



Detección de toxinas A y B intracelulares en genotipos epidémicos de *Clostridioides difficile*

Detection of intracellular toxins A and B in epidemic genotypes of *Clostridioides difficile*

Iveth Jiménez-Badilla*

Carlos Quesada-Gómez††

Resumen

Introducción: *Clostridioides difficile* es el principal causante de diarrea de origen nosocomial y asociada al uso de antibióticos a nivel mundial; sus principales factores de virulencia son las toxinas A y B (TcdA y TcdB). En los últimos años se ha dado el surgimiento de cepas con virulencia incrementada y responsables de brotes epidémicos caracterizadas dentro del genotipo NAP1/RT027. Estas cepas exhiben una mayor secreción de toxinas y presentan altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas. El primer informe de brotes epidémicos por estas cepas en América Latina, fue hecho en Costa Rica, donde también se describió un genotipo autóctono clasificado como NAP_{CR1}/RT019, que presentó una virulencia incrementada pero sin sobresecreción de toxinas.

Métodos: se obtuvo lisados celulares de aislamientos clínicos de los genotipos NAP1/RT027, NAP_{CR1}/RT019 y NAP4/RT014 para la detección de TcdA y TcdB intracelular por medio de *Western Blot*. Además, se realizó un ensayo de citotoxicidad en cultivo celular para evaluar el nivel y la actividad biológica de la TcdB detectada en los lisados. Lo anterior en diferentes tiempos del crecimiento *in vitro* de las bacterias.

Resultados: en los lisados celulares se detectó TcdA en todos los genotipos estudiados y TcdB solamente en NAP1/RT027. La mayor señal detectada para ambas toxinas fue en la cepa NAP1/RT027 a las 24 y 48 horas de crecimiento. En cultivo celular predominó una mayor actividad citotóxica de TcdB producida por NAP1/RT027, seguida por el genotipo NAP_{CR1}/RT019 y una actividad menor en NAP4/RT014.

Conclusiones: La detección de una mayor cantidad y actividad de toxinas a nivel intracelular en la cepa epidémica NAP1/RT027 se correlaciona con reportes anteriores sobre hiperproducción de toxinas por este genotipo. Se comprueba que una cepa con virulencia incrementada como NAP_{CR1}/RT019 no sobreproduce toxinas, lo cual también concuerda con reportes de la detección de toxinas a nivel extracelular. Este estudio presenta información importante acerca de metodologías que permiten la detección de toxinas en lisados de *C. difficile* y contribuye a la discusión sobre las diferencias en la producción de toxinas según los genotipos de este patógeno.

Palabras clave: *Clostridioides difficile*, toxinas, intracelular, NAP1/RT027.

* Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica.

† Contacto: carlos.quesada@ucr.ac.cr

Recepción: 14/08/2020. Aceptación: 18/12/2020

Cómo citar este artículo: Jiménez-Badilla I, Quesada-Gómez C. Detección de toxinas A y B intracelulares en genotipos epidémicos de *Clostridioides difficile*. Hechos Microbiol. 2021;12(1):11-17. DOI: 10.17533/udea.hm.v12n1a02

Abstract

Introduction: *Clostridioides difficile* is the world's leading cause of hospital-acquired diarrhea due to antibiotic use, with toxins A and B (TcdA and TcdB) as the main virulence factors. In recent years, there has been an emergence of strains with increased virulence, characterized as genotype NAP1/RT027, which are responsible for epidemic outbreaks. These strains exhibit a higher toxin secretion and high fluoroquinolone resistance. The first report of epidemic outbreaks due to these strains in Latin America was described in Costa Rica, where an autochthonous genotype was also described and classified as NAP_{CR1}/RT019. This genotype showed increased virulence but no toxin oversecretion.

Methods: Cell lysates from clinical isolates of NAP1/RT027, NAP_{CR1}/RT019, and NAP4/RT014 genotypes were obtained and intracellular TcdA and TcdB were detected by Western Blot (WB). In addition, a cell culture cytotoxicity assay was performed to evaluate the level and biological activity of TcdB in those lysates. This was performed at different times on the *in vitro* bacterial growth.

Results: TcdA was detected in the cell lysates of all study genotypes and TcdB was detected only in NAP1/RT027 by WB. The highest TcdA and TcdB signal was detected in NAP1/RT027 at 24 and 48 hours of growth. On cell culture, the predominant cytotoxic activity was due to TcdB produced by NAP1/RT027, followed by NAP_{CR1}/RT019 and a lower activity in NAP4/RT014.

Conclusions: The detection of a higher amount and activity of intracellular toxins in the epidemic strain NAP1/RT027 correlates with previous reports of toxin overproduction by this genotype. It was proved that a strain with increased virulence, such as NAP_{CR1}/RT019 does not overproduce toxins. This also correlates with reports of extracellular toxin detection. This study presents important information about methodologies for toxin detection on *C. difficile* lysates and contributes to the discussion on the differences in toxin production according to this pathogen's genotypes.

Keywords: *Clostridioides difficile*, toxins, intracellular, NAP1/RT027.

Introducción

Clostridioides difficile es la principal causa de diarrea asociada a la atención en salud en adultos; las infecciones por esta bacteria pueden presentarse en un espectro desde asintomático, diarrea y hasta una colitis pseudomembranosa fulminante, asociados al consumo de antibióticos. Pueden presentarse complicaciones, como megacolon tóxico y perforación intestinal.¹ La mayoría de los aislamientos de *C. difficile* producen una o dos toxinas, TcdA y TcdB, las cuales son consideradas los principales factores de virulencia. Estas toxinas entran en las células epiteliales intestinales y glicosilan varias familias de GTPasas monoméricas, lo que conduce a la despolimerización de la actina con la pérdida de la arquitectura celular, destrucción de las vellosidades y una respuesta inflamatoria de la mucosa.² Los genes que codifican las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*) se encuentran en un locus de patogenicidad (PaLoc), que también incluye los genes *tcdR* (un factor sigma que regula positivamente la transcripción de los genes de las toxinas), *tcdE* (posiblemente codifica para una hollina) y *tcdC* (regulador negativo potencial de la expresión de *tcdA* y *tcdB*).³ Algunos estudios han informado que las deleciones en *tcdC* favorecen la hipersecreción de TcdA y TcdB, sin embargo aún es controversial debido a trabajos que afirman lo contrario.^{4,5} Algunas otras cepas de *C. difficile* producen una tercera toxina, conocida como toxina binaria (CDT), que está en otro locus llamado CdtLoc.⁶

En los últimos años se ha reportado un aumento en la incidencia y severidad de casos de infección por *C. difficile* (ICD) en la comunidad y casos en personas antes consideradas fuera de riesgo.⁷ Además, se ha dado la aparición de cepas más virulentas y epidémicas; la principal ha sido caracterizada como PFGE tipo NAP1 (North - American pulsotype 1) o ribotipo PCR 027 (genotipo NAP1/RT027).^{8,9} Estas cepas han sido aisladas desde el 2003 en brotes alrededor del mundo.^{10,11} Además, el primer informe de brotes epidémicos por esta cepa en América Latina fue en Costa Rica.¹² Las cepas del genotipo NAP1/RT027 secretan TcdA, TcdB y CDT; además, presentan una mutación de 18 pb en *tcdC*, que se ha asociado con la hipersecreción de toxinas y explica en parte la virulencia incrementada de este genotipo epidémico.¹³

Durante el primer brote reportado en América Latina, también se logró identificar un genotipo nuevo que fue aislado con similar frecuencia que NAP1/RT027, el cual fue clasificado como NAP_{CR1}/RT019.¹⁴ Este genotipo autóctono compartió varias características con las cepas epidémicas NAP1/RT027, tales como: altas tasas de recurrencia y mortalidad, resistencia a diferentes antibióticos (principalmente a las fluoroquinolonas), la misma delección en el gen regulador *tcdC* y mutaciones en el gen *gyrA*. Sin embargo, no presentaba una sobresecreción de toxinas.¹⁴

El conocimiento de los mecanismos involucrados en la secreción de las toxinas de *C. difficile* al exterior es poco conocido, por lo que se ha sugerido que diferentes isoformas de la proteína TcdE están involucradas en la secreción de toxinas de *C. difficile*.¹⁵ Adicionalmente, existe un conocimiento limitado del estado de las toxinas a nivel intracelular antes de ser secretadas por cepas bacterianas relacionadas con brotes epidémicos. En el presente trabajo se compara la presencia y la actividad de TcdA y TcdB a nivel intracelular de tres genotipos (dos de los cuales están involucrados en brotes epidémicos), con el objetivo de aportar al conocimiento de los mecanismos de producción y secreción de toxinas para un mejor entendimiento de su patogénesis.

Materiales y métodos

DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS DEL ESTUDIO

Se utilizaron tres aislamientos clínicos pertenecientes a los genotipos NAP1/RT027, NAP_{CR1}/RT019 y NAP4/RT014 de *C. difficile* y una cepa de referencia no toxigénica (ATCC[®] 700057). Los dos primeros fueron los responsables de un brote epidémico a nivel hospitalario en Costa Rica. El primero es conocido históricamente como hipervirulento, el segundo autóctono y el último es un genotipo que se aísla frecuentemente.¹⁴

DETECCIÓN DE TOXINAS EN LOS LISADOS CELULARES

Las bacterias fueron inoculadas en agar Brucella (BD BBL[®]) con 5% de sangre lisada de caballo (Oxoid[®]) y vitamina K (Sigma[®]) y se incubaron 24 horas, a 37°C, en cámara de anaerobiosis (90% N₂, 5% CO₂ y 5%

H₂, Bactron II ShellLab[®]). Cuatro colonias fueron introducidas en caldo TYT (3% tripticasa peptona (BD BBL[®]), 2% de extracto de levadura y 0,1% tioglicolato de sodio [(Sigma[®]), pH 7.2] para realizar los recuentos de bacterias viables a través del tiempo, incubando en las mismas condiciones de anaerobiosis. A partir de este medio se tomó 1 mL del cultivo de cada bacteria en los siguientes tiempos: 0, 4, 8, 24 y 48 horas para la obtención de los lisados y posterior detección de las toxinas.

Las alícuotas obtenidas en cada punto de la curva de crecimiento se centrifugaron por 15 min a 22.000 g a 4 °C, eliminando los sobrenadantes. Los sedimentos celulares remanentes se lavaron en PBS 1X y se concentraron en buffer de lisis 2X (Tris-HCl 100 mM a pH 6.8, 2% SDS, 23% de glicerol) y después de 1 h se calentaron a 100 °C para promover la lisis celular. Finalmente, fueron centrifugados para sedimentar los restos celulares y esta vez extraer los sobrenadantes obtenidos, los cuales fueron utilizados para la detección de las toxinas A y B.

Se efectuó la cuantificación de proteínas totales de los lisados mediante el ensayo DCTM Protein Assay (BioRad[®]). Luego, a 20 µg de proteínas totales se agregó buffer de carga (Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, 10% SDS, 87% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 2% azul de bromofenol) y así separar las proteínas de los lisados por medio de un SDS-PAGE reductor al 7.5% de poliacrilamida. Finalmente, se realizó la electrotransferencia a membranas de PVDF para la detección de las toxinas A y B en los lisados citoplasmáticos mediante Western Blot. Las toxinas se detectaron con los anticuerpos monoclonales anti-TcdA (TTC8, tgcBIOMICS[®]) y anti-TcdB (2CV, tgcBIOMICS[®]), respectivamente. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y conjugado con peroxidasa (Invitrogen[®]). Después se reveló con el kit Lumi-Light^{PLUS} (Roche[®]) y se fotodocumentó con el ChemiDoc XRS (BioRad[®]). Como controles se emplearon los lisados bacterianos de la cepa no toxigénica de *C. difficile* (ATCC[®] 700057).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TcdB POR ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Para obtener los lisados bacterianos de *C. difficile* para inocular en el cultivo celular, se centrifugaron alícuotas del cultivo bacteriano en medio TYT incubadas

por 24 horas; estas se centrifugaron a 15.000 g por 40 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, los sedimentos se lavaron 6 veces con PBS 1X y por último se resuspendieron en PBS 1X con inhibidores de proteasas cOmplete Mini EDTA-free (Roche®) al 0.1% (aprotinina 0.03 µM, AEBSF 0.2 mM, E-64 1.4 µM, leupeptina 0.1 µM, PMSF). Las muestras de cada cepa fueron lisadas en frío mediante sonicación con un protocolo de 1 ciclo de 1 minuto, seguido de 7 ciclos de 30 segundos a una amplitud de 50% (Misonix®). Posteriormente, estos lisados fueron centrifugados y los sobrenadantes utilizados para el análisis en cultivo celular.

Los lisados obtenidos de cada cepa fueron inoculados en diluciones seriadas en las monocapas de cultivo de células HeLa, las cuales se mantuvieron en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino (Sigma®). Las células fueron monitoreadas para identificar la aparición del efecto citopático (el cual se caracteriza porque la célula toma una forma redonda), mediante microscopía óptica.¹⁶ A las 24 horas de incubación, se determinó el nivel de citotoxicidad de cada lisado y se expresó como el inverso de la dilución en donde los lisados causaban el 50% del efecto citopático en la monocapa (CPE_{50%}). Como control se utilizó el lisado de una cepa no toxigénica de *C. difficile* (ATCC® 700057), el PBS en el que estaban resuspendidas las bacterias antes de ser lisadas y la proteína TcdB pura (TechLab®). Además, se realizaron ensayos de neutralización en cultivo celular con un anticuerpo monoclonal anti-TcdB (TechLab®), para determinar que el efecto citopático observado fuera producido por esta toxina.¹⁷

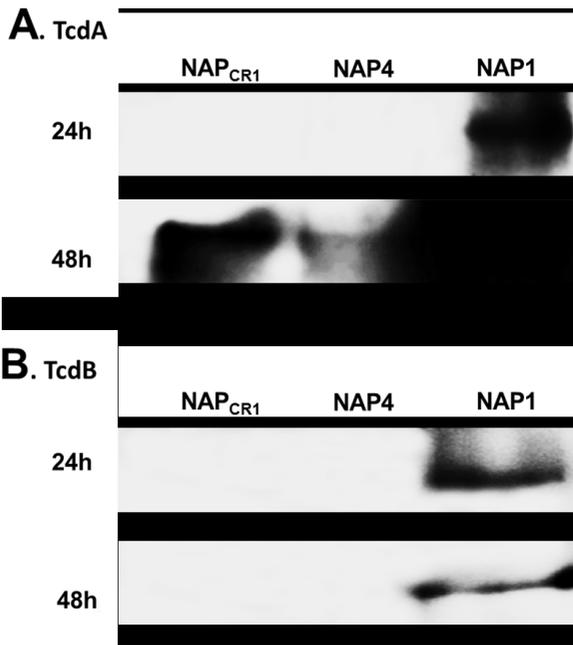
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados se emplearon los programas SPSS statistics versión 25, para lo cual se aplicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la hipótesis de normalidad y las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney para la comparación de los resultados. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor *p* menor a 0,05.

Resultados

TcdA y TcdB SE DETECTARON A NIVEL INTRACELULAR Y EN MAYOR CANTIDAD EN EL GENOTIPO NAP1/RT027

Las toxinas TcdA y TcdB se detectaron en los distintos tiempos de la curva de crecimiento a partir de los lisados de los genotipos estudiados. A las 24 horas de crecimiento fue posible detectar bandas proteicas correspondientes a TcdA únicamente en el genotipo NAP1/RT027, mientras que no se detectó señal en los genotipos NAP4/RT014 y NAP_{CR1}/RT019. A las 48 horas fue posible detectar TcdA en todos los genotipos, notándose una mayor intensidad en las proteínas detectadas en NAP1/RT027, seguida de NAP_{CR1}/RT019 y una banda proteica de mucha menor intensidad en NAP4/RT014 (Fig. 1A). De manera similar, al realizar la detección de TcdB a las 24 horas, se observó señal únicamente en el genotipo NAP1/RT027, mientras que a las 48 horas se observó el mismo patrón que el observado a las 24 horas (Fig. 1B). No se detectó ninguna señal de toxinas a las 0, 4 y 8 horas de crecimiento, ni en los lisados de la cepa no toxigénica (datos no mostrados).



LA ACTIVIDAD DE TcdB INTRACELULAR FUE MAYOR EN LOS LISADOS DEL GENOTIPO NAP1/RT027

En todos los tiempos (4, 8, 24 y 48 h de crecimiento) analizados predominó una mayor actividad citotóxica del genotipo NAP1/RT027, la cual fue significativamente diferente a los otros genotipos para los lisados bacterianos de 24 y 48 h (Fig. 2). Además, los lisados bacterianos de 24 h de crecimiento presentaron la máxima citotoxicidad de todos los genotipos. De manera interesante, se observó una disminución significativa de la actividad de los lisados de NAP1/RT027 a las 48 horas. Al inocular el contenido de los lisados bacterianos de cada tiempo y cepa en estudio junto con un antisero específico anti-TcdB (TechLab®) fue posible neutralizar el efecto citopático sobre las células HeLa, demostrándose que el efecto citopático observado se debía a la actividad de la toxina B sobre el cultivo celular que estaba contenida en los lisados bacterianos.

Figura 1. Detección de las toxinas A y B intracelulares de diferentes genotipos de *C. difficile*. Las proteínas obtenidas de los lisados de las bacterias en los tiempos indicados de la curva de crecimiento fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 7.5%; después, electrotransferidas a membranas de PVDF y detectadas con anticuerpos monoclonales contra la toxina A (A) y la toxina B (B).

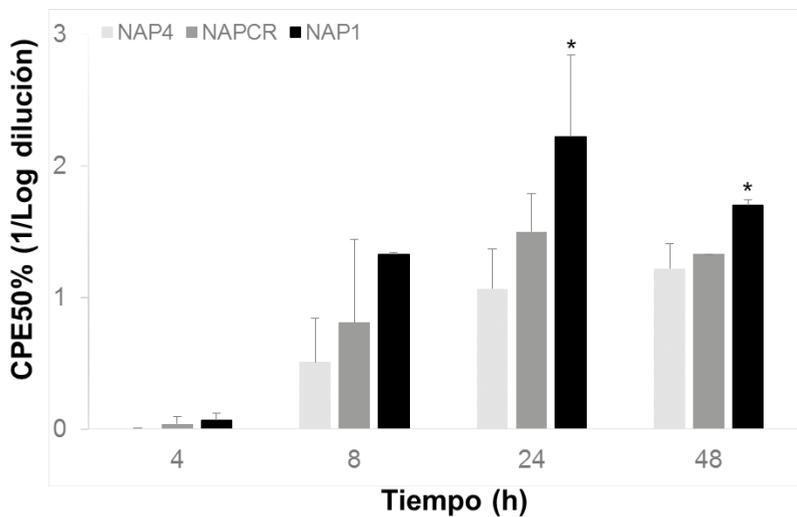


Figura 2. Cuantificación de la toxina B intracelular de diferentes genotipos de C. difficile. Lisados bacterianos de diferentes puntos de la curva de crecimiento *in vitro* fueron titulados en diluciones decimales en monocapas de células HeLa. Después de 24 horas de la intoxicación de las células con cada lisado, se determinó la dilución que causaba un efecto citopático en el 50% de la monocapa celular, por examinación visual mediante un microscopio de campo claro invertido. Cada barra representa el CPE_{50%} de cada lisado en cada tiempo de la curva de crecimiento. **P*<0.05 (Kruskall-Wallis seguido de pruebas de U Mann-Whitney para cada uno de los grupos).

Discusión

La cantidad de TcdA y TcdB detectada en NAP1/RT01 a nivel intracelular fue mayor que para los otros genotipos, lo cual concuerda con los reportes que establecen que este genotipo es hipersecretor de toxinas.¹⁸ Se determinó que la cantidad de toxinas en los lisados de *C. difficile* aumenta conforme las células entran en la fase estacionaria, cerca de las 24 horas de crecimiento.

En este estudio, específicamente para TcdB, se detectó la toxina en el aislamiento clínico del genotipo NAP1/RT027 por medio de Western Blot, lo cual concuerda con los reportes previos de que este genotipo no solo es hipersecretor de esta toxina sino que esta es detectable en tiempos inferiores a las 48 horas del crecimiento bacteriano.¹⁹

En cuanto a NAP4/RT014 y NAP_{CR1}/RT019, ambos genotipos mostraron la presencia de TcdA a partir de las 48 horas a nivel intracelular, mientras que en estudios a nivel extracelular TcdA fue débilmente detectable desde las 8 horas en NAP4/RT014 y desde las 24 horas en NAP_{CR1}/RT019, con aumento en las concentraciones a las 48 horas.¹⁴

En todos los tiempos analizados, en cultivo celular, predominó una mayor actividad citotóxica por parte de NAP1/RT027, seguido del genotipo NAP_{CR1}/RT019 y una actividad menor en NAP4/RT014. La citotoxicidad fue significativa, a partir de las 8 horas, en las tres cepas analizadas, observándose la mayor actividad a las 24 horas de crecimiento. Lo anterior ha sido demostrado también a nivel genético, donde al cuantificar los ARNs mensajeros de *tcdB* en estos tres genotipos (a las 4, 8, 24 y 48 horas), la señal siempre fue mayor para NAP1/RT027.^{14,20}

Por lo tanto, la técnica de Western Blot (WB) podría tener una sensibilidad menor, en este estudio, que los ensayos de citotoxicidad y de ahí el hecho que no se detecte TcdB pero se logren determinar efectos citopáticos en el cultivo celular. No obstante, siendo el WB menos sensible, se consiguió detectar una buena señal de las toxinas para NAP1/RT027, lo cual lleva a pensar que hay presencia de una considerable cantidad de toxina en los lisados bacterianos.

Por otro lado, previamente se demostró que a nivel extracelular se detecta una mayor cantidad de toxina para NAP1/RT027, lo que podría implicar que

este genotipo también presenta un evento de secreción aumentada.^{18,21} La secreción de TcdA y TcdB sigue siendo un proceso desconocido en *C. difficile*, dado que estas proteínas no presentan ningún péptido señal aparente o señal de secreción reconocible, y la lisis bacteriana no parece explicar la liberación de toxinas. Se han propuesto varios modelos para la secreción de toxinas dependiente de TcdE.¹⁵ Si las toxinas son secretadas en un estado no plegado, posiblemente a través de secreción traduccionalmente acoplada, solo se necesitaría un canal estrecho en la membrana citoplasmática y este no permitiría el escape de proteínas citoplasmáticas.^{15,21} Por lo tanto, la mayor detección de toxinas en NAP1/RT027 a nivel intracelular observada en el presente estudio, no estaría dada por una deficiencia o baja en la secreción dado que a nivel extracelular es posible detectar mayores cantidades de toxinas que otros genotipos. Lo anterior llevaría a pensar que en NAP1/RT027 se podría estar presentando una expresión de diferentes isoformas de TcdE²¹ o bien por otros mecanismos de secreción a explorar que expliquen que no existe un efecto acumulativo de la toxina a nivel intracelular.

Por otro lado, a pesar de que el genotipo NAP_{CR1}/RT019 fue uno de los responsables de un brote epidémico en un hospital y presenta una virulencia aumentada, se comprueba que es una cepa a la cual se le detecta menos toxinas intracelulares en comparación con la cepa clásica epidémica NAP1/RT027.¹⁴

Conclusiones

En el presente trabajo, se logró determinar que existen diferencias en la sensibilidad de las metodologías utilizadas para la detección de las toxinas de *C. difficile* a nivel intracelular. Los resultados aquí obtenidos podrán ser aplicados en otros estudios donde se busque evaluar la presencia de toxinas en lisados celulares de otras cepas de *C. difficile* y así conseguir una mejor caracterización de un amplio y diverso número de genotipos de este patógeno. Además, este trabajo contribuye con una evidencia más de que los diversos genotipos de *C. difficile* tienen diferentes capacidades de producir toxinas, lo que eventualmente podría estar relacionado con una mayor virulencia.

Conflicto de interés

Los autores declaran la inexistencia de conflicto de intereses en el desarrollo del presente trabajo.

Referencias

- Slimings C, Riley T.** Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: Update of systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:881–891.
- Voth D, Ballard J.** *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:247–263.
- Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C.** Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem.* 1997;244:735–742.
- Matamouros S, England P, Dupuy B.** *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol.* 2007;64(5):1274–1288.
- Cartman ST, Kelly ML, Heeg D, Heap J, Minton N.** Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:4683–4690.
- Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK.** *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes.* 2012;121e134.
- Søes L, Holt H, Böttiger B, Nielsen H, Andreasen V, Kemp M, et al.** Risk factors for *Clostridium difficile* infection in the community: a case-control study in patients in general practice, Denmark, 2009–2011. *Epidemiol Infect.* 2013;2:27,1–12.
- Cartman S, Heap J, Kuehne S, Cockayne A, Minton NP.** The emergence of “hypervirulence” in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:387e395
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, et al.** Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet.* 2005;366:1079e1084.
- Collins D, Hawkey P, Riley T.** Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2013;2:21.
- McDonald C, Killgore G, Thompson A, Owens R, Kazakova S, Sambol S, et al.** An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2005;353:2433e2441,
- Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado M, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, et al.** Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *J Clin Microbiol.* 2010;48:669–670.
- Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan V, Johnson S, et al.** Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *J Bacteriol.* 2010;192:4904–4911
- Quesada-Gómez C, López-Ureña D, Acuña-Amador L, Villalobos Zúñiga M, Du T, Freire R, et al.** Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1216–1226
- Govind R, Dupuy B.** Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathogens.* 2012;8(6), 1–14.
- Lyras D, O’Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, et al.** Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature.* 2009;458(7242):1176–9.
- Murray R, Boyd D, Levett PN, Mulvey MR, Alfa MJ.** Truncation in the *tcdC* region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC Infectious Diseases.* 2009;9:103.
- Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S.** *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology.* 2008;57:685–689.
- Quesada-Gómez C, López-Ureña D, Chumbler N, Kroh HK, Castro-Peña C, Rodríguez C, et al.** Analysis of TcdB proteins within the hypervirulent clade 2 reveals an impact of RhoA glucosylation on *Clostridium difficile* proinflammatory activities. *Infect Immun.* 2016;84:856–865.
- Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C.** Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem.* 1997;244:735–742.
- Govind R, Fitzwater L, Nichols R.** Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion. *J Bacteriol.* 2015;197:2600–2609