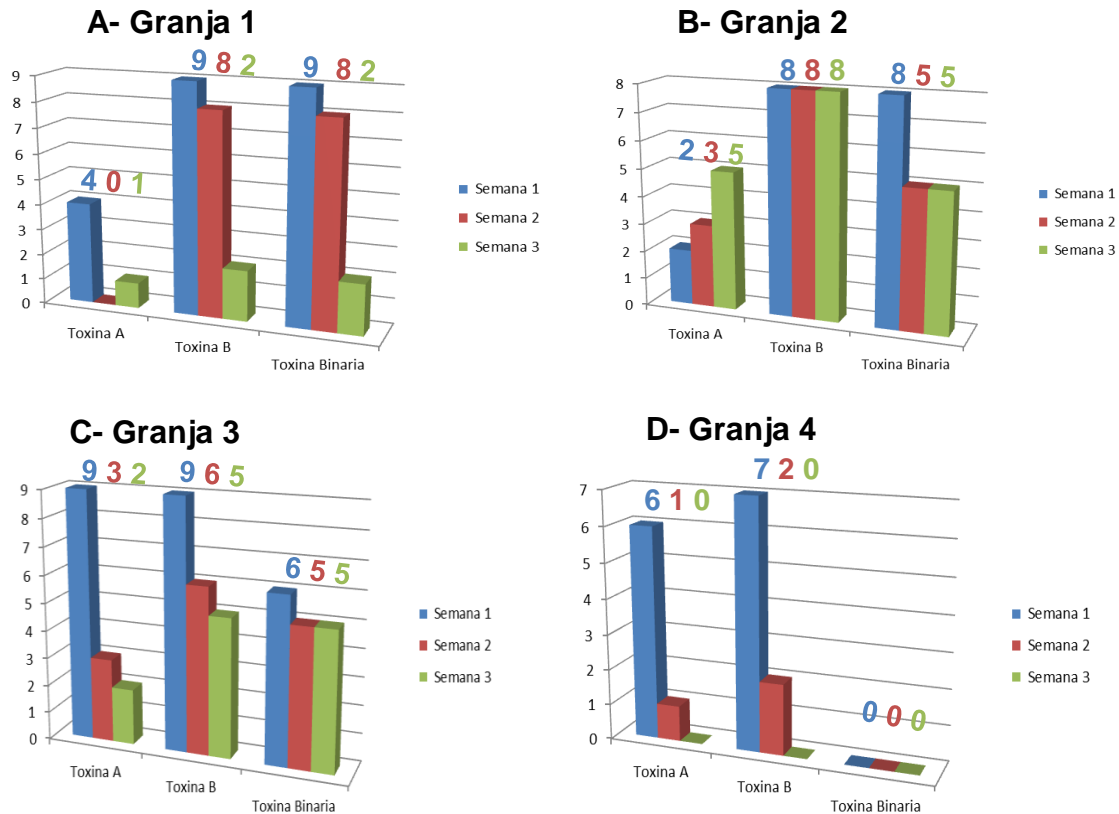


Figura 12: A) Granja 1. B) Granja 2. C) Granja 3. D) Granja 4.

Para evaluar la relación existente entre las chances de aislar CDI a partir de un animal con o sin diarrea, se realizó el correspondiente análisis de correspondencia de los datos, encontrando las siguientes frecuencias que ratifican lo expuesto (Tabla 3). Los resultados del análisis indican que es 3.04 veces más probable aislar CDI a partir de un animal con diarrea que de un lechón sin dicha sintomatología.

Tabla 3: Análisis de frecuencias absolutas de aislamientos de CDI a partir de lechones con o sin diarrea.

Aislamiento/Diarrea	SI	NO	Total
SI	20 (0.80*; 0.27 [#])	5 (0.20*; 0.11 [#])	25 (1.00)
NO	54 (0.57*; 0.73 [#])	41 (0.43*; 0.89 [#])	95 (1.00)
Total	74 (1.00)	46 (1.00)	120 (1.00)

*Contribución de frecuencia relativa por filas; [#]Contribución de frecuencia relativa por columnas

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El presente trabajo de tesina final de grado se consolida en el primer reporte de aislamientos y caracterizaciones de cepas de *Clostridium difficile* recuperados a partir de muestras de materia fecal de lechones en Argentina. Si bien existen reportes en la literatura respecto del aislamiento y caracterización molecular de este microorganismo en otros países del mundo (Songer 2004; Alvarez-Pérez *et al.* 2009); en Argentina solamente se han descripto casos de enfermedad diarreica con lesiones compatibles con las causadas por *C. difficile*, sin haberlo podido aislar y caracterizar molecularmente (Cappuccio *et al.* 2009).

La importancia de la presente tesina radica en que se ha conseguido aislar cepas, caracterizarlas como toxígenas o no toxigénicas mediante PCR y hacer un banco de aislamiento para posteriores estudios. Se pudo conocer la circulación de agentes causantes de enfermedades diarreicas con potencial zoonótico en lechones, presentes en granjas con producción intensiva de cerdos. Si bien para confirmar el diagnóstico es necesario sumar al aislamiento las características histopatológicas patognomónicas de la colitis ulcerativa causada por CDI, haber logrado aislamientos y poder caracterizarlos son el puntapié inicial de futuras investigaciones.

En este trabajo se demuestra que de un total de 120 muestras tomadas de lechones de entre 1, 2 y 3 semanas se pudo aislar *C. difficile* en 74 (61,6%) muestras, lo que indica que hay una alta circulación de la bacteria en las granjas. Siendo mayor la circulación en las granjas de producción más intensificada de 2000 madres (entre 60%-80%) en comparación con una granja de menos de 300 madres (43,33%).

Estudios previos en cerdos han mostrado resultados similares a los demostrados en el presente trabajo. Por ejemplo, la prevalencia general de *C. difficile* en lechones de 10 granjas en Carolina del Norte (EE. UU.) fue de 47.6% (Songer 2004). También en los Estados Unidos, se detectaron toxinas de *C. difficile* en el contenido de colon del 29% de los lechones de 1 a 7 días de edad con diarrea neonatal (Yaeger *et al.* 2002). Además, se detectaron toxinas de *C. difficile* en el

contenido colónico de 23/29 (79%) de lechones aparentemente sanos (Yaeger *et al.* 2007).

En este trabajo las cepas de *C. difficile* se recuperaron en una proporción considerable de lechones en la primer semana de vida, como se plantea en el trabajo de Alvarez-Pérez *et al.* (2009), pero también se vió en los resultados obtenidos que esta bacteria también se encuentra presente en lechones de 2 y 3 semanas, independientemente de la manifestación de sintomatología (presencia o ausencia de diarrea). Además, se observaron diferencias en la prevalencia de *C. difficile* en lechones entre las cuatro granjas analizadas, donde se vió que en la granja 4 hay una tasa menor de aislamiento de la bacteria, posiblemente asociándose esto a que se trata de una granja de menor tamaño (menos de 300 madres) y que la circulación de *C. difficile* con potencial zoonótico, se encuentra disminuida por las prácticas que se llevan a cabo en la misma o tal vez una menor presión en la cantidad de animales, reduce la circulación de CDI.

Se ha sugerido que *C. difficile* puede ser actualmente la causa descontrolada más importante de diarrea neonatal en cerdos (Songer 2004; Songer & Anderson 2006), habiendo desplazado a otros agentes bacterianos y virales como la causa principal de esta enfermedad (Yaeger *et al.*, 2002). En este trabajo se pudo ver, en base a los resultados obtenidos, que la diarrea neonatal en los lechones no tiene una fuerte asociación a *C. difficile*, ya que se aisló a la bacteria de materia fecal no diarreica y en algunas muestras de materias fecales diarreicas no se pudo aislar *C. difficile*.

Los resultados que se presentan en este trabajo se basan en muestras de materia fecal mediante estimulación ano-rectal y/o hisopados rectales, por lo que no se observó si los lechones tenían lesiones macroscópicas como edema de mesocolon y lesiones histopatológicas típicas causadas por *C. difficile* (Zimmerman 2012).

Aunque la mayoría de las cepas de *C. difficile* producen toxina A, toxina B y toxina binaria, algunas cepas producen solo toxina B o ninguna toxina (Songer & Uzal

2005). Los genes *tcdA* y *tcdB*, de las toxinas A y B respectivamente, son los que codifican los factores de virulencia esenciales de *C. difficile* (Songer *et al.* 2000; Keel & Songer 2006) que se identifican en la mayoría de los aislamientos recuperados. En el presente trabajo se observó la presencia de las tres toxinas, con una prevalencia incrementada de la toxina B, seguida de la toxina binaria, esta última es probable que se asocie a las cepas con una mayor virulencia. También se pudo ver que en los aislamientos negativos para la toxina B, fueron de igual modo negativos para la toxina A o la toxina Binaria. Mientras que los aislamientos positivos para las toxinas B fueron positivos al menos para la toxina A o Binaria cuando no fueron positivos para ambas toxinas. Observándose que en la gran mayoría de los aislamientos positivos para las toxinas, los lechones no presentaban ningún síntoma de la presencia de *C. difficile*. Por lo anteriormente expuesto, se decidió crio-preservar las cepas aisladas para utilizarlas en futuros estudios de patogenicidad de las cepas.

En conclusión:

- Este es el primer informe que compara la prevalencia de *C. difficile* en un gran número de cerdos diarreicos y no diarreicos en Argentina
- No se identificó un vínculo claro entre el aislamiento de esta bacteria y la diarrea porcina neonatal.
- La detección de *C. difficile* en muestras fecales por PCR es una herramienta útil para el diagnóstico temprano de infecciones causadas por este microorganismo en cerdos y para la detección de portadores asintomáticos.
- Esta información puede ser de gran ayuda cuando se estudia la prevalencia de *C. difficile* en diferentes granjas y pueden ser utilizados como base para implementar medidas para prevenir la posible transmisión zoonótica de este patógeno emergente.

BIBLIOGRAFÍA

- Allo, M; Silva, J; Fekety, R; Rifkin, G; Waskin, H. 1979. Prevention of clindamycin-induced colitis in hamsters by *Clostridium sordellii* antioxin. Gastroenterology. 76:351-355.
- Alvarez-Pérez, S.J; Alba, P; Blanco, J L; García, M E. 2009. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pig feces by PCR. Veterinarni Medicina, 54, 2009 (8): 360–366
- Baines, S D; O'Connor, R; Saxton, K; Freeman, J; Wilcox, M K. 2009. Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 663:520–525.
- Bakker, D; Corver, J; Harmanus, C; Goorhuis, A; Keessen, EC; Fawley, WN; Wilcox, MH; Kuijper, EJ. 2010. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus Variable-Number Tandem-Repeat analysis and tetracycline resistance. Journal of Clinical Microbiology. 48: 3744–3749.
- Barbut, F; Petit, J C. 2001. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clinical Microbiology and Infection. 7:405-410.
- Barbut, F; Lalande, V; Burghoffer, B; Thien, HV; Grimprel, E; Petit, JC. 2002. Prevalence and genetic characterization of Toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. Journal of Clinical Microbiology. 40: 2079–2083.
- Bartlett, JG; Chang, TW; Gurwith, M; Gorbach, SL; Onderdonk, AB. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. The New England Journal of Medicine. 298: 531-534.
- Bartlett, JG. 1992. Antibiotic-Associated Diarrhea. Clinical Infectious Diseases. 15(4): 573-581.
- Bartlett, JG. 1994. *Clostridium difficile*: History of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clinical Infectious Diseases. 18(Suppl 4): S265- S272.

- Bauer, MP; Notermans, DW; Van Benthem, BH; Brazier, JS; Wilcox, MH; Rupnik, M; Monnet, DL; Van Dissel, JT; Kuijper, E. 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 377:63–73. doi:10.1016/S0140-6736(10)61266-4.
- Beaugerie, L. 2004. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18:337–352.
- Borriello, SP; Honour, P. 1981. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology* 34: 1124-1127
- Borriello, SP; Wilcox, MH. 1998. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41(Suppl 3): 67–69.
- Cappuccio, JA; Quiroga, MA; Moredo, F A; Canigia, L F; Machuca, M; Capponi, O; Bianchini, A; Zielinski, G; Sarradell, J; Ibar, M; Vigo, GB; Giacoboni, G; Perfumo, CJ. 2009. Neonatal piglets mesocolon edema and colitis due to *Clostridium difficile* infection: prevalence, clinical disease and pathological studies. *Braz J Vet Pathol*. 2(1), 35 – 40.
- Deng, K; Plaza-Garrido, A; Torres, JA; Paredes-Sabja, D. 2015. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *Food Microbiol*. 46:218–21.
- Dial, S; Delaney, JA; Barkun, AN; Suissa, S. 2005. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *American Medical Association*. 294: 2989-2995.
- Donskey, CJ. 2010. Preventing transmission of *Clostridium difficile*: is the answer blowing in the wind? *Clin Infect Dis*. 50:1458–61.
- Drudy, D; Fanning, S; Kyne, L. 2007. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Institute Journal Infectious Disease*. 11: 5-10.
- Edwards, AN; Karim, ST; Pascual, RA; Jowhar, LM; Anderson, SE; McBride, SM. 2016. Chemical and stress resistances of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells. *Front Microbiol*. 7:97–13.

- Genth, H; Dreger, SC; Huelsenbeck, J; Just, I. 2008. *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. The international journal of biochemistry & cell biology. 40(4), 592-597.
- Gerding, DN; Muto, CA; Owens, RC. 2008. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. Clinical Infectious Diseases. Vol 46, Suppl 1, 15.
- Geric, B; Johnson, S; Gerding, DN; Grabnar, M; Rupnik, M. 2003. Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large Clostridial Toxins. Journal of Clinical Microbiology. 41: 5227–5232.
- Gonçalves, C; Decré, D; Barbut, F; Burghoffer, B; Petit, JC. 2004. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. Journal of Clinical Microbiology. 42: 1933–1939.
- Green, RH. 1974. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. Yale Journal of Biology and Medicine. 3:166-181.
- Gülke, I; Pfeifer, G; Liese, J; Fritz, M; Hofmann, F; Aktories, K; Barth, H. 2001. Characterization of the enzymatic component of the ADPribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. Infection and Immunity. 69: 6004-6011.
- Hacek, DM; Ogle, AM; Fisher, A; Robicsek, A; Peterson, LR. 2010. Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. American Journal of Infection Control. 38: 350-353
- Hafiz, S. 1974. *Clostridium difficile* and its toxins. Tesis Doctoral. University of Leeds.
- Hafiz, S; Oakley, CL. 1976. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. Journal of Medical Microbiology. 9: 129-136.
- Hall, IC; O'Toole, E. 1935. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. American Journal of Diseases of Children. 49: 390-402.

- Holmes, DS; Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114(1):193-7.
- Hopman, NE; Keessen, EC; Harmanus, C; Sanders, IM; Van Leengoed, LA; Kuijper, EJ; Lipman, LJ. 2011. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol.* 149:186–192.
- Hunter, PA; Dawson, S; French, GL; French, GL; Goossens, H; Hawkey, PM; Kuijper, EJ; Nathwani, D; Taylor, DJ; Teale, CJ; Wilcox, RE; Woodford, N; Wulf, MW; Piddock, LJ. 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practice and politics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 65(Suppl 1): 13–17.
- ICSB: The Ad Hoc Committee of the Judicial Commission of the ICSB. 1976. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 26: 563- 599.
- Johnson, D; Pieniasek, N; Griffin, D; Misener, L; Rose, J. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium oocysts* in water samples. *Appl Environ Microbiol.* 61:3849-3855.
- Johnson, S; Samore, MH; Farrow, KA; Killgore, GE; Tenover, FC; Lyras, D; Rood, JI; DeGirolami, P; Baltch, AL; Rafferty, ME; Pear, SM; Gerding, DN. 1999. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *The New England Journal of Medicine.* 341: 1645–1651.
- Jones, RL; Adney, WS; Alexander, AF; Shideler, RK; Traub-Dargatz, JL. 1988. Hemorrhagic necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium difficile* infection in four foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 193: 76–79.
- Kaatz, GW; Gitlin, SD; Schaberg, DR; Wilson, KH; Kauffman, CA; Seo, SM; Fekety, R. 1988. Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Epidemiol.* 127:1289–94.
- Keel, MK; Songer, JG. 2006. The comparative pathology of *Clostridium difficile* associated disease. *Veterinary Pathology.* 43:225–240.

- Keel, MK; Songer, JG. 2007. The distribution and density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs. *Veterinary Pathology*. 44: 814–822.
- Keel, MK; Songer, JG. 2011. The attachment, internalization, and time-dependent, intracellular distribution of *Clostridium difficile* toxin A in porcine intestinal explants. *Veterinary Pathology*. 48:369–380.
- Keessen, EC; Gaastra, W; Lipman, LJ. 2011. *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet Microbiol*. 153:205-217.
- Kelly, AR; Jones, RJ; Gillick, JC; Sims, LD. 1984. Outbreak of botulism in horses. *Equine Veterinary Journal*. 16: 519–521.
- Kink, JA; Williams, JA. 1998. Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C difficile* associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun*. 66:2018-2025.
- Knetsch, CW; Connor, TR; Mutreja, A; Van Dorp, SM; Sanders, IM; Browne, HP; Harris, D; Lipman, L; Keessen, EC; Corver, J; Kuijper, EJ; Lawley, T. 2014. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands. 19.45.20954.
- Knoop, FC; Owens, M; Crocker, TC. 1993. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 6: 251-265.
- Kramer, A; Schwebke, I; Kampf, G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 6:130-131.
- Kuijper, EJ; Coignard, B; Tull, P. 2006. Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*. 12(Suppl 6):S2–S18.
- Leffler, DA; Lamont, JT. 2015. *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med*. 372:287-288.

-Lessa, FC; Winston, LG; McDonald, LC. 2015. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. N Engl J Med. 372:2369-2370.

-Levett, PN. 1984. Detection of *Clostridium difficile* in faeces y direct gas liquid chromatography. J. Clin. Pathol. 37, 117-119.

-Libby, JM; Jortner, BS; Wilkins, TD. 1982. Effects of the two toxins of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated cecitis in hamsters. Infection and Immunity. 36: 822–829.

-Lizer, JT; Madson, DM; Schwartz, KJ; Hank Harris, DL; Bosworth, BT; Kinyon, JM; Ramirez, A. 2012. Experimental infection of conventional neonatal pig with *Clostridium difficile*: A new model. Journal of Swine Health and Production. 21(1): 22-29.

-Loo, VG; Poirier, L; Miller, MA; Oughton, M; Libman, MD; Michaud, S; Bourgault, AM; Nguyen, T; Frenette, C; Kelly, M; Vibien, A; Brassard, P; Fenn, S; Dewar, K; Hudson, TJ; Horn, R; Rene, P; Monczak, Y; Dascal, A. 2005. A predominantly clonal multi institutional outbreak of *Clostridium difficile* associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med 353:2442–2449.

-Lyras, D; O'Connor, JR; Howarth, PM; Sambol, SP; Carter, GP; Phumoonna, T; Poon, R; Adams, V; Vedantam, G; Johnson, S; Gerding, DN; Rood, JI. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature. 458(7242): 1176-1179.

-Mackie, R; Sghir, A; Gaskins, HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. American Journal of Clinical Nutrition. 69: 1035S - 1045S.

-Marler, LM; Siders, JA; Wolters, LC; Pettigrew, Y; Skitt, BL; Allen, SD. 1992. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. Journal of clinical microbiology 30: 514-516.

-Millar, B; Jiru, X; Moore, J; Earle, J. 2001. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. J Microbiol Methods 47: 255.

- Mitchell, Brett; Gardner, Anne. 2012. Mortality and *Clostridium difficile* infection: A review. Antimicrobial resistance and infection control. 1.20.10.1186/2047-2994-1-20.
- Modaber, I. 1975. *Clostridium difficile*. Acta Medica Irani. 18: 111-128.
- Noren, T; Akerlund, T; Back; Sjoberg, L; Persson, I; Alriksson, I; Burman, LG. 2004. Molecular epidemiology of hospital associated and community acquired *Clostridium difficile* infection in a Swedish county. J Clin Microbiol. 42:3635-3643.
- Post, K.W; Jost, BH; Songer, JG. 2002. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. J. Vet. Diagn. Invest. 14:258-259.
- Poutanen, SM; Simor, AE. 2004. *Clostridium difficile* associated diarrhea in adults. Canadian Medical Association Journal. 171(1): 51-58.
- Riley, TV; Brazier, JS; Hassan, H; Williams, K; Phillips, KD. 1987. Comparison of alcohol shock enrichment and selective enrichment for the isolation of *Clostridium difficile*. Epidemiology and infection 99: 355-359.
- Roberts, K; Smith, CF; Snelling, AM; Kerr, KG; Banfield, KR; Sleight, PA; Beggs, CB. 2008. Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. BMC Infectious Diseases. 8:7.
- Rupnik, M; Widmer, A; Zimmermann, O; Eckert, C; Barbut, F. 2008. *Clostridium difficile* toxine type V, ribotype 078, in animals and humans. J Clin Microbiol. 46:2146.
- Simango, C; Mwakurudza, S. 2008. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int J Food Microbiol 124:268–70.
- Snyder, M.I. 1937. Further studies on *Bacillus difficilis* (Hall and O'toole). Journal of Infectious Diseases. 60:223-231.
- Songer, J. G. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clinical Microbiology Reviews. 9: 216–234.

- Songer, JG; Post, KW; Larson, DJ; Jost, BH; Glock RD. 2000. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. Swine Health and Production. 8: 185-189.
- Songer, JG. 2004. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. Anim. Health Research Rev. 5(2): 321-326.
- Songer, J.G., Uzal, F.A., 2005. Clostridial enteric infections in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 528–536
- Songer, JG; Anderson, MA. 2006. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. Anaerobe. 12:1-4.
- Songer, JG; Trinh, HT; Killgore, GE; Thompson, AD; McDonald, LD; Limbago, BM. 2009. *Clostridium difficile* in retail meat products. Emerging Infectious Diseases. 15:819-821.
- Songer, JG; Harmon, AE; Keel, MK. 2016. Toxins of *Clostridium difficile*. In Clostridial Diseases in Animals pp. 61–70.
- Sorg, JA; Sonenshein, AL. 2008. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. Journal of Bacteriology. 190: 2505–2512.
- Squire, MM; Lim, SC; Foster, NF; Riley, TV. 2011. Detection of *Clostridium difficile* after treatment in a two stage pond system. In: van Barneveld RJ (Ed.) Manipulating pig production. Australasian Pig Science Association, Adelaide, SA. 215.
- Stubbs, S; Rupnik, M; Gibert, M; Brazier, J; Duerden, B; Popoff, M. 2000. Production of actin specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiology Letters 186 (2000) 307-312.
- Viscidi, R; Laughton, BE, Yolken R, Bo-Linn, P; Moench, T; Ryder, RW; Bartlett, JG. 1983. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. J Infect Dis. 148:93-100.
- Vonberg, RP; Kuijper, EJ; Wilcox, MH; Barbut, F; Tuñil, P; Gastmeier, P; European C. difficile-Infection Control Group; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); Van den Broek PJ; Colville, A; Coignard, B; Daha, T; Debast, S;

Duerden, BI; Van den Hof, S; Van der Kooi, T; Maarleveld, HJ; Nagy, E; Notermans, DW; O'Driscoll, J; Patel, B; Stone, S; Wiuff, C. 2008. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 14:2–20.

-Walker, AS; Eyre, DW; Wyllie, DH; Dingle, KE; Griffiths, D; Shine, B; Oakley, S; O'Connor, L; Finney, J; Vaughan, A; Crook, DW; Wilcox, MH; Peto, TE; 2013. Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis. 56:1589-1600.

-Warriner, K; Xu, C; Habash, M; Sultan, S; Weese, SJ. 2016. Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: significant sources of *C. difficile* community acquired infection? Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

-Waters, EH; Orr, JP; Clark, EG; Schaufele, CM. 1998. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 10:104–108.

-Weese, JS; Staempfli, HR; Prescott, JF. 2001. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. Equine Veterinary Journal. 33(4): 403-409.

-Weese, JS; Wakeford, T; Reid-Smith, R; Rousseau, J; Friendship, R. 2010. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. Anaerobe. 16: 501–504.

-Wilson, KH; Perini, F. 1988. Competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. Infection and Immunity. 56: 2610-2614.

-Yaeger, M; Funk, N; Hoffman, L. 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 14: 281–287.

-Yaeger, MJ; Kinyon, JM; Songer, JG. 2007. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of

neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19: 52-59.

-Zimmerman, JJ; Karriker, LA; Ramirez, A; Schwartz, KJ; Stevenson, GW. 2012. *Diseases of Swine*. 10th edition. Hoboken, Nueva Jersey: Wiley-Blackwell. 714-715p.

ANEXO

Granja	Muestra	Semanas	ID	Diarrea	Aislamiento	Fecha	P C R	Gel tcdA (1266pb)	Gel tcdB (270pb)	Gel Binarias
1	1	1° S	1-1°S-1	1	1	21/08/2018	1	1	1	1
1	2	1° S	1-1°S-2	1	0	-	0	0	0	0
1	3	1° S	1-1°S-3	1	1	21/08/2018	1	1	1	1
1	4	1° S	1-1°S-4	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	5	1° S	1-1°S-5	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	6	1° S	1-1°S-6	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	7	1° S	1-1°S-7	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	8	1° S	1-1°S-8	1	1	21/08/2018	1	1	1	1
1	9	1° S	1-1°S-9	1	1	21/08/2018	1	1	1	1
1	10	1° S	1-1°S-10	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	11	2° S	1-2°S-11	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	12	2° S	1-2°S-12	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	13	2° S	1-2°S-13	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	14	2° S	1-2°S-14	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	15	2° S	1-2°S-15	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	16	2° S	1-2°S-16	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	17	2° S	1-2°S-17	1	0	-	0	0	0	0
1	18	2° S	1-2°S-18	1	0	-	0	0	0	0
1	19	2° S	1-2°S-19	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	20	2° S	1-2°S-20	1	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	21	3° S	1-3°S-21	0	0	-	0	0	0	0
1	22	3° S	1-3°S-22	0	0	-	0	0	0	0
1	23	3° S	1-3°S-23	0	1	21/08/2018	1	0	1	1
1	24	3° S	1-3°S-24	0	1	21/08/2018	1	1	1	1
1	25	3° S	1-3°S-25	0	0	-	0	0	0	0
1	26	3° S	1-3°S-26	0	0	-	0	0	0	0
1	27	3° S	1-3°S-27	0	0	-	0	0	0	0
1	28	3° S	1-3°S-28	0	0	-	0	0	0	0
1	29	3° S	1-3°S-29	0	0	-	0	0	0	0
1	30	3° S	1-3°S-30	0	0	-	0	0	0	0
2	1	1° S	2-1°S-1	0	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	2	1° S	2-1°S-2	1	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	3	1° S	2-1°S-3	0	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	4	1° S	2-1°S-4	0	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	5	1° S	2-1°S-5	0	0	-	0	0	0	0
2	6	1° S	2-1°S-6	0	0	-	0	0	0	0
2	7	1° S	2-1°S-7	0	1	16/08/2018	1	1	1	1
2	8	1° S	2-1°S-8	0	1	16/08/2018	1	1	1	1
2	9	1° S	2-1°S-9	0	1	16/08/2018	1	0	1	1

2	10	1° S	2-1°S-10	0	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	11	2° S	2-2°S-11	0	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	12	2° S	2-2°S-12	0	1	16/08/2018	1	0	1	0
2	13	2° S	2-2°S-13	0	0	-	0	0	0	0
2	14	2° S	2-2°S-14	0	0	-	0	0	0	0
2	15	2° S	2-2°S-15	0	1	16/08/2018	1	1	1	1
2	16	2° S	2-2°S-16	0	1	16/08/2018	1	1	1	1
2	17	2° S	2-2°S-17	0	1	16/08/2018	1	0	1	0
2	18	2° S	2-2°S-18	0	1	16/08/2018	1	0	1	0
2	19	2° S	2-2°S-19	0	1	16/08/2018	1	0	1	1
2	20	2° S	2-2°S-20	0	1	16/08/2018	1	1	1	1
2	21	3° S	2-3°S-21	0	1	23/08/2018	1	1	1	1
2	22	3° S	2-3°S-22	0	1	23/08/2018	1	1	1	1
2	23	3° S	2-3°S-23	0	1	23/08/2018	1	1	1	1
2	24	3° S	2-3°S-24	0	1	23/08/2018	1	1	1	1
2	25	3° S	2-3°S-25	0	1	23/08/2018	1	0	1	0
2	26	3° S	2-3°S-26	0	0	-	0	0	1	0
2	27	3° S	2-3°S-27	0	1	23/08/2018	1	0	1	0
2	28	3° S	2-3°S-28	0	1	23/08/2018	1	0	1	1
2	29	3° S	2-3°S-29	0	0	-	0	0	0	0
2	30	3° S	2-3°S-30	0	1	23/08/2018	1	1	1	0
3	1	1° S	3-1°S-1	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	2	1° S	3-1°S-2	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	3	1° S	3-1°S-3	1	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	4	1° S	3-1°S-4	0	1	07/09/2018	1	1	1	0
3	5	1° S	3-1°S-5	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	6	1° S	3-1°S-6	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	7	1° S	3-1°S-7	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	8	1° S	3-1°S-8	0	1	07/09/2018	1	1	1	0
3	9	1° S	3-1°S-9	0	1	07/09/2018	1	1	1	0
3	10	1° S	3-1°S-10	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	11	2° S	3-2°S-11	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	12	2° S	3-2°S-12	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	13	2° S	3-2°S-13	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	14	2° S	3-2°S-14	0	1	07/09/2018	1	0	1	0
3	15	2° S	3-2°S-15	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	16	2° S	3-2°S-16	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	17	2° S	3-2°S-17	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	18	2° S	3-2°S-18	0	1	07/09/2018	1	0	1	1
3	19	2° S	3-2°S-19	1	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	20	2° S	3-2°S-20	1	1	07/09/2018	1	0	1	1

3	21	3° S	3-3°S-21	0	1	07/09/2018	1	1	1	1
3	22	3° S	3-3°S-22	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	23	3° S	3-3°S-23	0	1	07/09/2018	1	0	1	1
3	24	3° S	3-3°S-24	0	1	07/09/2018	1	0	1	1
3	25	3° S	3-3°S-25	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	26	3° S	3-3°S-26	0	0	07/09/2018	1	0	1	1
3	27	3° S	3-3°S-27	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	28	3° S	3-3°S-28	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	29	3° S	3-3°S-29	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
3	30	3° S	3-3°S-30	0	1	07/09/2018	1	0	1	1
4	1	1° S	4-1°S-1	0	0	07/09/2018	0	0	0	0
4	2	1° S	4-1°S-2	0	1	07/09/2018	1	1	1	0
4	3	1° S	4-1°S-3	0	1	07/09/2018	1	1	1	0
4	4	1° S	4-1°S-4	0	1	07/09/2018	1	1	1	0
4	5	1° S	4-1°S-5	0	1	11/09/2018	1	1	1	0
4	6	1° S	4-1°S-6	0	0	11/09/2018	1	0	0	0
4	7	1° S	4-1°S-7	0	1	11/09/2018	1	0	1	0
4	8	1° S	4-1°S-8	0	1	11/09/2018	1	1	1	0
4	9	1° S	4-1°S-9	1	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	10	1° S	4-1°S-10	0	1	11/09/2018	1	1	1	0
4	11	2° S	4-2°S-11	0	1	11/09/2018	1	0	0	0
4	12	2° S	4-2°S-12	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	13	2° S	4-2°S-13	0	1	11/09/2018	1	1	1	0
4	14	2° S	4-2°S-14	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	15	2° S	4-2°S-15	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	16	2° S	4-2°S-16	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	17	2° S	4-2°S-17	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	18	2° S	4-2°S-18	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	19	2° S	4-2°S-19	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	20	2° S	4-2°S-20	0	1	11/09/2018	1	0	1	0
4	21	3° S	4-3°S-21	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	22	3° S	4-3°S-22	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	23	3° S	4-3°S-23	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	24	3° S	4-3°S-24	0	0	11/09/2018	0	0	0	0
4	25	3° S	4-3°S-25	0	1	12/09/2018	1	0	0	0
4	26	3° S	4-3°S-26	0	0	12/09/2018	0	0	0	0
4	27	3° S	4-3°S-27	0	0	12/09/2018	0	0	0	0
4	28	3° S	4-3°S-28	0	0	12/09/2018	0	0	0	0
4	29	3° S	4-3°S-29	0	0	12/09/2018	0	0	0	0
4	30	3° S	4-3°S-30	1	1	12/09/2018	1	0	0	0