

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

***Clostridium difficile*: padronização e avaliação de métodos de diagnóstico, ocorrência em seres humanos e animais e desenvolvimento de um modelo experimental em hamsters**

Rodrigo Otávio Silveira Silva

BELO HORIZONTE – MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2014

Rodrigo Otávio Silveira Silva

***Clostridium difficile*: padronização e avaliação de métodos de diagnóstico, ocorrência em seres humanos e animais e desenvolvimento de um modelo experimental em hamsters.**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato
Co-orientador: Prof. Dr. Roberto M. Carvalho Guedes

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2014

S586c Silva, Rodrigo Otávio Silveira, 1985-
Clostridium difficile: padronização e avaliação de métodos de diagnóstico, ocorrência em seres humanos e animais e desenvolvimento de um modelo experimental em hamsters / Rodrigo Otávio Silveira Silva. – 2014.

205 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Co-orientador: Roberto M. Carvalho Guedes

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Clostridium difficile – Teses. 2. Toxinas bacterianas – Teses. 3. Fezes – Exame – Teses. 4. Hamster como Animal de laboratório – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 616.931

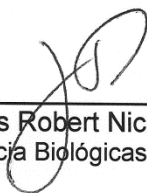
Tese defendida e aprovada em 17 de janeiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



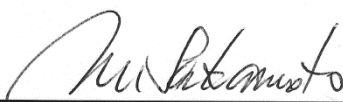
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente - Orientador



Prof. Maristela Silveira Palhares
Escola de Veterinária da UFMG



Prof. Jacques Robert Nicoli
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG



Prof. Sidnei Myoshi Sakamoto
Universidade Federal Rural do Semiárido - RN



Dr. Antônio Augusto Fonseca Jr.
Laboratório Nacional Agropecuário/LANAGRO

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, a minha irmã, amigos e familiares que
me apoiaram durante essa jornada*

"Education is the most powerful weapon which you can use to change the world"

Nelson Mandela (1918-2013)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e a minha irmã, pelo apoio incondicional. Ao meu pai, pelo exemplo de garra.

Aos meus amigos Gabriel Furtado, Alessandra Dias, Filipe Silvano e Rachel Maia que, muitas vezes sem perceber, me fazem perseverar.

Aos meus primos e amigos Paulo França, Paulo Fernando e Gustavo Silva. Aos meus avós Maria, Marta, Ostiana e França.

A todos amigos da *Tasingegade 29* e tantos outros que conheci durante o período em Copenhagen, em especial ao Phillip R., Marta Merino, Katie Hofstchen, Zlatko e Girhidar.

À Gry Persson e ao Prof. Anders Miki Bojesen, da *University of Copenhagen*.

À Ida Just, pelo acolhimento, paciência e carinho.

À Profa Maja Rupnik e toda sua equipe da *Public Health Institut Maribor* (Eslovênia).

Aos parceiros do ICB-UFMG Dra. Marcelle Almeida, Dra. Flávia Siqueira e Prof Evanguedes Kalapothakis.

Aos parceiros da Clínica de Pequenos Animais da UFMG, em especial a Silvia Trindade e Marina Coroa.

Aos pessoal da Clínica de Equinos: Jackeline Resende, Felipe Moreira, Ana Luisa e Profa Renata Maranhão. Um agradecimento especial a Profa Maristela Palhares que tanto me incentivou durante o doutorado.

Ao Prof Márcio Garcia Ribeiro, da UNESP-Botucatu.

Aos parceiros e colegas veterinários que se dedicam aos animais silvestres: Mirella D'Ellia, Francisco Ferreira e Marcus Romero.

Cláudia Pimenta, Ana Flávia Michel, Amanda Vasconcellos, Eliana Paladino pelo apoio, conselhos e, principalmente, pelo carinho.

Dr. Andrea Blanc, da University of the Republic (Uruguai), Prof Marcos Bryian e Profa Danielle Magalhães.

Às empresas Medivax, Alere e Vencofarma, apoiadores do presente projeto.

Prof Roberto Guedes, por toda a ajuda mas, sobretudo, por sua contagiante empolgação com o meio acadêmico.

Aos patologistas Michelle Gabardo e Profa. Rosenele Ecco pelas discussões valiosas durante a execução do projeto.

Ao pessoal do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-Pedro Leopoldo, MG), em especial ao Dr. Ronnie Antunes de Assis e Dr. Antônio Augusto Fonseca Junior.

Ao Prof Dr. Eduardo Garcia Vilela e a todos os residentes do Hospital das Clínicas da UFMG que acreditaram no projeto e doaram seu tempo para sua execução. É indispensável também agradecer aos pacientes que voluntariamente aceitaram participar do estudo.

Aos órgãos de fomento que tornaram possível a execução desse projeto de doutorado: CNPq, Fapemig, CAPES (em especial á bolsa de doutorado sanduíche) e INCT-Pecuária.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios da UFMG: Prhiscylla Sadanã, Carlos Oliveira, Felipe Masiero, Luciana Aramuni, Bruna Alves, Laura Bernardes, Amanda Diniz, Isabella Moreira, Guilherme Guerra, Lucas Queiroz.

A todos os colegas e vizinhos de laboratório do DMVP, em especial a Ana Carolina Diniz e Profa Zélia Lobato.

E finalmente ao Prof Francisco Lobato pela orientação acadêmica e, ainda mais importante, pelo apoio, paciência e conselhos fraternais no dia-a-dia.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	16
3. LITERATURA CONSULTADA	16
3.1 Histórico.....	16
3.2 Patogenia.....	17
3.3 A Doença Em Seres Humanos	18
3.3 A Doença Em Animais Domésticos	20
3.3.1 Suínos	20
3.3.2 Equinos.....	22
3.3.3 Cães	22
3.4 <i>Clostridium difficile</i> como agente zoonótico	23
3.5 Diagnóstico	24
3.5.1 Detecção das toxinas	24
3.5.2 Isolamento e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	25
3.6 Tratamento e controle	27
4. CAPÍTULO 1: Padronização e avaliação de métodos de diagnóstico para	
infecção por <i>Clostridium difficile</i>	35
4.1 Padronização da soroneutralização celular para detecção das toxinas A/B de <i>Clostridium</i>	
<i>difficile</i> em fezes.	35
4.2 Avaliação de kits comerciais de ELISA e da cultura toxigênica frente a citotoxicidade	
celular para o diagnóstico de <i>C. difficile</i> em suínos e equinos.	42
4.3 Avaliação de kits comerciais de ELISA para o diagnóstico de infecção por <i>Clostridium</i>	
<i>difficile</i> em pacientes internados no Hospital das Clínicas da UFMG.	50
5. CAPÍTULO 2: Ocorrência da infecção por <i>Clostridium difficile</i>	59
5.1 Detecção das toxinas A/B e isolamento de <i>Clostridium difficile</i> em potros diarreicos e	
saúdáveis.	59
5.2 Isolamento de <i>Clostridium difficile</i> de fezes de espécies de carnívoros silvestres no Brasil.	
.....	65
5.3 Surto de diarreia por <i>Clostridium difficile</i> em uma granja de suínos no Brasil	69
5.4 Primeiro relato de diarreia por <i>Clostridium difficile</i> em potros no Brasil.....	74
5.5 Diarreia por <i>Clostridium difficile</i> associada a candidíase em um potro.....	78
5.6 Diarreia por <i>Clostridium difficile</i> em uma jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	84
5.7 Susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de animais e	
seres humanos no Brasil.	89
5.8 Ribotipagem de estirpes de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de seres humanos e animais no	
Brasil.	96
6. CAPÍTULO 3: Desenvolvimento de um modelo de infecção por <i>Clostridium</i>	
<i>difficile</i> em hamsters sírios (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	103
COMENTÁRIOS FINAIS.....	113
PESPECTIVAS FUTURAS.....	113
CONCLUSÕES.....	114
ANEXOS: Versão original dos artigos publicados.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection
BHI – “*Brain Heart Infusion*” ou meio Infusão-Cérebro-Coração
BID – “*bis in die*”, ou administração duas vezes ao dia
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCFA - Ágar Cicloserina-Cefoxitina-Fructose
CDI – *Clostridium difficile* infection.
CETEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEUA - Comissão de Ética em Experimentação Animal
CHO – Linhagem celular “*Chinese Hamster Ovary*”
CIM - Concentração inibitória mínima
CLSI – “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRAS - Centro de Reabilitação de Animais Silvestres
CTA – “*Cell cytotoxicity assay*”
CTAm - CTA em células em monocamada
CTAn – CTA em células não-aderidas (ou em suspensão)
DL50 - Dose letal para 50%
DMM - Dose mínima mortal
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EC/ml – Efeito citotóxico por mililitro
ELISA - “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”
EUA – Estados Unidos da América
FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais
HCUFMG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HE – Coloração com hematoxilina e eosina
HV - Hospital Veterinário
ICD - Infecções por *C. difficile*
IM – Via de inoculação intramuscular
kDa – Quilodaltons
MEM – Meio essencial mínimo
MIC – *Minimal inhibitory concentration*
NAAT - *Nucleic acid amplification test* ou testes de amplificação de ácidos nucleicos
NIBSC – *National Institute for Biological Standards and Control*
PAS - Coloração Ácido Periódico-Schiff
PCR – “*Polimerase chain reaction*” ou Reação em cadeia da polimerase
PRPq-UFMG – Pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
QD – “*quaque die*” ou administração medicamentosa uma vez ao dia
rPCR – PCR em tempo real
RPM – Rotações por minuto
SFB – Soro fetal bovino
TC – “*Toxigenic culture*” ou cultura toxigênica.
TCCFA – Ágar Cicloserina-Cefoxitina-Fructose suplementado com Taurocolate.
TCCFB - Caldo de cefoxitina-cicloserina suplementado com taurocolate
UFC – Unidades formadoras de colônias
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UI – Unidade Internacional
UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UTIs – Unidades de tratamento intensivo
VERO – Linhagem celular “*African Green Monkey Kidney*”
VPN - Valor preditivo negativo
VPP – Valor preditivo positivo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado de títulos obtidos, em efeito citotóxico por mililitro (EC/ml), no ensaio de citotoxicidade celular em monocamada (CTAm) e em células não-aderidas (CTAn) para amostras de fezes de seres humanos, leitões, hamsters e equinos sabidamente positivas para as toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	39
Tabela 2: Resultados obtidos nos três testes imunoenzimáticos (ELISAs), na cultura toxigênica e no teste de citotoxicidade celular para o diagnóstico da infecção por <i>Clostridium difficile</i> em potros e leitões.....	44
Tabela 3: Comparação de três ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e cultura toxigênica frente a soroneutralização como “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção por <i>Clostridium difficile</i> em leitões.....	44
Tabela 4: Comparação de três ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e cultura toxigênica frente a soroneutralização como “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção por <i>Clostridium difficile</i> em potros.....	45
Tabela 5: Resultados obtidos nos três testes imunoenzimáticos, na cultura toxigênica (TC) e no teste de citotoxicidade celular (CTA) para o diagnóstico da infecção por <i>Clostridium difficile</i> em pacientes internados no Hospital das Clínicas da UFMG.....	52
Tabela 6: Avaliação de três kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) frente a citotoxicidade celular (CTA) e cultura toxigênica (TC) como padrão “ouro” para o diagnóstico de infecção por <i>Clostridium difficile</i> em pacientes do Hospital das Clínicas da UFMG, Brasil, 2013 (n=84).....	52
Tabela 7: Resultados de detecção das toxinas A/B e isolamento de <i>Clostridium difficile</i> de potros diarreicos e não-diarreicos (n=154).....	61
Tabela 8: Número de estirpes de <i>Clostridium difficile</i> utilizadas para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana por espécie e histórico clínico.....	90
Tabela 9: Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml classificação quanto a susceptibilidade antimicrobiana de 54 estirpes de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de fezes de seres humanos e animais.....	90
Tabela 10: Ribotipos, hospedeiro e histórico de estirpes de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de seres humanos e animais no Brasil.....	98
Tabela 11: Identificação, espécie e histórico das estirpes de <i>Clostridium difficile</i> utilizadas para indução experimental em hamsters sírios (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	104
Tabela 12: Ocorrência de diarreia, morte, lesões intestinais e resultado de isolamento e detecção das toxinas A/B por CTA nos grupos inoculados (G1 a G4) e nos grupos controles (C1 e C2) com diferentes estirpes toxigênicas de <i>Clostridium difficile</i>	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** (A) – Coloração de Gram de uma cultura de *Clostridium difficile*. Bastonetes Gram-positivos com esporos. (B) – Detalhe de um esporo subterminal de *C. difficile* ainda com o corpo celular. (C) – Leitão: edema de mesocolon em um leitão acometido por *C. difficile*. (D) – Leitão. Colon. Redução severa das células caliciformes e enterite neutrofílica necrozante com intensa infiltração de neutrófilos da lamina própria para o lumen intestinal (400X). Figuras 1C e 1D foram adaptadas de Cruz-Junior et al. (2013) e Silva et al. (2013b).....21
- Figura 2:** (A) - Ceco, potro. A pseudomembrana de fibrina foi retirada e revelou a mucosa intestinal edemaciada e com pequenas áreas de ulceração. (B): Mucosa estomacal edemaciada e revelando a presença de uma pseudomembrana de aspecto acinzentado e fracamente aderida.....80
- Figura 3:** (A1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo C1. Ceco sem alterações macroscópicas visíveis; (B1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo G1. Alças cecais tumefeitas com serosa intensamente e difusamente congesta, apresentando líquido serosanguinolento no lúmen, sugestivo de tiflite hemorrágica; (A2) Micrografia do ceco de um animal do grupo controle (C1), mostrando as vilosidades com aspecto normal (aumento de 100X). (B2) Micrografia do ceco de um animal do grupo G1. Nota-se a extensa destruição da mucosa intestinal, infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrocíticas, caracterizando uma tiflite necro-hemorrágica (aumento de 100X).....107
- Figura 4:** Lâminas coradas pelo técnica de coloração de esporos (Wirtz-Conklin). (A) Cultura após 72 horas de incubação. Observar a presença de células vegetativas (bastonetes rosados) e esporo livres ou ainda ligados a célula mãe (corados pelo verde-malaquita). (B) Suspensão de esporos. Observar a presença apenas de esporos livres do corpo celular (aumento de 1000X).....108
- Figura 5:** Sobrevivência de hamsters durante o período de observação de 30 dias dos grupos de animais inoculados com diferentes concentrações de esporos da estirpe ATCC9689 (A1 a A4) de *Clostridium difficile* e do grupo controle.....110

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi: (1) padronizar um protocolo de detecção das toxinas A/B em cultura de célula; (2) avaliar kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISAs) para diagnóstico da infecção por *Clostridium difficile* (ICD) em humanos, potros e suínos; (3) avaliar a ocorrência de ICD em potros, leitões e carnívoros silvestres; (4) avaliar os ribotipos e a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de diversas origens; (5) padronizar um modelo de ICD em hamsters sírios. O teste de citotoxicidade celular padronizado permitiu a detecção das toxinas A/B em amostras de fezes, tornando-se uma opção para o diagnóstico e permitindo a avaliação de outros métodos de diagnóstico. Todos os ELISAs testados apresentaram baixa sensibilidade (<61%) e especificidade acima de 90% para amostras de seres humanos. Dessa forma, aproximadamente um em cada três pacientes com ICD seriam erroneamente indicados como negativos por tais testes no hospital avaliado. De forma semelhante, para amostras de suínos os kits de ELISA também apresentaram uma baixa sensibilidade (<60%), sugerindo que tais testes não seriam adequados para o diagnóstico individual em leitões. Já para potros, a alta sensibilidade e especificidade (acima de 90 e 94%, respectivamente) apresentada pelos kits sugere que esses possam ser uma boa opção para o diagnóstico de diarreia por *C. difficile* nessa espécie. A ICD foi diagnosticada, pela primeira vez no Brasil, em potros e leitões. Mais de 50% das granjas de suínos avaliadas possuíam pelo menos um leitão diagnosticado com ICD, sugerindo uma grande disseminação da doença. Em potros, foi possível perceber que a pouca familiaridade dos clínicos com a ICD levava a uma antibioticoterapia errônea com consequente agravamento dos sinais clínicos. Pela primeira vez no mundo a doença foi confirmada em um felino silvestre. Foram encontrados 13 ribotipos de *C. difficile*, sendo que, em vários casos, o mesmo ribotipo foi encontrado em seres humanos e animais. Todas as estirpes avaliadas apresentaram alta susceptibilidade ao metronidazol, vancomicina e florfenicol, enquanto 7,4%, 9,3%, 25,9% e 37,0% foram consideradas resistentes a oxitetraciclina, penicilina, tilosina e eritromicina, respectivamente. O modelo de ICD foi padronizado em hamsters sírios, tornando-se uma opção para estudos futuros sobre patogenia da doença e métodos de tratamento e prevenção. Como conclusão, o presente estudo confirma a ICD como uma importante causa de diarreia em animais e humanos no Brasil e reforça a necessidade de mais trabalhos focando em novos métodos de diagnóstico e de controle da doença em animais domésticos e humanos.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, nosocomial, diarreia, zoonose

ABSTRACT

The aim study was to: (1) develop the detection of A/B toxins in cell culture assay; (2) evaluate three commercial enzyme immunoassays (EIAs) for diagnosis of CDI in humans, foals and piglets; (3) evaluate the frequency of CDI in humans, in piglets, in foals and in wild carnivores; (4) evaluate the ribotypes and antimicrobial susceptibility of *C. difficile* strains from various sources; (5) develop an model of CDI in Syrian hamsters. The standardized cell culture assay was able to detect A/B toxins from stool samples, becoming an option for the diagnosis of CDI and allowing the evaluation of other diagnostic methods. All EIAs tested showed a high sensitivity and specificity (always above 90 and 94%, respectively) for foals' samples, whereas for humans' and piglets' samples the low sensitivity (under 60%) of all EIAs tested suggest that they are not a good option for individual diagnosis in this species. In piglets and foals, the disease was confirmed for the first time in Brazil and more than 50% of sampled farms had at least one positive piglet, suggesting a great dissemination of the disease in swine. A marked unfamiliarity of disease in foals was seen by clinicians, commonly leading to worsening of clinical status of animals by wrong antibiotic therapy. For the first time, the disease was confirmed in wild felids. Thirteen different ribotypes were found and the commonly the same ribotype was isolated from animals and humans. All *C. difficile* strains were susceptible to metronidazole, vancomycin, florfenicol, whereas 7.4%, 9.3%, 25.9% and 37.0% were considered resistant to oxytetracyclin, penicillin, tylosin and erythromycin, respectively. An animal model of ICD was developed in hamsters (*Mesocricetus auratus*) and now can be used for future pathogenesis, treatment and prevention CDI studies. As a conclusion, the present study confirms ICD as a important cause of diarrhea in animals and humans in Brazil. In addition, it highlighted the need of more studies about diagnosis and control methods of this disease.

Keywords: *Clostridium difficile*, nosocomial, diarrhea, zoonosis

1. INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio obrigatório e pode esporular em condições adversas. Considerado um patógeno emergente, é atualmente responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos (Balassiano et al., 2011). Em animais domésticos, a infecção por *C. difficile* é comum em suínos e equinos, ocorrendo também em cães, bovinos e animais de laboratório como cobaias, coelhos e hamsters (Bartlett, 2009). Em leitões, com a melhoria no controle de agentes clássicos causadores de diarreia, *C. difficile* emergiu como um importante patógeno entérico. Hoje, este é considerado a principal causa não controlada de diarreia neonatal nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa (Songer, 2010).

No Brasil, até o ano de 2011 inexistiam relatos da doença em animais domésticos. Desde então, estudos comprovaram a infecção por *C. difficile* em suínos, potros e cães (Silva et al., 2011; Preis et al., 2012; Silva et al., 2012; Silva et al., 2013a; Silva et al., 2013b). Além disso, estudos recentes também mostraram que as estirpes isoladas de seres humanos com infecção por *C. difficile* apresentam grande semelhança genética com as estirpes isoladas de animais (Jhung et al., 2008; Norman et al., 2011), levantando a hipótese de uma zoonose. Apesar da importância crescente da infecção por *C. difficile*, existe um forte desconhecimento com relação aos métodos de diagnóstico tanto para seres humanos quanto para animais, dificultando decisões clínico-epidemiológicas. Além disso, inexistem imunoprofiláticos disponíveis para prevenção e controle da doença para animais domésticos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram: (1) padronizar um protocolo de detecção das toxinas A/B em cultura de célula; (2) avaliar três kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISAs) para diagnóstico de infecção por *Clostridium difficile* (ICD) em seres humanos internados no Hospital das Clínicas da UFMG, em potros e em suínos; (3) avaliar a ocorrência de ICD em potros, leitões e carnívoros silvestres no Brasil; (4) avaliar os ribotipos e a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de diversas origens; (5) padronizar um modelo de ICD em animais de laboratório.

3. LITERATURA CONSULTADA

3.1 Histórico

C. difficile foi isolado pela primeira vez a partir de fezes e mecônio de bebês recém-nascidos por Hall e O'Tolle em 1935. Pela dificuldade encontrada no isolamento e pela morfologia do microrganismo, os autores o chamaram inicialmente de *Bacillus difficilis*. Como aquele microrganismo ainda não era reconhecido como um patógeno, poucos estudos foram publicados até a década de 70. A partir desse período, a clindamicina passou a ser extremamente utilizada em seres humanos no combate a infecções por microorganismos anaeróbicos e, concomitante ao seu uso, relatos de diarreia e colite pseudomembranosa surgiram (Lyerly et al., 1988). Iniciou-se uma intensa busca pelo agente causal, sendo então demonstrado que *C. difficile* estava presente em grande quantidade nas fezes de pacientes com colite pseudomembranosa e diarreia nosocomial (George et al., 1978). A partir desta constatação, *C. difficile* tem sido incriminado como o principal

agente causador de diarreia associada a antibioticoterapia em seres humanos. Relatos recentes sugerem um aumento da morbimortalidade em diversos países (Samie et al., 2008). Dados com relação ao impacto da doença ainda são escassos, mas estima-se que apenas nos Estados Unidos ocorram cerca de três milhões de casos anualmente, implicando em um custo de 1,1 bilhão de dólares no tratamento (Gellad et al., 2007).

Trabalhos com *C. difficile* em seres humanos e animais são escassos em toda a América Latina (Balassiano et al., 2012). No Brasil, destacam-se um relato de um surto hospitalar (Balassiano et al., 2010) e um recente levantamento de prevalência de diarreia nosocomial em um hospital universitário no Rio de Janeiro (Balassiano et al., 2011). Tais trabalhos confirmam a importância da doença e reforçam a necessidade de mais estudos para elucidar a real situação da infecção por *C. difficile* em seres humanos no Brasil.

Em animais, a infecção por *C. difficile* foi relatada pela primeira vez em cobaias (*Cavia porcellus*) por Hambre et al. (1943) em um estudo onde o objetivo inicial era avaliar o potencial do tratamento com penicilina em casos de mionecroses clostridiais, doença comum na época devido a ferimentos em soldados na segunda guerra mundial. Para esta avaliação, induzia-se mionecrose com inoculação de *C. perfringens* nos animais e testava-se o tratamento com diferentes doses de penicilina. Porém, para surpresa dos pesquisadores, a administração de penicilina tornou-se mais letal que própria mionecrose por *C. perfringens* devido a quadros de enterocolite grave. Estudos posteriores indicaram que vários outros antimicrobianos causavam o mesmo efeito em cobaias e em outras

espécies de roedores (Green, 1974). Já em suínos e equinos, o isolamento de *C. difficile* foi relatado pela primeira vez na década de 80 (Jones e Hunter, 1983; Ehrlich et al., 1984), mas somente em meados da década de 90 este microrganismo ganhou maior repercussão como um causador de diarreia nestas duas espécies (Songer, 2010).

Relatos de infecções por *C. difficile* já foram descritos em várias outras espécies domésticas como coelhos, bovinos e até felinos (Martins et al., 2001; Weese et al., 2001; Bano et al., 2008). Porém, nestas espécies a ocorrência de distúrbios gastrointestinais relacionadas a este agente parecem incomuns. Atualmente, inúmeros trabalhos visam a padronização de métodos de diagnóstico e avaliação da hipótese de *C. difficile* ser um agente zoonótico, enquanto outras pesquisas têm buscado imunopreventivos para a prevenção da diarreia causada por este microrganismo emergente.

3.2 Patogenia

A patogenia da diarreia por *C. difficile* ainda é bastante obscura na maioria dos animais. Acredita-se que a infecção inicia-se pela ingestão dos esporos oriundos principalmente de animais infectados ou portadores saudáveis. Em geral, a microbiota intestinal impede o estabelecimento do agente, sendo que a infecção ocorre na ausência de uma microbiota capaz de inibir a colonização pelo microrganismo. Dessa forma, comumente *C. difficile* coloniza o intestino após uma depleção dos microrganismos intestinais causada pela antibioticoterapia, ou previamente ao estabelecimento completo da microbiota, como ocorre em leitões nas primeiras horas de vida (Båverud, 2002). Em seres humanos, equinos e

cães existe também a possibilidade da exacerbação do crescimento de estirpes já presentes no organismo dos portadores saudáveis, ainda pelo mesmo mecanismo de comprometimento da microbiota intestinal (Båverud, 2002; Hopman et al., 2011).

Uma vez no intestino, estirpes toxigênicas de *C. difficile* produzem duas toxinas: a toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina). A lesão no intestino parece ser iniciada pela toxina A, que possui receptores na lâmina basal das células epiteliais. Ocorre quebra das junções celulares, permitindo a ação da toxina B, cujos receptores, acredita-se, encontram-se na região baso-lateral do epitélio, amplificando a lesão. Ambas, depois de internalizadas por endocitose, causam condensação da actina culminando com a desorganização do citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose (Lyerly et al., 1988). Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, agindo também em outros órgãos. Ainda como consequência da destruição das junções celulares, há uma intensa migração leucocitária intestinal que resulta na formação da pseudomembrana característica da doença em seres humanos (Hookman et al., 2009).

Uma terceira toxina, a toxina binária, vem chamando a atenção dos pesquisadores e clínicos, sendo muito semelhante às outras toxinas binárias produzidas por bactérias do gênero *Clostridium*, como a toxina iota, produzida pelo *C. perfringens* tipo E, e a toxina C2, produzida pelo *C. botulinum* tipo C (Samie et al., 2008). Muito tem sido discutido com relação à importância clínica da toxina binária, mas o real significado deste fator de virulência ainda é desconhecido. Em seres humanos, estudos relatam uma

maior gravidade da doença em pacientes infectados por estirpes produtoras da toxina binária (Rupnik et al., 2005). De acordo com Gonçalves et al. (2004), a toxina binária pode agir sinergicamente com as toxinas A/B, aumentando a despolimerização do citoesqueleto por um mecanismo complementar, agravando o quadro clínico e exacerbando os sintomas. Além da desorganização celular, esta toxina parece formar protusões nas células alvos com consequente extravasamento de material do citosol, formando uma malha densa na superfície celular que facilitaria a adesão e multiplicação de *C. difficile* no intestino (Schwan et al., 2009).

3.3 A Doença Em Seres Humanos

Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em 1935, somente na década de 70 *C. difficile* foi reconhecido como um patógeno para seres humanos. Desde então *C. difficile* passou a ser a principal causa bacteriana de diarreia associada a antibioticoterapia prolongada com morbimortalidade crescente em diversos países (Samie et al., 2008).

Durante a década de 90, a incidência dessa infecção nos EUA permaneceu estável, tendo sido registrados cerca de 30-40 casos por 100.000 indivíduos. Porém, em 2001, esse número aumentou para 50 e, em 2005, já se observava 84 casos por 100.000 indivíduos. De acordo com Gellad et al. (2007), ocorrem cerca de três milhões de casos anualmente neste país, implicando em um custo de 1,1 bilhões de dólares para o tratamento. A mortalidade associada à infecção também tem aumentado, assim como maior resistência ao tratamento antimicrobiano convencional. Em dois levantamentos epidemiológicos sobre a causa de óbitos de pacientes internados em hospitais na Inglaterra, a colite

pseudomembranosa foi a principal causa de óbito em 499 pacientes no ano de 1999 e em mais de três mil pacientes no ano de 2006 (Kelly e Lamont, 2008), sugerindo novamente a crescente importância da doença.

Acredita-se que o aumento do número de casos registrados deve-se ao uso, muitas vezes indiscriminado, de drogas antimicrobianas, considerado o principal fator de risco para essa infecção. Outros fatores predisponentes reconhecidos são idade avançada, hospitalização ou a permanência em instituições de cuidados de saúde (Bartlett, 2009).

Nos últimos anos, tem sido relatado o surgimento de estirpes altamente virulentas de *C. difficile*, destacando-se a estirpe NAP1/027. O uso disseminado de fluoroquinolonas parece estar relacionado ao surgimento de tal estirpe e o isolamento dessa tem sido cada vez mais relacionada a surtos graves sobretudo em países desenvolvidos, com uma frequência de isolamento de 8 e 36% nos EUA e na Europa, respectivamente (Cheknis et al., 2009). Ainda não existem evidências desta estirpe no Brasil, e em toda a América Latina esta estirpe foi, até o momento, encontrada apenas na Costa Rica (Balassiano et al., 2012). De acordo com Balassiano et al., (2012), o potencial de propagação mundial da infecção por *C. difficile* demonstra a necessidade de estudos epidemiológicos com intuito de se caracterizar as estirpes circulantes. Outros autores destacam a necessidade de uma maior sensibilização e vigilância dos profissionais de saúde mesmo em países onde surtos com a estirpe NAP1/027 ainda não ocorreram.

No Brasil, são raros estudos sobre a infecção por *C. difficile* em seres humanos e, em geral, os trabalhos são

pouco robustos. O primeiro trabalho focado em diarreia nosocomial em adultos foi realizado em 2002 por Marcon et al. (2006), com um total de 49 pacientes que desenvolveram diarreia em unidades de tratamento intensivo (UTIs). Desses, 22 (44,8%) foram diagnosticados com infecção por *C. difficile*. É interessante observar, ainda, que 86% dos pacientes amostrados dividiam o ambiente com outro paciente que também apresentou anteriormente diarreia nosocomial, sugerindo o alto potencial de disseminação da doença.

Em 2009, Balassiano et al. publicaram um estudo avaliando 21 pacientes com diarreia nosocomial após antibioticoterapia de largo espectro. A infecção por *C. difficile* foi confirmada em 6 dos 21 pacientes (28,5%), sendo possível isolar o agente em quatro desses. As quatro estirpes isoladas foram positivas para os genes das toxina A (*tcdA*) e B (*tcdB*), mas negativo para o gene da toxina binária (*cdtB*). Duas estirpes pertenciam ao ribotipo 014, enquanto outras duas foram caracterizadas como ribotipo 106. Até então, a detecção de estirpes do ribotipo 106 nunca tinha ocorrido fora do Reino Unido, o que novamente sugere a disseminação das estirpes de *C. difficile*.

Recentemente, um levantamento mais completo e de longa duração foi relatado por Balassiano et al. (2010) em uma UTI de um hospital universitário no Rio de Janeiro. Durante o período de 2006 a 2009, ocorreram 218 casos de diarreia nosocomial, sendo que 43 (19,7%) foram confirmados como infecção por *C. difficile*. O período mais crítico foi entre 2007 e 2008, quando o hospital vivenciou um surto. Neste período, 101 amostras foram coletadas e em 32 (31,5%) delas foram detectadas as toxinas A/B. Aproximadamente 80% dos pacientes infectados possuíam mais

de 65 anos, todos encontravam-se com algum grau de imunocomprometimento e sob antibioticoterapia. Quatro estirpes foram isoladas, três de pacientes e uma do ambiente hospitalar. Todas as quatro, pertencentes aos ribotipos 038 e 135, foram positivas para os genes *tcdA* e *tcdB* e negativas para o gene relativo a toxina binária (*cdtB*).

O último trabalho, até o momento, no Brasil foi conduzido por Balassiano et al. (2011). Todos os pacientes recebiam antibioticoterapia de largo espectro e eram considerados imunodeprimidos. Dos 70 pacientes com diarreia nosocomial, 19 (27,1%) foram confirmados com *C. difficile*. Desses, foram isoladas oito estirpes de *C. difficile* dos seguintes ribotipos: 010, 020, 133 e 233. É interessante observar que quatro das oito (50%) estirpes isoladas pertenciam ao ribotipo 133, descrito somente no Brasil até o momento. Novamente nenhuma estirpe foi positiva para o gene relativo a toxina binária, algo até então inédito no Brasil.

3.3 A Doença Em Animais Domésticos

3.3.1 Suínos

As infecções por *C. difficile* (ICD) em suínos ocorrem quase exclusivamente em leitões com até sete dias de idade. Ao contrário de seres humanos, o desenvolvimento da doença nesta espécie pode não estar necessariamente correlacionada com a utilização de antibióticos (Songer e Uzal, 2005).

C. difficile encontra-se disseminado no ambiente, é potencialmente eliminado nas fezes pelas porcas e a colonização do intestino dos leitões ocorre nas primeiras horas de vida (Hopman et al., 2011). Clinicamente, a infecção por *C. difficile* em leitões é caracterizada pelo

baixo desenvolvimento corporal e edema de mesocólon. Raramente podem ser observados outros sinais, como hidrotórax, dificuldade respiratória, edema escrotal, facial e até ocorrência de morte súbita (Songer e Uzal, 2005). Em granjas acometidas, cerca de 30% dos animais apresentam-se positivos para a presença das toxinas A/B, podendo chegar a 100% em alguns casos (Songer et al., 2004). É importante salientar que apenas parte dos animais infectados apresentam diarreia, com consistência pastosa a aquosa. A simples ausência de conteúdo diarréico no cólon não descarta a possibilidade de infecção, sendo a doença comumente subclínica nesta espécie (Yaeger et al., 2007)

Colite e edema de mesocólon (Figura 1C), principalmente quando este último é grave, são as alterações macroscópicas que melhor se correlacionam com a ocorrência de infecções por *C. difficile* em leitões (Yaeger et al. 2002). Deve-se enfatizar porém que, em uma granja afetada, é comum encontrar vários leitões aparentemente saudáveis porém positivos para detecção das toxinas A/B e com lesões intestinais típicas quando submetidos a uma avaliação histopatológica (Songer e Uzal, 2005; Yaeger et al., 2007). Em razão disso, a avaliação microscópica é extremamente valiosa para a confirmação do diagnóstico epidemiológico em suínos.

Em animais positivos comumente é possível observar supuração na lâmina própria do cólon, edema, infiltrado de células inflamatórias mononucleares e neutrófilos na serosa e mesentério, redução marcante do número de células caliciformes, além da lesão típica conhecida como “forma de vulcão” (Figura 1D), devido ao extravazamento de neutrófilos por pequenas ulcerações na mucosa (Keel e Songer, 2006)

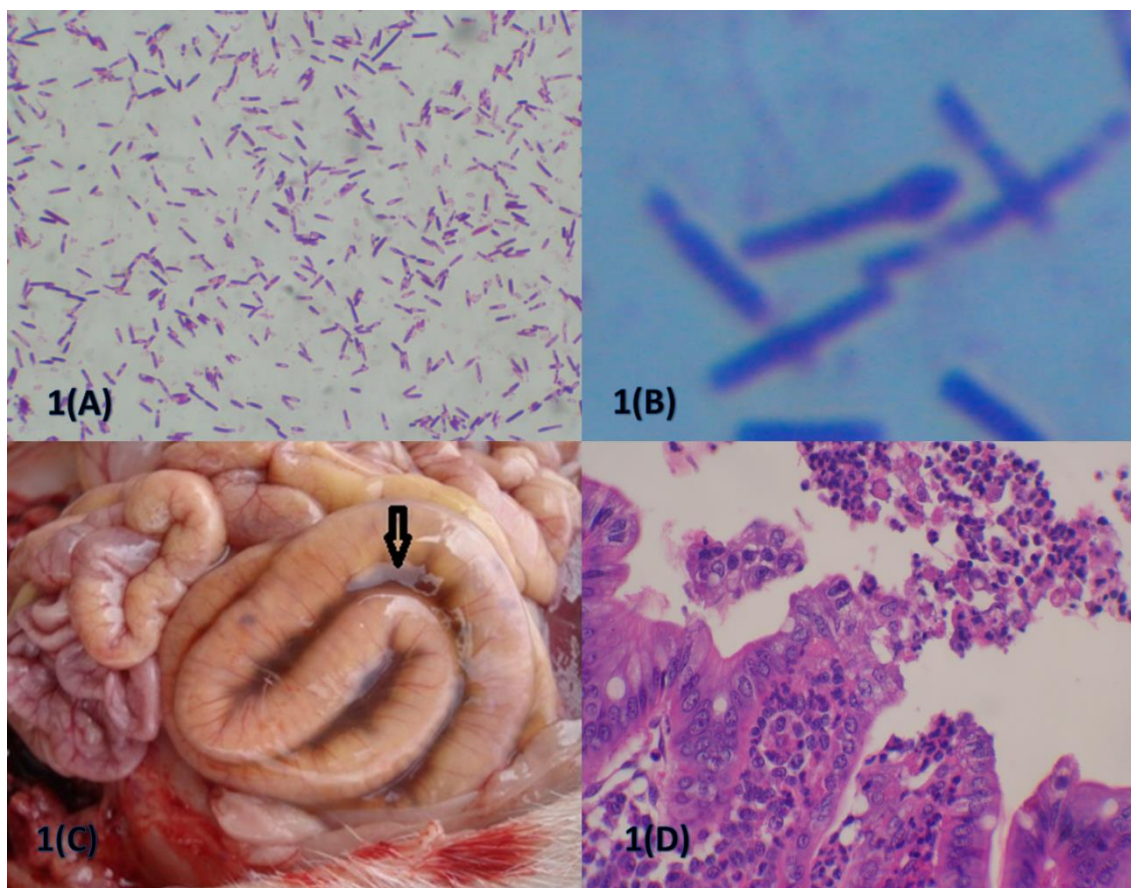


Figura 1 (A) – Coloração de Gram de uma cultura de *Clostridium difficile*. Bastonetes Gram-positivos com esporos. (B) – Detalhe de um esporo subterminal de *C. difficile* ainda com o corpo celular. (C) – Leitão: edema de mesocolon em um leitão acometido por *C. difficile*. (D) – Leitão. Colon. Redução severa das células caliciformes e enterite neutrofílica necrozante com intensa infiltração de neutrófilos da lamina própria para o lumen intestinal (400X). Figuras 1C e 1D foram adaptadas de Cruz-Junior et al. (2013) e Silva et al. (2013b).

Nos Estados Unidos, o exame de 1000 leitões com enterite revelou a presença das toxinas A/B em 34,1% dos animais sem o envolvimento de outro patógeno (Songer e Anderson, 2006). Em outros 24,3% foi possível identificar as toxinas A/B em associação a detecção de outro patógeno, tais como rotavírus, *C. perfringens* e *Escherichia coli* enterotoxigênica, demonstrando a possibilidade de coinfeção com outros agentes. No Brasil, um levantamento realizado no Rio Grande do Sul encontrou aproximadamente 16% de animais positivos para as toxinas A/B (Lippke et al., 2011), resultado semelhante ao relatado em Minas Gerais (Silva et al., 2011). Neste último estudo, 53% das granjas amostradas tiveram pelo menos um animal positivo,

sugerindo uma grande disseminação da doença. Em um trabalho realizado por Cruz-Junior et al. (2013) em Minas Gerais, avaliou-se a presença dos principais agentes causadores de diarreia neonatal em suínos (rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* e *C. difficile*) foram encontradas as toxinas A/B e/ou lesões histológicas características de *C. difficile* em 50% dos animais. Estes resultados sugerem, de forma semelhante ao relatado no EUA e Europa, uma queda na prevalência dos agentes clássicos causadores de diarreia e uma crescente importância de *C. difficile* como patógeno entérico, confirmando a infecção por este agente como uma das

principais causas de diarreia neonatal em suínos na atualidade.

3.3.2 Equinos

Em equinos, a infecção por *C. difficile* acomete principalmente potros com até cinco meses de idade, sendo caracterizada por uma diarreia pastosa a aquosa, com enterocolite necrotizante (Keel e Songer, 2006). Acredita-se que, assim como em seres humanos, nesta espécie raramente a infecção ocorre de forma espontânea, sendo normalmente associada a algum desequilíbrio da microbiota gastrointestinal, principalmente pela utilização de antibióticos (Weese et al., 2000). Os antimicrobianos comumente relacionados ao desenvolvimento da infecção por *C. difficile* em equinos incluem a eritromicina, ceftiofur, norfloxacin, florfenicol, lincomicina e os beta-lactâmicos em geral (Båverud, 2002; Preis et al., 2012; Silva et al., 2012). É interessante ressaltar que a utilização de múltiplos antibióticos têm sido associada a um maior risco de desenvolvimento da infecção por *C. difficile* em potros (Magdesian et al., 2002; Preis et al., 2012). Clinicamente os animais infectados apresentam-se com diarreia, comumente profusa, desidratados, deprimidos e com presença marcante de gás no intestino grosso (Båverud, 2002).

No Brasil, até o presente momento trabalhos sobre a infecção por *C. difficile* em potros limitam-se a duas descrições de diagnóstico (Preis et al., 2012; Silva et al., 2012), embora a prevalência da doença, nesta espécie, permaneça obscura pela ausência de levantamentos epidemiológicos. Silva et al. (2012) relataram a ocorrência de diarreia em três animais de cinco meses de idade, dois dias após a administração de penicilina para tratamento de uma possível pneumonia. Já Preis et al.

(2012) descreveram um caso de enterite por *C. difficile* em um animal de 12 dias de vida, associada a candidíase e antibioticoterapia prolongada. Em ambos relatos, houve uma suspeita inicial de salmonelose, sendo que apenas no primeiro relato houve diagnóstico laboratorial *ante mortem*, o que permitiu a alteração da antibioticoterapia com foco na infecção por *C. difficile* e restabelecimento dos animais. Já no relato descrito por Preis et al. (2012), a ausência de diagnóstico laboratorial pode ter sido um agravante uma vez que a escolha dos antibióticos foi baseada na suspeita de salmonelose, levando o animal a óbito.

Estes trabalhos confirmaram a ocorrência da doença em equinos no país e demonstram a necessidade do diagnóstico diferencial para as diarreias em potros, especialmente quando o início dos sinais clínicos ocorreram poucos dias após antibioticoterapia ou em casos onde antimicrobianos comumente utilizados para salmonelose, como ceftiofur, norfloxacin ou florfenicol, não resultam em melhora clínica significativa.

Em equinos adultos, *C. difficile* tem sido relatado como um agente nosocomial causador de diarreia aguda ou cólica durante a internação e após a antibioticoterapia prévia para alguma outra doença (Båverud et al. 2002). Porém, até o presente momento inexistem relatos de infecção por *C. difficile* em equinos adultos no Brasil.

3.3.3 Cães

A importância de *C. difficile* em cães diarréicos ainda não é totalmente conhecida. Inicialmente, acreditava-se ser este agente responsável apenas por raros casos de diarreia crônica recidivante (Berry e Levett, 1986; Marks e Kather, 2003). Porém, o risco

de colonização cresce significativamente com a hospitalização e a infecção com estirpes toxigênicas de *C. difficile* está correlacionada com o desenvolvimento de diarreia (Struble et al., 1994; Clooten et al., 2008). Estes fatos, associados à administração de antibióticos e imunossupressivos, parecem favorecer a colonização intestinal por *C. difficile* em cães internados. De forma semelhante ao que ocorre em seres humanos, sugere-se que o uso destes medicamentos, associado a internação, são os principais fatores de risco para desenvolvimento de diarreia associada a *C. difficile* em cães, tornando-o um patógeno nosocomial também nessa espécie (Vaishnavi, 2009).

No Brasil, existe apenas um trabalho sobre *C. difficile* que confirma a ocorrência da doença em cães (Silva et al., 2013a), onde foi realizado o isolamento e detecção das toxinas A/B em cães diarréicos oriundos de um hospital veterinário e em animais aparentemente saudáveis, fora do ambiente hospitalar. De forma semelhante ao relatado em outros trabalhos, Silva et al. (2013a) encontraram uma associação significativa entre a ocorrência de diarreia e a presença das toxinas A/B, sugerindo a participação de *C. difficile* em quadros entéricos nesta espécie (Struble et al., 1994, Clooten et al., 2008). Os autores chamam atenção para a possibilidade de doença subclínica, uma vez que parte dos animais aparentemente saudáveis foram positivos para as toxinas A/B.

Apesar dos avanços dos estudos nos últimos anos, mais pesquisas são necessárias para esclarecer algumas questões relacionadas à infecção por *C. difficile* em cães, destacando-se o papel deste agente como causador de diarreia

em animais não-internados e sem antibioticoterapia prévia.

3.4 *Clostridium difficile* como agente zoonótico

A hipótese de animais como reservatórios e transmissores de *C. difficile* para seres humanos foi levantada pela primeira vez em 1983 por Borriello et al. ao realizarem o isolamento do agente em fezes de cães e gatos. Desde então, essa hipótese permaneceu pouco lembrada. Com o desenvolvimento e maior aplicação das técnicas de biologia molecular, estudos com as estirpes de *C. difficile* de diversas origens tornaram-se comuns. Entre essas técnicas, a mais utilizada atualmente é a ribotipagem, proposta inicialmente por Gurtler et al. (1993). A técnica permitiu a criação de uma biblioteca de mais de 160 padrões (ribotipos) a partir de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais, seres humanos e do ambiente (Stubbs et al., 2000).

Através da técnica da ribotipagem, estudos recentes relataram que estirpes de *C. difficile* isoladas a partir de produtos cárneos compartilhavam grande semelhança com os isolados de seres humanos com colite pseudomembranosa, sugerindo uma possível transmissão do agente por alimentos de origem animal (Rodríguez-Palácios et al., 2007; Songer et al., 2009). A partir desses resultados, alguns trabalhos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a similaridade entre estirpes isoladas de seres humanos e de animais domésticos, sendo observado que muitos ribotipos isolados de bovinos, suínos e cães eram os mesmos encontrados em seres humanos com infecção por *C. difficile* (Arroyo et al., 2005; Jhung et al., 2008). Recentemente um estudo relatou que a

exposição ocupacional a suínos aumenta significativamente a chance de colonização pelo agente em seres humanos e as estirpes isoladas dos trabalhadores e dos animais tinham o mesmo ribotipo, reforçando a hipótese de transmissão entre espécies (Norman et al., 2011). Outro ponto que tem chamado a atenção é o grande aumento do isolamento do ribotipo 078 em seres humanos nos EUA e na Inglaterra. Essa estirpe é comumente isolada de bezerras e corresponde a 83% dos isolados de suínos no EUA (Keel et al., 2007).

Estes resultados reforçaram a hipótese de transmissão de *C. difficile* entre animais e seres humanos. Em paralelo a esta suspeita, eventos recentes indicam mudanças na epidemiologia das infecções causadas por *C. difficile*, com ocorrência da doença em seres humanos saudáveis, sem prévia exposição a ambiente hospitalar e até mesmo na ausência de antibioticoterapia (Samie et al., 2008). Mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de infecção por *C. difficile* como zoonose. Se confirmada tal suspeita, a prevenção da doença (e até mesmo da colonização) em animais domésticos poderá passar a ser uma prioridade (Songer, 2010).

Estudos de ribotipagem de *C. difficile* no Brasil são escassos e restritos a estirpes isoladas de seres humanos (Balassiano et al., 2009). Até o presente momento, inexistem trabalhos brasileiros avaliando a ribotipagem de isolados de *C. difficile* de animais domésticos, impedindo a avaliação da similaridade entre as cepas isoladas de seres humanos e de animais no Brasil.

3.5 Diagnóstico

3.5.1 Detecção das toxinas

A detecção da presença das toxinas A/B pela visualização do efeito citopático

em cultura celular (“*cell cytotoxicity assay*”- CTA) é considerado pela maioria dos pesquisadores como o “método padrão-ouro” para o diagnóstico de infecções causadas por *C. difficile*. Várias linhagens celulares podem ser utilizadas para detecção das citotoxinas, sendo a *Chinese Hamster Ovary* (CHO) a mais comumente utilizada e a *African Green Monkey Kidney* (VERO) considerada a mais sensível (Delmeé, 2001).

Este método consiste na inoculação do filtrado de fezes em um cultivo celular e a observação do efeito citopático, causado principalmente pela toxina B, que é 1000 vezes mais citotóxica que a toxina A (Ciesla e Bobak, 1998). A leitura é realizada em 24 a 48 horas e a confirmação é dada pela soroneutralização do efeito citopático por anticorpos específicos contra as toxinas A/B de *C. difficile* ou de *C. sordellii* (Delmeé, 2001).

A CTA tem como principal vantagem a alta sensibilidade e especificidade para detecção das toxinas A/B em fezes (Doern et al., 1992). Por outro lado o resultado é demorado e permite processar apenas poucas amostras por vez, quando comparado com outras técnicas como os kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) ou imunocromatografia. Outro ponto desfavorável é a necessidade de manutenção de linhagens celulares, o que consome tempo, possui um custo relativamente elevado e necessita de pessoal treinado (Post et al., 2002).

Os kits comerciais para detecção das toxinas A/B são de fácil execução e o resultado é rápido, sendo dado em poucas horas. Infelizmente todos os kits disponíveis no mercado brasileiro são importados, aumentando o custo do diagnóstico, além de serem padronizados para a detecção das

toxinas A/B a partir de fezes de seres humanos, fazendo com que a sensibilidade e especificidade sejam extremamente variáveis entre eles e por espécie animal. Deve ser ressaltado, ainda, que alguns *kits* disponíveis são padronizados apenas para detecção da toxina A. A pesquisa de ambas as toxinas é essencial uma vez que são comuns relatos de infecção por *C. difficile*, incluindo grandes surtos em seres humanos, causados por estirpes variantes, produtoras apenas da toxina B (Alfa et al., 2000; Kuijper et al., 2001).

Trabalhos avaliando o desempenho de *kits* de ELISA para detecção das toxinas A/B sugerem que tais produtos seriam de baixa eficiência para suínos (Anderson e Songer, 2008; Keessen et al., 2011). Em geral, os *kits* testados apresentam sensibilidade ou especificidade baixas. Porém, uma exceção é relatada por Post et al. (2002), ao encontrarem 91% de sensibilidade e 86% de especificidade em um *kit* avaliado com fezes suínas. Para fezes de cães, Couicha e Marks (2006) avaliaram cinco *kits* comerciais ELISA e também concluíram que todos eram inadequados devido a baixa sensibilidade, que variou de 7 a 33% (Chouicha e Marks, 2006). Dessa forma, tanto para suínos quanto para cães, a utilização de *kits* comerciais parece ser inadequada para o diagnóstico. Especula-se, para ambas as espécies, que a sensibilidade e especificidade dos *kits* de ELISA sejam comprometidas pela presença de inibidores e de proteases fecais que diminuiriam a especificidade da ligação e/ou causariam a degradação das toxinas nas fezes (Couicha e Marks, 2006).

Para equinos, apenas um *kit* foi avaliado até o momento e a performance foi considerada adequada, com sensibilidade de 84% e especificidade

de 96% (Medina-Torres et al., 2010). Porém mais trabalhos são necessários para elucidar o desempenho dos *kits* comerciais para aplicação em espécimes clínicos de equinos, incluindo a avaliação entre amostras de potros e de animais adultos, algo que não ocorreu no relato de Medina-Torres et al. (2010).

Não existem estudos avaliando os *kits* comerciais presentes no mercado brasileiro frente a amostras clínicas de equinos, suínos ou cães, dificultando o diagnóstico das infecções por *C. difficile* nas espécies domésticas no país. Tendo em vista a confirmação de uma prevalência significativa da doença na suinocultura e ainda a confirmação da infecção também em cães e equinos, a avaliação de tais *kits* e a padronização do diagnóstico da infecção por *C. difficile* em cada espécie doméstica será crucial para uma avaliação epidemiológica mais completa e implementação de medidas de controle e tratamento mais efetivos.

3.5.2 Isolamento e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após o estabelecimento do papel do *C. difficile* como principal causador de colite pseudomembranosa e diarreia nosocomial em seres humanos, George et al. (1979) relataram a utilização de um agar específico para isolamento: Ágar CCFA (Cefoxitina-Cicloserina-Fructose-Ágar). Desde então, é o meio mais utilizado para isolamento de *C. difficile* a partir de fezes (Delmeé, 2001). Várias modificações do ágar CCFA foram propostas ao longo dos anos, entre essas, a adição de taurocolate ao CCFA (TCCFA) demonstrou melhorar a recuperação de *C. difficile*. O taurocolate é um sal presente na bile de seres humanos e de animais, sendo encontrado no intestino. Segundo Sorg e Sonenshein (2008),

esporos de *C. difficile* parecem ter receptores para taurocolate, que sinalizariam ao esporo o momento adequado para a germinação, aumentando assim o índice de isolamento do agente (Ramirez et al., 2010).

Outra estratégia comumente utilizada para melhorar o isolamento de *C. difficile* é o choque com álcool absoluto, onde volumes iguais de álcool e fezes são misturados por aproximadamente 30 minutos antes do plaqueamento. O choque com álcool aumenta a sensibilidade do isolamento por eliminar formas vegetativas e outras bactérias presentes nas fezes, permanecendo os esporos de *C. difficile* (Borriello e Honour, 1981). Ainda de acordo com Songer e Uzal (2005), algumas estirpes podem não crescer no ágar TCCFA devido à susceptibilidade a um ou a ambos antibióticos utilizados no meio seletivo.

Colônias de *C. difficile* podem ser reconhecidas por sua morfologia típica, aspecto conhecido como “vidro moído”: colônias rizóides, irregulares de coloração acinzentada e odor característico, semelhante ao de fezes de equinos (Delmeé, 2001). Na coloração de Gram é possível observar bastonetes Gram-positivos com esporos subterminais (Figura 1A e 1B) (Vaishnavi, 2009). Porém, além do diagnóstico presumptivo pela morfologia colonial e tintorial, é necessária uma confirmação da identidade, sendo a PCR a técnica mais utilizada para este fim. Além de confirmar a identidade, a maioria das técnicas combina a detecção dos genes codificadores da toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) e, eventualmente, a detecção de outros fatores de virulência adicionais, como a toxina binária (*cdtB* e *cdtA*) (Lemée et al., 2004; Silva et al., 2011). A pesquisa destes genes é

importante uma vez que alguns trabalhos sugerem uma alta correlação entre alguns tipos toxigênicos de *C. difficile* e uma maior gravidade da doença em seres humanos e algumas espécies de animais (Voth e Ballard, 2005; Arroyo et al., 2007).

Como *C. difficile* pode ser um habitante normal da microbiota intestinal, apenas o isolamento não confirma a doença tanto em seres humanos quanto em animais domésticos (Ferreira et al., 2003; Arroyo et al., 2007; Yaeger et al., 2007; Clooten et al., 2008). Em razão disso, o isolamento era utilizado apenas na condução de investigações epidemiológicas e avaliação da sensibilidade do microrganismo a antibióticos. Porém, estudos recentes demonstraram que o isolamento seguido da detecção dos genes *tcdA* e/ou *tcdB* por PCR ou da avaliação da produção *in vitro* das toxinas A/B pela estirpe (técnica conhecida como *toxigenic culture*, ou TC) seria um teste com correlação relativamente alta com a ocorrência da doença.

Com isso, muito têm-se pesquisado com relação ao potencial da TC como “método ouro” para o diagnóstico em algumas espécies (Keessen et al., 2011). Em geral, a técnica apresenta alta sensibilidade, mas sua especificidade é variada. Ao que tudo indica, seria um teste interessante para triagem mas, assim como a CTA, o TC é laborioso e necessita de um tempo relativamente grande (no mínimo 72 horas) para a obtenção do resultado. Além disso, inexistente um padrão de TC, dificultando comparações de estudos sobre o desempenho desse método.

Uma outra opção relatada para o diagnóstico, ainda pouco conhecida no Brasil, seriam *kits* comerciais de PCR em tempo real (rPCR), também conhecidos como testes de amplificação

de ácidos nucléicos (*nucleic acid amplification test* – NAAT), para detecção do gene *tcdB* diretamente das fezes. Inexistem estudos avaliando a rPCR em amostras de equinos, mas relatos sugerem que a rPCR apresenta grande sensibilidade para seres humanos e suínos (Schmidt e Gilligan, 2009; Keessen et al., 2011). Por outro lado, muito têm-se discutido com relação a especificidade, uma vez que existe a possibilidade de portador assintomático, o que geraria resultados falso-positivos. Até o presente momento, a proposta seria a utilização da rPCR como um primeiro teste de triagem, sendo resultados positivos confirmados por CTA, TC ou kits comerciais de ELISA de alta especificidade (Keessen et al., 2011).

No Brasil atualmente o diagnóstico laboratorial das infecções por *C. difficile* em humanos e animais é dado pela detecção das toxinas A/B por ELISA. Além disso, a avaliação histopatológica tem-se mostrado uma ferramenta auxiliar essencial para confirmação em suínos ou em casos de óbito de equinos. Para suínos, quando utilizado kits de ELISA de baixa sensibilidade mas alta especificidade, há ainda a possibilidade de múltipla amostragem na granja suspeita, o que parece aumentar significativamente a sensibilidade do teste (Keessen et al., 2011). Trabalhos avaliando os kits comerciais de ELISA são essenciais para verificar quais são adequados para o diagnóstico e quais os mais indicados para cada espécie doméstica.

3.6 Tratamento e controle

O controle das infecções por *C. difficile* nas espécies domésticas é baseado em medidas gerais de manejo, uma vez que inexistem vacinas disponíveis no mercado brasileiro. Como os esporos de *C. difficile* podem permanecer viáveis

por grandes períodos e resistir à maioria dos desinfetantes, estes possuem alto potencial de contaminação ambiental, especialmente em hospitais (Buggy et al., 1983). A diminuição da contaminação e disseminação ambiental são essenciais, sendo o uso correto de produtos contendo cloro ativo e a higienização das mãos duas estratégias de extrema importância (Båverud et al., 2003). Em equinos e cães, de forma semelhante ao que é feito na maioria dos hospitais humanos, o isolamento de animais suspeitos também é essencial. É interessante salientar ainda que a aplicação de álcool nas mãos para eliminação dos esporos desse microrganismo é ineficiente (Macleod-Glover e Sadowski, 2010).

Estudos com camundongos e hamsters demonstraram que anticorpos contra as toxinas A/B induzidos por imunização são capazes de prevenir a doença (Corthier et al., 1991; Siddiqui et al., 2012). Em seres humanos, um toxóide para prevenção das diarreias por *C. difficile* encontra-se em fase final de teste, tendo grande potencial para utilização (Greenberg et al., 2012). Entretanto, o mesmo não pode ser dito para as espécies domésticas, uma vez que são raros estudos avaliando a imunidade de equinos e suínos ao *C. difficile* e suas toxinas. Em um futuro próximo, a produção de um toxóide A/B poderá ser um ponto essencial para o controle das doenças associadas a *C. difficile* em animais.

Outra alternativa que poderá ser utilizada futuramente para prevenção e tratamento é a administração de estirpes não-toxigênicas de *C. difficile*. Tal possibilidade foi levantada por trabalhos ao demonstrarem que seres humanos e animais, previamente colonizados por essas estirpes, possuíam uma menor chance de serem infectados por uma estirpe toxigênica e

de desenvolverem diarreia (Shim et al., 1998; Clooten et al., 2008; Silva et al., 2011; Silva et al., 2013a). Desde então, estudos avaliando o potencial da administração oral de estirpes não-toxigênicas para prevenção e tratamento das infecções por *C. difficile* tem sido desenvolvidos e um efeito protetivo foi relatado em um trabalho com seres humanos e com suínos (Songer et al., 2007; Songer et al., 2010).

Inexistem trabalhos sobre a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais domésticos no Brasil. Estudos com estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos nos EUA sugerem que tiamulina, virginiamicina e tilosina, incluídos na alimentação dos animais, podem ser úteis na profilaxia ou terapia (Songer e Anderson, 2006). Já em equinos e cães, além da terapêutica básica de suporte de animais diarreicos, preconiza-se a imediata substituição do antibiótico que precedeu a infecção por metronidazol, primeira droga de escolha, ou vancomicina (Tabaqchali, 1995; Jang et al., 1997; Båverud, 2004).

Em aproximadamente 20% dos casos de seres humanos com ICD ocorre recorrência do quadro clínico após o término do tratamento com metronidazol ou vancomicina. Muitas vezes a recorrência da doença persiste por longos períodos, sempre após a retirada do antimicrobiano, sendo necessário tratamentos alternativos para recuperação da microbiota (Kaur et al., 2011). Entre as alternativas, estudos experimentais sugerem que alguns probióticos podem auxiliar no tratamento das infecções por *C. difficile* por facilitar o restabelecimento da microbiota, aumentar a resposta imune e combater diretamente o patógeno e suas toxinas no intestino (Toothaker e Elmer, 1984; Kaur et al., 2011). Entre os microrganismos mais estudados

destacam-se o *Lactobacillus rhamnosus* e a levedura *Saccharomyces boulardii*, ambos com efeitos positivos comprovados tanto em modelos de ICD em roedores quanto em estudos clínicos com seres humanos. Já em equinos e suínos são raros os trabalhos avaliando o efeito de probióticos em casos de ICD (Toothaker e Elmer, 1984; Kaur et al., 2011; Zilberberg e Shorr, 2013).

Outra opção, usada até o momento apenas em humanos, é o transplante de microbiota fecal. Nesse caso, um doador saudável, comumente um parente próximo do paciente, cede o conteúdo fecal que será transplantado por sonda nasogástrica ou colonoscopia para o paciente com ICD. Com isso, ocorre uma rápida recuperação da microbiota, que por sua vez inibe o crescimento e produção de toxinas de *C. difficile* (Rubin et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ALFA, M.J.; KABANI, A.; LYERLY, D. et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol.*, v.38, n.7, p.2706-2714, 2000.
- ANDERSON, M. A; SONGER, J. G. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe.*, v.128, p.204-206, 2008.
- ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Med Microbiol.*, v.54, p.163-6, 2005.
- ARROYO, L.G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J.S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered

- from horses with diarrhea. *Vet Microbiol.*, v.120, p.179-183, 2007.
- BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; DE OLIVEIRA, M.P. et al. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.68, n.4, p.449-55, 2010.
- BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, n.2, p.249-55, 2011.
- BALASSIANO, I.T.; MIRANDA, K.R.; BOENTE, R.F. et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v.15, n.3, p. 61-64, 2009.
- BALASSIANO, I.T.; YATES, E.A.; DOMINGUES, R.M. et al. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, v.61, n.2, p.169-79, 2012.
- BANO, L. Prevalence and Molecular Characterization of *Clostridium difficile* isolated from rabbits and detection of its main toxins. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, 2008, Verona. *Proceedins of the...* Verona: [s.n], 2008. p. 911-914. Disponível em: <<http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2008-Verona/Papers/P-Bano.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2013.
- BARTLETT, J. G. *Clostridium difficile* infection: historic review. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.227-9, 2009.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet Clinic North Am Eq Pract*, v.20, n.3, p.615-630, 2004.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Vet Q.*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.
- BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, v.35, n.5, p.465-71, 2003.
- BERRY, A. P; LEVETT, P. N. Chronic diarrhea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *Vet Rec.*, v.118, p.102-103, 1986.
- BORRIELLO, S.P. HONOUR, P.; TURNER, T. et al. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *J Clin Pathol.*, v. 36, n.1, p.84-7, 1983.
- BORRIELLO, S. P; HONOUR, P. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *J Clin Pathol.*, v.34, n.10, p.1124-7, 1981.
- BUGGY, B.P., WILSON, K.H., FEKETTY, R. et al. Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. *J Clin Microbiol.*, v.18, n.2, p.348-52 1983.
- CHEKNIS, A.K.; SAMBOL, S.P.; DAVIDSON, D.M. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for C.

difficile infections: 2005-2007. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.230-3, 2009.

CHOUICHA, N; MARKS, S.L. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *J Vet Diagn Investig.*, v.18, n.182-188, 2006.

CIESLA, W.P.Jr; BOBAK, D.A. *Clostridium difficile* toxins A and B are cation-dependent UDP-glucose hydrolases with differing catalytic activities. *J Biol Chem.*, v.273, n.26, p.16021-16026, 1998.

CLOOTEN, J., KRUTH, S., ARROYO, L. et al. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet Microbiol.*, v.129, p.209-14, 2008.

CORTHIER, G.; MULLER, M.C.; WILKINS, T.D. et al. Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun.*, v.59, n.3, p.1192-5, 1991.

CRUZ-JUNIOR, E.C.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S. et al. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesq Vet Bras*, no prelo, 2013.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect.*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

DOERN, G.V.; COUGHLIN, R.T.; WU, L. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a

monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays. *J Clin Microbiol.*, v.30, n.8, p.2042-6, 1992.

EHRICH, M.; PERRY, B.D.; TROUTT, H.F. et al. Acute diarrhea in horses of the Potomac River area: examination for clostridial toxins. *J Am Vet Med Assoc.*, v.185, n.4, p.433-5, 1984.

FERREIRA, C.E.; NAKANO, V.; DURIGON, E.L. et al. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.4, p.451-455, 2003.

GELLAD, Z.F.; JOHNSON, J.L.; MUIR, A.J. et al. Severity of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.*, v.9, n.4, p.276-280, 2007.

GEORGE, R.H.; SYMONDS, J.M.; DIMOCK, F. et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J.*, v.18, n.1, p.695, 1978.

GEORGE, W.L.; SUTTER, V.L.; CITRON, D. et al. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.9, n.2, p.214-9, 1979.

GONÇALVES, C.; DECREÉ, D.; BARBUT, F. et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.5, p.1933-1939, 2004.

GREEN, R.H. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. *Yale J Biol Med.*, v.47, n.3, p.166-81, 1974.

- GREENBERG, R.N.; MARBURY, T.C.; FOGLIA, G. et al. Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine. *Vaccine*, v.30, n.13, p.2245-9, 2012.
- GÜRTLER, V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J Gen Microbiol.*, v.139, n.12, p.3089-97, 1993.
- HALL, I.C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants. *Am J Dis Child.*, v.49, p.390-402, 1935.
- HAMBRE, D. M. et al. The toxicity of penicillin as prepared for clinical use. *J Am Med Associat.*, v.206, p.642, 1943.
- HOOKE, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol.*, v.15, n.13, p.1554-80, 2009.
- HOPMAN, N.E.; KEESSEN, E.C.; HARMANUS, C. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol.*, v.149, n.1, p.186-92, 2011.
- JANG, S.S.; HANSEN, L.M.; BREHER, J.E. et al. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin Infect Dis.*, v.25, p.266-7, 1997.
- JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis.*, v.14, n.7, p.1039-45, 2008.
- JONES, M.A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *Vet Rec.*, v.112, n.11: p.253.
- KAUR, S.; VAISHNAVI, C.; PRASAD, K.K. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* & epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Res*, v.133, p.434-441, 2011.
- KEEL, K.; BRAZIER, J.S.; POST, K.W. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol.*, v.45, n.6, p.1963-4, 2007.
- KEEL, M.K.; SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet Pathol.*, v.43, n.3, p.225-240, 2006.
- KEESSEN, E.C.; HOPMAN, N.E.; VAN LEENGOED, L.A. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n.5, p.1816-21, 2011.
- KELLY, C.P.; LAMONT, J.T. *Clostridium difficile*: more difficult than ever. *N Engl J Med*, v.359, n.18, p.1932-40. 2008.
- KUIJPER, E.J.; DE WEERDT, J.; KATO, H. et al. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v.20, n.8, p.528-534, 2001.
- LEMEE, L.; DHALLUIN, A.; TESTELIN, S. et al. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.12, p.5710-5714, 2004.
- LIPPKE, R.T.; BOROWSKI, S.M.; MARQUES, S.M.T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated

- with neonatal diarrhea in piglets. *Pesq Vet Bras.*, n.31, v.6, p.505-510, 2011.
- LYERLY, D.M.; KRIVAN, H.C.; WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev.*, v.1, n.1, p.1-18, 1988.
- MACLEOD-GLOVER, N.; SADOWSKI, C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Can Fam Physician.*, v.56, n.5, p.417-23, 2010.
- MAGDESIAN, K.G.; HIRSH, D.C.; JANG, S.S. et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993-1997). *J Am Vet Med Assoc.*, v.220, n.1, p.67-73, 2002.
- MARCON, A.P.; GAMBA, M.A.; VIANNA, L.A. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. *Braz J Infect Dis*, v.10, p. 384–389, 2006.
- MARKS, S.L.; KATHER, E.J.. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clinic North Am: Small Animal Practic*, v.33, n.5, p.1029-60, 2003.
- MARTINS, A.M.C.R.P.F.; LEME, M.C.M.; HIPOLITO, M. et al. Descrição de um caso de enterocolite pseudomembranosa em bovino. *Arq Inst Biol.*, v.68, n.1, p.119-121, 2001.
- MEDINA-TORRES, C.E.; WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol.*, 152, 212-215, 2010.
- NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *App Environm Microbiol.*, v.77, n.16, p.5755-60, 2011.
- POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. et al. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest.*, v.14, n.3, p.258-259, 2002.
- PREIS, I.S.; SILVA, R.O.S.; PIRES, P.S. et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz J Vet Pathol.*, v.5, n.1, p.7-11, 2012.
- RAMIREZ, N.; LIGGINS, M.; ABEL-SANTOS, E. Kinetic evidence for the presence of putative germination receptors in *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol.*, v.192, n.16, p.4215-22, 2010.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STAEMPFLI, H.R.; DUFFIELD, T. et al. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis J.*, v.13, n.3, p.485-487, 2007.
- RUBIN, T.A.; GESSERT, C.E.; AAS, J. et al. Fecal microbiome transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection: Report on case series. *Anaerobe*, v.56, p.1-5, 2012.
- RUPNIK, M.; DUPUY, B.; FAIRWEATHER, N.F. et al. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol*, v.54, p.113-117, 2005.
- SAMIE, A.; OBI, C.L.; FRANASIAK, J. et al. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdtA*, *cdtB*), and *tcdC* genes in Vhembe District, South Africa.

Am J Trop Med Hyg, v.78, n.4, p.577-585, 2008.

SCHMIDT, M.L.; GILLIGAN, P.H. *Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible? *Anaerobe*, v.6, p.270-3, 2009.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog*, v.5, n.10, 2009.

SHIM, J.K.; JOHNSON, S.; SAMORE, M.H. et al. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet*, v.351, n.9103, p.633-6, 1998.

SIDDIQUI, F.; O'CONNOR, J.R.; NAGARO, K. et al. Vaccination with parenteral toxoid B protects hamsters against lethal challenge with toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* but does not prevent colonization. *J Infect Dis.*, v.205, n.1, p.128-33, 2012.

SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v.43, n.1, p.73-80, 2013b.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.

SILVA, R.O.S.; SANTOS, R.L.R.; PIRES, P.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. *Braz J Microbiol*, v.44, n1. 133-137, 2013a.

SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, v.140, p.399-404, 2010.

SONGER, J.G.; JONES, R.; ANDERSON, M.A. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Vet Microbiol.*, v.124, n.4, p.358-361, 2007.

SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; KILLGORE, G.E. et al. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, v.15, n.5, p.819-821, 2009.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Investig.*, v.17, n.6, p.528-536, 2005.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev*, n.2, p.321-6, 2004.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1-4, 2006.

SORG, J.A.; SONENSHEIN, A.L. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol.*, v.191, n.3, p.1115-7, 2009.

STRUBLE, A.L.; TANG, Y.J.; KASS, P.H. et al. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*, v.6, p.342-7, 1994.

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M. et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett*, v.186, p.307-312, 2000.

TABAQCHALI, S.; JUMAA, P. Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. *BMJ*, v.310, n.6991, p.1375-80, 1995.

TOOTHAKER, R.D.; ELMER, G.W. Prevention of Clindamycin-induced Mortality in Hamsters by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.26, p.552-556, 1984.

VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Microbiol.*, v.27, n.4, p.289-300, 2009.

VOTH, D.E.; BALLARD J.D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinic Microbiol Reviews.*, v.18, n.2, p.247-263, 2005.

WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Survival of

Clostridium difficile and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest*, v. 12, n.4, p.332-6, 2000.

WEESE, J.S.; WEESE, H.E.; BOURDEAU, T.L. et al. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n.9, p.1436-9, 1421, 2001.

YAEGER, M.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*, v.14, n.4, p.281-7, 2002.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; GLENN, SONGER, J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J Vet Diagn Invest*, v.19, n.1, p.52-59, 2007.

ZILBERBERG, M.D.; SHORR, A.F. Preventing *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Crit Care Clin*, v.29, p.11-18, 2013.

4. CAPÍTULO 1: Padronização e avaliação de métodos de diagnóstico para infecção por *Clostridium difficile*

4.1 Padronização da soroneutralização celular para detecção das toxinas A/B de *Clostridium difficile* em fezes.

RESUMO

O diagnóstico da infecção causada por *Clostridium difficile* é baseado na detecção das toxinas diretamente nas fezes, sendo a detecção do efeito citotóxico causado pelas toxinas A/B em cultura de células (CTA) considerado o método “ouro”. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um protocolo de CTA em células em monocamada (CTAm) ou não-aderidas (CTAn) para detecção das toxinas A/B em fezes. Pool de fezes inoculadas com as toxinas A/B foram submetidas a variadas concentrações de células VERO e de antitoxinas de *C. sordellii*, sendo ambos os métodos padronizados com 8×10^3 células por poço e 0,1UI de antitoxina por poço. Após a padronização, amostras sabidamente positivas foram submetidas a CTAm e CTAn e títulos idênticos foram obtidos em ambos os métodos. Os protocolos padronizados de CTAm e CTAn mostraram-se eficientes para detecção das toxinas A/B em amostras de fezes, tornando-se uma opção para o diagnóstico das infecções por *C. difficile* em seres humanos e animais.

Palavras-chave: diarreia, soroneutralização celular.

INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbico obrigatório comumente encontrado no intestino de mamíferos. Hoje, *C. difficile* é o principal causador de colite pseudomembranosa em seres humanos, ocorrendo cerca de três milhões de casos anualmente nos EUA, implicando em um custo de 1,1 bilhão de dólares no tratamento (Gellad et al., 2007).

Em medicina veterinária, *C. difficile* é um importante agente causador de diarreia em potros e equinos adultos (Båverud et al., 1998). Em suínos a infecção por este agente é hoje a principal causa não-controlada de diarreia neonatal nos EUA e Europa (Songer e Anderson, 2006). No Brasil, estudos recentes comprovaram a ocorrência da doença em suínos e equinos, demonstrando a necessidade de implementação do diagnóstico da

doença na rotina laboratorial (Silva et al., 2011; Silva et al., 2012)

O diagnóstico da infecção causada por *C. difficile* é baseada na detecção das toxinas diretamente nas fezes por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ou pela detecção do efeito citotóxico causado pelas toxinas A/B em cultura de células, método conhecido como citotoxicidade celular (CTA) (Ciesla e Bobak, 1998). A CTA tem como principal vantagem a alta sensibilidade e especificidade, sendo por isso considerado o “padrão-ouro” (Doern et al., 1992). Existem diversos protocolos de CTA, com variações na linhagem celular, concentração total de células utilizadas, tempo de incubação e diluição dos espécimes clínicos. A grande maioria dos protocolos de CTA utilizam a inoculação de diluições do filtrado fecal na monocamada celular (CTAm), enquanto para outros agentes clostridiais comumente a inoculação

ocorre diretamente nas células em suspensão, não aderidas (CTAn) (Schleupner et al., 1995; Delmée, 2001; van der Berg et al., 2005; Salvarani et al., 2010). Como vantagem, a CTAm permite a armazenagem de placas já com a monocamada, aumentando a velocidade do processamento quando da chegada de amostras. Porém, o consumo de reagentes e de materiais é maior, elevando o custo do diagnóstico. Já a CTAn, possui um custo um pouco mais baixo e um protocolo mais simples, sendo mais adequado para uma rotina laboratorial onde poucas amostras são processadas por semana.

Por outro lado, independente do protocolo de CTA utilizado, o resultado é relativamente demorado (24 a 48 horas) e a técnica exige manutenção de linhagens celulares (Delmeé, 2001; Post et al., 2002). Já o ELISA, método mais comumente empregado para o diagnóstico em seres humanos e animais, permite um processamento de várias amostras simultaneamente e o resultado é dado em poucas horas (Delmée, 2001). Todos os kits de ELISA disponíveis no mercado brasileiro foram padronizados para utilização a partir de fezes humanas, sendo necessários estudos para avaliação da sensibilidade e especificidade para o diagnóstico a partir de espécimes clínicos de animais. Até o presente momento, nenhum dos kits disponíveis no mercado brasileiro foi avaliado com fezes de animais domésticos, permanecendo a dúvida com relação à adequação desses produtos para utilização no diagnóstico das infecções por *C. difficile* nestas espécies.

O presente estudo tem como objetivo padronizar uma soroneutralização celular para detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, disponibilizando-a para o diagnóstico em diversas espécies e para

futuras avaliações do desempenho de kits comerciais de ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção das toxinas A/B

Para a produção do sobrenadante contendo as toxinas A/B, foi utilizado um biorreator de bancada¹ com volume da dorna de 7,5L. O biorreator é provido de uma turbina do tipo *pitched-blade*, com controle programável de velocidade de agitação, mantida a 200 rpm, temperatura, mantida a 37°C e pH, mantido a 7,0. Para estabelecimento de um ambiente de anaerobiose, borbulhou-se gás nitrogênio durante 30 minutos antes do início da fermentação.

Para produção do inóculo e para fermentação bacteriana (produção das toxinas A/B), utilizou-se meio Brain Heart Infusion (BHI)². Após crescimento por 24 horas, o inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) para o meio BHI no biorreator e a fermentação foi realizada de acordo com Popoff (1987). Após crescimento, os cinco litros da cultura foram centrifugados a 10.000 x g por 40 minutos e o sobrenadante concentrado 50 vezes por ultrafiltração em sistema Pellicon³ com membrana de retenção de 100 KDa, até obtenção de um volume final de aproximadamente 10 mL. A toxina concentrada foi submetida a um ELISA⁴ nas diluições 1:10, 1:100 e 1:200 para confirmação da presença das toxinas A/B.

A dosagem protéica do concentrado contendo as toxinas A/B foi realizada por dois métodos: em equipamento

¹ BioFlo 110 - New Brunswick Scientific CO., Inglaterra.

² Difco Laboratories, EUA.

³ Millipore CO., EUA.

⁴ *C. difficile* Tox A/B II - Techlab Inc, EUA

Nanovue⁵ com leitura a 280nm e utilizando volume de 5 µl da toxina e pelo método de Bradford⁶ com leitura em espectrofotômetro⁷ a 595nm.

Inoculação das toxinas A/B em amostras de fezes

Foram coletadas amostras de dez leitões com sete dias de vida e de fezes de quatro equinos adultos e um potro de cinco meses de idade. Todos os animais encontravam-se aparentemente saudáveis e os equinos não possuíam histórico de desordens gastrointestinais nos últimos dois meses. As amostras foram negativas para as toxinas A/B por ELISA e para o isolamento de *C. difficile*. Para formação do *pool* de suínos (*pool* 1) e de equinos (*pool* 2), quantidades iguais de fezes dos animais foram misturadas e homogeneizadas. Para o *pool* 1, adicionou-se dois gramas de fezes de cada suíno, enquanto que para o *pool* 2, adicionou-se 4 gramas de fezes de cada equino, totalizando 20 gramas para cada. Metade do volume de ambos os *pools* foram separados para utilização como controle negativo, sendo aliquotados em microtubos e armazenados a -20°C. A outra metade foi utilizada para inoculação das toxinas A/B. Os *pools* para controle positivo foram inoculados com 5 ml da cultura contendo as toxinas A/B, homogeneizados, aliquotados em microtubos e armazenados a -20°C.

Para extração das toxinas, as fezes foram diluídas na proporção de 1:5 com salina tamponada e, após centrifugação a 3000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22µm (Delmée, 2001).

Padronização da citotoxicidade celular em monocamada (CTAm) e em células não aderidas (CTAn)

Foi utilizada a linhagem celular VERO (ATCC CCL-81) cultivada no meio essencial mínimo (MEM)⁸, suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB)⁸, penicilina (40.000UI/mL) e estreptomicina (20.000UI/mL) (Salvarani et al., 2010). A linhagem celular foi cultivada em até a confluência mínima de 90%, em estufa úmida com atmosfera controlada de 5% CO₂ a 37°C. Para ambos os métodos, foram avaliadas as seguintes concentrações celulares: 1,0x10³, 4,0x10³, 8,0x10³, 1,0x10⁴, 1,5x10⁴, 2,0x10⁴, 3,0x10⁴, 4,0x10⁴, células por poço. Os anticorpos anti-toxinas de *Clostridium sordellii*⁹ foram testados nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3 UI por poço.

Para o teste CTAn, baseado em Salvarani et al. (2010), uma placa de 96 poços recebeu 100µl de sobrenadante fecal filtrado nos quatro primeiros poços e o restante recebeu 50µl de MEM. Procedeu-se a diluição seriada do material na base 2. Ao final, adicionou-se 50µl de MEM nas duas primeiras colunas e 50µl de MEM com antitoxina de *C. sordellii* nas duas colunas restantes. Após 60 minutos a 37°C, adicionou-se 50µl de cultivo contendo a quantidade celular adequada por poço. As placas foram incubadas a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂ por 24 horas.

Para o teste CTAm, baseado em van der Berg et al. (2005), uma placa de 96 poços recebeu, nos quatro primeiros poços, 100µl de cultivo contendo a quantidade celular adequada por poço. Após incubação *overnight* para estabelecimento da monocamada, o

⁵ General Electric Company, EUA

⁶ Proteoquant, Proteobras, Brasil

⁷ Modelo E225-D, CELM, Brasil

⁸ MEM - Gibco laboratories, EUA

⁹ NIBSC, Inglaterra

meio de cultivo foi retirado e adicionou-se 50 µl de MEM. Em outra placa de 96 poços, realizou-se a diluição seriada na base 2 do sobrenadante fecal filtrado. Ao final, adicionou-se 50µl de MEM nas duas primeiras colunas e 50µl de MEM com antitoxina de *C. sordellii* nas duas colunas restantes. Após incubação a 37°C por 60 minutos, o conteúdo foi transferido para a placa contendo a monocamada celular e incubado a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂ por 24 horas.

O título, adaptado do relato de Schleupner et al. (1995) e expressado em efeito citotóxico por mililitro (EC/ml), foi considerado como a maior diluição onde houve 90% ou mais de arredondamento celular, seguido de, no mínimo, 90% de neutralização desse efeito na mesma diluição onde houve adição de antitoxina

Avaliação da CTAm e CTAn em amostras positivas

Para avaliação do protocolo padronizado de CTAn e CTAm, amostras sabidamente positivas para as toxinas A/B foram submetidas a extração e simultaneamente a CTAn e CTAm. Foram utilizadas oito amostras positivas no ELISA¹⁰, sendo duas de seres humanos, quatro de leitões e duas de potros naturalmente infectados. Além dessas, foram incluídas quatro amostras de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados por *C. difficile*, como preconizado por Sambol et al. (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxina concentrada apresentou resultados positivos nas três concentrações testadas no ELISA,

confirmando a presença das toxinas A/B. A dosagem protéica do concentrado foi de 30,2 e 25,6 µg/ml pela leitura em equipamento Nanovue (General Electric Company, EUA) com leitura a 280nm e pelo método de Bradford, respectivamente.

Na padronização da concentração celular, a sensibilidade foi idêntica para as concentrações de 1×10^3 a 4×10^4 células por poço, porém concentrações menores que 8×10^3 células por poço dificultavam a visualização do arredondamento celular, aumentando a chance de erro na interpretação do resultado. Com isso, a concentração escolhida foi a de 8×10^3 células por poço, menor quantidade de células que permitia uma fácil leitura e apresentava a maior sensibilidade no teste.

Diversas linhagens celulares são relatadas para o diagnóstico de infecção por *C. difficile* por CTA. Em geral, as linhagens Chinese Ovary Hamster, HeLa e VERO tem sido as mais utilizadas. No presente estudo optou-se pela VERO por ser sabidamente a linhagem mais sensível às toxinas A/B (Delmée et al., 2001; van der Berg et al., 2005). Além da linhagem celular, a concentração de células por poço também é um parâmetro extremamente variável entre autores e trabalhos. A concentração celular foi padronizada pela observação da sensibilidade da linhagem frente a amostras de fezes inoculadas com as toxina A/B produzidas *in vitro* e com amostras de infecção natural em várias espécies. É interessante observar que houve pouca variação dentro de um intervalo considerável de concentração celular, uma vez que a linhagem Vero apresentou a mesma sensibilidade quando utilizou-se 1×10^3 até 4×10^4 células por poço. Dessa forma, mesmo com uma concentração celular 40 vezes maior, o efeito de arredondamento

¹⁰ *C. difficile* ToxA/B, Techlab, EUA

celular observado foi o mesmo após incubação a 24 ou 48 horas, confirmando a alta sensibilidade da linhagem celular as toxinas A/B de *C. difficile*.

Em concentrações de 0,01 a 0,08 UI por poço, alguns espécimes clínicos apresentaram neutralização do efeito citotóxico menor que 90% na última diluição de leitura. A partir de 0,1 UI/poço, todas as amostras trabalhadas apresentaram ponto de corte onde foi possível observar 90% ou mais de arredondamento celular e, na mesma diluição, 90% ou mais de proteção quando da adição de antitoxina anti-*C. sordellii*. A grande maioria dos trabalhos não descrevem a quantidade de anticorpo utilizada, dificultando comparações. Alguns autores utilizam anticorpos comerciais para diagnóstico de *C. difficile*, informando apenas o volume utilizado (Van der Berg et al., 2005) enquanto em outros trabalhos os autores apenas relatam a utilização de antitoxina de *C. sordellii* ou *C. difficile* produzida *in house* (Schleupner et al.,

1995; Delmée, 2001; Keessen et al., 2011).

Outro ponto que chama atenção é a grande variação de parâmetros utilizados para a determinação de positividade das amostras. Em alguns relatos, a quantidade de arredondamento e de proteção varia entre 10, 30 e 50%, enquanto alguns autores citam até mesmo que qualquer diferença de proteção é considerada positividade (Schleupner et al., 1995; Delmée, 2001; Van den Berg et al., 2005; Keessen et al., 2011). No presente estudo, o ponto de corte foi padronizado como a diluição onde correu arredondamento maior que 90% seguido de proteção também maior que 90%, o que na visão do autor diminui a subjetividade do diagnóstico e, consequentemente, a possibilidade de resultados falso-positivos.

A tabela 1 resume os resultados de títulos encontrados na CTAn e CTAm para os controles e para as amostras sabidamente positivas.

Tabela 1: Resultado de títulos obtidos, em efeito citotóxico por mililitro (EC/ml), no ensaio de citotoxicidade celular em monocamada (CTAm) e em células não-aderidas (CTAn) para amostras de fezes de seres humanos, leitões, hamsters e equinos sabidamente positivas para as toxinas A/B de *Clostridium difficile*.

Amostra	Espécie	Título (EC/ml) x 10 ³	
		CTAm	CTAn
S1	Suínos	20,5	20,5
S2		5,1	5,1
S3		20,5	20,5
S4		1,3	1,3
HAM1	Hamsters ¹	20,5	20,5
HAM2		>81,9	>81,9
HAM3		>81,9	>81,9
HAM4		>81,9	>81,9
PO1	Potros	10,2	10,2
PO2		10,2	10,2
H1	Seres humanos	5,1	5,1
H2		1,3	1,3
Pool 1	Suínos ²	20,5	20,5
Pool 2	Equinos ²	20,5	20,5
Controle Negativo 1	Suínos	Negativo	Negativo
Controle Negativo 2	Equinos	Negativo	Negativo

¹amostras de animais com infecção por *C. difficile* induzida experimentalmente. ²Amostras de fezes inoculadas com toxinas A/B produzidas *in vitro*.

O título (EC/ml) foi o mesmo em todas as amostras testadas, sugerindo que ambos os protocolos são adequados para a detecção das toxinas A/B em amostras de fezes. Não houve diferença de resultados na leitura com 24 ou 48 horas.

A grande maioria dos trabalhos para detecção das toxinas A/B relata a utilização da CTAm (Delmée et al 2001; van der Berg et al., 2005), protocolo mais demorado e mais complexo quando comparado com a CTAn. O presente estudo sugere ambos protocolos como aceitáveis para detecção das toxinas A/B e, de forma semelhante ao relatado por Keessen et

al. (2011), os resultados encontrados indicam que a leitura pode ser realizada com apenas 24 horas.

A CTA padronizada torna-se uma opção para o diagnóstico das infecções por *C. difficile* em seres humanos e animais domésticos. Além disso, a técnica será útil para avaliações do desempenho de kits comerciais de ELISA.

AGRADECIMENTOS

CNPq, Fapemig, CAPES, PRPq-UFGM e INCT. Agradecimentos á Profa Zélia Inês P. Lobato pelo auxílio na padronização do teste.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.A; SONGER, J.G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in swine. *Vet Microbiol*, v.128, p.204-6, 2008.

BÅVERUD, V.; FRANKLIN, A.; GUNNARSSON, A. et al. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J*, v.30, n.6, p.482-8, 1998.

CIESLA, W.P.Jr; BOBAK, D.A. *Clostridium difficile* toxins A and B are cation-dependent UDP-glucose hydrolases with differing catalytic activities. *J Biol Chem.*, v.273, n.26, p.16021-16026, 1998.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect.*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

DOERN, G.V.; COUGHLIN, R.T.; WU, L. Laboratory diagnosis of

Clostridium difficile-associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays. *J Clin Microbiol.*, v.30, n.8, p.2042-6, 1992.

GELLAD, Z.F.; JOHNSON, J.L.; MUIR, A.J. et al. Severity of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.*, v.9, n.4, p.276-280, 2007.

KEESSEN, E.C.; HOPMAN, N.E.; VAN LEENGOED, L.A. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n.5, p.1816-21, 2011.

POPOFF, M. R. Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect Immun*, v.55, n.1, p.35-43, 1987

POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. et al. Evaluation of a test for

Clostridium difficile toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest.*, v.14, n.3, p.258-259, 2002.

SALVARANI, F.M.; LOBATO, Z.I.P.; ASSIS, R.A. et al. *In vitro* evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.62, n.4, p.778-783, 2010.

SAMBOL, S.P.; MERRIGAN, M.M.; TANG, J.K. et al. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *J Infect Dis*, v.186, n.12, p.1781-9, 2002.

SCHLEUPNER, M.A.; GARNER, D.C.; SOSNOWSKI, K.M. et al. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. *J*

Clinl Microbiol, v.33, p.1755-1759, 1995.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.

VAN DEN BERG, R.J.; BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, L.S.; GERRITSEN, H.J. et al. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, v.43, p.5338-40, 2005.

4.2 Avaliação de kits comerciais de ELISA e da cultura toxigênica frente a citotoxicidade celular para o diagnóstico de *C. difficile* em suínos e equinos.

RESUMO

Clostridium difficile é considerado uma das principais causas de diarreia em leitões e potros. Apesar da crescente importância de *C. difficile* como enteropatógeno nestas espécies, não existe consenso com relação ao diagnóstico laboratorial das infecções por este agente em animais domésticos e o desempenho da maioria dos testes comercialmente disponíveis é ainda desconhecido. O objetivo do presente trabalho foi comparar o desempenho de três testes de ELISA e da cultura toxigênica frente a citotoxicidade celular como “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em leitões e potros. Com relação as amostras de leitões, todos os ELISAs testados e a cultura toxigênica apresentaram baixa sensibilidade (entre 50 e 60%), enquanto a especificidade variou entre 82 e 98%. Já para amostras de potros, os ELISAs apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade acima de 95%, enquanto que a cultura toxigênica apresentou 43% e 99% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Esses resultados sugerem que os ELISAs e o protocolo de cultura testados são de baixa sensibilidade para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em leitões, se considerado o animal de forma individual. Já para potros, os kits de ELISA parecem se uma boa opção diagnóstica devido a alta sensibilidade e especificidade encontrados.

Palavras-chave: colite, enterite, zoonose.

INTRODUÇÃO

C. difficile é hoje considerado como a principal causa não controlada de diarreia neonatal em suínos (Songer e Anderson, 2006) e um dos principais causadores de diarreia em potros (Båverud, 2002). Além disso, estudos recentes demonstraram que estirpes isoladas de seres humanos, com infecção por *C. difficile* (ICD), têm uma alta semelhança genética com as estirpes isoladas de origem animal (Jhung et al., 2008; Norman et al., 2011), levantando a hipótese de uma zoonose.

Para a maioria dos autores, o "padrão ouro" para o diagnóstico da ICD é o ensaio de citotoxicidade celular (CTA). Porém trata-se de uma técnica demorada, trabalhosa e que exige pessoal treinado. Dessa forma, imunoensaios enzimáticos (ELISA)

comerciais são os testes mais comumente utilizados para o diagnóstico de ICD em seres humanos e animais (Medina-Torrez et al., 2010; René et al., 2012). Recentemente, a cultura toxigênica também foi descrita como uma técnica sensível para os seres humanos (Peterson et al., 2010), mas pouco se sabe da sua aplicação para as amostras de fezes de animais domésticos.

Apesar da importância da *C. difficile* como enteropatógeno de leitões e potros e até mesmo como um agente potencial zoonótico, inexistem padrões para o diagnóstico de infecção por este agente e o desempenho da maioria dos métodos de detecção disponíveis comercialmente são desconhecidos (Keessen et al., 2011). À luz disto, o objetivo do presente estudo foi comparar os desempenhos de três ELISA e da cultura toxigênica frente a

citotoxicidade celular como o “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em leitões e potros.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de fezes de suínos incluídas neste estudo foram de animais com idade entre um a sete dias de vida, encaminhados à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para diagnóstico etiológico de diarreia neonatal. Foram obtidas 73 amostras, 62 de animais diarréicos e 11 de animais não-diarréicos, de 32 granjas diferentes e localizadas nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo. De potros, um total de 106 amostras, de animais com idade variando entre um dia e seis meses, foram coletadas em haras e de animais apresentados ao Hospital Veterinário da UFMG (HV). Em haras, foram coletadas 98 amostras de fezes de 15 diferentes propriedades, sendo 53 amostras de animais diarréicos e 38 de animais não diarréicos (aparentemente saudáveis). Já no HV foram coletadas 15 amostras de potros diarréicos no momento da internação. Todos os espécimes clínicos de suínos e equinos foram recolhidos em recipientes estéreis e mantidos a -20 °C até a execução dos testes, por um período máximo de até sete dias.

Ensaios imunoenzimáticos (ELISA), Citotoxicidade celular (CTA) e Cultura toxigênica (CT)

Os ensaios de CTA para a detecção das toxinas A/B de *C. difficile* foram realizados com células Vero (VERO-ATCC CCL 81) como descrito anteriormente no item 4.1 deste trabalho. Para o isolamento, as amostras de fezes foram submetidas a um choque

com álcool absoluto (Avbersek et al., 2009) e alíquotas de 50 µl foram inoculadas em placas contendo agar cicloserina-cefoxitina-frutose¹¹ suplementada com 7% de sangue equino e 0,1% de sódio taurocolate¹². Após a incubação em ambiente de anaerobiose, em jaras com mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) a 37 °C por 72 horas, todas as colônias com morfologia sugestiva e coloração de Gram característica foram submetidas a uma PCR para confirmação da identidade pela detecção do gene (*tpi*) e tipificação pela detecção dos genes das toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) e binária (*cdtB*) (Silva et al., 2011). Todos os isolados toxigênicos em PCR foram testados por CTA para produção *in vitro* de toxina como descrito anteriormente por Medina-Torrez et al. (2010).

Três ELISAs comerciais para detecção das toxinas A/B foram avaliados: *C. difficile* Tox A/B II¹³, Remel Prospect *C. difficile* Toxins A/B¹⁴ e *Clostridium difficile* Ridascreen¹⁵. As reações foram realizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes e a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram calculados para cada ELISA e para a TC, com seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade¹⁶ e considerando o CTA como “padrão-ouro” (Delmeé, 2001).

RESULTADOS

Para as amostras de suínos, as toxinas A/B foram detectadas pelo CTA em 22 (30,1%) amostras (tabela 2). Todos os

¹¹ Hi-media, Mumbai, Índia.

¹² Sigma-Aldrich Co., EUA.

¹³ Techlab Inc., EUA

¹⁴ Oxoid, Inglaterra

¹⁵ R-Biopharm, Alemanha

¹⁶ STATA, College Station, Texas, EUA

kits de ELISA testados apresentaram sensibilidade abaixo de 64% e especificidade entre 80 e 98% (tabela 3). Estirpes de *C. difficile* foram isoladas a partir de 10 (13,7%) leitões, sendo nove estirpes classificadas como

toxigênicas por PCR. Todas as estirpes toxigênicas por PCR foram capazes de produzir toxina *in vitro*. Com isso, a TC apresentou 40,9% de sensibilidade e especificidade de 98%.

Tabela 2: Resultados obtidos nos três testes imunoenzimáticos (ELISAs), na cultura toxigênica e no teste de citotoxicidade celular para o diagnóstico da infecção por *Clostridium difficile* em potros e leitões

Método	Amostras de Potros				Amostras de Leitões			
	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
	V	F	V	F	V	F	V	F
Citotoxicidade celular	9	-	97	-	22	-	51	-
Cultura Toxigênica	6	1	96	3	9	1	50	13
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	9	4	93	0	12	6	45	10
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	9	1	96	0	13	1	50	9
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	9	4	93	0	14	10	41	8

Legenda: V – verdadeiro, F - Falso

Tabela 3: Comparação de três ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e cultura toxigênica frente a soroneutralização como “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção por *Clostridium difficile* em leitões.

Método	Amostras de leitões (n=73)			
	% (intervalo de confiança de 95%)			
	Sens	Espec	VPP	VPN
Cultura toxigênica	40,9 (23,3-61,3)	98,0 (89,7-99,7)	90,9 (59,6-98,2)	79,7 (67,8-87,5)
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	54,5 (34,7-73,1)	88,2 (76,7-94,4)	76,7 (43,8-83,7)	81,8 (69,7-89,8)
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	59,1 (38,7-76,7)	98,0 (89,7-99,6)	92,9 (68,5-98,7)	84,7 (73,5-91,8)
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	63,6 (42,9-80,2)	80,3 (67,5-88,9)	58,3 (38,8-75,5)	83,6 (70,9-91,5)

Legenda: Sens=Sensibilidade; Espec=Especificidade; VPP=valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo.

As toxinas A/B foram detectadas em nove amostras de potros (8,5%), todos de animais com diarreia. Os ELISAs testados detectaram os oito animais positivos (100% de sensibilidade), enquanto a especificidade dos testes ficou acima de 95% (tabela 4). Estirpes

de *C. difficile* foram isoladas de sete potros (6,2%), sendo seis dessas toxigênicas por PCR e por cultura toxigênica. Frente a este resultado, a cultura toxigênica apresentou sensibilidade de 55% e especificidade de 99% para amostras de fezes de potros.

Tabela 4: Comparação de três ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e cultura toxigênica frente a soroneutralização como “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção por *Clostridium difficile* em potros.

Método	Amostras de potros (n=106)			
	% (intervalo de confiança de 95%)			
	Sens	Espec	VPP	VPN
Cultura toxigênica	50 (25.4-74.6)	99 (94.6-99.8)	85.7 (48.7-97.4)	94.3 (88.1-97.4)
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	100 (75-100)	99 (94.6-99.8)	92.3 (66.7-98.6)	99.9 (96.1-100)
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	100 (75-100)	97 (91.5-99)	80 (54.8-93)	99 (96-100)
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	100 (75-100)	97 (91.5-99)	80 (54.8-93)	99 (96-100)

Legenda: Sens=Sensibilidade; Espec=Especificidade; VPP=valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo.

DISCUSSÃO

Todos os ELISAs testados apresentaram baixa sensibilidade para as amostras de fezes de suínos. Desempenho semelhante também foi relatado em outros trabalhos anteriores com outros kits comerciais (Anderson e Songer, 2008; Keessen et al., 2011). Alguns autores atribuíram esta baixa sensibilidade a uma possível presença de inibidores nas fezes, mas até agora não há nenhum trabalho que confirme essa hipótese (Chouicha e Marks, 2006; Keessen et al., 2011). Por outro lado, semelhante ao relatado por Keessen et al. (2011), resultados falsos-positivos variaram entre os kits (dados não mostrados), sugerindo que os resultados incorretos foram devido ao teste, e não devido a presença de alguma substância nas amostras.

Também é interessante notar que uma versão mais antiga do kit da marca Techlab® foi previamente testada por Post et al. (2002) para amostras de fezes de suínos, sendo relatada uma sensibilidade de 91% e especificidade de 86%. No presente estudo, a nova versão do teste Techlab® mostrou uma sensibilidade mais baixa (55%), mas a especificidade foi de 98%.

Já para amostras de potros, a alta sensibilidade dos ELISAs corrobora os

resultados encontrados por Medina-Torrez et al. (2010), que testaram um kit e encontraram sensibilidade de 84% e especificidade de 96%. Este resultado sugere que os kits de ELISA podem ser uma boa opção para o diagnóstico das infecções por *C. difficile* nesta espécie.

É interessante salientar, ainda, que nenhum animal não-diarreico foi positivo para as toxinas A/B, como relatado anteriormente (Weese et al., 2001; Båverud et al., 2003). Embora seja uma informação conhecida, pesquisas recentes demonstraram que é comum, por parte de clínicos e patologistas, a solicitação da detecção das toxinas A/B a partir de fezes potros não diarreicos (Medina-Torrez et al., 2010). A inclusão desses espécimes clínicos pode levar a uma diminuição do valor preditivo positivo se o teste não é 100% específico, principalmente em uma baixa prevalência da doença. É importante citar ainda que a maioria dos laboratórios relatam o uso de imunoenaios enzimáticos comerciais (ELISAs) para detecção de toxinas em amostras de fezes de equinos, um teste mais rápido e econômico que a detecção em cultura de células, mas comumente de menor sensibilidade e especificidade (Medina-Torrez et al., 2010).

A TC apresentou uma sensibilidade baixa tanto para amostras de potros quanto para amostras de suínos (50 e

40,9%, respectivamente), contrastando com o relatos anteriores (Medina-Torrez et al., 2010; Keessen et al., 2011). Entretanto, não há nenhum método padrão para a cultura toxigênica de *C. difficile*, tornando difícil comparar resultados de TC com outros autores. Uma grande variedade de meios e também diferenças no protocolo de isolamento são comuns, tais como a utilização de choque com álcool e variações no tempo de incubação. No presente trabalho, optou-se por um método de isolamento simples que seria mais aplicável para o diagnóstico quando comparado com métodos anteriores (Medina-Torrez et al., 2010; Sharp et al., 2010; Keessen et al., 2011). Neste protocolo, as amostras foram submetidas a um choque de álcool e plaqueadas em ágar um TCCFA, seguido por um tempo de incubação de 72 horas. Porém, sabe-se que algumas estirpes de *C. difficile* podem não crescer devido a susceptibilidade a um ou a ambos antibióticos utilizados no meio (Songer e Uzal, 2005). Além disso, a utilização de CCFA, mesmo com a suplementação de taurocolate, pode ter uma sensibilidade variável para recuperação de esporos de *C. difficile* quando comparado com meios líquidos, como por exemplo o TCCFB (caldo de cefoxitina-cicloserina suplementado com taurocolate) (Thitiran et al., 2011). Todos esses fatores podem ter contribuído para a baixa sensibilidade encontrada no protocolo testado de TC. Deve-se destacar ainda que a TC não parece ser uma boa opção para o diagnóstico em potros devido ao elevado tempo para obtenção dos resultados. No presente estudo, mesmo com um método simplificado de cultura, os resultados de TC levaram pelo menos seis dias. Considerando que a infecção por *C. difficile* apresenta um curso agudo nessa espécie, a TC torna-se uma opção pouco interessante para diagnóstico em equinos.

Todos os isolados de *C. difficile* toxigênicos por PCR foram capazes de produzir toxinas *in vitro*. Estes resultados sugerem uma boa correlação entre a detecção dos genes codificadores das toxinas A/B por PCR e produção *in vitro* das toxinas A/B pelas estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos e equinos. Sugere-se que, com a detecção por PCR dos genes *tcdA* e *tcdB* das estirpes isoladas, o teste de produção de toxina *in vitro* não seja necessário, o que economizaria tempo e custo do diagnóstico. Entretanto, estudos com um maior número de estirpes são necessários para confirmar essa hipótese.

No presente trabalho, estirpes toxigênicas foram isoladas de dois animais negativos para toxinas A/B: um leitão diarréico e de um potro aparentemente saudável com dois dias de vida. Um estado de portador assintomático deve ser considerado neste caso. De forma semelhante ao presente trabalho, Båverud (2002) demonstraram que para potros com idade inferior a 14 dias de vida, o estado de portador assintomático é comum. Outra possibilidade para explicar a presença de uma estirpe toxigênica mas sem a presença das toxinas A/B é a degradação dessas proteínas por proteases fecais. Para Chouicha e Marks (2006), a presença de uma atividade de protease em amostras de fezes animais também poderia levar à degradação das toxinas fazendo com que estas não cheguem aos níveis mínimos de detecção do teste, mas até agora não há nenhum estudo confirmando esta hipótese. Deve-se ressaltar porém que o tempo entre coleta e processamento de amostras no presente trabalho foi de no máximo uma semana. Além disso, trabalhos anteriores com amostras dos suínos e equinos demonstrou que a toxina permanece detectável por pelo

menos um mês quando armazenada a -20 °C (Weese et al., 2000; Keessen et al., 2011). Estes achados sugerem que a não detecção das toxinas A/B pelos kits de ELISAs no presente estudo não foi devido ao tempo e forma de armazenamento das amostras.

É também importante notar que não existe um protocolo padrão para a CTA, havendo diferenças na linhagens de células, na concentração utilizada e também na diluição inicial das amostras de fezes. Todos esses parâmetros podem influenciar diretamente na sensibilidade do método. No presente trabalho optou-se pela linhagem celular Vero, considerada a mais sensível às toxinas A/B (Delmée, 2001), e por um protocolo de CTA amplamente utilizado com sucesso em outros estudos similares (van den Berg et al., 2005; Medina-Torrez et al., 2010 Keessen et al., 2011).

Para potros, os kits de ELISA testados apresentaram alta sensibilidade e especificidade, sugerindo que são adequados para o diagnóstico de infecção por *C. difficile* nesta espécie. Já para leitões, tais testes não apresentaram bom desempenho para diagnóstico individual de leitões entre zero e sete dias de vida. Para seres humanos, resultados semelhantes foram relatados e alguns estudos sugerem que pelo menos um algoritmo de duas etapas é necessário para um diagnóstico

seguro de *C. difficile* (Peterson et al., 2011). Porém, até o momento, não há consenso sobre quais testes devem ser usados em cada passo do diagnóstico. A abordagem em duas fases também foi relatada por Keessen et al. (2011) para suínos. Os autores sugerem um PCR em tempo real como o primeiro teste seguido por TC como teste confirmatório.

No presente trabalho um dos ELISAs mostrou uma especificidade de 98% para as amostras de leitões, permitindo que um grande grau de confiança nos resultados positivos, com uma VPP de 92% e um VPN de 85%. À luz desses resultados, sugere-se que esse teste poderia ser útil para pesquisar a presença da doença em um rebanho de suínos quando múltiplas amostras são colhidas. De acordo com Cameron e Baldock (1998) e considerando a prevalência encontrada (aproximadamente 30%), seriam necessárias 20 e 30 amostras para confirmar, com 95% de certeza, a ausência da doença em um plantel de até 600 matrizes e >600 matrizes, respectivamente.

APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

Protocolo 102/10 CEUA-UFGM (amostras de leitões) e 150/2010 CETEA-UNESP (amostras de potros).

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.A; SONGER, J.G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in swine. *Vet Microbiol.* v.128, p.204-6, 2008.

AVBERSEK, J.; JANEZIC, S.; PATE, M. et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.252-5, 2009.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Vet Q Journal*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.

- BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, v.35, n.5, p.465-71, 2003.
- CAMERON, A.R.; BALDOCK, F.C. A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev. Vet. Med*, v.34, p.1-17, 1998.
- CHOUICHA, N; MARKS, S.L. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *J Vet Diagn Invest.*, v.18, n.182-188, 2006.
- DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinic Microbiol Infect*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.
- JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis.*, v.14, n.7, p.1039-45, 2008.
- KEESSEN, E.C.; HOPMAN, N.E.; VAN LEENGOED, L.A. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n.5, p.1816-21, 2011.
- MEDINA-TORRES, C.E.; WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R. et al. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med*, v.24, n.3, p.628-32, 2010.
- NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *App Environm Microbiol.*, v.77, n.16, p.5755-60, 2011.
- PETERSON, L.R.; MEHTA, M.S.; PATEL, P.A. et al. Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel. *Am J Clin Pathol*, v.136, n.3, p.372-80, 2011.
- POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. et al. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest.*, v.14, n.3, p.258-259, 2002.
- RENÉ, P.; FRENETTE, C.P.; SCHILLER, I. et al. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.73, n.1, p.94-6, 2012.
- SHARP, S.E.; RUDEN, L.O.; POHL, J.C. et al. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *J Clin Microbiol*, v.48, n.6, p.2082-6, 2010.
- SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; SOUZA, D.F.M. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82-4. 2013a
- SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Eq Vet J*, 2013b.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of

Clostridium difficile from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagnostic Invest*, v.17, n.6, p.528-536, 2005.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1-4, 2006.

THITARAM, S.N.; FRANK, J.F.; LYON, S.A. et al. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and

prevalence. *J Food Prot*, v.74, p.130-3, 2011.

WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest*, v. 12, n.4, p.332-6, 2000.

WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. et al. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Vet J*, v.33, n.4, p.403-9, 2001.

4.3 Avaliação de kits comerciais de ELISA para o diagnóstico de infecção por *Clostridium difficile* em pacientes internados no Hospital das Clínicas da UFMG.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar o desempenho de três testes comerciais de ELISA frente a citotoxicidade celular (CTA) e a cultura toxigênica (TC) para o diagnóstico de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HCUFMG) com suspeita de infecção por *C. difficile* (ICD). Foram coletadas 92 amostras de fezes. Dessas, 29 (34,5%) foram positivas por CTA ou TC, ambos considerados “padrão ouro” para o diagnóstico de ICD. Os kits de ELISAs testados apresentaram sensibilidade entre 52,4% e 60,9%, enquanto que a especificidade foi superior a 90%. O presente estudo reforça a necessidade de mais estudos focando na padronização de novos métodos de diagnóstico de ICD em humanos.

Palavras-chave: nosocomial, colite pseudomembranosa.

INTRODUÇÃO

Clostridium difficile foi isolado pela primeira vez em 1935, mas somente no final da década de 70 foi reconhecido como um patógeno para seres humanos. Hoje, a infecção pelo *C. difficile* (ICD) passou a ser reconhecida como a principal causa bacteriana de diarreia associada a antibioticoterapia prolongada e como patógeno nosocomial de grande importância (Samie et al., 2008). Nos Estados Unidos da América, ocorrem cerca de três milhões de casos anualmente, com aumento da mortalidade e da resistência do microrganismo ao tratamento antimicrobiano convencional, representando um custo de 1,1 bilhões de dólares anualmente (Oldfield, 2004; Kelly e Lamont, 2008). Além disso, tem sido relatado o surgimento de estirpes altamente virulentas de *C. difficile* em diversos países (Balassiano et al., 2012) e de casos em pacientes não internados e sem histórico de antibioticoterapia, demonstrando a necessidade de mais estudos relacionados ao diagnóstico e controle desse patógeno.

Atualmente a detecção das toxinas A/B nas fezes é considerada por muitos

pesquisadores o método “ouro” para diagnóstico de ICD, sendo a citotoxicidade celular (CTA) reconhecida como a técnica mais sensível. Recentemente, alguns autores têm sugerido a cultura toxigênica (TC) como um método mais sensível e, portanto, como possível substituto da CTA como “método ouro”, entretanto, ambas as técnicas são demoradas, trabalhosas e exigem pessoal treinado. Dessa forma, os imunoensaios enzimáticos (ELISA) comerciais são, até o momento, os testes mais utilizados para o diagnóstico de ICD em seres humanos (René et al., 2012).

Outra opção que têm sido citada como possível método de diagnóstico são os kits comerciais de PCR em tempo real, também conhecidos como testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT- *Nucleic acid amplification tests*). Estudos investigando tais testes relatam uma alta sensibilidade para detecção de *C. difficile* em amostras de fezes, sugerindo que tais testes podem ser úteis para a triagem de pacientes com suspeita de ICD (Viala et al., 2012; Silva Junior, 2012; Humphries, 2012). Porém, até o momento, o maior entrave para a utilização de NAAT para o

diagnóstico de ICD é o alto custo, em média mais caro que os testes de ELISA comerciais (Humphries, 2012).

Apesar da crescente importância de *C. difficile* como patógeno nosocomial, no Brasil são raros estudos sobre CDI e, até o momento, não foram encontrados estudos avaliando os testes de diagnóstico presentes no mercado brasileiro. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi comparar os desempenhos de três ELISA comerciais e um NAAT frente a citotoxicidade celular e cultura toxigênica para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HCUFMG).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas 92 amostras de fezes de pacientes com suspeita de infecção por *C. difficile*, todos com idade superior a 18 anos de idade, sem distinção racial ou de sexo, e sempre após a assinatura do “Termo de consentimento livre e esclarecido”. Os espécimes clínicos foram recolhidos em recipientes estéreis e mantidos a -20 °C até a execução dos testes, por um período máximo de até dez dias.

Citotoxicidade celular (CTA) e Cultura toxigênica (TC)

Os ensaios de CTA para a detecção das toxinas A/B de *C. difficile* foram realizados com células de rim de macaco verde (VERO-ATCC CCL 81) (Capítulo 4, item 4.1). Para o isolamento, as amostras de fezes foram submetidas a um choque com álcool absoluto (Avbersek et al., 2009) e alíquotas de 50 µl foram plaqueadas em

agar cicloserina-cefoxitina-frutose¹⁷ suplementada com 7% de sangue equino e 0,1% de taurocolato sódico¹⁸. Após a incubação em jaras de anaerobiose com mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) a 37°C por 72 horas, todas as colônias com morfologia coloração de Gram sugestivas foram submetidas a uma PCR para confirmação da identidade pela detecção do gene (*tpi*) e tipificação pela detecção dos genes das toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) e binária (*cdtB*) (Silva et al., 2011). Todas as estirpes que possuíam pelo menos um dos dois principais genes de virulência (*tcdA* ou *tcdB*) foram consideradas toxigênicas.

Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) comerciais

Três ELISAs comerciais para detecção das toxinas A/B foram testadas: *C. difficile* Tox A/B II¹⁹, Remel Prospect *C. difficile* Toxins A/B²⁰ e *Clostridium difficile* Ridascreen²¹. Além dos ELISAs, um kit de NAAT²² foi avaliado. Todas as reações foram realizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes e a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) foram calculados com seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade e considerando o CTA ou TC como “padrão-ouro”. Calculou-se a concordância entre o CTA e TC teste Kappa²³.

RESULTADOS

Dos pacientes amostrados, 25 (27,2%) foram positivos para detecção das

¹⁷ Himedia, Mumbai, Índia

¹⁸ Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA

¹⁹ Techlab Inc., EUA

²⁰ Oxoid, Inglaterra

²¹ R-Biopharm, Alemanha

²² SimplexTM *C. difficile* Universal Direct Kit, Focus Diagnostics, EUA

²³ STATA, College Station, Texas, EUA

toxinas A/B por CTA. *C. difficile* foi isolado em 29 (31,5%) amostras, sendo seis estirpes não-toxigênicas e 23 (25%) consideradas toxigênicas (tabela 5). Dessas, 15 (65,2%) possuíam os genes *tcdA* e *tcdB* (A⁺B⁺CDT⁻), seis (26,1%) possuíam os genes *tcdA*, *tcdB* e *cdtB* (A⁺B⁺CDT⁺) e duas (8,7%) possuíam os genes *tcdB* e *cdtB*, mas eram negativas

para o gene *tcdA* (A⁻B⁺CDT⁻). A concordância (kappa) entre os resultados de CTA e TC foi de 0,61, variando de 0,41 a 0,81 em um intervalo de confiança de 95%. Todos os ELISAs testados e o NAAT apresentaram sensibilidade entre 59 e 68% e especificidade acima de 91% (tabela 6).

Tabela 5: Resultados obtidos nos três testes imunoenzimáticos, na cultura toxigênica (TC) e no teste de citotoxicidade celular (CTA) para o diagnóstico da infecção por *Clostridium difficile* em pacientes internados no Hospital das Clínicas da UFMG.

Método	CTA				TC			
	R+	R-	F+	F-	R+	R-	F+	F-
Citotoxicidade celular (CTA)	25	67	-	-	17	61	8	6
Cultura Toxigênica (TC)	17	61	6	8	23	69	-	-
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	17	65	2	8	15	68	1	8
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	16	63	4	9	14	63	6	9
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	16	67	0	9	14	67	2	9
Simplexa™ <i>C. difficile</i> Universal Direct Kit (Focus Diagnostics)	13	58	1	8	13	57	1	9

Legenda: R+ real positivo; R- real negativo; F- falso negativo; F+ falso positivo

Tabela 6: Avaliação de kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) e um de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) frente a citotoxicidade celular e cultura toxigênica como padrão “ouro” para o diagnóstico de infecção por *Clostridium difficile* em pacientes (n=92) do Hospital das Clínicas da UFMG.

Método	Citotoxicidade celular (CTA)				Cultura toxigênica (TC)			
	% (IC)				% (IC)			
	SE	ES	VPP	VPN	SE	ES	VPP	VPN
Citotoxicidade celular (CTA)	-	-	-	-	73,9 (53,5- 87,5)	88,4 (78,8- 94)	68 (48,4- 82,8)	91 (81,8- 95,8)
Cultura toxigênica (TC)	68 (48,4 - 82,8)	91 (81,8- 95,8)	73,9 (53,5- 87,5)	88,4 (78,8- 94)	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	68 (48,4- 82,8)	97 (89,8 - 99,2)	89,5 (68,6 - 97,1)	89 (79,8- 94,3)	65,2 (44,9- 81,2)	98,5 (91,9- 99,7)	93,8 (71,7 - 98,9)	89 (79,8 - 94,3)
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	64 (44,5- 79,8)	94 (85,6- 97,7)	80 (58,4- 91,9)	87,5 (77,9- 93,3)	60,9 (40,8- 77,8)	91,3 (82,3- 96)	70 (48,1- 85,5)	87,5 (77,9- 93,3)
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	64 (44,5- 79,8)	100 (94,5- 100)	99,9 (80,5- 100)	88,2 (79 - 93,6)	60,9 (40,8- 77,8)	97,1 (90- 99,2)	87,5 (64 - 65)	88,2 (79- 93,6)
Simplexa™ <i>C. difficile</i> Universal Direct Kit (Focus Diagnostics)	59,1 (38,7 - 76,7)	98,3 (90,9- 99,7)	92,9 (68,5- 98,7)	86,4 (76,1- 92,7)	61,9 (40,9- 79,2)	98,3 (91- 99,7)	92,9 (68,5- 98,7)	87,9 (77,9- 93,7)

Legenda: SE=sensibilidade; ES=especificidade; VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; IC=Intervalo de confiança de 95%.

DISCUSSÃO

A porcentagem de pacientes confirmados com ICD no presente estudo (aproximadamente 25%) é semelhante ao relatado em trabalhos recentes no Brasil, que encontraram entre 19,7% e 28,5% de pacientes positivos (Balassiano et al., 2009; Balassiano et al., 2010; Balassiano et al., 2011). Deve-se enfatizar, porém, que além de diferenças relativas ao hospital estudado, os trabalhos anteriores utilizaram *kits* comerciais de ELISA para o diagnóstico, o que pode ter subestimado porcentagem de positivos devido a baixa sensibilidade comumente apresentada por estes testes. Pela primeira vez no Brasil, o diagnóstico foi confirmado por CTA e/ou TC, ambos considerados como “padrão-ouro” para o diagnóstico de diarreia nosocomial por *C. difficile* em seres humanos (Humphries, 2012; Silva Junior, 2012).

Outro ponto que chama atenção é que mais de 63% dos pacientes considerados “suspeitos” de ICD pelos clínicos foram negativos em todos os testes realizados. A proporção encontrada é semelhante ao relatado em outros países (Samra et al. 2008; Eastwood et al., 2009; Litvin et al., 2009; Shin et al., 2009; Wilcox, 2011) e sugere uma dificuldade de identificação clínica da diarreia nosocomial causada por *C. difficile*. Essa característica peculiar torna ainda mais importante a utilização de teste rápido de diagnóstico laboratorial, o que poderia diminuir a frequência de antibioticoterapia empírica nesses pacientes. Além disso, um teste rápido e de alta sensibilidade permitiria a triagem dos indivíduos suspeitos e evitaria o isolamento desnecessário dos negativos, o que eleva drasticamente os gastos na

instituição de cuidado devido ao grande número de suspeitos que são negativos para ICD (Alcalá, 2012; Strachan et al., 2012).

Até aproximadamente dez anos atrás, acreditava-se que o CTA possuía sensibilidade e especificidade acima de 99%, sendo considerada portanto como a principal técnica para diagnóstico de ICD em humanos e animais (Delmée, 2001; Wilcox, 2011). Porém, nos últimos anos, verificou-se que a sensibilidade dos protocolos de CTA apresentavam, frente a cultura toxigênica, sensibilidade entre 65 e 86% e especificidade acima de 90% (Humphries, 2012). Corroborando tais achados, a sensibilidade do protocolo CTA utilizado foi de 73,9%, no presente estudo. É também importante notar que, apesar dos diversos estudos sobre diagnóstico de CDI em humanos, ainda não existe um protocolo padrão para a CTA, havendo diferenças na linhagens de células, na concentração utilizada e também na diluição inicial das amostras de fezes. No presente trabalho optou-se pela linhagem celular Vero, considerada a mais sensível às toxinas A/B (Delmée, 2001), e por um protocolo de CTA utilizado com sucesso em estudos similares (van den Berg et al., 2005; Medina-Torrez et al., 2010; Keessen et al., 2011; Silva et al., 2012; Silva et al., 2013a; Silva et al., 2013b).

Por outro lado, o protocolo de TC apresentou uma sensibilidade bastante inferior ao esperado (68%) em comparação com trabalhos anteriores que relatam sensibilidade próxima a 100% (Shin et al., 2009; Silva Junior, 2012). Ainda não há nenhum método padrão para a cultura toxigênica de *C. difficile*, tornando difícil comparar resultados de TC com outros autores. Uma grande variedade de meios e

também diferenças no protocolo de isolamento são comuns, tais como a utilização de choque com álcool e variações no tempo de incubação (Delmée, 2001). No presente trabalho, optou-se por um protocolo de isolamento simples, que seria mais aplicável para o diagnóstico quando comparado com métodos anteriores (Sharp et al., 2010). Sabe-se que algumas estirpes de *C. difficile* podem não crescer devido a susceptibilidade aos antibióticos utilizados no meio (Songer e Uzal, 2005). Recentemente, Malik et al. (2013) demonstraram que a presença de antimicrobianos no meio de cultura causam um estresse capaz de diminuir a taxa de isolamento do agente.

Além disso, a utilização de CCFA, mesmo com a suplementação de taurocolate, pode ter uma sensibilidade variável para recuperação de esporos de *C. difficile* quando comparado com protocolos que preconizam utilização de meios líquidos para um pré-enriquecimento antes do plaqueamento em ágar seletivo (Thitiran et al., 2011). Todos esses fatores podem ter contribuído para a baixa sensibilidade encontrada no protocolo testado de TC.

Mesmo com a sensibilidade de TC inferior ao relatado em estudos anteriores, a concordância entre os resultados de CTA e TC foi de 0,61, resultado semelhante ao relatado em outros estudos (Keessen et al., 2011) e que, de acordo com Landis e Koch (1977), pode ser classificado como uma concordância substancial. De qualquer forma, deve-se destacar ainda que a TC não parece ser uma boa opção para o diagnóstico devido ao elevado tempo para obtenção dos resultados. No presente estudo, mesmo com um método simplificado, os resultados de TC necessitaram de pelo menos de seis dias para conclusão.

Um outro ponto que deve ser citado é a possibilidade de resultados falso-positivos no TC. A colonização assintomática por *C. difficile* é um evento raro em adultos saudáveis, porém pode alcançar entre 9 e 20% em alguns grupos, especialmente pacientes internados em hospitais por longos períodos (Humphries, 2012; Silva Junior, 2012). Uma medida essencial para diminuir o número de resultados falso-positivos é a diferenciação entre estirpes toxigênicas e não toxigênicas após o isolamento. No presente estudo, quatro (4,3%) pacientes com suspeita de diarreia por *C. difficile* foram negativos para as toxinas A/B e amostras não toxigênicas foram obtidas das amostras de fezes. Um protocolo de isolamento sem confirmação da toxigenicidade do agente indicaria tais pacientes como positivos para ICD, o que poderia culminar com a administração desnecessária de antibióticos. De acordo com Peterson et al (2007), mesmo com a confirmação da toxigenicidade da estirpe isolada, a TC ainda indicaria aproximadamente 10% de resultados falso-positivos. No presente estudo, oito pacientes (8,7%) foram positivos para TC mas negativos para toxinas A/B por CTA e por todos ELISAs utilizados. Nesses casos, um resultado falso-positivo deve ser considerado. Uma vez que ambos testes “ouro” possuem pontos falhos, a avaliação de novos métodos de diagnóstico para ICD deve ser realizada considerando simultaneamente CTA e TC como padrão “ouro”.

A baixa sensibilidade apresentada pelos kits comerciais de ELISA no presente estudo (entre 59 e 68%) corrobora trabalhos anteriores que relatam entre 50 e 77%, enquanto a especificidade permanece acima de 90% (Alcalá, 2012; Humphries, 2012). Em razão da facilidade de execução, velocidade de

obtenção dos resultados e baixo custo, os kits de ELISA comerciais ainda são os testes mais utilizados para o diagnóstico de ICD em seres humanos em todo o mundo (Wilcox, 2011; René et al., 2012). No presente trabalho, considerando o kit que apresentou melhor desempenho (68% de sensibilidade), um em cada três pacientes com ICD seriam erroneamente indicados como negativos, o que poderia culminar com agravamento clínico por interrupção da antibioticoterapia. Além disso, no HCUFMG, de forma semelhante a muitos outros hospitais, pacientes com suspeita de ICD são isolados no intuito de diminuir a disseminação do agente no ambiente (Alcalá, 2012; Zilberberg e Shorr, 2013). Dessa forma, outro ponto negativo relativo a baixa sensibilidade dos kits de ELISA seria a potencial de disseminação de esporos de *C. difficile* devido a não permanência desses indivíduos no isolamento.

Por outro lado, a baixa sensibilidade apresentada pelo NAAT (menos de 62%) foi surpreendente uma vez que trabalhos anteriores com outros kits relataram sensibilidade e especificidade superiores a 90% (Eastwood et al., 2009; Humphries, 2012; Viala et al., 2012). Em comparação com outros testes disponíveis no mercado, o NAAT testado no presente trabalho teria como vantagem a extração térmica do DNA bacteriano direto das fezes, sem posterior purificação. De forma resumida, toma-se um *swab* da amostra fecal, realiza-se a imersão deste em uma solução de lise, seguido de um ciclo de aquecimento e centrifugação. O sobrenadante obtido após a centrifugação desse material é utilizado como molde de DNA para a reação. Alguns autores relatam que a principal causa de resultados falso-negativos em NAATs seria a obtenção de um material com quantidade insuficiente de DNA

(Stamper et al., 2009; Novak-Weekley et al., 2010; Viala et al., 2012). Com isso, pode-se hipotetizar que pelo menos parte do grande número de resultados falso-negativos obtidos com o NAAT testado tenha relação com a ausência de um protocolo mais refinado de extração de DNA, o que aumentaria o número de cópias do gene buscado (*tcdB*, no caso) e diminuiria ainda a quantidade de inibidores da reação.

Uma das amostras testadas apresentou resultado indeterminado no NAAT. Como recomendado pelo fabricante, uma outra alíquota do espécime clínico foi descongelada para repetição do teste, mas novamente um resultado indeterminado foi obtido. Resultados indeterminados em NAATs são causados principalmente pela presença de inibidores de PCR nas fezes (Eastwood et al., 2009; Hampshire, 2012). De qualquer forma, tal evento não parece ser frequente uma vez que apenas uma amostra (1,2%) dos 81 espécimes testados apresentou resultado indeterminado, frequência similar ao relatado anteriormente por outros autores (Eastwood et al., 2009; Hampshire, 2012).

Diversas alternativas tem sido propostas para melhorar o diagnóstico de ICD em humanos. Em instituições que utilizam kits de ELISA, o envio de mais de uma amostra do mesmo paciente foi sugerido por alguns autores, mas estudos revelaram que, além de onerar o diagnóstico, tal medida não aumenta significativamente o valor preditivo positivo do teste e pode ainda influenciar negativamente na taxa de falso-positivos (Litvin et al., 2009; Gade e Turett, 2009; Humphries, 2012).

Alguns autores sugerem que um algoritmo de pelo menos duas etapas é necessário para um diagnóstico seguro de ICD em seres humanos, mas ainda

não há consenso sobre quais testes devem ser usados em cada passo do diagnóstico (Shin et al., 2009; Peterson et al., 2011; Alcalá, 2012; Humphries, 2012). Com isso, o presente estudo reforça a necessidade urgente de mais

estudos para padronização e avaliação de métodos de diagnósticos para ICD, permitindo assim um controle mais eficiente da infecção por *C. difficile* em hospitais.

APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

Aprovado no COEP-UFMG (CAAE - 0710.0.203.0000.11)

REFERÊNCIAS

ALCALÁ L. Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: past, present, and future. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v.31, p. 65-7, 2013.

AVBERSEK, J.; JANEZIC, S.; PATE, M. et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.252-5, 2009.

BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; DE OLIVEIRA, M.P. et al. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.68, n.4, p.449-55, 2010.

BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, n.2, p.249-55, 2011.

BALASSIANO, I.T.; MIRANDA, K.R.; BOENTE, R.F. et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v.15, n.3, p. 61-64, 2009.

BALASSIANO, I.T.; YATES, E.A.; DOMINGUES, R.M. et al. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, v.61, n.2, p.169-79, 2012.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect.*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

EASTWOOD, K.; ELSE, P.; CHARLETT, A. et al. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxicogenic culture methods. *J Clin Microbiol*, v.47, p.3211-3217, 2009.

GADE, R.; TURETT G. The utility of repeated stool toxin testing for diagnosing *Clostridium difficile* colitis. *South Med J*, v.102, p.1007-1009, 2009.

HUMPHRIES, R.M. Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. *Clinic Microbiol Newsletter*, v.34, pages 151-157, 2012.

KEESSEN, E.C.; HOPMAN, N.E.; VAN LEENGOED, L.A. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n.5, p.1816-21, 2011.

- KELLY, C.P.; LAMONT, J.T. *Clostridium difficile*: more difficult than ever. *N Engl J Med*, v.359, n.18, p.1932-40, 2008.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v.33, p.159-174, 1977.
- LITVIN, M.; RESKE, K.A.; MAYFIELD, J. et al. Identification of a pseudo-outbreak of *Clostridium difficile* infection (CDI) and the effect of repeated testing, sensitivity, and specificity on perceived prevalence of CDI. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.30, p.1166-1171, 2009.
- MALIK, DJ.; PATEL, K.V.; CLOKIE, M.R. et al. On the difficulties of isolating *Clostridium difficile* from hospital environments. *J Hosp Infect*, 84, p.181-3, 2013.
- MEDINA-TORRES, C.E.; WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R. et al. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med*, v.24, n.3, p.628-32, 2010.
- NOVAK-WEEKLEY SM, MARLOWE EM, MILLER JM. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. *J Clin Microbiol*, v.48, p.889-93, 2010.
- OLDFIELD, E.C. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: risk factors, diagnostic methods, and treatment. *Rev Gastroenterol Disord*, v.4, n.4, p.186-195, 2004
- PETERSON, L.R.; MEHTA, M.S.; PATEL, P.A. et al. Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel. *Am J Clin Pathol*, v.136, p.372-380, 2011.
- RENÉ, P.; FRENETTE, C.P.; SCHILLER, I. et al. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.73, n.1, p.94-6, 2012.
- SAMIE, A.; OBI, C.L.; FRANASIAK, J. et al. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdtA*, *cdtB*), and *tcdC* genes in Vhembe District, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*, v.78, n.4, p.577-585, 2008.
- SAMRA, Z.; LUZON, A.; BISHARA, J. Evaluation of two rapid immunochromatography tests for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Dig Dis Sci*. v.53, p.1876-9, 2008.
- SHARP, S.E.; RUDEN, L.O.; POHL, J.C. et al. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *J Clin Microbiol*, v.48, n.6, p.2082-6, 2010.
- SHIN, B.M.; KUAK, E.Y.; LEE, E.J. et al. Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*, v.47, p.2952-2956, 2009.
- SILVA JÚNIOR, M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. *Einstein*, v.10, p.105-109, 2012.
- SILVA, R.O.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet J*, ahead of print, doi: 10.1111/evj.12046, 2013a.

- SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; DE MAGALHÃES SOARES, D.F. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*. v.20, p.82-44, 2013b
- SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.
- SONGER, J.G; UZAL, F A. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest*, v.17, n.6, p.528-536, 2005.
- STAMPER, P.D.; ALCABASA, R.; AIRD, D. et al. Comparison of a commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. v.47, p.373-8, 2009.
- STRACHAN, A.J.; EVANS, N.E.; WILLIAMS, O.M. et al. Comparison of a frozen human foreskin fibroblast cell assay to an enzyme immunoassay and toxigenic culture for the detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 75, p.42-45, 2013.
- THITARAM, S.N.; FRANK, J.F., LYON, S.A. et al. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J Food Prot*, v.74, p.130-133, 2011.
- VAN DEN BERG, R.J.; BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, L.S.; GERRITSEN, H.J. et al. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, v.43, p.5338-5340, 2005.
- VIALA, C.; LE MONNIER, A.; MAATAOUI, N. et al. Comparison of commercial molecular assays for toxigenic *Clostridium difficile* detection in stools: BD GeneOhm Cdiff, XPert C. *difficile* and illumigene C. *difficile*. *J Microbiol Methods*. v.90, p.83-85, 2012.
- WILCOX, M.H. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection: in a state of transition or confusion or both? *J Hosp Infect*, v.79, p.1-3, 2011.
- ZILBERBERG, M.D.; SHORR, A.F. Preventing *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Crit Care Clin*, v.29, p.11-18, 2013.

5. CAPÍTULO 2: Ocorrência da infecção por *Clostridium difficile*

5.1 Detecção das toxinas A/B e isolamento de *Clostridium difficile* em potros diarreicos e saudáveis.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi detectar as toxinas A/B e isolar *C. difficile* de amostras de fezes de potros diarreicos e não diarreicos. Um total de 154 amostras de potros foram coletadas, sendo 139 amostras de haras (63 de potros diarreicos e 76 de não-diarreicos) e 15 amostras de potros com diarreia internados em um hospital veterinário. As toxinas A/B foram detectadas pelo ensaio de citotoxicidade celular (CTA). Todas as colônias sugestivas foram submetidas a PCR para detecção dos genes das toxinas A, B e toxina binária. Na detecção das toxinas A/B de *C. difficile*, oito das 154 (5,2%) amostras foram positivas, todas oriundas de animais diarreicos. Dentre os positivos, 6/15 (40%) eram de potros hospitalizados e apenas 2/63 (3,2%) de amostrados em haras, com diferença entre esses grupos ($p=0,002$). Um animal positivo para as toxinas A/B foi negativo no isolamento de *C. difficile* e duas estirpes toxigênicas foram isoladas a partir de potros diarreicos negativo na CTA.

Palavras-chave: colite, equinos, antibioticoterapia.

INTRODUÇÃO

C. difficile é um bacilo Gram-positivo, formador de esporos e reconhecido como responsável pela maioria dos casos de diarreia associada a antibioticoterapia em seres humanos (Schwan et al., 2009). Em equinos, é responsável pela colite em animais adultos (Songer et al., 2009) e diarreia em potros, que pode ocorrer de forma espontânea ou associada ao uso de antimicrobianos (Båverud et al., 2004; Silva et al., 2012). Recentemente, estudos demonstraram que os isolados de seres humanos com infecção por *C. difficile* (ICD) têm alta correlação genética com as estirpes isoladas de animais, levantando a hipótese de uma doença zoonótica (Jhung et al., 2008; Norman et al., 2011).

A detecção de toxinas e o isolamento do agente seguido da detecção de genes codificadores de fatores de virulência podem levar a uma melhor compreensão dos padrões de

transmissão e fatores de risco, ajudando a elucidar a epidemiologia da *C. difficile* em equinos (Silva et al., 2011). Com isso, o objetivo deste estudo foi detectar as toxinas A/B, isolar estirpes de *C. difficile* e identificar os genes relativos aos principais fatores de virulência dos isolados a partir de amostras de fezes de potros diarreicos e não diarreicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 154 amostras foram coletadas em haras ou de potros atendidos no Hospital Veterinário (HV) da UFMG. De haras, foram obtidas 139 amostras de fezes de 17 propriedades rurais diferentes, sendo 63 de potros diarreicos e 76 de não-diarreicos. Os espécimes de potros do HV totalizaram 15 amostras de fezes diarreicas, todas obtidas no momento da chegada ao HV e de animais em que a principal motivação para a consulta foi a

ocorrência de diarreia. Todos os espécimes foram coletados diretamente da ampola retal e acondicionados em frascos esterilizados e mantidos a -20°C até o processamento.

Deteção das toxinas A/B e Isolamento de *Clostridium difficile*

O teste de citotoxicidade celular (CTA) para a detecção das toxinas A/B de *C. difficile* foi realizado em células African Green Monkey Kidney (Vero-ATCC CCL 81) (Capítulo 4, item 4.1). Para o isolamento, volumes iguais de amostras de fezes e etanol a 96% (v/v) foram misturados e, após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, alíquotas de 50 µL foram inoculadas em placas de agar cicloserina-cefoxitina-frutose²⁴ suplementada com sangue de equino a 7% e taurocolato de sódio²⁵ a 0,1%. Após a incubação em jarras de anaerobiose com mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) a 37 °C por 72 horas, todas as colônias com morfologia sugestiva foram submetidos a uma PCR para detecção simultânea de um gene constitutivo (*tpi*) e os genes codificadores das toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) e toxina binária (*cdtB*) de *C. difficile* (Silva et al., 2011).

Análise estatística

O teste exato de Fisher²⁶ foi utilizado para avaliar as associações entre variáveis. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na detecção das toxinas A/B de *C. difficile*, oito amostras foram positivas (5,2%), todas de potros com diarreias (tabela 7). Destes, 6/15 (40%) eram de potros hospitalizados e apenas 2/63

(3,2%) eram de potros diarréicos amostrados em haras, havendo diferença significativa ($p=0,002$) entre os dois grupos. Com relação ao histórico dos animais, três dos potros positivos desenvolveram diarreia após tratamento prévio com antibióticos para outra infecção, enquanto que quatro animais aparentemente tiveram início espontâneo da doença. Não há histórico com relação a um dos potros positivos, amostrado em um haras. No presente estudo, não foi detectada as toxinas A/B em potros não-diarréicos.

Estirpes de *C. difficile* foram isoladas de 13 animais, 11 diarréicos (sete deles positivos para as toxinas A/B) e dois de aparentemente saudáveis. Dez estirpes foram toxigênicas por PCR, enquanto as três restantes eram não-toxigênicas. Um animal positivo para as toxinas A/B foi negativo para isolamento de *C. difficile*, ao passo que estirpes toxigênicas foram isoladas de três potros negativos para as toxinas A/B, dois deles diarréicos e um aparentemente saudável.

²⁴ Hi-media, Mumbai, Índia

²⁵ Sigma-Aldrich Co., Sto Louis, EUA

²⁶ STATA, College Station, Texas, EUA.

Tabela 7: Resultados de detecção das toxinas A/B e isolamento de *Clostridium difficile* de potros diarreicos e não-diarreicos (n=154).

Método	Resultados	Potros			Total
		Saudáveis (Haras)	Diarreícos		
			Hospital	Haras	
Detecção toxinas A/B	Positivo	0/76 (0%)	6/15 (40%) ^a	2/63 (3,2%) ^b	8/154 (5,2%)
	Negativo	76/76 (100%)	9/15 (60%)	61/63 (96,8%)	146/154 (94,8%)
Isolamento de <i>C. difficile</i>	Positivo	3/76 (3,9%)	9/15 (60%)	2/63 (3,2%)	14/153 (9,5%)
	A ⁺ B ⁺	2/76 (2,6%)	7/15 (46,7%)	1/63 (1,6%)	10/154 (6,5%)
	A ⁻ B ⁻	1/76 (1,3%)	2/15 (13,3%)	1/63 (1,6%)	4/153 (2,6%)
	Negativo	73/76 (96,1 %)	6/15 (40%)	61/63 (96,8%)	140/154 (90,1%)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença (p<0,05)

DISCUSSÃO

Em contraste com o relatado em estudos com cães e leitões (Clooten et al., 2008; Keessen et al., 2011; Silva et al., 2011), a ausência de potros não-diarreicos positivos para as toxinas A/B sugere que a doença subclínica não seja importante nesta espécie, resultado que corrobora relatos anteriores (Weese et al., 2001; Båverud et al., 2003).

No grupo diarreico, oito dos 78 potros (10,2%) foram positivos para a detecção de toxina A/B, sendo quatro com cinco meses de idade, um com três meses, um com dois meses e dois animais com 13 dias de idade. A prevalência encontrada é maior do que os 5% relatados por Frederick (2009) nos EUA, mas inferior aos 16,7% relatado por Weese et al., (2001) no Canadá. Também é interessante notar que houve uma diferença (p=0,002) entre o número de animais positivos oriundos do HV e de haras. Animais amostrados no HV possuíam 16 vezes mais probabilidade de ser positivos para as toxinas A/B do que animais diarreicos amostrado em haras.

A maior positividade de animais amostrados no HV não pode ser interpretada como infecção nosocomial pois todas as amostras foram coletadas no momento da entrada dos animais. Por outro lado, uma hipótese para essa diferença tem relação com o fato de que, comumente, potros admitidos no HV são previamente tratados no haras, mas sem resposta efetiva. De fato, no presente estudo todos os animais positivos no HV foram inicialmente diagnosticados por clínicos com outra causa de diarreia diferente de *C. difficile*. Assim, uma hipótese para a alta positividade em potros amostrados no HV pode ser o desconhecimento sobre a diarreia por *C. difficile* por veterinários, levando a um tratamento ineficiente e piora dos sinais clínicos. Além disso, tendo em vista a semelhança clínica entre as diarreias de diferente etiologia em potros, o presente estudo destaca a necessidade de diagnóstico laboratorial para diferenciação dos enteropatógenos nesses animais, o que permitiria uma administração mais adequada de antibióticos.

Dois potros positivos para as toxinas A/B desenvolveram diarreia após administração de penicilina G devido a

suspeita clínica de pneumonia (caso descrito com mais detalhes no item 5.3 desta tese ou na publicação Silva et al., 2012). Outros quatro animais positivos (três hospitalizados e um de haras) possuíam histórico de desenvolvimento espontâneo da diarreia. Também é interessante notar que em todos esses quatro casos houve agravamento dos sinais clínicos após a administração de antimicrobianos que não metronidazol, ou seja, compostos não específicos para a infecção por *C. difficile*. Nestes casos, acredita-se que ocorra pouco efeito direto sobre *C. difficile* e uma considerável agressão a microbiota, permitindo um ambiente favorável a continuidade da infecção e, consequentemente, a produção das toxinas pelo microrganismo.

Outro aspecto interessante deste estudo foi o isolamento de uma estirpe não-toxigênica seguido de, alguns dias mais tarde, isolamento de uma estirpe toxigênica. Neste caso, uma fêmea de dois meses de idade foi apresentada a um clínico com histórico de dois dias de diarreia pastosa. Até essa altura, nenhum antibiótico havia sido administrado. Amostras de fezes foram submetidas a um diagnóstico diferencial de vários enteropatógenos (pesquisa de oocistos, rotavírus, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *C. perfringens*, *Lawsonia intracellularis*, detecção das toxinas A/B e isolamento de *C. difficile*). Somente *E. coli* foi detectada, mas o isolado foi negativo para fatores de virulência por PCR (Macêdo et al., 2007). Uma estirpe não-toxigênica de *C. difficile* também foi isolada.

Mesmo sem a detecção de um agente etiológico, o animal recebeu antibioticoterapia (sulfa-trimetropim). Quatro dias após o início do tratamento, o potro apresentou um agravamento do estado clínico, com uma diarreia profusa esverdeada e com presença de

gás nos intestinos. Novas amostras de fezes foram coletadas e submetidas ao diagnóstico diferencial de enteropatógenos. Neste momento, uma estirpe toxigênica de *C. difficile* foi isolada e o espécime foi positivo para as toxinas A/B.

Neste caso, uma hipótese a ser considerada seria o comprometimento da microbiota administração de antimicrobianos. Inicialmente a diarreia pode não ter sido causada por *C. difficile* e, uma vez que não foram detectados enteropatógenos, pode-se sugerir inclusive que a causa era não-infecciosa. Dessa forma, a administração de antimicrobianos pode ter facilitado a colonização por uma estirpe toxigênica de *C. difficile* adquirida no ambiente ou favorecido o crescimento exarcebado de uma estirpe pre-existente no intestino. Nesse caso, considera-se a possibilidade de que este animal foi pré-colonizados por mais de uma estirpe simultaneamente, uma toxigênica e uma não-toxigênica. A colonização por mais de um tipo de *C. difficile* foi previamente descrita em humanos e leitões e recentemente confirmada em equinos (Schoster et al., 2012). Este é o primeiro relatório desta situação atípica em um potro e pode alertar para a necessidade de retestes de animais negativos quando esses apresentarem um agravamento da diarreia após o uso de antimicrobianos.

Seis dos potros positivos receberam metronidazol após a confirmação da infecção e houve recuperação da doença, enquanto um dos animais, que foi tratado com florfenicol e ceftiofur, veio a óbito. Tais achados sugerem a eficácia clínica de metronidazol para ICD em potros como já relatado anteriormente (Båverud, 2004).

Dez estirpes toxigênicas do *C. difficile* foram isoladas, nove de potros com

diarreia e uma de um animal aparentemente saudável. Sete desses animais foram positivos para as toxinas A/B e três foram negativos. Um estado de portador deve ser considerado nesse caso (Båverud et al., 2003). Outra possibilidade de uma estirpe toxigênica em potro negativo para as toxinas A/B é a degradação da toxina pelas proteases intestinais e fecais (Clooten et al., 2008). Porém, esta hipótese deve ser analisada com cuidado já que estudos mostraram uma grande estabilidade das toxinas A/B em fezes de equinos (Weese et al., 2000; Båverud et al., 2003).

Três estirpes não-toxigênicas também foram isoladas de dois potros não-diarréicos (um com sete dias e outro com 12 meses de idade) e de um potro diarréico (com cinco meses). É notável observar que *C. difficile* foi isolado apenas de um animal entre 68 (2,9%) não-diarréicos e com mais de um mês de idade. Esse resultado corrobora estudos anteriores ao demonstrarem que o isolamento em potros saudáveis com mais de 30 dias de vida é raro, mas pode ocorrer, principalmente após tratamento com antibióticos (Båverud et al., 2002; Båverud, 2004). Infelizmente, não há dados sobre a administração do

antibiótico deste potro aparentemente saudável.

Um animal foi positivo para as toxinas A/B mas negativo para o isolamento do agente. Não existe um protocolo padrão de isolamento de *C. difficile* a partir de amostras de fezes, o que dificulta comparações entre trabalhos. De qualquer forma, resultados similares foram previamente descritos em potros (Båverud et al., 1997; Weese et al., 2001; Båverud et al., 2003; Arroyo et al., 2007) e em estudos com outras espécies como cães e suínos (Clooten et al., 2008; Silva et al., 2011). Entre as causas possíveis, destaca-se a possível susceptibilidade de algumas estirpes de *C. difficile* a um ou a ambos antibióticos utilizados no meio de isolamento (Songer e Uzal, 2005). Além disso, o uso de agar, mesmo com a adição de taurocolate, pode ter uma sensibilidade menor para recuperação de esporos de *C. difficile* quando comparado com caldos seletivos (Thitiran et al., 2011).

APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

Protocolo número 150/2010 CETEA-UNESP

REFERÊNCIAS

ARROYO, L.G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J.S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol.*, v.120, p.179-183, 2007.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet Clinic North Am Eq Pract*, v.20, n.3, p.615-630, 2004.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Vet Q.*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J*, v.29, n.4, p.279-84, 1997.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, v.35, n.5, p.465-71, 2003.

CLOOTEN, J., KRUTH, S., ARROYO, L. et al. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet Microbiol.*, v.129, p.209-14, 2008.

- JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis.*, v.14, n.7, p.1039-45, 2008.
- KEESSEN, E.C.; HOPMAN, N.E.; VAN LEENGOED, L.A. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n.5, p.1816-21, 2011.
- MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichiacoli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.59, p.1117-1123, 2007.
- MAGDESIAN, K.G.; LEUTENEGGER, C.M. Real-time PCR and typing of *Clostridium difficile* isolates colonizing mare-foal pairs. *Vet J*, v.190, p.119-123, 2011.
- NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *App Environm Microbiol.*, v.77, n.16, p.5755-60, 2011.
- SCHOSTER ,A.; ARROYO, L.G.; STAEMPFLI, H.R. et al. Presence and molecular characterization of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in intestinal compartments of healthy horses. *BMC Vet Res*, v.8, p.94, 2012.
- SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLos Pathog*, v.5, n.10, 2009.
- SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.
- SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; DIAL, S.M. et al. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *J Vet Diagn Invest*, v.21, n.3, p.377-380, 2009.
- SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest*, v.17, n.6, p.528-36, 2005.
- THITARAM, S.N.; FRANK, J.F.; LYON, S.A. et al. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J Food Prot*, v.74, p.130-3, 2011.
- WEESE, J. S; STAEMPFLI, H. R; PRESCOTT, J. F. et al. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Vet J*, v.33, n.4, p.403-9, 2001.
- WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest*, v. 12, n.4, p.332-6, 2000.

5.2 Isolamento de *Clostridium difficile* de fezes de espécies de carnívoros silvestres no Brasil.

RESUMO

Apesar da crescente importância de *Clostridium difficile* como enteropatógeno para seres humanos e animais domésticos, o papel desse agente como causador de doença em espécies silvestres ou mesmo a importância desses animais como reservatórios de estirpes de *C. difficile* permanecem obscuros. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar estirpes de *C. difficile* em amostras de fezes de carnívoros silvestres no Brasil. Foram coletadas 31 amostras de fezes de carnívoros de diversas espécies em centros de reabilitação e triagem de animais silvestres localizados nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Espírito Santo. Realizou-se o isolamento de *C. difficile* e avaliou-se a toxigenicidade das estirpes por PCR e pelo teste de citotoxicidade celular (CTA) a partir da cultura do isolado. Amostras de fezes positivas para o isolamento foram ainda submetidas a detecção das toxinas A/B por CTA e por um ELISA comercial. Foi possível isolar *C. difficile* em duas (6,4%) amostras, sendo uma toxigênica, isolada de uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e uma não toxigênica, isolada de um Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*). Ambos animais encontravam-se sob antibioticoterapia no momento da coleta, sendo a jaguatirica positiva também para as toxinas A/B nas fezes, confirmando tratar-se de um quadro de diarreia por *C. difficile*. O presente estudo sugere que carnívoros silvestres não possuem grande importância como reservatório de estirpes de *C. difficile*. Por outro lado, demonstra que este agente pode ser um causador de diarreia nessas espécies, principalmente em animais em cativeiro e sob antibiótico terapia.

Palavras-chave: jaguatirica, lobo, zoonose, nosocomial, cativeiro, felinos.

INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é atualmente reconhecido como um importante agente causador de diarreia e enterocolite em seres humanos e animais domésticos (Silva Junior et al., 2012; Silva et al., 2013a). Estudos demonstraram ainda que os isolados de seres humanos com infecção por *C. difficile* (ICD) têm alta correlação genética com as estirpes isoladas de animais, levantando a hipótese de uma doença zoonótica (Jhung et al. 2008; Songer, 2010; Norman et al., 2011).

Apesar da crescente importância de *C. difficile* como enteropatógeno para seres humanos e animais domésticos e até mesmo como possível agente zoonótico, o papel da ICD na maioria das espécies selvagens permanece obscuro, existindo

apenas poucos estudos sobre o assunto, a maioria limitando-se a descrições de casos clínicos (Bojesen et al., 2006). Recentemente, levantou-se a hipótese de animais silvestres como possíveis reservatórios de estirpes de *C. difficile* para seres humanos e animais domésticos, porém a existência de poucos trabalhos sobre o tema impedem qualquer conclusão a respeito (Jardine et al., 2010; Bandelj et al., 2011).

Isolamento e detecção de genes relativos a fatores de virulência em estirpes de *C. difficile* podem auxiliar no conhecimento de fatores de risco e epidemiologia da doença (Silva et al., 2011). Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar estirpes de *C. difficile* em amostras de fezes de carnívoros silvestres no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 31 amostras de carnívoros silvestres foram coletadas, sendo 11 de *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), oito de *Puma concolor* (onça parda), quatro de *Leopardus tigrinus* (gato do mato pequeno), três de *Leopardus pardalis* (jaguarundi), dois de *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e um de *Puma yagouaroundi* (jaguarundi). As amostras foram obtidas de animais recolhidos por centros de triagem e de recolhimento de animais silvestres localizados nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Todas as amostras coletadas foram alíquotadas em microtubos estéreis e armazenadas a -20°C até a realização dos testes.

Isolamento e PCR de *C. difficile* e detecção das toxinas A/B

Para selecionar esporos de *C. difficile*, volumes iguais de amostras de fezes e etanol a 96% (v/v) foram misturados e, após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, alíquotas de 50 µL foram inoculadas em placas de agar cicloserina-cefoxitina-frutose²⁷, suplementada com sangue de equino a 7% e taurocolato sódico²⁸ a 0,1%. Após a incubação em jarras de anaerobiose contendo mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) a 37 °C por 72 horas, todas as colônias com morfologia sugestiva foram submetidos a uma PCR para detecção simultânea de um gene constitutivo (*tpi*) e os genes codificadores das toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) e toxina binária (*cdtB*) de *C. difficile* (Silva et al., 2011). As estirpes isoladas foram testadas quanto a produção de toxinas A/B *in vitro*, como previamente descrito por Medina-Torres

et al. (2010) e utilizando a técnica de CTA (Capítulo 4, item 4.1).

Alíquotas de fezes de amostras positivas no isolamento de *C. difficile* foram submetidas a detecção das toxinas A/B por CTA (Capítulo 4, item 4.1) e por um kit comercial de ELISA²⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

C. difficile foi isolado de apenas duas amostras (6,4%), oriundas de uma jaguarundi (macho, adulto, diarreico) e de um lobo-guará (fêmea, adulto, não-diarreico). A estirpe isolada do *C. brachyurus* foi negativa para todos os fatores de virulência pesquisados por PCR (A⁺B⁺CDT⁻) e nenhum efeito citotóxico foi detectado na cultura *in vitro* do isolado, indicando que a estirpe era não-toxigênica. Corroborando esse achado, as amostras de fezes desse animal foram negativas para as toxinas A/B por CTA e ELISA. Com isso, acredita-se que a estirpe encontrada faça parte da microbiota, não sendo, portanto, associada a nenhum quadro entérico nesse caso. É interessante observar que esse lobo-guará encontrava-se sob antibioticoterapia no momento da coleta devido a uma infecção secundária de uma miíase na orelha esquerda.

Por outro lado, a estirpe isolada da jaguarundi foi positiva para os genes da toxina A/B, negativa para o gene da toxina binária por PCR (A⁺B⁺CDT⁻) e positiva para o teste de produção *in vitro* das toxinas A/B. Além do isolamento, as toxinas A/B foram encontradas nas fezes da jaguarundi por CTA e ELISA. Sabe-se que esse animal desenvolveu diarreia durante o uso de uma cefalosporina para prevenção de infecções secundárias após uma cirurgia ortopédica. De posse desse histórico, e

²⁷ Hi-media, Mumbai, Índia

²⁸ Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA.

²⁹ *C. difficile* Tox A/B II - Techlab Inc., EUA.

considerando que o diagnóstico das infecções por *C. difficile* é baseado na detecção das toxinas A/B e no isolamento de estirpes toxigênicas (Silva et al., 2012), conclui-se que o caso em questão tratou-se de um quadro de diarreia associada a *C. difficile*. Esse foi o primeiro relato de infecção por este agente em um carnívoro silvestre e é descrito com maiores detalhes no capítulo 5 (item 5.6) ou na publicação Silva et al., 2013b.

O conhecimento sobre a importância de *C. difficile* como causador de diarreia em espécies selvagens é extremamente limitado, existindo relatos em javalis, roedores, avestruzes, primatas e lagomorfos (Frazier et al., 1993; Shivaprasad, 2003; Keel e Songer, 2006). Em 2006, Bojesen et al. relataram ainda um surto de ICD em elefantes asiáticos mantidos em cativeiro na Dinamarca. Nesse caso, não houve administração prévia de antibióticos mas os autores sugerem que a ingestão de grande quantidade de brócolis pode ter influenciado a ocorrência da doença. Esse alimento é conhecido por conter alta concentração de sulfuranos, que possuem a capacidade de inibir o crescimento de uma variedade de microrganismos. Com isso, acredita-se que a ingestão de grande quantidade de brócolis tenha causado o comprometimento da microbiota intestinal, seguido do crescimento e produção de toxinas de *C. difficile*.

REFERÊNCIAS

BANDELJ, P.; TRILAR, T.; RACNIK, J. et al. Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. *FEMS Microbiol Letters*, v.321, p.183-185, 2011.

BOJESEN, A.M.; OLSEN, K.E.; BERTELSEN, M.F. Fatal enterocolitis

. Além do pontencial como patógeno para animais silvestres, recentemente alguns autores levantaram a hipótese dessas espécies selvagens atuarem como reservatórios de estirpes de *C. difficile* para seres humanos e animais domésticos, estimulando estudos nessa área (Jardine et al., 2010). Miller et al. (2010) observaram um baixo índice de isolamento (4%) de *C. difficile* em lontras de vida livre (*Enhydra lutris nereis*), no Canadá. Já em um estudo com 465 amostras de pássaros de vida livre, na Eslovênia, relatou-se prevalência zero, sugerindo que pássaros migratórios dificilmente teriam um papel como reservatório do agente (Bandelj et al., 2011). Em outro estudo realizado com pequenos mamíferos comuns nas regiões urbanas do Canadá, tais como roedores e pequenos marsupiais, Jardine et al. (2010) também relataram uma baixa prevalência de *C. difficile*.

Com os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que, de forma semelhante a estudos com outros grupos de animais de vida livre, os carnívoros silvestres também parecem não possuir grande importância como reservatório de estirpes de *C. difficile*. Por outro lado, sugere-se que este agente possa ser um causador de diarreia nessas espécies, principalmente em animais em cativeiro e sob antibioticoterapia.

in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol*, v.116, p.329-335, 2006.

FRAZIER, K.S.; HERRON, A.J.; HINES, M.E. et al. Diagnosis of enteritis and enterotoxemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*). *J Vet Diagn Invest*, v.5, p.623-625, 1993.

- JARDINE, C.; REID-SMITH, R.J.; FLOCKHART, L. et al. *Clostridium difficile* in wild small mammals. *3rd International Clostridium difficile Symposium*. Bled, Eslovênia, Setembro, p.22-24, 2010.
- JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis*, v.14, p.1039-45, 2008.
- KEEL, M. K; SONGER, J. G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet Pathol*, v.43, p.225-240, 2006.
- MEDINA-TORRES, C.E.; WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med*, v.24, p.628-632, 2010.
- MILLER, M.A.; BYRNE, B.A.; JANG, S.S. et al. Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Vet Res*, v.41, p.1-3, 2010.
- NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *Appl Environ Microbiol*, v.77, p.5755-60, 2011.
- SHIVAPRASAD, H.L. Hepatitis associated with *Clostridium difficile* in an ostrich chick. *Avian Pathol*, v.32, p.57-62, 2003.
- SILVA JÚNIOR, M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. *Einstein*, v.10, n.1, p.105-109, 2012.
- SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v.43, n.1, p.73-80, 2013a.
- SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, p.498-500, 2012.
- SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; SOUZA, D.F.M. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82-4, 2013b.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JÚNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41, p.1130-35, 2011.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, v.140, p.399-404, 2010.

5.3 Surto de diarreia por *Clostridium difficile* em uma granja de suínos no Brasil

RESUMO

Apesar da importância de *C. difficile* como agente causador de diarreia em leitões neonatos, inexistem relatos de surtos por este agente em suínos no Brasil. Este trabalho teve como objetivo descrever um surto de enterite neonatal por *C. difficile* em uma granja de suínos localizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O índice de diarreia aumentou de 2% para aproximadamente 20% em leitões de 1 a 7 dias de idade. Animais necropsiados apresentaram edema de mesocolon e uma grave colite neutrofílica necrotizante foi observada em cortes histológicos. Sete dos animais amostrados foram positivos para as toxinas A/B de *C. difficile* e negativos para outros patógenos pesquisados. A associação do quadro clínico, achados macro e microscópicos *post-mortem* e exames laboratoriais confirmaram o diagnóstico de colite por *C. difficile*. O presente trabalho confirma a ocorrência de diarreia causada por *C. difficile* em suínos no Brasil e reforça a necessidade do diagnóstico na rotina laboratorial.

Palavras-chave: diarreia neonatal, enterite, colite.

NOTA

O Brasil atualmente é o terceiro maior produtor de carne suína no mundo, com um rebanho de aproximadamente 39 milhões de animais (IBGE, 2010). Entretanto, pouco se sabe da importância de *C. difficile* como causador de diarreia em leitões no país. Atualmente, nos EUA esse microrganismo é considerado como a principal causa não controlada de diarreia (Songer e Anderson, 2006). Até 2010, não existiam relatos no Brasil sobre a infecção por *C. difficile* em suínos. A doença foi confirmada nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul por dois levantamentos por *C. difficile* em uma granja de suínos localizada em Gaurama, Rio Grande do Sul, Brasil.

A propriedade, uma granja comercial de larga escala, possuía 2000 matrizes e com sistema “all-in-all-out”. Os animais eram acomodados em baias que eram limpas e desinfetadas após a saída de cada lote. Em dezembro de 2011, o proprietário relatou um aumento de ocorrência de diarreia, principalmente em leitões com até três dias de vida,

epidemiológicos (Lippke et al., 2011; Silva et al., 2011). Em um estudo sobre diagnóstico diferencial de causas de diarreia em leitões de maternidade, *C. difficile* foi considerado a principal causa de enterite infecciosa (Cruz Junior et al., 2013).

Mesmo com a crescente importância de *C. difficile* como causador de desordens entéricas na suinocultura brasileira, inexistem descrições de surtos da doença. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é descrever um surto de diarreia.

com aparente redução do ganho de peso, mas baixa mortalidade (aproximadamente 1,5%). De acordo com os registros da granja, a ocorrência de diarreia em leitões com até sete dias de vida subiu de uma média de 2% para em torno de 19 a 23% nos últimos três meses. Apesar do uso de uma vacina contendo toxóide alfa de *C. perfringens* e *Escherichia coli* enterotoxigênica, não houve alteração na frequência de diarreia.

Em visita a granja, 18 leitões diarréicos e dois aparentemente saudáveis (n=20), de leitegadas diferentes e com idade variando de um a sete dias de vida, foram eutanasiados por eletrocussão, sangrados e necropsiados. Todas lesões macroscópicas foram anotadas e amostras de fezes de sete animais, sendo dois aparentemente saudáveis e cinco diarréicos, foram coletadas diretamente do reto e armazenadas a 4°C por 48 horas. Dois dos animais diarréicos foram selecionados e amostras do jejuno, íleo, ceco e colon foram fixadas em formalita tamponada 10% para avaliação histológica.

As amostras de fezes foram submetidas a pesquisa de oocistos pelo método de flutuação (Hoffman, 1987), pesquisa de rotavirus pelo eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de coloração pela prata (Herring et al., 1982), isolamento e genotipagem de *C. perfringens* (Vieira et al., 2008) e *C. difficile* (Silva et al., 2011) e para bacteriologia de enteropatógenos aeróbios em ágar MacConkey (Biobrás, Prodimol Biotechnology) e Muller-Hinton suplementado com 5% de sangue equino (Difco Laboratories, Detroit, USA). Para detecção das toxinas A/B de *C. difficile*, as amostras foram submetidas ao teste de citotoxicidade celular em células Vero (ATCC CCL 81) (como descrito no Capítulo 4, item 4.1 deste trabalho).

No exame *post mortem*, 18 dos 20 leitões (16 diarréicos e dois aparentemente saudáveis) apresentaram edema de mesocolon, uma alteração *post mortem* comumente associada a infecção por *C. difficile* (Yaeger et al., 2007). Além de edema de mesocolon e diarreia, nenhuma outra alteração marcante foi observada, algo também comum em casos de diarreia por *C. difficile* em leitões. Outros sinais como hidrotórax, dificuldade respiratória,

edema escrotal e facial podem ocorrer, mas são raros (Songer e Uzal, 2005). Além da lesão macroscópica, dois dos animais diarréicos foram submetidos a avaliação histológica, apresentando colite necrotizante neutrofílica severa com intensa infiltração de neutrófilos da lâmina própria para o lúmen intestinal, alteração microscópica também considerada típica das infecções por *C. difficile* (Yaeger et al., 2007).

O exame parasitológico foi negativo para oocistos e apenas colônias de *E. coli* foram obtidas na rotina bacteriológica de aeróbios. Em uma PCR para detecção dos fatores de virulência de *E. coli* (Macêdo et al., 2007), todos os isolados foram caracterizados como não toxigênicos. *C. perfringens* tipo A foi isolado de dois leitões, um diarréico e outro não diarréico. Ambas as estirpes foram negativas para o gene relativo a produção da toxina beta-2 (*cpb2*), considerado o principal fator de virulência associado a diarreia por *C. perfringens* em leitões (Schotte et al. 2004). Dessa forma, acredita-se que tais estirpes faziam parte da microbiota residual, não estando portanto envolvidas na diarreia.

Todas as sete amostras de fezes foram positivas para as toxinas A/B de *C. difficile* no teste de citotoxicidade celular. Isolados de *C. difficile* foram obtidos de três amostras, sendo duas de leitões diarréicos e uma de um não-diarréico, e todas as estirpes foram positivas para os genes das toxinas A (*tdcA*) e B (*tcdB*), mas negativa para o gene da toxina binária (*cdtB*) por PCR.

Apesar das alterações macro e microscópicas serem fortemente sugestivas de infecção por *C. difficile*, a doença não poderia ser confirmada sem a detecção das toxinas A/B (Delmeé, 2001). Em alguns casos, a associação de

isolamento e confirmação da toxigenicidade da estirpe também é útil para o diagnóstico. No presente trabalho, todas estas pesquisas laboratoriais foram realizadas, com a detecção das toxinas A/B em todas as amostras de fezes avaliadas e isolamento de estirpes toxigênicas de *C. difficile* a partir de três desses espécimes clínicos.

Pode-se observar que alguns leitões foram positivos para as toxinas A/B mas negativos para o isolamento do agente. Este resultado corrobora o encontrado em outros trabalhos em leitões e outras espécies domésticas (Båverud et al., 2003; Clooten et al., 2008; Silva et al., 2011) e, provavelmente, é causado pela susceptibilidade de algumas estirpes de *C. difficile* a um ou a ambos os antibióticos presentes no meio de cultura empregado para o isolamento (Songer e Uzal, 2005). A detecção das toxinas A/B em leitões não diarréicos é também um evento conhecido. Segundo Yaeger et al (2007), a ausência de conteúdo diarréico no intestino não exclui a possibilidade de infecção, uma vez que a colite por *C. difficile* é comumente subclínica e pode ocorrer inclusive constipação em alguns casos.

No presente trabalho, uma grande parcela dos leitões necropsiados apresentavam edema de mesocolon e todas as amostras testadas foram positivas para as toxinas A/B. De acordo com Songer (2004), em granjas com diarreia por *C. difficile*, 30% dos leitões são positivos para as toxinas A/B, mas essa proporção pode chegar a 100% em alguns casos. Considerando que a infecção por *C. difficile* é frequentemente subclínica (Yaeger et al., 2007), a alta incidência de diarreia (aproximadamente 20%) é uma característica marcante nesse caso. É importante salientar ainda que nenhum outro enteropatógeno foi encontrado.

Dessa forma, a alta incidência de diarreia, a grande proporção de animais com alterações *post-mortem* e positivos para as toxinas A/B sugerem um surto de diarreia por *C. difficile* na granja em questão.

Apesar da infecção por *C. difficile* ser considerada a principal causa de diarreia neonatal em suínos nos EUA (Songer e Anderson, 2006), pouco se sabe com relação a importância dessa doença em toda a América Latina, existindo apenas dois levantamentos realizados no Brasil, onde ambos demonstraram uma prevalência de aproximadamente 16% em leitões (Lippke et al., 2011; Silva et al., 2011). É importante salientar que, segundo Silva et al (2011), 53% das granjas testadas tiveram pelo menos um animal positivo para as toxinas A/B, sugerindo uma grande disseminação da doença. Como já relatado nos EUA e Europa, estes trabalhos confirmam *C. difficile* como um dos principais enteropatógenos de suínos no Brasil e demonstram a necessidade de mais estudos sobre prevalência e controle dessa doença.

Como vacinas contra *C. difficile* não estão comercialmente disponíveis no Brasil, o controle de infecções por este agente em animais domésticos é baseada em medidas gerais de manejo (Silva et al., 2012). Recentemente, alguns trabalhos levantaram a possibilidade de *C. difficile* ser um agente zoonótico (Arroyo et al., 2007). Mais estudos são necessários para confirmação sendo que, até o momento, nenhuma evidência de transmissão entre animais e seres humanos foi encontrada (McNamara et al., 2011).

A associação das alterações *post-mortem* e os resultados laboratoriais confirmaram o diagnóstico de diarreia por *C. difficile*. Este estudo revela a possibilidade de uma incidência

subestimada de diarreia causada por

AGRADECIMENTOS

Fapemig, Capes, CNPq, INCT e PRPq/UFGM.

REFERÊNCIAS

ARROYO, L.G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J.S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol.*, v.120, p.179-183, 2007.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, v.35, n.5, p.465-71, 2003.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Pecuária Nacional*. Rio de Janeiro, v.38, p.1-65. 2010.

CLOOTEN, J., KRUTH, S., ARROYO, L. et al. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet Microbiol.*, v.129, p.209-14, 2008.

CRUZ-JUNIOR, E.C.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S. et al. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesq Vet Bras*, no prelo, 2013.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect.*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained

este agente em leitões no Brasil. polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.473-477, 1982.

HOFFMANN, R.P. *Diagnóstico de Parasitismo Veterinário*. Porto Alegre: Editora Sulina, 1987.156p.

LIPPKE, R.T.; BOROWSKI, S.M.; MARQUES, S.M.T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesq Vet Bras.*, n.31, v.6, p.505-510, 2011.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichiacoli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.59, p.1117-1123, 2007.

MCNAMARA, S.E.; ABDUJAMILOVA, N.; SOMSEL, P. et al. Carriage of *Clostridium difficile* and other enteric pathogens among a 4-H avocational cohort. *Zoonoses Public Health*, v.58, n.3, 192-9, 2011.

SCHOTTE, U.; TRUYEN, U.; NEUBAUER, H. Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors--a review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, v.51, n.10, p.423-6, 2004.

SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v.43, n.1, p.73-80, 2013.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1-4, 2006.

SONGER, J.G.; UZAL, F A. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest*, v.17, n.6, p.528-536, 2005.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of

food animals. *Anim Health Res Rev*, n.2, p.321-6, 2004.

VIEIRA, A.A.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M. et al. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq Instit Biol*, v.75, p.513-6, 2008.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; GLENN, SONGER, J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J Vet Diagn Invest*, v.19, n.1, p.52-59, 2007.

5.4 Primeiro relato de diarreia por *Clostridium difficile* em potros no Brasil

RESUMO

Apesar da importância de *C. difficile* como agente causador de diarreia e colite em potros, inexistem relatos confirmados de tal doença no Brasil. O objetivo deste trabalho foi descrever dois casos confirmados de diarreia causada por *C. difficile* em potros, ocorridos em Minas Gerais, Brasil. Os animais, com cinco meses de idade, foram encaminhados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com histórico de cinco dias de diarreia após antibioticoterapia com penicilina para uma possível pneumonia. Ambos os animais foram positivos para detecção das toxinas A/B de *C. difficile* e estirpes toxigênicas de *C. difficile* foram isoladas de amostras de fezes. Os animais apresentaram melhora gradual com o tratamento baseado em metronidazol e fluidoterapia e receberam alta após sete dias. A associação do quadro clínico, exames laboratoriais e o sucesso terapêutico permitem confirmar o diagnóstico de colite por *C. difficile*. O presente trabalho chama a atenção para a possibilidade de diarreia causada por *C. difficile* em equinos no Brasil e reforça a necessidade do diagnóstico para tal infecção na rotina laboratorial.

Palavras-chave: colite, equinos, diarreia nosocomial.

RELATO DE CASO

C. difficile é um anaeróbico, bastonete Gram-positivo que tem sido reconhecido como um importante patógeno bacteriano tanto em seres humanos quanto em animais. Atualmente, é responsável por 95% de todos os casos de colite pseudomembranosa e a maioria dos casos de diarreia associada a antibióticos em seres humanos (Schwan et al., 2009). Em cavalos adultos, este agente pode causar colite comumente nosocomial e associada a antibioticoterapia (Songer et al., 2009). Em potros, *C. difficile* é responsável por diarreia e enterocolite em animais com até 5 meses de idade (Båverud et al., 2004). Apesar da importância de *C. difficile* como patógeno em equinos, não há diagnósticos confirmados dessa doença em potros no Brasil. Portanto, o objetivo deste artigo é descrever o primeiro caso confirmado de colite por *C. difficile* em dois potros no Brasil.

Dois potros, com cinco meses de idade, da raça Mangalarga Marchador e com

histórico de cinco dias de diarreia foram examinados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV). O proprietário informou que três animais que compartilharam a mesma baia iniciaram o quadro de diarreia no segundo dia após o tratamento com penicilina para uma suspeita clínica de pneumonia. Com o início da diarreia, suspeitou-se de salmonelose e o tratamento com penicilina foi substituído por florfenicol. Quatro dias após o início da diarreia, um dos animais veio a óbito. Os outros dois potros foram então encaminhados para o HV.

No dia da admissão, os dois animais encontravam-se desidratados e foi possível observar a evacuação de diarreia verde aquosa. Os animais não apresentavam hipertermia. As duas principais suspeitas clínicas foram salmonelose e diarreia por *C. difficile*. Sangue de ambos os potros foram coletados para um hemograma completo e para a avaliação bioquímica sérica. As amostras de fezes foram colhidas para exame parasitológico, cultura

bacteriológica de rotina, detecção de *Lawsonia intracellularis* por PCR (Jones et al., 1993), isolamento de *C. difficile* (Silva et al., 2011) e detecção das toxinas A/B por dois métodos: utilizando um kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA - Ridascreen *Clostridium difficile* toxins A/B, R-Biopharm, Alemanha); e pelo método de citotoxicidade celular, realizado utilizando células VERO (ATCC CCL 81) e com soroneutralização do efeito citotóxico através de antitoxinas de *C. sordellii* (NIBSC, Inglaterra). Inicialmente, o tratamento consistiu em fluidoterapia com solução composta de ringer lactato, solução salina e glicose (proporção 3:2:1 - 130 ml kg⁻¹ dia⁻¹, com um total de 1,5 g de glicose kg⁻¹ dia⁻¹), omeprazol (4mg kg⁻¹ SID) e antibióticos (metronidazol: BID 20 mg kg⁻¹, IV, e ceftiofur: 4.4mg kg⁻¹ de SID, IM).

Ambos animais encontravam-se com uma anemia inicial, com um hematócrito de 24 e 20% e de 9,2 e 8,8 g dL⁻¹ de hemoglobina, respectivamente. Ambos os potros tiveram também uma diminuição da proteína total (4,7 e 4,0 g dL⁻¹) e de albumina (1,5 e 1,3 g dL⁻¹). Todos estes resultados são frequentemente encontrados em casos de diarreia associada a *C. difficile* (Båverud, 2004). O exame parasitológico foi negativo, e apenas algumas colônias de *E. coli* foram obtidos da cultura bacteriológica de rotina de amostras de fezes. Descartando a suspeita inicial, *Salmonella* sp. não foi isolada. *L.intracellularis* não foi detectada por PCR. Por outro lado, ambas amostras de fezes foram positivas para toxinas A/B por ELISA e no ensaio de citotoxicidade celular. Além disso, *C. difficile* foi isolado a partir de ambos os potros, e as duas amostras foram positivas por PCR para os genes da toxina A (*tcdA*) e B (*tcdB*), mas

negativo para o gene da toxina binária (*cdtB*). Ambas amostras isoladas foram capazes de produzir toxina *in vitro*, comprovando sua toxigenicidade.

No segundo dia após a admissão, os potros encontravam-se hidratados e mais ativos, apresentando um menor número de episódios de diarreia mas ainda com fezes líquidas. A consistência do material fecal mudou gradualmente de líquido a pastoso entre os terceiro e quarto dias de hospitalização, retornando ao sólido e com o odor característico a partir do quinto dia. Os animais receberam alta do HV sete dias após a admissão.

O diagnóstico laboratorial da infecção por *C. difficile* é baseado na detecção das toxinas A/B pelo ensaio de CTA, considerado por muitos o "padrão de ouro", ou por ELISA (Delmeé, 2001). Em alguns casos, a associação entre o isolamento e produção de toxinas *in vitro* também podem ser úteis. No presente relato, todos estes ensaios foram conduzidos. Em ambas amostras, as toxinas A/B foram detectadas por ELISA comercial e no ensaio de citotoxicidade, e isolados de *C. difficile* toxigênicos foram obtidos a partir de ambos os animais.

De acordo com Båverud et al. (2003), a diarreia associada a *C. difficile* em potros pode ocorrer espontaneamente, mas é sabido que o tratamento com antibióticos também podem levar à excreção do microrganismo. Sob estas circunstâncias, os antimicrobianos levam a um desequilíbrio da microbiota residente, permitindo a colonização por *C. difficile* (Båverud et al., 2002). Os potros do presente relato desenvolveram diarreia dois dias após tratamento com penicilina, sugerindo que a antibioticoterapia foi um fator predisponente para a infecção por *C. difficile*. Uma observação semelhante

foi descrito por Båverud (2004), ao sugerir que a penicilina predispõe estabelecimento de *C. difficile* no intestino de equinos.

É também importante notar que em animais adultos, *C. difficile* é a principal causa de colite associada a antibióticos e pode mesmo ser um agente nosocomial, como reportado para os seres humanos (Songer et al., 2009). Estes resultados reforçam a necessidade de incluir *C. difficile* no diagnóstico diferencial da diarreia em potros e de colite após antibioticoterapia em cavalos adultos, especialmente nos casos em que a doença se desenvolveu após internação em um hospital veterinário.

No momento, não existem produtos comerciais disponíveis para imunoprofilaxia contra infecções por *C. difficile* em animais domésticos. O tratamento é baseado na interrupção da administração do antibiótico que iniciou o quadro, seguido por fluidoterapia para manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico. Em casos onde a antibioticoterapia é necessária, metronidazol é a droga de primeira escolha (Båverud, 2004). Testes de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *C. difficile* de equinos não são realizados rotineiramente, mas estudos demonstraram que a maioria das estirpes foram sensíveis ao metronidazol. Até o momento, isolados de *C. difficile* de equinos foram encontrados apenas em cavalos americanos (Jang et al., 1997) e, nesses casos, a vancomicina é a opção recomendada (Båverud et al., 2004).

A associação dos achados clínicos, resultados laboratoriais e resultado do tratamento confirma o diagnóstico de diarreia por *C. difficile*. Este relato revela a possibilidade de uma incidência subestimada de diarreia causada por

este agente em potros no Brasil e sugere que a detecção das toxinas A/B de *C. difficile* deve ser considerada um exame importante na análise de rotina de casos de diarreia.

AGRADECIMENTOS

Fapemig, Capes, CNPq, PRPq-UFMG.

REFERÊNCIAS

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet Clinic North Am Eq Pract*, v.20, n.3, p.615-630, 2004.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Vet Q.*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, v.35, n.5, p.465-71, 2003.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinic Microbiol Infect*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

JANG, S.S; HANSEN, L.M.; BREHER, J.E. et al. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin Infect Dis.*, v.25, p.266-7, 1997.

JONES, G.F.; WARD, G.E.; MURTAUGH, M.P. et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, v.10, p.2611-2615, 1993.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog*, v.5, n.10, 2009.

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of

Clostridium difficile from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.

SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; DIAL, S.M. et al. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *J Vet Diagn Invest*, v.21, n.3, p.377-380, 2009.

5.5 Diarreia por *Clostridium difficile* associada a candidíase em um potro

RESUMO

C. difficile é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, responsável por quadros de enterocolite espontânea ou após antibioticoterapia em potros. Já as infecções fúngicas por membros do gênero *Candida* são comumente associadas a falhas na transferência de imunidade passiva ou ao uso prolongado de antimicrobianos. O objetivo deste relato foi descrever um caso de infecção fúngica oportunista em um potro com enterite causada por *C. difficile*. Um fêmea com 18 dias de idade da raça Mangalarga Marchador foi apresentado a um veterinário local com histórico de quatro dias de conjuntivite, diarreia e hipópio. O diagnóstico clínico foi de salmonelose mas, mesmo com o tratamento baseado em fluidoterapia, antibióticos (enrofloxacina e norfloxacina) e anti-inflamatório (flunixinina-meglumina), não houve melhora clínica e o animal foi eutanasiado. No exame *post-mortem* e na histologia, foi possível visualizar uma infecção por *Candida albicans* com ulcerações na mucosa oral, da língua, esofágica e estomacal. A avaliação intestinal revelou uma tiflocolite com formação de pseudomembrana. O conteúdo intestinal foi positivo para detecção das toxinas A/B, sugerindo que a infecção por *C. difficile* tenha sido a causa da diarreia. O presente relato chama a atenção para a possibilidade de ocorrência de infecções graves por *Candida albicans* associado a administração de antibióticos de largo espectro e por períodos prolongados. Além disso, sugere-se a necessidade de implementação da detecção das toxinas A/B de *C. difficile* na rotina laboratorial para diagnóstico diferencial das diarreias em potros.

Palavras-chave: candidíase, tiflocolite, *Candida albicans*.

NOTA

A diarreia é uma das afecções clínicas mais comuns em potros, sendo que aproximadamente 80% deles têm pelo menos um episódio de diarreia durante os primeiros seis meses de vida. Muitos agentes infecciosos têm sido relatados como causa de diarreia em potros, incluindo principalmente *C. difficile* e *Salmonella* spp. (Frederick et al., 2009). *C. difficile* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, responsável por quadros de enterocolite, principalmente após antibioticoterapia, em várias (Ginn et al., 2007). *Candida* spp. são fungos dimórficos, leveduras ovóides que se reproduzem por brotamento, sendo a *Candida albicans* a espécie mais comumente isolada de seres humanos e animais. A candidíase oral ocorre com relativa frequência em potros, porcos e cães e envolve a proliferação de leveduras e hifas nas

espécies de animais e em seres humanos (Thean et al., 2011).

As infecções fúngicas são frequentemente oportunista e podem surgir a partir de microbiota normal (Byrne, 2007). Os membros do gênero *Candida* são fungos ubíquos encontrados em diversas espécies de plantas e como parte da microbiota normal do aparelho digestivo, do trato respiratório superior e mucosa genital de mamíferos camadas de paraqueratose superficiais do epitélio oral, apresentando-se como uma pseudomembrana de material cinza-claro, irregular predominantemente na mucosa oral e na parte inferior da língua (Brown et al., 2007; AFIP, 2010). Já infecções mais graves por *C. albicans* podem gerar ulcerações gástrica e esofágica,

ocorrendo relatos em seres humanos, suínos, cangurus e até em golfinhos (Gross e Mayhew, 1983). O objetivo deste relato foi descrever um caso de infecção fúngica oportunista em um potro com enterite causada por *C. difficile*.

Um potro, fêmea, com 18 dias de idade e da raça Mangalarga Marchador foi apresentado a um veterinário com histórico de quatro dias de conjuntivite, diarreia e hipópio. O animal foi tratado com colírio a base de sulfato de condroitina e ciprofloxacina. Além disso, o potro recebeu antibióticos (florfenicol e enrofloxacina), anti-inflamatório (flunixinina-meglumina), anti-espasmódico (N-butilescolamina) e foram administrados suplementos alimentares. Cinco dias depois, sem melhora clínica, o potro foi internado no Hospital Veterinário da UFMG. Clinicamente o animal encontrava-se apático e com baixo desenvolvimento corporal. Além disso, hipertermia (40°C), desidratação grave, hipermotilidade intestinal e diarreia profusa de cor esverdeada foram observados. Iniciou-se fluidoterapia, administraram-se antibióticos (enrofloxacina e norfloxacina), anti-inflamatório (flunixinina-meglumina), anti-espasmódicos (N-butilescolamina), adsorvente (carvão ativado), vitamina B1 (cobalamina) e probióticos. Apesar do tratamento, não houve melhora clínica. Onze dias após o início da doença, o animal encontrava-se

hiportérmico e defecou grande quantidade de um conteúdo cilíndrico acinzentado, sugestivo de pseudomembrana de fibrina. Devido ao prognóstico desfavorável, realizou-se a eutanásia seguida de necropsia do animal.

Amostras de tecidos e conteúdo intestinal foram coletados para exame histopatológico e bacteriológico. Para histologia, amostras de tecido foram fixados em formalina a 10%, rotineiramente processado e corados com hematoxilina e eosina (HE) e coloração Ácido Periódico-Schiff (PAS). O conteúdo intestinal foi submetido a pesquisa das toxinas A/B por ensaio imunoenzimático (ELISA, Ridascreen *C. difficile* toxin A/B, R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha) e por citotoxicidade celular (CTA) (Capítulo 4, item 4.1).

Na necropsia, o potro apresentava má condição corporal. Na câmara anterior do globo ocular direito havia uma pequena quantidade de fibrina. Na superfície dorsal e ventral da língua e na mucosa do esôfago, era possível observar placas brancas multifocais ou coalescentes, fracamente aderidas e de aspecto friável. Além disso, haviam áreas multifocais de ulceração sobre a mucosa do esôfago. A mucosa estomacal encontrava-se difusamente espessada, caracterizada por um membranosa branco-acinzentada e friável facilmente separados (Figura 2A).

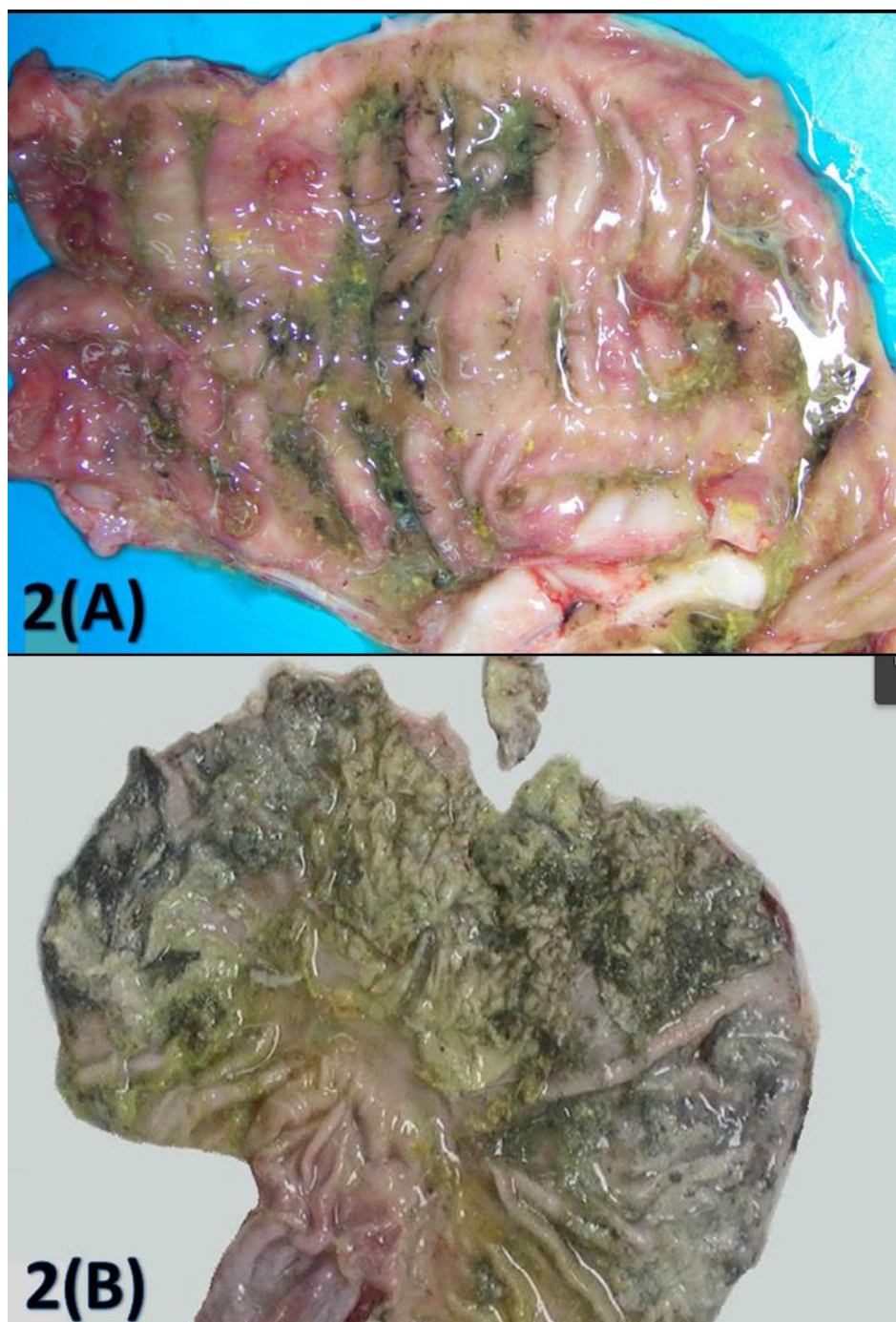


Figura 2(A): Ceco, potro. A pseudomembrana de fibrina foi retirada e revelou a mucosa intestinal edemaciada e com pequenas áreas de ulceração. **(B):** Mucosa estomacal edemaciada e revelando a presença de uma pseudomembrana de aspecto acinzentado e fracamente aderida.

As mucosas do intestino delgado, ceco e cólon encontrava-se hiperêmicas, edemaciadas e algumas úlceras agudas multifocais (0,5 cm de diâmetro) foram observados na mucosa do ceco e cólon maior. No lúmen do ceco e cólon, havia grande quantidade pseudomembrana de fibrina (Figura 2A).

O conteúdo intestinal foi positivo para a detecção das toxinas A/B de *C. difficile* por ELISA e por CTA. Uma estirpe de *C. difficile* foi isolada em ágar TCCFA (ágar composto de cicloserina-cefoxitina-frutose e suplementado com 5% de sangue de cavalo e 0,1% de taurocolato). Por meio da PCR

multiplex (Silva et al., 2011) foi possível detectar os genes codificadores das toxinas A (*tcdA*) e B (*tcdB*), enquanto o gene da toxina binária (*cdtB*), um factor de virulência adicional de *C. difficile*, não foi detectado. Não foi possível isolar *Salmonella* spp. e *C. perfringens* a partir do conteúdo intestinal.

No exame histopatológico, observou-se hiperqueratose moderada com grande presença de blastoconídeos e pseudohifas aderidos ao epitélio da língua. Além disso, havia uma área extensa de ulceração focal associada com uma intensa infiltração de neutrófilos, restos celulares e numerosas colônias bacterianas. Houve também uma acentuada esofagite com presença de pseudomembrana friável. A porção não glandular do estômago encontrava-se espessadas devido a hiperplasia do epitélio escamoso, com marcante hiperplasia paraqueratótica e infiltração de neutrófilos. Em algumas áreas do epitélio escamoso, foi possível observar queratinização circunferencial e lamelar. Além disso, foram observados grande número de blastoconídeos e pseudohifas aderidos ao epitélio a as áreas ulceradas. Em muitas seções desprendimento do epitélio ulcerado, detritos, neutrófilos e leveduras podiam ser vistos. No PAS, os blastoconídios, pseudohifas e leveduras sugestivas de *Candida* spp foram corados positivamente.

No colon e ceco, uma tiflocolite multifocal ulcerativa foi observada. Nesta área, leveduras positivas no PAS também foram visualizadas. Houve ainda vasculite e trombose associada com as pseudohifas. Lesões compatíveis com infecção por *C. difficile* foram caracterizados por moderada a acentuada de necrose superficial do epitélio com infiltração neutrofílica e grande quantidade de bacilos

intralesionais, especialmente no cólon maior e ceco.

Infecções causadas por *Candida* spp. estão geralmente relacionadas com fatores predisponentes, principalmente imunodeficiência ou terapia com antibióticos e/ou corticóides (McClure et al., 1985). Quando de imunodeficiência em potros jovens são comuns quando há falha de colostragem. Além disso, não são raros os relatos onde a antibioticoterapia suprime a microbiota normal e favorece a proliferação de leveduras (McClure et al., 1985; Bruijn e Wijnberger, 2004). Em um indivíduo saudável, a presença de uma microbiota intestinal normal mantém espécies de *Candida* sob controle por competição pela glicose disponível (Bruijn e Wijnberger, 2004, Brown et al., 2007). As lesões graves por *C. albicans* neste potro provavelmente ocorreram devido alterações na microbiota pela administração intensa de antibióticos para tentativa de controle da doença entérica. No entanto, a possibilidade de imunodeficiência não pode ser excluída uma vez que não havia informações sobre a quantidade e qualidade do colostro ingerido por este animal.

Fatores de virulência de espécies de *C. albicans* incluem, entre outros, a produção de diferentes enzimas hidrolíticas e adesinas. Estes permitem sua adesão à superfície do epitélio escamoso (Karkowski-Kuleta et al., 2009). Algumas espécies de *C. albicans*, principalmente *C. albicans*, podem digerir a queratina *in vitro* o que possivelmente auxilia a invasão do epitélio e o alcance do estrato córneo (Gross e Mayhew, 1983).

As lesões no ceco e colon encontradas na necropsia e relatadas na histologia foram sugestivas de infecção por *C. difficile*. Para o diagnóstico laboratorial

de enterite causada por este agente é necessário detectar as toxinas A/B no conteúdo intestinal (Post e Songer, 2006). Assim, a lesão compatível combinada com a visualização de bacilos intralesionais e a detecção das toxinas A/B permitiu o diagnóstico de tiflocolite difusa por *C. difficile*, sendo essa possivelmente a causa da diarreia neste potro.

Os principais fatores de virulência de *C. difficile* são toxina A e toxina B, que agem diretamente sobre as células da mucosa epitelial. As toxinas promovem o comprometimento da adesão entre os enterócitos e iniciam uma cascata inflamatória que amplifica o dano aos tecidos hospedeiros e culmina com a exsudação de fluidos e formação da pseudomembrana característica da doença (Anderson e Songer, 2008).

A ocorrência de candidíase severa no potro em questão chama atenção para a necessidade de cuidados na transferência da imunidade passiva por colostragem. Além disso, a administração de antibióticos de largo espectro e por períodos prolongados deve ser acompanhada de um acompanhamento clínico cuidadoso, lembrando sempre da possibilidade de ocorrência de infecções oportunistas por *C. albicans* nestes pacientes. Finalmente, a ausência de diagnóstico etiológico precoce de diarreia por *C. difficile* impediu a mudança na conduta clínica, culminando com a administração contínua de antimicrobianos ineficazes para infecção tal agente. Tal fato provavelmente favoreceu a manutenção da infecção por *C. difficile* e a disseminação da candidíase pelo comprometimento da microbiota indígena. Com isso, o presente trabalho reforça a necessidade de implementação da detecção das toxinas A/B na rotina

laboratorial para diagnóstico diferencial das diarreias em potros.

AGRADECIMENTOS

CAPES, Fapemig, INCT, PRPq-UFMG e CNPq.

REFERÊNCIAS

ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY. Departament of Veterinary Pathology. Conference 7, case 3. Wednesday Slide Conference 2010-2011. Disponível em: <http://www.afip.org/>. Acesso em: mai. 2011.

BROWN, C. C; BAKER, D. C; BAKER, I. K. Alimentary system. In: MAXIE, M. G. (ed). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5. ed. Toronto: Saunders Elsevier, 2007, pp. 01-296.

BRUIJN, C. M; WIJNBERG, I. D. Potential role of *Candida* species in antibiotic-associated diarrhea in a foal. *Vet Rec*, v.135, p.26-28, 2004.

BYRNE, B. A. Laboratory diagnosis of fungal diseases. In: SELLON, D. C; LONG, M. T. *Equine infectious diseases*. St. Louis: Saunders, p385-393. 2007.

CARRILLO, N. A. Candidiasis. In: SELLON, D.C; LONG, M.T. *Equine infectious diseases*. St. Louis: Saunders, 2007, p.406-408.

GINN, P.E.; MANSELL, J.E.K.L.; RAKICH, P.M. Skin and appendages. In: MAXIE, M.G. (Ed). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5. ed. Toronto: Saunders Elsevier, 2007, pp.553-781.

GROSS, T.L.; MAYHEW, I.G. Gastroesophageal ulceration and

candidiasis in foals. *J Am Vet Med Assoc*, v.182, p.1370-1373, 1983.

JONES, R.L.; ADNEY, W.S.; ALEXANDER, A.F. et al. Hemorrhagic necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium difficile* infection in four foals. *J Am Vet Med Assoc*, v.193, p.76-79, 1988.

KEEL, M. K; SONGER, J. G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet Pathol*, v.43, p.225-240, 2006.

MCCLURE, J. J; ADDISON, J. D; MILLER, R. I. Immunodeficiency manifested by oral candidiasis and bacterial septicemia in foals. *J Am Vet Med Assoc*, v.186, p.1195-1197, 1985.

MEDINA-TORRES, C.E.; WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol.*, 152, 212-215, 2011.

MUELLER, R.S; BETTENAY, S.V; SHIPSTONE, M. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida*

guilliermondii. *Vet Rec*, v.150, p.728-730, 2002.

REILLY, L. K; PALMER, J. E. Systemic candidiasis in four foals. *J Am Vet Med Assoc*, v.205, p.464-466, 1994.

SCHLEUPNER, M.A.; GARNER, D.C.; SOSNOWSKI, K.M. et al. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. *J Clinl Microbiol*, v.33, p.1755-1759, 1995.

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.

THEAN, S.; ELLIOTT, B.; RILEY, T. *Clostridium difficile* in horses in Australia: a preliminary study. *J Med Microbiol*, 2011.

5.6 Diarreia por *Clostridium difficile* em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*)

RESUMO

O objetivo deste trabalho é relatar um caso de diarreia por *C. difficile* em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*) ocorrido no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. O animal, um macho com aproximadamente dois anos de idade, foi enviado ao Centro de Reabilitação de Animais Silvestres com histórico de atropelamento e fratura de tíbia e fíbula. Após a cirurgia para redução da fratura, iniciou-se antibioticoterapia com duas doses de cefovecina sódica intervaladas de 8 dias. Durante o tratamento, o animal apresentou diarreia. A amostra de fezes coletada para exames laboratoriais foi positiva para as toxinas A/B no ensaio de citotoxicidade celular e uma estirpe toxigênica de *C. difficile* foi isolada. Nenhum outro patógeno pesquisado foi encontrado. A associação de histórico, sinais clínicos e exames laboratoriais confirmam o diagnóstico de diarreia por *C. difficile*. O presente relato aponta *C. difficile* como um possível enteropatógeno de felinos silvestres e sugere que este agente deve ser considerado em casos de diarreia nestas espécies, principalmente quando os sinais clínicos iniciaram após antibioticoterapia.

Palavras-chave: zoonose, enterocolite, felinos, nosocomial

RELATO DE CASO

Jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) é o maior felino entre os pequenos felídeos tropicais da América do sul (Trolle et al., 2003). Apesar de ser uma das espécies mais comuns de felídeos silvestres, estudos recentes indicam que algumas subpopulações encontram-se em risco sobretudo devido a fragmentação de habitat e caça esportiva (Laurenson et al., 2005).

C. difficile é um bacilo, Gram-positivo, anaeróbico obrigatório e responsável pela maioria dos casos de diarreia associada ao uso de antimicrobianos em humanos, além de um importante enteropatógeno para diversas espécies de animais domésticos, como equinos, suínos e cães (Songer et al., 2010; Silva et al., 2013a). Recentemente, a infecção por *C. difficile* (ICD) tornou-se um ponto de discussão em saúde pública uma vez que estirpes isoladas de animais apresentam grande semelhança com os isolados encontrados em seres humanos com colite pseudomembranosa (Arroyo

et al., 2005; Arroyo et al., 2007; Rodriguez-Palacios et al., 2007).

Apesar da importância de *C. difficile* como enteropatógeno para seres humanos e animais e até mesmo como possível agente zoonótico, a importância da ICD para a maioria das espécies silvestres permanece obscura, limitando-se a alguns poucos estudos e relatos de caso (Bojesen et al., 2006; Bandelj et al., 2011). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo descrever um caso de diarreia por *C. difficile* em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*) ocorrido no Brasil.

Em julho de 2012, uma jaguatirica macho com aproximadamente 24 meses de idade e pesando 11,6 kg foi apresentada no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, após ter sido atropelada em uma rodovia na cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul. Após um raio-x, o animal foi diagnosticado com uma fratura de tíbia e fíbula. Realizou-se a redução cirúrgica da fratura e iniciou-se antibioticoterapia

com duas doses de cefovecina sódica (8mg/kg, via subcutânea) com intervalo de oito dias entre as doses. Durante o tratamento, o animal apresentou diarreia de consistência pastosa.

Dois dias após a administração da última dose de antibiótico, a jaguatirica continuava a apresentar episódios de diarreia, sendo então coletado conteúdo fecal para exames laboratoriais. Os seguintes exames foram realizados: detecção de rotavírus em gel de poliácridamida seguido de coloração pela prata (Herring et al., 1982); detecção de células vegetativas e cistos de *Giardia* sp. por ELISA (Ridascreen Giardia, R-Biopharm, Alemanha); isolamento de *C. perfringens* (Vieira et al., 2008) e de *C. difficile* (Silva et al., 2011); e rotina bacteriológica para bactérias aeróbias em ágar MacConkey (Biobrás®, Prodímol Biotechnology, Brasil) e Muller-Hinton suplementado com 5% de sangue equino (Difco Laboratories, Detroit, EUA). Além disso, pesquisou-se as toxinas A/B de *C. difficile* por meio de um kit de ELISA (*C. difficile* Tox A/B II - Techlab Inc., Blacksburg, USA) e pelo método da citotoxicidade celular (Capítulo 4, item 4.1).

Colônias de *Escherichia coli* foram obtidas a partir da cultura bacteriológica de aeróbios, mas nenhum fator de virulência foi encontrado na PCR (Macêdo et al., 2007). *C. perfringens* tipo A também foi isolado, o que pode ser considerado normal uma vez que essa bactéria comumente participa da microbiota indígena de mamíferos e aves (Siqueira et al., 2012). De qualquer forma, é importante notar que a estirpe de *C. perfringens* isolada não possuía o gene (*cpe*), fator de virulência comumente associado a casos de diarreia em cães e gatos (Weese et al., 2001; Marks et al., 2002; Silva et al., 2013a). Dessa forma, tanto a estirpe de

E. coli quanto a estirpe de *C. perfringens* foram consideradas como parte da microbiota, não envolvidas no quadro de diarreia.

A amostra de fezes foi positiva para as toxinas A/B de *C. difficile* por ELISA e por CTA. Além disso, foi possível isolar uma estirpe de *C. difficile*, sendo essa positiva por PCR para os genes da toxina A (*tdcA*) e B (*tcdB*) e negativa para o gene da toxina binária (*cdtB*). Em um teste de produção *in vitro* de toxinas, realizado de acordo com Brazier et al. (1993), confirmou-se a toxigenicidade de estirpe isolada.

O diagnóstico laboratorial das infecções por *C. difficile* é baseado na detecção das toxinas A/B e, em alguns casos, o isolamento de estirpes toxigênicas também pode auxiliar o diagnóstico (Silva et al., 2012). No presente relato, todos esses métodos foram realizados. A partir de uma amostra de fezes do animal, as toxinas A/B foram detectadas por CTA e ELISA, e uma estirpe toxigênica foi isolada, confirmando o diagnóstico de diarreia associada a *C. difficile* no animal em questão.

O felino do presente relato desenvolveu diarreia após o uso de cefovecina sódica, uma cefalosporina, sugerindo que a administração deste antimicrobiano tenha sido um ponto relevante na patogênese da doença nesse animal. A administração de antimicrobianos é um fator de risco conhecido para as infecções por *C. difficile* em humanos e algumas espécies domésticas, principalmente cães e equinos (Balassiano et al., 2012; Silva et al., 2013b). Em gatos domésticos, infecções por *C. difficile* já foram relatadas mas a doença parece rara (Weese et al., 2001). É importante lembrar ainda que as cefalosporinas são comumente citadas como responsáveis por casos de ICD em seres humanos e

equinos, corroborando o achado no presente relato (Båverud, 2002).

Outro ponto a ser destacado é a dose de cefovecina utilizada. Para cães e gatos, é indicada a administração de uma dose única de 8mg/kg para um tratamento de 14 dias (Murphy et al., 2012). Em felinos silvestres, o uso desse antimicrobiano é pouco estudado, mas existem relatos de tratamentos eficazes em leões e tigres (Schrader et al., 2012; Steeil et al., 2012). De qualquer forma, a dose utilizada na jaguatirica do presente relato foi maior que a dose recomendada para gatos domésticos e a dose descrita nos poucos relatos de uso de cefovecina sódica em felinos silvestres. Dessa forma, pôde-se levantar a hipótese de que a dose utilizada tenha agravado o efeito deletério na microbiota, facilitando a colonização de *C. difficile*. Por último, é importante lembrar ainda que, de acordo com o *US Food and Drug Administration* (2008), ocorrência de diarreia foi um dos efeitos adversos mais comuns durante a avaliação da utilização de cefovecina sódica em cães e gatos. Infelizmente não foi relatada a realização de nenhum exame de diagnóstico para avaliar se essa diarreia era de origem infecciosa e se havia a presença das toxinas A/B nessas fezes.

A importância de *C. difficile* como causador de diarreia em espécies selvagens é limitado, existindo relatos em javalis, roedores, aves, primatas, lagomorfos e a descrição de um surto da doença em elefantes de um zoológico dinamarquês (Frazier et al., 1993; Shivaprasad, 2003; Bojesen et al. 2006; Keel e Songer, 2006). Recentemente alguns trabalhos levantaram também a hipótese de animais silvestres como possíveis reservatórios de estirpes de *C. difficile* para seres humanos e animais domésticos, porém os estudos

realizados até o momento abordaram poucas espécies: apenas lontras, aves migratórias e pequenos mamíferos presentes no meio urbano (Jardine et al., 2010; Miller et al. 2010; Bandelj et al., 2011). De forma geral, todos esses estudos encontraram uma baixa prevalência de *C. difficile*, sugerindo que tais espécies não possuem grande importância como reservatórios e disseminadores de estirpes de *C. difficile*.

A associação do histórico, achados clínicos e resultados laboratoriais confirmam o diagnóstico de diarreia associada a *C. difficile* na jaguatirica. Este é o primeiro relato de infecção por *C. difficile* em um felino silvestre. Sugere-se que a detecção das toxinas A/B deva ser considerada em casos de diarreia nesses animais, especialmente quando os sinais clínicos iniciaram após a administração de antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

CNPq, Fapemig, CAPES e PRPq-UFMG.

REFERÊNCIAS

- ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Med Microbiol.*, v.54, p.163-6, 2005.
- ARROYO, L.G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J.S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol.*, v.120, p.179-183, 2007.
- BALASSIANO, I.T.; YATES, E.A.; DOMINGUES, R.M. et al. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, v.61, n.2, p.169-79, 2012.

- BANDELJ, P.; TRILAR, T.; RACNIK, J. et al. Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. *FEMS Microbiol Letters*, v.321, p.183-185, 2011.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Vet Q.*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.
- BOJESSEN, A.M.; OLSEN, K.E.; BERTELSEN, M.F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol*, v.116, p.329-335, 2006.
- BRAZIER, J.S. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clin Infect Dis.*, v.4, p.228-233, 1993.
- FRAZIER, K.S.; HERRON, A.J.; HINES, M.E. et al. Diagnosis of enteritis and enterotoxemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*). *J Vet Diagn Invest*, v.5, p.623-625, 1993.
- HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol*, v.16, p.473-477, 1982.
- JARDINE, C.; REID-SMITH, R.J.; FLOCKHART, L. et al. *Clostridium difficile* in wild small mammals. *3rd International Clostridium difficile Symposium*. Bled, Eslovênia, Setembro, p.22-24, 2010.
- KEEL, M.K; SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet Pathol.*, v.43, n.3, p.225-240, 2006.
- LAURENSEN, M.K. Approaches to disease control in domestic canids for the conservation of endangered wild carnivores. In: CLEAVELAND, S. et al *Conservation and development Interventions at the Wildlife: Livestock interface: Implications for Wildlife, Livestock and Human Health*. Gland and Cambridge: IUCN Publications Services Unit, 2005.
- MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichiacoli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.59, p.1117-1123, 2007.
- MARKS, S.L.; KATHER, E.J.; KASS, P.H. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med*, v.15, p. 533-40, 2002.
- MILLER MA, BYRNE BA, JANG SS. et al. Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Vet Res*, v.41, n.1, 2010.
- MURPHY, C.P.; REID-SMITH, R.J.; BOERLIN, P. et al. Out-patient antimicrobial drug use in dogs and cats for new disease events from community companion animal practices in Ontario. *Can Vet J*, v.53, n.3, p.291-8, Mar, 2012.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STÄMPFLI, H.R.; STALKER, M. Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol.*, v.124, n.2, p.166-172, 2007.
- SCHRADER, G.M.; WHITESIDE, D.P.; SLATER, OM. Conservative management of pyothorax in an Amur

- tiger (*Panthera tigris altaica*). *J Zoo Wildl Med*, v.43, n.2, p.425-9, Jun, 2012.
- SHIVAPRASAD, H.L. Hepatitis associated with *Clostridium difficile* in an ostrich chick. *Avian Pathol*, v.32, p.57-62, 2003.
- SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v.43, n.1, p.73-80, 2013a.
- SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.
- SILVA, R.O.S.; SANTOS, R.L.R.; PIRES, P.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. *Braz J Microbiol*, v.44, n1. Ahead of print, 2013b.
- SIQUEIRA, F.F.; ALMEIDA, M.O.; BARROCA, T.M. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet Microbiol.*, 2012.
- SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, v.140, p.399-404, 2010.
- STEEIL, J.; SCHUMACHER, J.; SEIBERT, R. et al. Cefovecin (Convenia) for the treatment of septic peritonitis in a female lion (*Panthera leo*). *J Zoo Wildl Med*, v.43, n.3, p.678-81, 2012.
- TROLLE, M.VIERI; KERY, M. Estimation of ocelot density in the Pantanal using capture-recapture analysis of camera-trapping data. *JMammalogy*, v.84, n.2, p.607-614, 2003.
- UNITED NATIONS. Food and Drug Administration. *Freedom of information summary: NADA*. p. 141-285. 2008. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugsProducts/FOIADrugSummaries/ucm062340.pdf>. Acesso em: 12 fev 2013.
- VIEIRA, A.A.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M. et al. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq Instit Biol*, v.75, p.513-6, 2008.
- WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. et al. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med*, v.15, p. 374-8, 2001.

5.7 Susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Clostridium difficile* isoladas de animais e seres humanos no Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais e seres humanos no Brasil. Foram utilizadas 54 estirpes de *C. difficile* isoladas de amostras de fezes de leitões (n=16), cães (n=13), seres humanos (n=13), potros (n=8), bezerros (n=2), jaguatirica (n=1) e lobo-guará (n=1). A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método da diluição seriada em ágar para penicilina, florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina, vancomicina, metronidazol e tilosina. Todas as estirpes de *C. difficile* avaliadas foram sensíveis ao metronidazol e vancomicina. Não foi observada resistência ao florfenicol e 52 (96,4%) estirpes foram sensíveis a esse antimicrobiano. Cinco (9,3%), cinco (9,3%), 14 (25,9%) e 20 (37%) estirpes foram resistentes a oxitetraciclina, penicilina, tilosina e eritromicina, respectivamente.

Palavras-chave: diarreia nosocomial, colite pseudomembranosa, tratamento, resistência.

INTRODUÇÃO

C. difficile é um bacilo Gram-positivo, formador de esporos e reconhecido como responsável pela maioria dos casos de diarreia associada a antibioticoterapia em seres humanos (Silva Junior, 2012). Em Medicina Veterinária, é responsável por quadros de diarreia e colite em diversas espécies, acometendo principalmente animais domésticos e, em relatos recentes, algumas espécies silvestres (Silva et al., 2013a; Silva et al., 2013b; Bojensen et al., 2006). De forma semelhante ao que ocorre em seres humanos, a infecção por *C. difficile* (ICD) em animais é comumente associada ao uso de antimicrobianos (Båverud et al., 2004; Songer et al., 2009; Hopman et al., 2011; Silva et al 2012).

Recentemente, estudos demonstraram que os isolados de seres humanos com colite pseudomembranosa por *C. difficile* possuem grande semelhança genética com as estirpes isoladas de animais

domésticos, levantando à hipótese da doença ser uma zoonose (Jhung et al., 2008; Norman et al., 2011). Mesmo com a crescente importância de *C. difficile* como causador de distúrbios entéricos em seres humanos e animais e até como possível agente zoonótico, são escassos os estudos avaliando a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* no Brasil, sendo a maioria dos relatos pouco robustos e limitados a isolados de seres humanos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais e seres humanos no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 54 estirpes de *C. difficile* isoladas de leitões (n=16), cães (n=13), seres humanos (n=13), potros (n=8), bezerros (n=2), jaguatirica (n=1) e lobo-guará (n=1). A tabela 8 resume o número de estirpes por espécie e o histórico clínico resumido delas.

Tabela 8: Número de estirpes de *Clostridium difficile* utilizadas para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana por espécie e histórico clínico.

Espécie	Histórico Clínico	Número de Estirpes	Total
Cães	Diarréicos (outra causa)	5	13
	Aparentemente saudáveis	8	
Leitões	ICD confirmada	8	16
	Diarréicos (outra causa)	4	
	Aparentemente saudáveis	4	
	ICD confirmada	4	
Potros	Diarréicos (outra causa)	2	8
	Aparentemente saudáveis	2	
Bezerros	Diarréicos (outra causa)	2	2
Jaguaritica	ICD confirmada	1	1
Lobo-guará	Diarréicos (outra causa)	1	1
Seres humanos	ICD confirmada	13	13
TOTAL			54

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método da diluição seriada em ágar, como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). Testou-se os seguintes antimicrobianos: penicilina, florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina, vancomicina, metronidazol e tilosina. Para o controle do teste, foi utilizada uma amostra de referência de *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285). Para todos os antimicrobianos, foram testadas as concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0 µg/mL, em ágar Brucella (Difco Laboratories, EUA) suplementado com 5% de sangue

equino, hemina e vitamina K (CLSI, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da CIM obtidos para as 54 estirpes de *C. difficile* trabalhadas podem ser encontrados na tabela 9. Todas as estirpes foram sensíveis ao metronidazol e à vancomicina. A susceptibilidade ao florfenicol e à oxitetraciclina foi de 96,3% e 81,5 respectivamente. Cinco (9,3%), cinco (9,3%), 14 (25,9%) e 20 (37,0%) estirpes foram resistentes a oxitetraciclina, penicilina, tilosina e eritromicina, respectivamente.

Tabela 9: Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml classificação quanto a susceptibilidade antimicrobiana de 54 estirpes de *Clostridium difficile* isoladas de fezes de seres humanos e animais.

Antimicrobiano	Número de estirpes e CIM (µg/ml)											Classificação (%)			
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	S ¹	SM ²	R ³
Metronidazol	20	30	3	1									100	0	0
Vancomicina	28	19	7										100	0	0
Florfenicol			10	42		2							96,3	3,7	0
Oxitetraciclina	34	7				2	6					5	79,6	11,1	9,3
Penicilina	3	24	22	5									50,0	40,7	9,3
Tilosina	7	29	1	1	1		1			3		11	72.2	1.9	25.9
Eritromicina	13	10	7	4			2			2	4	12	63,0	0	37,0

Legenda: ¹S: susceptível, ²SM: susceptibilidade moderada. R³ resistente (R). Classificação de acordo com o CLSI (2011); *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2011).

Todas as estirpes de *C. difficile* avaliadas foram sensíveis ao metronidazol e à vancomicina,

antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento de ICD em seres humanos, equinos e cães (Båverud et

al., 2002; Marks e Kather, 2003; Båverud, 2004; Spigaglia et al 2011; Silva et al., 2013c). Este resultado é similar ao relatado em estudos anteriores em diversas espécies de animais domésticos (Båverud et al., 2003; Marks e Kather, 2003; Post e Songer, 2004; Fry et al., 2012) sendo que, até o momento, estirpes resistentes ao metronidazol só foram encontradas em equinos nos EUA (Jang et al., 1997; Magdesian et al., 2006). De forma semelhante ao que ocorre em animais, estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos resistentes ao metronidazol são incomuns (Shah et al., 2010; Spigaglia et al., 2011).

Isolados de *C. difficile* resistentes à vancomicina são extremamente raros, tanto em estirpes isoladas de animais quanto de pacientes humanos. Além disso, a vancomicina é considerada clinicamente mais efetiva e sabidamente leva a menos casos de reincidência no tratamento de ICD em seres humanos (Shah et al., 2010), considerada a melhor opção por muitos clínicos. Além do presente estudo, no Brasil existe apenas um trabalho que avaliou a susceptibilidade antimicrobiana de seis estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos com CDI onde todos os isolados foram sensíveis ao metronidazol e vancomicina (Balassiano et al., 2009).

Nenhuma estirpe foi resistente ao florfenicol, enquanto cinco isolados (9,3%), sendo dois de suínos, dois de seres humanos e um de jaguatirica, foram resistentes à oxitetraciclina. Em geral, uma grande variação nos valores de CIM para as tetraciclina é relatada em estudos com estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos e seres humanos, mas, em geral, quase todos os isolados são sensíveis (Delmé e Avesani, 1988; Post e Songer 2004; Shah et al., 2010). Comumente, a resistência a essa classe

de antimicrobianos é associada com a presença de genes do grupo *tet*, especialmente *tetM* (Huang et al., 2009). A alta susceptibilidade de *C. difficile* às tetraciclina difere de outras espécies de *Clostridium*, especialmente *C. perfringens*, sendo a resistência à tetraciclina um evento comum nessa espécie (Slavić et al., 2011).

As cinco estirpes resistentes à penicilina foram isoladas de três potros, todos com diagnóstico confirmado de ICD, e de dois leitões. É interessante observar que em dois desses potros, a diarreia por *C. difficile* iniciou-se após administração de penicilina G devido a uma suspeita clínica de pneumonia (Silva et al., 2012). Esse resultado corrobora com o descrito por Båverud (2002), que relatou que beta-lactâmicos são comumente associados a ocorrência de ICD em potros e equinos adultos. Em contraste com relatos em outros países (Huang et al., 2009; Shah et al., 2010), nenhum isolado de seres humanos apresentou resistência à penicilina no presente trabalho, sendo que apenas uma das 13 amostras testadas (7,7%) apresentou susceptibilidade moderada a esse composto.

Os macrolídeos testados, tilosina e eritromicina, foram os antimicrobianos que apresentaram maior número de estirpes resistentes. A detecção de resistência de *C. difficile* a estes compostos já foi anteriormente relatada em estirpes de várias origens, incluindo isolados de equinos (Båverud et al., 2003) e seres humanos (Delmée e Avesani, 1988; Spigaglia et al., 2011). No presente estudo, das 20 (37%) estirpes resistentes a eritromicina, dez (18,5%) eram de leitões, quatro (7,4%) de cães, três (5,6%) de humanos, duas (3,7%) de equinos e uma (1,9%) de bezerro. Destas, 16 (80%) apresentaram CIM maior ou igual a 256,0 µg/µL. Em seres humanos, alguns macrolídeos são

listados como antimicrobianos comumente envolvidos em casos de ICD (Zilberberg e Shorr, 2013). Infelizmente, existem poucos trabalhos na literatura com estirpes de animais, porém a eritromicina já foi relatada como uma importante causadora de colite em éguas (Båverud, 2002). É interessante notar que a ocorrência de estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos resistentes à eritromicina parece variar muito entre países, com relatos de variando de 87% de isolados resistentes na Inglaterra a 0% na Suíça (Huang et al., 2009).

O comportamento bimodal apresentado pelos isolados frente à eritromicina sugere a presença de algum fator genético de resistência. De fato, estudos demonstram que a resistência de estirpes do gênero *Clostridium* a esse antimicrobiano tem relação principalmente com a presença de genes do grupo *erm* (*erythromycin ribosomal methylase*), responsáveis pela codificação de uma metilase que inibe a ação da eritromicina (Slavić et al., 2011). Estudos pesquisando a presença de genes de resistência a antimicrobianos são raros em estirpes de *C. difficile* isoladas de animais. Recentemente Fry et al. (2012) relataram uma alta correlação entre a resistência à eritromicina e a presença do gene *ermB* em estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos, confirmando essa hipótese. É importante citar, porém, que nem todas as estirpes com alta resistência à eritromicina apresentam genes do grupo *erm*, sugerindo a existência de outros mecanismos envolvidos ainda desconhecidos (Huang et al., 2009).

Alguns trabalhos relatam uma alta susceptibilidade de estirpes de *C. difficile* à tilosina, sugerindo que esse antimicrobiano poderia ser usado na alimentação de suínos com o objetivo

de diminuir a eliminação de *C. difficile* nas fezes dos animais (Post e Songer, 2004; Songer e Anderson, 2006). Em contraste, no presente estudo, 14 estirpes (25,9%) foram resistentes à tilosina, oito delas isoladas de leitões. Além dessas, três isolados de cães, dois de humanos e um de bovino foram resistentes a esse macrolídeo, sugerindo que esse antimicrobiano não seria efetivo para a profilaxia, controle e tratamento da ICD nas espécies avaliadas no presente trabalho.

É interessante citar que a tilosina é um antimicrobiano comumente utilizado na suinocultura brasileira, sendo que todas as estirpes incluídas no presente estudo foram originárias de granjas que relataram o uso desse antimicrobiano em alguma fase de vida dos animais. Diferentemente, a oxitetraciclina é um composto cuja adição na alimentação animal é proibida no Brasil desde 1998 (Brasil, 1998). Duas das amostras resistentes à oxitetraciclina foram isoladas de dois leitões de uma mesma granja, ambos com CDI. Na granja em questão, o proprietário relatou o uso de oxitetraciclina na alimentação dos animais, apesar da proibição.

Seis estirpes (11,1%) foram consideradas multirresistentes por apresentarem elevada CIM simultaneamente a três antimicrobianos (tilosina, eritromicina e oxitetraciclina), sendo cinco amostras provenientes de suínos e uma de ser humano. Uma dessas estirpes, isolada de um leitão com ICD, apresentou ainda resistência a penicilina. A detecção de *C. difficile* multirresistentes de animais chama a atenção no presente estudo. Sabe-se que a antibioticoterapia possui um papel central no desenvolvimento de ICD, sendo que o risco aumenta consideravelmente quando *C. difficile* é resistente ao antimicrobiano utilizado (Owens et al., 2008). Somando este

aspecto à hipótese da ICD como possível zoonose, o presente estudo aponta para a necessidade do uso racional de antimicrobianos, especialmente na suinocultura. Além disso, são necessários mais estudos que busquem métodos alternativos para a profilaxia, controle e tratamento da ICD em animais domésticos, o que poderia diminuir a necessidade de utilização de antimicrobianos nestas espécies.

Resultados de susceptibilidade antimicrobiana devem ser interpretados com cautela uma vez que resultados *in vitro* nem sempre refletem o comportamento *in vivo* da droga avaliada. Além disso, estudos demonstraram que a maioria dos isolados de *C. difficile* de casos de ICD induzida por antibióticos em seres humanos eram sensíveis *in vitro* a droga empregada (Dzink e Bartlett 1980), sugerindo que o sucesso do tratamento é dependente não apenas da susceptibilidade de *C. difficile* ao antimicrobiano, mas também de outros fatores relativos a microbiota (Båverud et al., 2003). De qualquer forma, como não é realizado rotineiramente, a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos e animais, incluindo duas estirpes isoladas de animais silvestres, pode ser útil para o tratamento das desordens entéricas causadas pelo agente. Este é o primeiro trabalho a avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* de animais no Brasil. A próxima etapa do presente estudo é realizar a ribotipagem e avaliar a presença de genes de resistência das estirpes aqui utilizadas.

AGRADECIMENTOS

CNPq, Fapemig, CAPES, INCT e PRPq-UFMG.

REFERÊNCIAS

BALASSIANO, I.T.; MIRANDA, K.R.; BOENTE, R.F.; et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v.15, n.3, p. 61-64, 2009.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet Clinic North Am Eq Pract*, v.20, n.3, p.615-630, 2004.

BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q Journal*, v.24, 203-219, 2002.

BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, v.35, n.5, p.465-71, 2003.

BOJESSEN, A.M.; OLSEN, K.E.; BERTELSEN, M.F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol*, v. 116, n.4, p.329-35, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DA REFORMA AGRÁRIA, PORTARIA N.º 193, DE 12 DE MAIO DE 1998. <http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/610_GED.pdf> Acesso em 23/03/2013.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Test. Twenty-first Information Supplement v.31, n.1, January, 2011.

DELMÉE, M.; AVESANI, V. Correlation between serogroup and

susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*, v.22, p.325-31, 1988.

DZINK, J.; BARTLETT, J.G. *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrob Agents Chemother*, v.17, p.695-8, 1980.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2011). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. v.3.1, 2011.

FRY, P.R.; THAKUR, S.; ABLEY, M; et al. Antimicrobial resistance, toxinotype, and genotypic profiling of *Clostridium difficile* isolates of swine origin. *J Clin Microbiol*. v.50, n.7, p.2366-72, 2012.

HOPMAN, N.E.; KEESSEN, E.C.; HARMANUS, C. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol*, v.149, n.1, p.186-192, 2011.

HUANG, H.; WEINTRAUB, A.; FANG, H, et al. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents*. v.34, n.6, p.516-22, 2009.

JANG, S.S.; HANSEN, L.M.; BREHER, JE. et al. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin Infect Dis*, v.25, S266-7, 1997.

JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis*, v.14, n.7, p.1039-1045, 2008.

MAGDESIAN, K.G.; DUJOWICH, M.; MADIGAN, JE. et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *J Am Vet Med Assoc*, v.228, p.751-5, 2006.

MARKS, S.L.; KATHER, E.J. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet Microbiol*, v.94, p.39-45, 2003.

NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *App Environ Microbiol*, v.77, n.16, p.5755-5760, 2011.

OWENS, R.C. JR.; DONSKEY, C.J.; GAYNES, R.P. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, v.15, p.S19-31, 2008.

POST, K.W.; SONGER, J.G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe*. v.10, p.47-50, 2004.

SHAH, D.; DANG, M.D.; HASBUN, R. et al. *Clostridium difficile* infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v.5, p.555-64, 2010.

SILVA JÚNIOR M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. *Einstein*, v.10, n.1, p.105-9, 2012.

SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; SOUZA, D.F.M. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot

(*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82-4, 2013a.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.

SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Eq Vet J*, 2013c.

SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v.43, n.1, p.73-80, 2013b.

SLAVIĆ, D.; BOERLIN, P.; FABRI, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey

origin from Ontario. *Can J Vet Res*, v.75, p.89–97, 2011.

SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; DIAL, S.M. et al. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *J Vet Diagn Invest*, v.21, n.3, p.377-380, 2009.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1-4, 2006.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. et al. European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, v.66, p.2227-34, 2011.

ZILBERBERG, M.D.; SHORR, A.F. Preventing *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Crit Care Clin*, v.29, p.11-18, 2013.

5.8 Ribotipagem de estirpes de *Clostridium difficile* isoladas de seres humanos e animais no Brasil.

RESUMO

Apesar da reconhecida importância de *Clostridium difficile* em seres humanos e animais, estudos de ribotipagem do agente no Brasil são escassos e restritos a poucas estirpes isoladas de seres humanos. O objetivo do estudo foi avaliar os ribotipos das amostras de *C. difficile* isoladas de seres humanos e animais no Brasil. Foram utilizadas 38 estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos hospitalizados (n=13), cães (n=8), leitões (n=6), potros (n=5), bezerros (n=5) e jaguatirica (n=1). A ribotipagem foi realizada por PCR utilizando dois pares de iniciadores para a região espaçadora intergênica 16S-23S. O produto da PCR foi concentrado e submetido a eletroforese em gel de agarose a 3%. Os ribotipos encontrados foram comparados com a biblioteca de estirpes do Institute of Public Health Maribor (Eslovênia). Foram encontrados 13 ribotipos diferentes, sendo os ribotipos SLO 064, 014/20 e 106 os mais comuns, correspondendo por 11 (28,9%), nove (23,7%) e seis (15,8%) amostras respectivamente. Nove ribotipos diferentes foram detectados entre os isolados de seres humanos, sendo três inéditos e cinco encontrados em ao menos uma espécie animal. Este estudo revela uma grande diversidade de ribotipos em isolados de *C. difficile* de seres humanos e animais no Brasil e reforça a necessidade de mais estudos para confirmar a hipótese de *C. difficile* como agente zoonótico.

Palavras-chave: diarreia nosocomial, zoonose.

INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é um patógeno emergente responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em humanos (Balassiano et al., 2011). Em animais, a infecção é comum em suínos e equinos, ocorrendo também em cães, bovinos e espécies silvestres (Bartlett, 2009). Trabalhos com seres humanos têm relatado aumento da morbidade e mortalidade da doença, assim como maior resistência ao tratamento antimicrobiano convencional e ocorrência da doença em seres humanos saudáveis, sem prévia exposição a ambiente hospitalar (Gellad et al., 2007; Samie et al., 2008).

Acredita-se que o aumento do número de casos registrados deve-se ao surgimento de estirpes altamente virulentas de *C. difficile* nos EUA e

Europa, porém trabalhos de tipagem de isolados de *C. difficile* são escassos em toda a América Latina (Balassiano et al., 2012), impedindo o conhecimento das estirpes circulantes em seres humanos e animais nessa região. Concomitante ao aumento dos casos e da gravidade das infecções por *C. difficile*, estudos demonstraram a presença de ribotipos semelhantes em amostras animais e de seres humanos com colite pseudomembranosa, sugerindo uma possível transmissão do agente entre homem e animais (Rodriguez-Palácios et al., 2007; Songer et al., 2009).

Apesar da reconhecida importância do agente em todo o mundo, estudos de ribotipagem de *C. difficile* no Brasil são escassos e restritos a poucas estirpes isoladas de seres humanos (Balassiano et al., 2012), permanecendo a dúvida com relação aos ribotipos que circulam

em nosso meio. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os ribotipos das amostras de *C. difficile* isoladas de seres humanos e animais no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes

Foram utilizadas 38 estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos (n=13), cães (n=8), leitões (n=6), potros (n=5), bezerros (n=5) e jaguatirica (n=1). Todas as estirpes pertencem a bacterioteca de isolados do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG.

Ribotipagem

A ribotipagem foi realizada como preconizado por Bidet et al. (1999). Os liofilizados foram reconstituídos em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, EUA) e incubados em tubo rosca por 48 horas a 37°C em ambiente de anaerobiose. Para obtenção de colônias isoladas, as estirpes foram plaqueadas em ágar BHI (Difco Laboratories, EUA) suplementando com 5% de sangue equino, e incubadas a 37°C em anaerobiose por 48 horas. Uma colônia de cada estirpe foi adicionada a 100 µl de água ultrapura e fervida por 12 minutos. Após centrifugação a 15.000 x g por 10 minutos, 5 µl do sobrenadante foram utilizados como molde para uma PCR de 50 µl PCR contendo 1 µM de primers

5'-CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-3' e 5'-

GCGCCCTTTGTAGCTTGACC-3', 2 U de *taq* polimerase (Pharmacia, União Britânica), 2.25 mM MgCl₂. O mix foi submetido a 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min (Stubbs et al., 1999).

Após a reação, o produto foi concentrado para um volume final de aproximadamente 25 µl por aquecimento a 75°C por 105 min e então submetido a eletroforese por 6 horas a 8°C com 150 mA e em gel de agarose a 3%. Para facilitar a leitura, o marcador de peso molecular foi adicionado a cada cinco canaletas de amostras (100 bp; Advanced Biotechnologies, Epsom, União Britânica). As bandas resultantes foram observadas após coração com brometo de etídio por 20 min (0.5 µg/µl) e comparadas com a biblioteca de ribotipos do *Institute of Public Health Maribor* (Maribor, Eslovênia) por meio do *software* Bionumerics (Applied Maths NV, Bélgica).

RESULTADOS

Foram encontrados 13 ribotipos diferentes, sendo os ribotipos SLO 064, 014/020 e 106 os mais comuns, correspondendo por 11 (28,9%), nove (23,7%) e seis (15,8%) amostras respectivamente (tabela 10). Nove ribotipos diferentes foram detectados entre os isolados de seres humanos, três deles desconhecidos até então. Cinco ribotipos encontrados em seres humanos foram também isolados em pelo menos em uma espécie animal.

Tabela 10: Ribotipos, hospedeiro e histórico de estirpes de *Clostridium difficile* isoladas de seres humanos e animais no Brasil.

Ribotipo	Espécie (n° de isolados)	Histórico Clínico
SLO 199*	Humano (1)	ICD
SLO 197*	Humano (1)	ICD
SLO 198*	Humano (1)	ICD
001/072	Leitão (1)	Não diarréico
	Humano (1)	ICD
011/049	Leitão (1)	Diarréia ND
	Leitão (2)	ICD
	Cão (1)	Não diarréico
	Leitão (1)	Não diarréico
014/020	Humano (1)	ICD
	Potro (1)	ICD
	Cão (1)	ICD
	Humano (2)	Diarréia ND
046	Jaguaririca (1)	ICD
	Cão (2)	Não diarréico
	Humano (1)	Diarréia ND
SLO 064	Bezerro (5)	Diarréia ND
	Cão (2)	Diarréia ND
	Potro (1)	Diarréia ND
078	Potro (2)	ICD
	Cão (1)	Não diarréico
106	Humano (4)	ICD
	Cão (1)	Diarréia ND
126	Leitão (1)	Não diarréico
	Potro (1)	Diarréia ND
SLO 147	Humano (1)	ICD

Legenda: ICD – Infecção por *C. difficile* confirmada por detecção das toxinas A/B; Diarréia ND – Diarréia por causa diferente de *C. difficile*. * - Novo ribotipo.

DISCUSSÃO

Estudos de ribotipagem de *C. difficile* no Brasil são escassos e restritos a estirpes isoladas de seres humanos (Balassiano et al., 2012). O presente estudo permite, pela primeira vez, a avaliação da similaridade entre as cepas isoladas de seres humanos e de animais no Brasil, além de revelar os ribotipos circulantes em nosso meio.

Em contraste com o relatado em estudos anteriores no Brasil (Balassiano et al., 2010; Balassiano et al., 2011), os ribotipos 010, 038, 133, 135 e 233 não foram encontrados. Em conjunto, tais resultados sugerem uma alta diversidade de ribotipos em seres humanos e animais no país, similar a relatos em

outros países (Keel et al., 2007; Avbersek et al., 2009; Janezic et al., 2012; Rodriguez et al., 2012). Por outro lado, a prevalência de cada ribotipos parece variar em diferentes regiões geográficas. O perfil brasileiro de ribotipos de *C. difficile* parece diferir dos relatos de países no hemisfério norte, com a ausência ou menor dos ribotipos 002, 078, 027, 015, 066 (Avbersek et al., 2009; Hopman et al., 2011; Janezic et al. 2012; Rodriguez et al., 2012). Resultados semelhantes foram relatados recentemente na Austrália (Knight et al., 2013) e, novamente, demonstram a necessidade de estudos regionais para o melhor entendimento da epidemiologia da infecção por *C. difficile*.

Dos nove ribotipos encontrados em seres humanos, cinco também foram encontrados em alguma espécie animal como canina, suína, bovina e equina. Dessa forma, o presente relato reacende a discussão com relação ao potencial zoonótico de *C. difficile*, como relatado em trabalhos anteriores (Rodriguez-Palacios et al., 2007; Songer et al., 2009; Janezic et al., 2012; Schneeberg et al., 2012). Mais estudos são necessários para avaliar tal hipótese e, se confirmada, a prevenção da doença e até mesmo da colonização em animais domésticos poderá passar a ser uma prioridade (Songer, 2010).

O ribotipo isolado com maior frequência foi o SLO 064, também conhecido como *53-like*, tendo sido encontrado em 11 (28,9%) estirpes entre isolados de seres humanos, bovinos, cães e potros. Todas as amostras de bezerros isoladas pertenciam ainda ao ribotipo SLO 064, demonstrando uma baixa diversidade de isolados dessa espécie se comparado com as demais espécies avaliadas ou com estudos anteriores com estirpes de bovinos (Janezic et al., 2012; Zidaric et al., 2012; Knight et al., 2013).

Ressalta-se que todas as estirpes não toxigênicas submetidas a ribotipagem pertenciam ao ribotipo SLO 064, o que sugere uma grande capacidade de colonização de diferentes espécies, incluindo seres humanos. Outros trabalhos também relataram a detecção de estirpes do ribotipo SLO 064 em diferentes espécies, reforçando tal hipótese (Zidaric et al., 2010; Janezic et al., 2012). Estudos têm demonstrado que a colonização por estirpes não toxigênicas é capaz de prevenir a diarreia por *C. difficile* em seres humanos e suínos, tendo potencial como um produto para profilaxia da doença (Sambol et al., 2002; Songer et al., 2007; Villano et al., 2012). Dessa

forma, considerando que as estirpes do ribotipo SLO 064 possuem alta capacidade de colonizar diferentes espécies, esta pode ser o foco de estudos futuros sobre a prevenção da doença pela colonização com estirpes não-toxigênicas.

O ribotipo 078 tem chamado a atenção de pesquisadores pelo aumento de sua frequência em casos em seres humanos, especialmente nos EUA e Europa, e por estar relacionado a casos de maior severidade da doença (Goorhuis et al., 2008; Walk et al., 2012). No Brasil, porém, tal ribotipo ainda não foi encontrado em seres humanos. Além disso, estudos no EUA relatam ainda o ribotipo 078 como o mais prevalente em bovinos e suínos (Keel et al., 2007; Zidaric et al. 2012; Rodriguez et al. 2012), contrastando novamente com os resultados encontrados no presente estudo onde apenas duas estirpes isoladas de animais foram caracterizadas como 078, ambas de potros com diarreia por *C. difficile*.

Até 2009, o ribotipo 106 havia sido relatado apenas no Reino Unido, quando então Balassiano et al. (2009) relataram o isolamento desse ribotipo no Brasil em seres humanos com diarreia por *C. difficile*. Neste estudo, o ribotipo 106 foi novamente isolado em seres humanos e de dois cães. O ribotipo 014/020, também previamente relatado em seres humanos no Brasil (Balassiano et al., 2011), foi novamente detectado em três pacientes com diarreia, sendo um deles com infecção por *C. difficile* confirmada por detecção das toxinas A/B. Além disso, estirpes caracterizadas como 014/020 foram encontradas ainda em três suínos, dois cães e em um potro, sugerindo uma alta frequência e disseminação desse ribotipo. É importante salientar que o ribotipo 014/020 é considerado o principal causador de ICD na comunidade

européia (Bauer et al., 2011), tendo sido relatado ainda em animais na Alemanha, Holanda e Eslovênia (Schneeberg et al., 2012; Koene et al., 2011; Janezic et al., 2012).

Nos últimos anos, diversos países têm relatado o surgimento de estirpes altamente virulentas de *C. difficile*, destacando-se ribotipo 027 (Barbut e Rupnik, 2012). O isolamento tem sido relacionado a surtos graves, sobretudo em países desenvolvidos, com uma frequência de isolamento de 8 e 36% nos EUA e na Europa, respectivamente (Cheknis et al., 2009). Neste estudo não foram encontradas estirpes do ribotipo 027, sendo que, até o momento, na

América Latina tal estirpe foi relatada apenas na Costa Rica e no Chile (Balassiano et al., 2012; Hernández-Rocha et al., 2012).

O presente estudo revela uma grande diversidade de ribotipos em isolados de *C. difficile* de seres humanos e animais no Brasil, com presença de ribotipos comuns entre seres humanos e animais. Mais estudos são indicados para confirmar a importância dos animais domésticos como reservatórios de estirpes de *C. difficile* para seres humanos.

AGRADECIMENTOS

CNPq, Fapemig, CAPES (Bolsa doutorado sanduíche, PDSE-18983/12-0), PRPq-UFMG e INCT-Pecuária. Prof Anders Miki Bojesen (Copenhagen University, Dinamarca) e a Prof Maja Rupnik (Institute of Public Health Maribor, Eslovênia) pelo auxílio na realização da ribotipagem e interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS

AVBERSEK, J.; JANEZIC, S.; PATE, M. et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.252-5, 2009.

BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; DE OLIVEIRA, M.P. et al. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.68, n.4, p.449-55, 2010.

BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M. et al. Detection of cross-infection associated

to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, n.2, p.249-55, 2011.

BALASSIANO, I.T.; MIRANDA, K.R.; BOENTE, R.F. et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v.15, n.3, p. 61-64, 2009.

BALASSIANO, I.T.; YATES, E.A.; DOMINGUES, R.M. et al. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, v.61, n.2, p.169-79, 2012.

BARBUT, F.; RUPNIK, M. Editorial commentary: 027, 078, and others: going beyond the numbers (and away from the hypervirulence). *Clin Infect Dis*, v.55, p.1669-72, 2012.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile* infection: historic review. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.227-9, 2009.

- BAUER, M.P.; NOTERMANS, D.W.; VAN BENTHEM, B.H. et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*, v.377, p.63-73.
- BIDET, P.; BARBUT, F.; LALANDE, V. et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett.*, v.176, n.2, p.261-6, 1999.
- GELLAD, Z.F.; JOHNSON, J.L.; MUIR, A.J. et al. Severity of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.*, v.9, n.4, p.276-280, 2007.
- GOORHUIS, A.; DEBAST, S.B.; VAN LEENGOED, L.A. et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *J Clin Microbiol.*, v.46, p.1157, 2008.
- HERNÁNDEZ-ROCHA, C.; BARRA-CARRASCO, J.; PIZARRO-GUAJARDO, M. et al. Epidemic *Clostridium difficile* ribotype 027 in Chile. *Emerg Infect Dis*, v.18, p.1370-2, 2012.
- HOPMAN NE, OORBURG D, SANDERS I. et al. High occurrence of various *Clostridium difficile* PCR ribotypes in pigs arriving at the slaughterhouse. *Vet Q*, v.31, p.179-81, 2011.
- JANEZIC, S.; OCEPEK, M.; ZIDARIC, V. et al. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiol*, v.12, p.48, 2012 2012.
- KEEL, K.; BRAZIER, J.S.; POST, K.W. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol.*, v.45, n.6, p.1963-4, 2007.
- KNIGHT, D.R.; THEAN, S.; PUTSATHIT, P. et al. Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR ribotype 078 strains in australian veal calves at slaughter. *Appl Environ Microbiol.*, v.79, p.2630-5, 2013.
- KOENE, M.G.; MEVIUS, D.; WAGENAAR, J.A. et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect*, v.18, p. 778-784, 2011.
- RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; VAN BROECK, J. et al. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. *Anaerobe*, v.18, p.621-625, 2012
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STAEMPFLI, H.R.; DUFFIELD, T. et al. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis J.*, v.13, n.3, p.485-487, 2007.
- SAMBOL, S. P. et al. Colonization for the Prevention of *Clostridium difficile* Disease in Hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*; 186: 1781–1789, 2002
- SAMIE, A.; OBI, C.L.; FRANASIAK, J. et al. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdtA*, *cdtB*), and *tcdC* genes in Vhembe District, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*, v.78, n.4, p.577-585, 2008.
- SCHNEEBERG, A.; RUPNIK, M.; NEUBAUER, H. et al. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal

shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, v.18, p.484-488, 2012.

SONGER, J.G.; JONES, R.; ANDERSON, M.A. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Vet Microbiol.*, v.124, n.4, p.358-361, 2007.

SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; KILLGORE, G.E. et al. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, v.15, n.5, p.819-821, 2009.

SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, v.140, p.399-404, 2010.

STUBBS, S.L.; BRAZIER, J.S.; O'NEILL, G.L. et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* v.37, p.461-3, 1999.

VILLANO, S.A.; SEIBERLING, M.; TATAROWICZ, W. et al. Evaluation of an Oral Suspension of VP20621, Spores of Nontoxigenic *Clostridium difficile* Strain M3, in Healthy Subjects. *Antimicrob. Agents and Chemother*, v.56, p. 5224–5229, 2012.

WALK, S.T.; MICIC, D.; JAIN, R. et al. *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clin Infect Dis*, v.55, p.1661-8, 2012.

ZIDARIC, V.; BEIGOT, S.; LAPAJNE, S. et al. The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. *Anaerobe*, v.16, p.371-5, 2010.

ZIDARIC, V.; PARDON, B.; DOS VULTOS, T. et al. Different antibiotic resistance and sporulation properties within multiclinal *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078, 126, and 033 in a single calf farm. *Appl Environ Microbiol.*, v.78, p.8515-8522, 2012

6. CAPÍTULO 3: Desenvolvimento de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*).

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi padronizar um modelo de infecção por *Clostridium difficile* (ICD) em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*). Para seleção dos isolados capazes de causar letalidade, cinco animais por grupo receberam uma dose de clindamicina (30mg/kg) por gavagem. Após 48 horas, administrou-se 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC), por animal, de quatro diferentes isolados toxigênicos de *C. difficile*. Selecionou-se um dos isolados capazes de causar diarreia e letalidade e administrou-se 4×10^2 ; 4×10^4 ; 4×10^6 ; 4×10^8 UFC por animal, novamente com cinco hamsters por grupo. Em todas as diluições testadas, foi possível observar a ocorrência de diarreia e morte. A maior concentração testada (4×10^8 UFC por animal) causou óbito de 100% dos hamsters do grupo. Todos os animais que vieram a óbito apresentaram tiflíte hemorrágica, foram positivos para as toxinas A/B e foi possível isolar *C. difficile* do conteúdo intestinal, confirmando a reprodução experimental da doença. A dose letal para 50% da população foi estabelecida em $6,3 \times 10^4$ UFC por animal. O modelo de indução de ICD em hamsters descrito no presente estudo passa a ser uma ferramenta valiosa para estudos relativos a patogenia, tratamento e controle dessa doença.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, diarreia nosocomial, modelo animal, infecção hospitalar.

INTRODUÇÃO

Considerado um patógeno emergente, *Clostridium difficile* é responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos (Balassiano et al., 2011). Em animais, a infecção por *C. difficile* (ICD) foi recentemente confirmada no Brasil em potros, cães e descrita em uma jaguatirica criada em cativeiro (Silva et al., 2013a; Silva et al., 2013b; Silva et al., 2013c). Em suínos, estudos recentes sugerem uma grande disseminação da doença em granjas brasileiras com elevado número de matrizes (Lippke et al., 2011; Silva et al., 2011), dado semelhante ao relatado nos últimos anos em países da Europa e nos Estados Unidos, onde a ICD é considerada a principal causa não controlada de diarreia em leitões (Songer, 2010).

Apesar da crescente importância de *C. difficile* como enteropatógeno para animais domésticos e seres humanos, não existem produtos imunoproliféricos para a doença. Em animais, somado aos prejuízos causados pelo agente especialmente na suinocultura e equinocultura, pesquisas sugerem que a infecção por *C. difficile* seja uma possível zoonose (Arroyo et al., 2005; Jung et al., 2008). Caso essa hipótese seja confirmada, a prevenção da doença e até mesmo da colonização por *C. difficile* no trato gastrointestinal de animais domésticos passará a ser uma prioridade (Silva et al., 2013d). Além disso, desde o reconhecimento de *C. difficile* como patógeno, pouco foi mudado nos protocolos de antibióticoterapia em seres humanos e animais, permanecendo o metronidazol e a vancomicina como as principais opções (Spigaglia et al., 2011). Tais relatos reforçam a necessidade de mais

estudos focando na avaliação de novos métodos de tratamento da ICD.

Para o desenvolvimento e avaliação de métodos de controle e tratamento da infecção por *C. difficile*, faz-se necessário a utilização de modelos animais de indução da doença. A principal espécie utilizada para tal são os hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) devido a sua alta sensibilidade a ICD, possibilitando a indução com diversas classes de antimicrobianos e sem a necessidade de obtenção de animais livres de patógenos (Best et al., 2012). Porém, a maioria dos trabalhos sobre modelos animais de ICD são pouco descritivos e deixam em aberto pontos essenciais para reprodução do protocolo de indução, tais como estirpe utilizada, dose de antimicrobiano e forma de administração (Best et al., 2012). Além disso, a maioria dos estudos relatam o uso de amostras de *C. difficile* não disponíveis no Brasil, dificultando a reprodução em nosso meio (Howerton et al., 2013; Nagaro et al., 2013). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi padronizar um protocolo de infecção por *C. difficile* em hamsters sírios, disponibilizando-o para futuros estudos sobre patogenia, tratamento e métodos de controle da ICD no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados cinco fêmeas de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), com quatro a oito semanas de idade, por grupo experimental. Água, maravalha, ração e gaiolas foram esterilizadas por autoclavagem (121°C por 20 minutos). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e acondicionados em estantes ventiladas, equipadas com filtros absolutos (Alesco Co., Inglaterra) para minimizar a contaminação do ambiente e entre os grupos experimentais.

Estirpes avaliadas

Quatro estirpes toxigênicas (A⁺B⁺) de *C. difficile*, pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, foram pré-selecionadas para avaliação quanto a toxigenicidade *in vivo* (Tabela 11), sendo elas: ATCC 9689, oriunda do banco de amostras do *American Type Culture Collection* e gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz; EQ5, estirpe isolada de um potro com ICD (Preis et al., 2012); Z14, estirpe isolada de um cão aparentemente saudável; I4, estirpe isolada de um suíno com ICD.

Tabela 11: Identificação, espécie e histórico das estirpes de *C. difficile* utilizadas para indução experimental em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*).

Identificação	Origem	Histórico
ATCC 9689	N/A	Banco de amostras do American Type Culture Collection
EQ5	Equino	Animal com infecção confirmada por <i>C. difficile</i> (Preis et al. 2012)
Z14	Cão	Animal aparentemente saudável com 12 anos de idade.
I4	Suíno	Animal com infecção confirmada por <i>C. difficile</i> .

Produção dos esporos das estirpes de *C. difficile*.

Os esporos de *C. difficile* foram produzidos de acordo com YANG et al. (2009). As estirpes foram inoculadas em erlenmeyer contendo 250 mL de BHI

(Brain Heart Infusion Broth, Difco Laboratories, EUA), seguindo de incubação a 37°C por 72 horas em ambiente de anaerobiose. Após esse período, as culturas foram mantidas por cinco dias em temperatura ambiente para induzir a esporulação. O conteúdo

foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos e ressuspendido com 10 mL de salina esterilizada 0,85% por duas vezes. Posteriormente, a suspensão foi submetida ao aquecimento de 80°C por 30 minutos, e repetição do protocolo de centrifugação. As soluções foram aliquotadas em microtubos esterilizados, contendo 300µL, e armazenadas a -20°C até a utilização.

Uma semana após a produção, as soluções de esporos foram avaliadas por meio de coloração de Gram, coloração de esporos (Wirtz-Conklin) e teste respiratório em ágar sangue constituído de agar Muller-Hinton suplementado com 5% de sangue ovino (Difco Laboratories, EUA). Para determinação da concentração de unidades formadoras de colônia por mL, diluições seriadas na base 10 (variando de 10^{-3} a 10^{-8}) foram inoculadas em ágar sangue. Após incubadas por 48 horas em ambiente de anaerobiose produzido por mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂), placas com 30 a 300 colônias foram contadas e calculou-se a média de UFC/mL. As contagens obtidas ao longo do período de avaliação foram comparadas pelo teste do qui-quadrado e pelo teste de Fisher, em um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). (STATA, College Station, Texas, EUA).

Para determinação da viabilidade da solução de esporos armazenadas a -20°C, uma alíquota da solução da estirpe ATCC9689 foi descongelada mensalmente, durante um período total de seis meses, e submetida a contagem de UFC/mL, como descrito anteriormente.

Avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*.

O objetivo desta etapa foi avaliar quais estirpes eram capazes de infectar os

hamsters e, consequentemente, causar diarreia e óbito. A avaliação de toxigenicidade *in vivo* foi realizada segundo Sambol et al. (2002). Dois dias após uma dose de clindamicina (30 mg/kg), administrou-se 100 µL de solução de esporos contendo 10^7 UFC das estirpes toxigênicas em cada animal. As administrações foram realizadas por gavagem. Os grupos, constituídos por cinco hamsters, foram divididos da seguinte forma: no grupo 1 (G1) os animais receberam esporos da estirpe ATCC9689; no grupo 2 (G2) foram administrados esporos da estirpe EQ5; no grupo 3 (G3) os animais receberam esporos da estirpe Z14; no grupo 4 (G4) administrou-se a estirpe I4; no grupo 5 (C1) os animais receberam apenas a dose de clindamicina e, 48 horas depois, uma dose de 100 µL de salina esterilizada 0,85%; no grupo 6 (C2) os animais receberam apenas esporos da estirpe toxigênica ATCC9689, sem a administração prévia de clindamicina.

Os animais foram observados diariamente por 30 dias quanto a ocorrência de diarreia (presença de fezes amolecidas na gaiola, cauda e focinho com sujidades indicativas) e morte. Após o término do experimento ou quando ocorria o óbito, os animais eram necropsiados e fragmentos do ceco eram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, foi feito o processamento pela técnica de desidratação, diafanização, inclusão, secção de 5 micras e coloração pela hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e avaliação histológica realizada em microscópio de luz clara. Coletou-se ainda o conteúdo intestinal para detecção das toxinas A/B pelo teste de citotoxicidade celular (CTA) e isolamento de *C. difficile*, como descrito por SILVA et al. (2013d).

Determinação da dose mínima mortal (DMM) e da dose letal para 50% (DL₅₀)

Dentre as estirpes capazes de causar infecção e letalidade, selecionou-se uma para avaliação da DMM e cálculo da DL₅₀. Foram formados cinco grupos contendo cinco hamsters em cada. Administrou-se uma solução de esporos contendo 4×10^2 (grupo A1), 4×10^4 (grupo A2), 4×10^6 (grupo A3) e 4×10^8 (grupo A4) UFC por animal. No quinto grupo (grupo controle), houve administração de apenas 100 μ L de salina esterilizada 0,85%. Utilizou-se mesmo esquema de indução e acompanhamento descrito para a avaliação da toxigenicidade *in vivo*. O total de óbitos ocorridos em cada grupo ao final do período de avaliação foram comparados pelo teste de Fisher, em um nível de significância de 95%

($p < 0,05$). (STATA, College Station, Texas, EUA).

RESULTADOS

Na produção das soluções de esporos, a contagem de unidades formadoras de colônia variou de $2,0 \times 10^8$ a $4,0 \times 10^9$ UFC/mL entre as estirpes trabalhadas. A contagem inicial da estirpe ATCC9689 foi de $2,2 \times 10^9$ UFC/mL, sendo que a média das sete contagens foi de $2,1 \times 10^9$ UFC/mL e o desvio padrão de $\pm 1,2 \times 10^8$ UFC/mL, não havendo alteração da contagem bacteriana ao longo do tempo testado ($p = 0,91$).

Na avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*, todas as amostras testadas foram consideradas toxigênicas uma vez que foram capazes de causar diarreia e morte dos animais (Tabela 12).

Tabela 11: Ocorrência de diarreia, morte, lesões intestinais e resultado de isolamento e detecção das toxinas A/B por CTA nos grupos inoculados (G1 a G4) e nos grupos controles (C1 e C2) com diferentes estirpes toxigênicas de *Clostridium difficile*.

Grupo (Estirpe)	Ocorrência n (%)		Lesões ¹	Isolamento ²	Toxinas A/B
	Diarreia	Morte			
G1 (ATCC)	4/5 (80)	5/5 (100)	Sim	Positivo	Positivo
G2 (EQ5)	3/5 (60)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
G3 (Z14)	4/5 (80)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
G4 (I4)	3/5 (60)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
C1 (Nenhuma)	0/5 (0)	0/5 (0)	Não	Negativo	Negativo
C2 (ATCC)	0/5 (0)	0/5 (0)	Não	Negativo	Negativo

¹Presença de lesões macroscópicas e histopatológicas nos animais que vieram a óbito. ²Isolamento de estirpes de *C. difficile* toxigênicas.

No exame *post mortem*, a mucosa e serosa do ceco encontravam-se extensamente hemorrágicas e com conteúdo líquido de aspecto sanguinolento (Figura 3: B1). Na avaliação histopatológica, foi possível

observar uma extensa destruição da mucosa intestinal com infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrócíticas, caracterizando uma tífite necro-hemorrágica (Figura 3: B2).

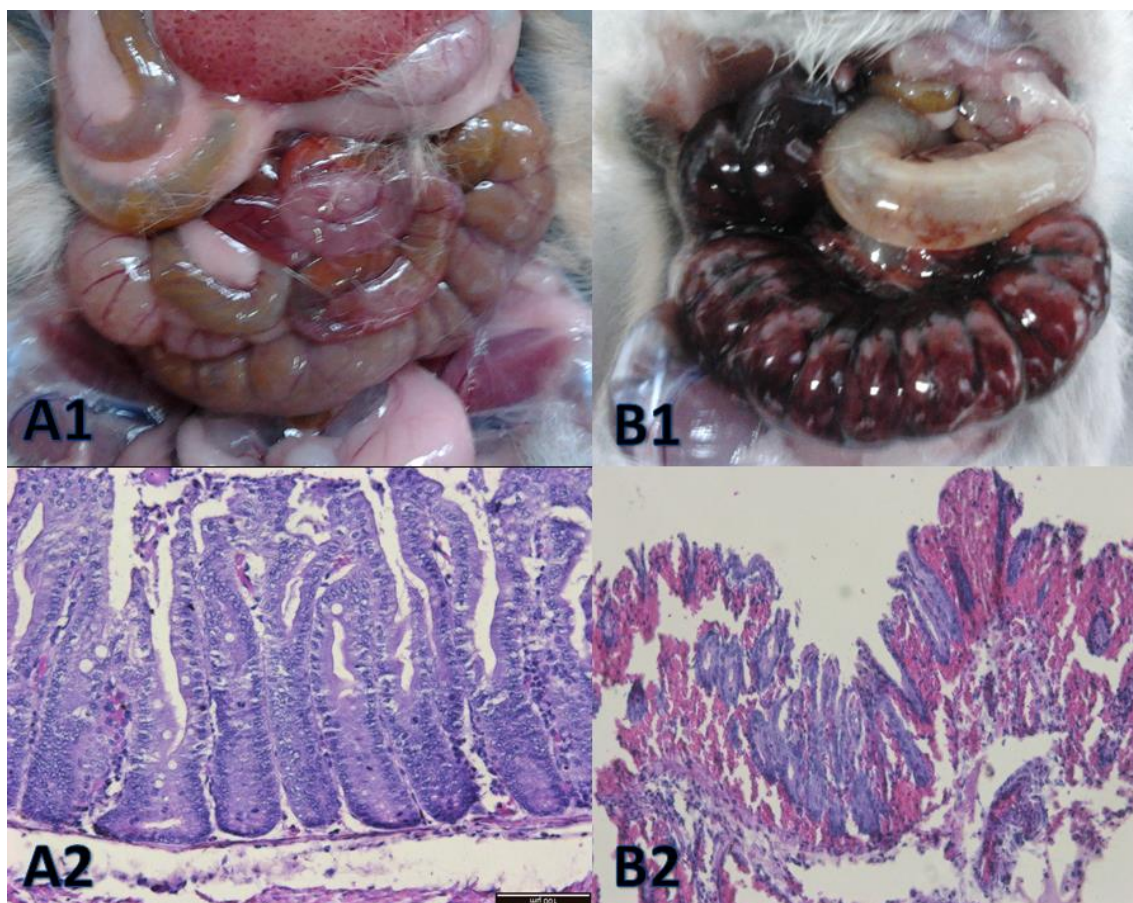


Figura 3: (A1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo C1. Ceco sem alterações macroscópicas visíveis; (B1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo G1. Alças cecais tumefeitas com serosa intensamente e difusamente congesta, apresentando líquido serosanguinolento no lúmen, sugestivo de tiflíte hemorrágica; (A2) Micrografia do ceco de um animal do grupo controle (C1), mostrando as vilosidades com aspecto normal (aumento de 100X). (B2) Micrografia do ceco de um animal do grupo G1. Nota-se a extensa destruição da mucosa intestinal, infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrocíticas, caracterizando uma tiflíte necro-hemorrágica (aumento de 100X).

A partir do conteúdo intestinal, coletado durante a necropsia dos hamsters que vieram espontaneamente a óbito, foi possível detectar as toxinas A/B e isolar *C. difficile* de todos os animais avaliados (Tabela 12). Já nos grupos controle (C1 e C2), nenhum animal desenvolveu diarreia ou veio a óbito durante o período de observação. Tais hamsters foram eutanasiados 30 dias

pós-desafio e nenhuma alteração *post mortem* significativa foi observada (Figura 3: A1 e A2). O conteúdo do ceco encontrava-se com consistência pastosa a sólida e não foi possível detectar as toxinas A/B ou isolar *C. difficile* de nenhum animal dos grupos controle (Tabela 12).

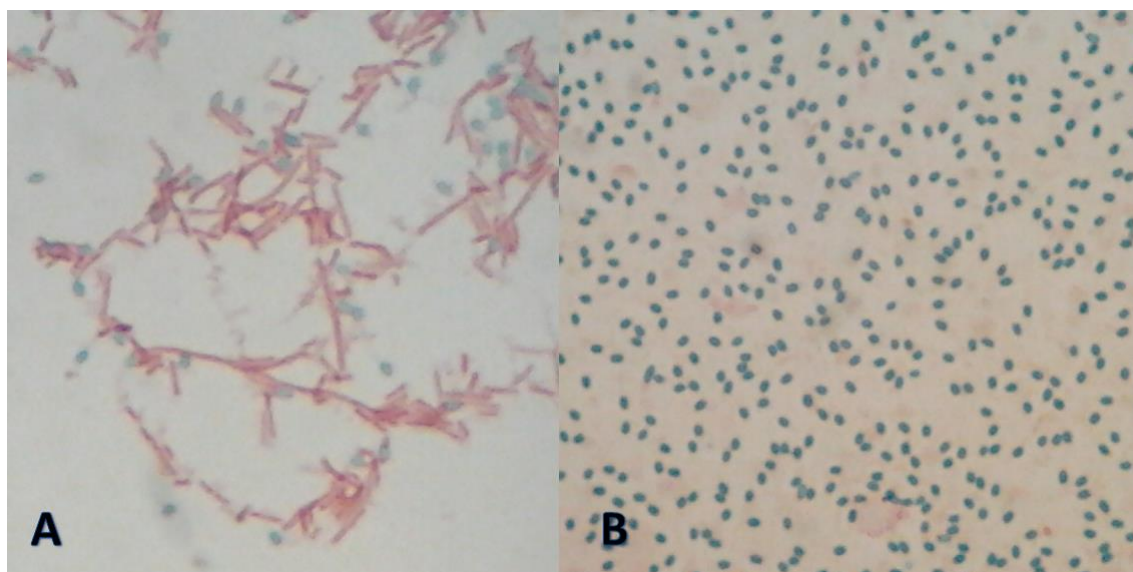


Figura 4: Lâminas coradas pelo técnica de coloração de esporos (Wirtz-Conklin). A: Cultura após 72 horas de incubação. Observar a presença de células vegetativas (bastonetes rosados) e esporos livres ou ainda ligados a célula mãe (corados pelo verde-malaquita). B: Suspensão de esporos. Observar a presença apenas de esporos livres do corpo celular (Aumento de 1000X)

Optou-se por prosseguir o trabalho com a estirpe ATCC9689. A figura 5 mostra o tempo de sobrevivência nos 30 dias de observação dos animais inoculados com diferentes concentrações da estirpe ATCC9689, durante a determinação da DMM e DL₅₀. Comparando com o grupo controle, foi possível perceber diferença na ocorrência de morte nos grupos A2, A3 ($p=0,038$) e no grupo A4 ($p=0,001$). Todos os hamsters que vieram a óbito possuíam lesões hemorrágicas no ceco e foram positivos para as toxinas A/B de *C. difficile*, confirmando novamente a indução da doença.

DISCUSSÃO

O protocolo de produção de esporos permitiu a obtenção de uma suspensão rica de esporos livres (sem a presença do corpo celular), com alto grau de pureza e sem contaminação no teste respiratório (Figura 4).

Resultados semelhantes de pureza e concentração foram relatados por YANG et al. (2009) para obtenção de

esporos de *Clostridium sporogenes* e *Clostridium hungatei*, sugerindo que esse protocolo, apesar de simples, é suficiente para a obtenção de uma solução de esporos de alta concentração e de elevada pureza.

Enquanto alguns trabalhos com modelos de ICD em hamsters não especificam a forma bacteriana administrada (Anton et al., 2004), outros autores relatam o uso de apenas células vegetativas (McVay e Rolfe, 2000; Kokkotou et al., 2008), apenas esporos (Sambol et al., 2002; Nagaro et al., 2013) ou proporções estimadas de ambos (Ochsner et al., 2009). No presente estudo optou-se por trabalhar com soluções de esporos livres que por sofrem menos alterações na concentração de UFC após armazenamento devido a alta resistência típica dessa forma bacteriana. Como esperado, as contagens seguintes à inicial apresentaram resultados semelhantes em todos os sete tempos avaliados, totalizando seis meses de armazenagem sem alteração significativa da contagem. Tal resultado demonstra a resistência dos esporos de

C. difficile armazenados a -20°C e confirma a possibilidade de armazenamento da solução nessas condições, facilitando o protocolo de indução devido a não necessidade de contínua produção e dosagem da estirpe a ser utilizada.

Na avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*, as lesões observadas foram similares às comumente relatadas em infecções por *C. difficile* em hamsters e outros roedores de laboratório (Sambol et al., 2002; Best et al., 2012; Howerton et al., 2013; Nagaro et al., 2013). Tais alterações foram encontradas em todos animais que vieram a óbito durante o experimento, incluindo aqueles que não apresentaram diarreia previamente. Além das lesões características, o isolamento e detecção das toxinas A/B nesses animais confirmam a indução da doença (Tabela 12).

Nos grupos controle (C1 e C2) não foram observados indícios de colonização ou infecção por *C. difficile* (Tabela 12). Tais resultados confirmam que não houve infecção cruzada no grupo C1, uma vez que tais animais receberam antimicrobiano e estariam susceptíveis a colonização por *C. difficile*. No grupo C2, a ausência de infecção demonstra que não houve colonização pela estirpe ATCC9689, provavelmente devido ao “efeito barreira” da microbiota íntegra (Båverud, 2002).

Três animais, dos grupos G1, G2 e G4, vieram a óbito antes que o quadro clínico de diarreia pudesse ser observado. A infecção por *C. difficile*

em hamsters é comumente fulminante, culminando com um quadro hiperagudo da doença que é caracterizado por extensa necrose intestinal e toxemia, podendo ocorrer óbito dos animais antes mesmo da visualização do quadro clínico de diarreia (Chen et al., 2008; Best et al., 2012; Howerton et al., 2013).

Nos três animais que sobreviveram, dos grupos G2, G3 e G4, não foram observadas alterações *post mortem* significativas e não foi possível detectar as toxinas A/B. Além disso, *C. difficile* não foi isolado do conteúdo intestinal, semelhante aos animais dos dois grupos controles. Acredita-se que a falha de indução possa ter ocorrido pela administração de uma dose insuficiente de esporos de *C. difficile* ou a microbiota não ter sido suficientemente agredida pela dose de antibiótico administrada, permanecendo o efeito barreira (Båverud, 2002).

Como todas as estirpes trabalhadas foram capazes de induzir a diarreia, optou-se por prosseguir o trabalho com a estirpe ATCC9689 por tratar-se de uma estirpe de referência certificada, internacionalmente reconhecida e fornecida gratuitamente pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) às universidades e órgãos de pesquisa brasileiros. Na figura 5, percebe-se que os óbitos iniciaram 24 horas após a administração dos esporos mas concentraram-se principalmente entre 72 e 96 horas pós-desafio, resultado semelhante ao relatado em trabalhos anteriores com hamsters (Sambol et al., 2002; Nagaro et al., 2013).

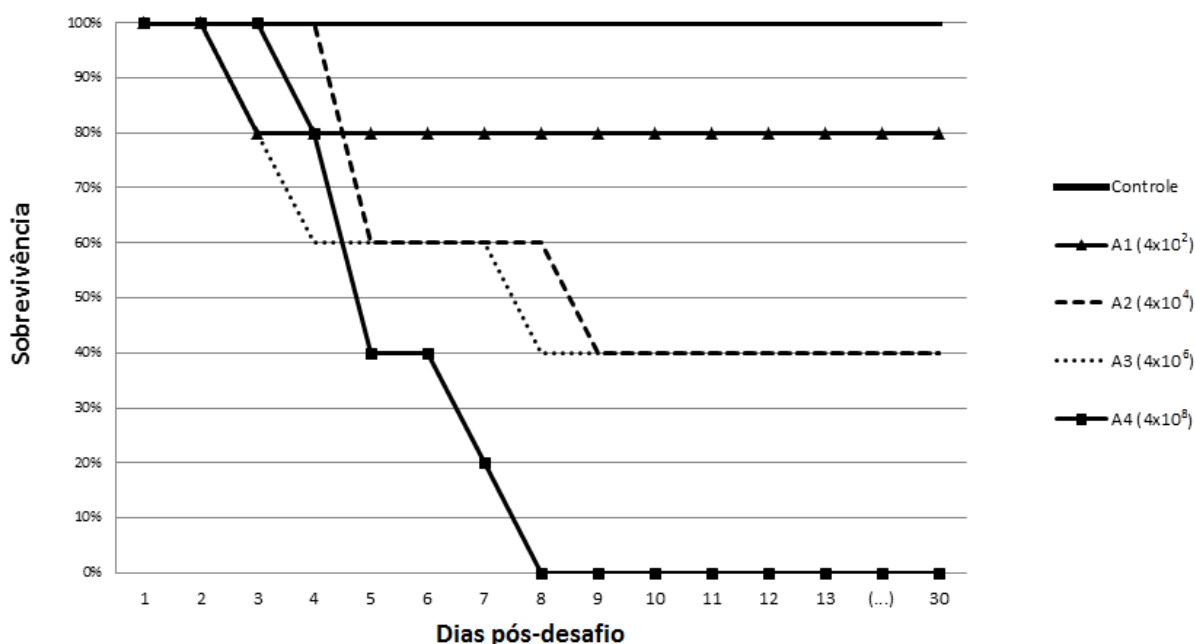


Figura 5: Sobrevivência de hamsters durante o período de observação de 30 dias dos grupos de animais inoculados com diferentes concentrações de esporos da estirpe ATCC9689 (A1 a A4) de *Clostridium difficile* e do grupo controle.

Além da utilização de diferentes estirpes de *C. difficile*, o grande número de diferentes protocolos de administração em modelos de ICD dificulta comparações. Em geral, as doses variam de 10^7 a 10^4 UFC por animal, porém a via de administração (gavagem, via oral), o tempo após antibióticoterapia que a estirpe é administrada e até mesmo a forma bacteriana utilizada (esporos, células vegetativas) variam, impedindo conclusões. Por outro lado, independente da forma e estirpe utilizada, a grande maioria dos trabalhos utilizam doses que causam entre 60 e 100% de letalidade (Sambol et al., 2002; Chen et al., 2008; Best et al., 2012; Howerton et al., 2013; Nagaro et al., 2013).

Considerando a diferença apresentada entre os grupos desafiados quando comparados com o grupo controle, poderia-se utilizar qualquer dose entre 4×10^4 e 4×10^8 UFC da estirpe ATCC9689, por animal, para estudos de

avaliação de métodos de proteção ou de tratamento. Alguns trabalhos de indução de infecções para outros micro-organismos utilizam também a DL_{50} . No presente estudo, a DL_{50} calculada segundo Reed e Muench (1938) foi de $6,3 \times 10^4$ UFC por animal.

O protocolo padronizado no presente estudo permitiu a utilização de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) como modelo de indução da infecção por *C. difficile*, disponibilizando-o como uma ferramenta valiosa para estudos relativos à patogenia, tratamento e controle dessa doença no Brasil.

APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Protocolo número 142/2012, CEUA-UFMG.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPEMIG, CAPES e INCT.

REFERÊNCIAS

- ANTON, P.M.; O'BRIEN, M.; KOKKOTOU, E. et al. Rifalazil treats and prevents relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother*, v.48, n.10, p.3975-9, 2004.
- ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Medic Microbiol*, v.54, p.163-6, 2005.
- BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, n.2, p.249-55, 2011.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Vet Quarterly*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.
- BEST, E.L.; FREEMAN, J.; WILCOX, M.H. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, v.2, p.145-167, 2012.
- CHEN, X.; KATCHAR, K.; GOLDSMITH, J.D. et al. A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, v.135, p.1984-1992, 2008.
- HOWERTON, A.; PATRA, M.; ABEL-SANTOS, E. A new strategy for the prevention of *Clostridium difficile* infection. *J Infect Dis*, v.207, p.1498-504, 2013.
- JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis*, v.14, n.7, p.1039-45, 2008.
- KOKKOTOU, E.; MOSS, A.C.; MICHOS, A. et al. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother*, v.52, n.3, p.1121-6, 2008.
- LIPPKE, R.T.; BOROWSKI, S.M.; MARQUES, S.M.T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesq Vet Bras*, v.31, n.6, p.505-510, 2011.
- LUNA, L.G. Routine Staining Procedures. In: Luna, L. G. (Ed). *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw- Hill Book Co, 1968.
- MCVAY, C.S.; ROLFE, R.D. *In vitro* and *in vivo* activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000 v.44, p.2254-8, 2000.
- NAGARO, K.J.; PHILLIPS, S.T.; CHEKNIS, A.K. et al. Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrobial Agents Chemother*, v.57, p.5266-70, 2013.
- OCHSNER, U.A.; BELL, S.J.; O'LEARY, A.L. et al. Inhibitory effect of REP3123 on toxin and spore formation in *Clostridium difficile*, and *in vivo* efficacy in a hamster gastrointestinal infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, v.63, p.964-71, 2009.

- PREIS, I.S.; SILVA, R.O.S.; PIRES, P.S. et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz J Vet Pathol*, v.5, n.1, p.7-11, 2012.
- REED, L.J.; MUENCH, H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, v. 27, p.494-497. 1938.
- SAMBOL, S.P.; MERRIGAN, M.M.; TANG, J.K. et al. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *J Infect Dis*, v.186, n.12, p.1781-9, 2002.
- SILVA, R.O.S.; SANTOS RL.; PIRES PS. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. *Braz J of Microbiol*, v.44, n1, p.131-137, 2013a.
- SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; DE MAGALHÃES SOARES, D.F. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82-4. 2013b.
- SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Eq Vet J*, v.45, p.671-675, 2013c.
- SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. et al. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v43, n.1, p.73-80, 2013d.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8, p.1130-1135, 2011.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, v.140, p.399-404, 2010.
- SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. et al. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, v.66, p.2227-34, 2011.
- YANG, W.; CROW-WILLARD, E.N.; PONCE, A. et al. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *J Applied Microbiol*, v.106, p-27-33, 2009.

COMENTÁRIOS FINAIS

Os kits de ELISA testados revelaram baixa sensibilidade para avaliação individual de amostras de fezes de leitões. Porém, devido a alta especificidade apresentada por um dos kits testados, uma opção seria a avaliação simultânea de várias amostras de leitões da mesma granja. Deve-se enfatizar, porém, que mais estudos são necessários para avaliar o impacto dessa alteração no desempenho do teste em questão.

Acredita-se que a baixa sensibilidade dos kits de ELISA para amostras de fezes de seres humanos podem ser um dos principais responsáveis pela dificuldade de controle da diarreia nosocomial por *C. difficile* no HCUFMG. A ausência de um método de triagem, com alta sensibilidade e com resultados rápidos, dificulta a identificação segura de pacientes a serem isolados e tratados, aumentando simultaneamente o risco de disseminação da doença e o uso empírico de antimicrobianos nesses pacientes. Com isso, o presente estudo reforça a necessidade urgente de mais trabalhos buscando métodos alternativos para diagnóstico tanto para suínos quanto para seres humanos.

Revelou-se, pela primeira vez, a ocorrência ICD em potros no Brasil. Apesar dos resultados encontrados sugerirem uma baixa prevalência da doença nessa espécie, o presente estudo destaca a pouca familiaridade dos clínicos e proprietários com a diarreia por *C. difficile* em potros, comumente levando a uma antibioticoterapia errônea com consequente agravamento dos sinais clínicos e prognóstico dos animais. Em suínos, destaca-se uma frequência da doença superior a trabalhos anteriores no país. Revelou-se ainda, pela primeira vez no mundo, que

a doença também pode ocorrer em felinos silvestres, sugerindo que tais animais também possam estar em risco quando submetidos a antibioticoterapia.

A padronização de um modelo experimental de infecção por *C. difficile* em hamsters sírios pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento de estudos relativos a novos métodos de tratamento e, principalmente, imunoproláticos para prevenção da diarreia em animais domésticos.

PESPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho demonstra a necessidade de mais estudos relativos a métodos de diagnóstico para diarreia causada por *C. difficile* sobretudo em seres humanos e suínos. Uma vez que nenhum dos testes disponíveis comercialmente parecem apresentar desempenho aceitável quando utilizados sozinhos, torna-se necessário avaliar a combinação de vários métodos no intuito de criar um algoritmo que permita um valor preditivo mais aceitável para o diagnóstico. Considerando que todos os kits de ELISA e NAAT presente no mercado brasileiro são importados, torna-se importante o desenvolvimento de métodos nacionais, diminuindo a dependência da importação e, consequentemente, o custo do diagnóstico.

Até o momento, inexistem vacinas comerciais para prevenção da enterite por *C. difficile* em seres humanos e animais domésticos. Com crescimento da importância de *C. difficile* em diversas espécies, o desenvolvimento de imunoproláticos e/ou de outros métodos de prevenção torna-se um ponto chave para futuras pesquisas.

CONCLUSÕES

A técnica padronizada de citotoxicidade celular permitiu a detecção das toxinas A/B a partir de amostras de fezes de animais e seres humanos, além de possibilitar a avaliação dos testes comerciais de ensaio imunoenzimático. Os resultados encontrados sugerem que os kits de ELISA testados são adequados para diagnóstico de ICD em potros, mas possuem sensibilidade baixa para amostras de fezes de seres humanos e leitões, dificultando o diagnóstico nessas espécies.

As estirpes de *C. difficile* avaliadas apresentaram alta susceptibilidade aos

dois antimicrobianos comumente utilizados no tratamento para ICD: metronidazol e vancomicina. Por outro lado, o estudo revelou a ocorrência de estirpes resistentes a tilosina, penicilina, eritromicina e oxitetraciclina. A ribotipagem das estirpes de *C. difficile* isoladas de animais e seres humanos revelou uma grande variedade de ribotipos, sendo parte deles comuns entre homens e animais. Por último, o modelo padronizado de ICD em hamsters torna-se uma opção interessante para futuros estudos relativos a patogenia, prevenção e controle da infecção por *C. difficile*.

ANEXOS: Versão original dos artigos publicados

SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v.43, n.1, p.73-80, 2013.

SILVA, R.O.S.; GUEDES, R.M.C.; SILVA, M.X.; LOBATO, F.C.F. Evaluation of three enzyme immunoassays and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enteritis in piglets. *J Swine Health Product.*, v.21, n.6, p.261-264, 2013.

SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Eq Vet J*, 2013. doi: 10.1111/evj.12046.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.

PREIS, I.S.; SILVA, R.O.S.; PIRES, P.S. et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz J Vet Pathol.*, v.5, n.1, p.7-11, 2012.

SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; SOUZA, D.F.M. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82-4, 2013.

SILVA, R.O.S.; NEVES, M.S.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A. et al. An outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets in Brazil. *Semina*, v.34, n.6, p.3923-28, 2013.

SILVA, R.O.S.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; DINIZ, A.N. et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from animals and humans in Brazil. *Ciência Rural*, v.44, p.841-846, 2014.

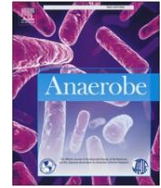
SILVA, R.O.S.; D'Ellia, M.L. et al. *Clostridium difficile* and *C. perfringens* from wild carnivore species in Brazil.

Anaerobe, 2014. doi:
10.1016/j.anaerobe.2014.06.012

SILVA, R.O.S.; NEVES, M.S.;
RIBEIRO, M.G. et al. Evaluation of
three enzyme immunoassays for
diagnosis of *Clostridium difficile*-
associated diarrhea in foals. *J Eq Vet
Science*, 2014. doi:
10.1016/j.jevs.2014.05.012.

SILVA, R.O.S.; RUPNIK, M.;
LOBATO, F.C.F. et al. Padronização de
um modelo de infecção por *Clostridium
difficile* em hamsters sírios
(*Mesocricetus auratus*). *Ciência Rural*,
2014.

SILVA, R.O.S.; VILELA, E.G.;
NEVES, M.S. et al. Evaluation of three
enzyme immunoassays and a nucleic
acid amplification test for diagnosis of
Clostridium difficile-associated diarrhea
at a University Hospital in Brazil. *Rev
Soc Bras Med Trop*, 2014. doi:
10.1590/0037-8682-0100-2014.



Note

Clostridium difficile-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*)

Rodrigo Otávio Silveira Silva^a, Mirella Lauria D'elia^a, Danielle Ferreira de Magalhães Soares^a,
 Álvaro Roberto Cavalcanti^b, Rodrigo Costa Leal^b, Guilherme Cavalcanti^b, Pedro Lúcio Lithg Pereira^a,
 Francisco Carlos Faria Lobato^{a,*}

^a Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Antônio Carlos Avenue 6627, Belo Horizonte 31.270-901, MG, Brazil

^b Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), Av. Desembargador Leão Neto do Carmo S/N, Quadra 3, Lote 3, Campo Grande, MS 79.031-90, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2013

Received in revised form

27 January 2013

Accepted 26 February 2013

Available online 4 March 2013

Keywords:

Zoonosis

Enterocolitis

Wild species

Nosocomial

ABSTRACT

The aim of this study is to report a case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*) in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The animal, a 24-month-old male, was referred to the Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) with a history of having been run over and tibia and fibula fractures. After a surgery to repair the fractures, the ocelot underwent antibiotic therapy with two doses of sodium cefovecin, during which he presented with diarrhea. A stool sample was positive for A/B toxins by a cytotoxicity assay, and a toxigenic strain of *C. difficile* was isolated. No other enteropathogens were detected. The association between the history, clinical signs and laboratory exams confirmed the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. The present report confirms *C. difficile* as a potential pathogen for wild felids and suggests that the *C. difficile*-associated diarrhea should be considered in diarrhea cases, especially when the clinical signs began after antimicrobial use.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The ocelot (*Leopardus pardalis*) is the largest cat among all small neotropical felids from America [1]. Exhibiting great plasticity, this animal uses a wide spectrum of habitats, occupying mangrove forests and coastal marshes, savanna grasslands and pastures, thorn scrub, and tropical forest of all types [2]. Despite recent ecological studies that have shown that the ocelot usually ranks first in felid abundance in most habitat types in the lowland Neotropics, some subpopulations are threatened and decreasing [3]. Although habitat fragmentation and hunting are considered the major threats to wildlife, diseases are an increasing concern for most of the endangered carnivores [4].

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, Gram-positive bacillus that may be responsible for most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans and is an important cause of enterocolitis in various domestic animals, including equines, piglets and dogs [5,6]. *C. difficile* infections (CDI) recently became a public health concern because of the significant overlap between ribotypes of *C. difficile* isolated from humans and animals [7,8], raising the possibility of *C. difficile* as zoonotic agent [9].

Despite the importance of *C. difficile* as enteropathogen for human and domestic animals and even as a zoonotic agent, the role of CDI in most wild species remains unclear, and there are only few studies and case reports that examine its role [10,11]. Therefore, the aim of this study is to report a case of *C. difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*) in Brazil.

2. Case report

On July 10, 2012, a 24-month-old male *L. pardalis* weighing 11.6 kg was taken to the Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) in Campo Grande after being hit by a vehicle on a highway in Corumbá city, Mato Grosso do Sul state, Brazil. After an X-ray, the animal was diagnosed with tibia and fibula fractures. Reduction in the fractures was performed, and after the surgery, the ocelot underwent preventive antibiotic therapy with two doses of sodium cefovecin (8 mg/kg, subcutaneous), with a seven-day interval between each dose. During this treatment, the animal presented with pasty diarrhea.

Two days after the last antibiotic administration, the ocelot was still presenting with pasty diarrhea. In light of this, a stool sample was collected for laboratory diagnosis. The following procedures were performed: rotavirus detection by polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining [12]; *Giardia* sp. vegetative stages and cysts detection by ELISA (Ridascreen *Giardia*, R-Biopharm, Germany), isolation and genotyping of *Clostridium*

* Corresponding author.

E-mail addresses: rodrigo.otaviosilva@gmail.com (R.O.S. Silva), flobato@vet.ufmg.br (F.C.F. Lobato).

perfringens [13] and *C. difficile* [14], and routine bacteriologic culture for aerobic bacteria in MacConkey agar (Biobrás®, Prodimol Biotechnology) and Muller-Hinton agar supplemented with 5% equine blood (Difco Laboratories, USA). In addition, *C. difficile* A/B toxin detection was performed using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) kit (*C. difficile* Tox A/B II – Techlab Inc., Blacksburg, VA, USA) and with the cytotoxicity assay (CTA) using African green monkey kidney cells (Vero-ATCC CCL 81) and *Clostridium sordellii* antitoxin (NIBSC – National Institute for Biological Standards and Control, England) [15].

Only colonies of *Escherichia coli* were obtained in the routine bacteriologic culture of the stool sample, although the isolate was considered not enterotoxigenic by PCR [16]. *C. perfringens* type A was also isolated, which is not surprising because this microorganism is commonly found in the microbiota of birds and mammals [17]. The isolated strain was negative for the enterotoxin gene (*cpe*), which is considered to be a major virulence factor associated with *C. perfringens*-associated diarrhea in dogs and cats [18–20]. In light of this, the possible involvement of both *E. coli* and *C. perfringens* in the diarrhea were ruled out in this case.

The stool sample was positive for A/B toxins by EIAs and CTA. In addition, *C. difficile* was isolated, and the strain was positive by PCR for the toxin A (*tcdA*) and B (*tcdB*) genes but negative for the binary toxin gene (*cdtB*). In an *in vitro* toxin production test, performed according to the method of Brazier [21], the isolated strains had a cytotoxic effect on Vero cells, followed by neutralization by *C. sordellii* antitoxin, confirming that the isolated strain was toxigenic.

The laboratory diagnosis of *C. difficile* infection is based on the detection of toxins A and/or B by cell culture or EIAs. In some cases, the association between isolation and *in vitro* toxin production may be useful [22]. In the present case report, all of these assays were conducted: the A/B toxins were detected by a commercial EIA and by CTA, *C. difficile* was isolated and the strain was confirmed to be toxigenic in an *in vitro* test.

The feline described in the present report developed diarrhea after the administration of sodium cefovecin, a cephalosporin, suggesting that treatment with this antibiotic was associated with the pathogenesis of the *C. difficile* infection in this animal. The administration of antibiotics is a well-known risk factor for CDI in humans and various domestic animal species, especially dogs, adult horses and foals [6,23–25]. In domestic cats, CDI has been reported but appears to be rare [18]. Cephalosporins are commonly cited in CDI in foals and humans, thus corroborating this report [25].

Another notable point is the dose of sodium cefovecin used in this case. For cats and dogs, cefovecin is commonly used in a single dose of 8 mg/kg for a 14-day treatment [26]. In wild species, the use of this drug is poorly studied, but there have been reports of successful treatment in a lion and an amur tiger [27,28]. The dose used in the presented case was much higher than the recommended dose for domestic cats or the dose described in reports for use in wild felines. In light of this, it cannot be ruled out that this high dose might have contributed to the impairment of the intestinal microbiota, leading to colonization by *C. difficile*. Furthermore, according to the US Food and Drug Administration [29], diarrhea is one of the most common adverse effects of the administration of these drugs in cats.

The importance of *C. difficile* as a cause of diarrhea in wild species is largely unknown. Bojesen et al. [11] reported an outbreak of CDI in captive Asian elephants in Denmark. In this case, there was no administration of antibiotics, but the authors suggested that the ingestion of broccoli, a rich source of sulforaphane, which has been shown to inhibit the growth of many intestinal microorganisms, might have triggered a subsequent overgrowth of *C. difficile*. Recently, some works have raised the importance of wild animals

as a reservoir of *C. difficile* for humans and domestic animals, but there are few works on this subject [30]. Miller et al. [31] detected a very low prevalence (4%) of *C. difficile* in free-living otters (*Enhydra lutris nereis*) from Canada, but no toxinotyping research was performed. A study with a large sample ($n = 465$) of wild birds in Slovenia showed zero prevalence of *C. difficile* in this taxon, indicating that migrating passerine birds are unlikely to serve as a reservoir and a carrier of *C. difficile* [10]. In another study conducted with small mammals such as procyonids, marsupials and rodent species, Jardine et al. [30] observed a very low prevalence of *C. difficile*. Therefore, the few examples of the occurrence and prevalence of *C. difficile* in wild animals mean that we have little awareness of their importance in the epidemiology of the disease.

Although *antemortem* diagnosis is difficult due to the necessity of ruling out a large number of other potential causes of diarrhea that may be discounted in *postmortem* examinations, the association of the history, clinical findings and laboratory results confirmed the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. This appears to be the first report of CDI in a wild felid species. The detection of the A/B toxins of *C. difficile* should be considered in diarrhea cases, especially when the clinical signs began during or after antimicrobial use in animals in captivity.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by funds from FAPEMIG, CAPES, CNPQ, INCT-Pecuária and PRPq-UFGM.

References

- [1] Trolle M, Kery M. Estimation of ocelot density in the Pantanal using capture-recapture analysis of camera-trapping data. *J Mammal* 2003;84:607–14.
- [2] Nowell K, Jackson P. North Africa and Southwest Asia, cheetah. In: Nowell K, Jackson P, editors. Wild cats: status survey and conservation action plan. Gland, Switzerland: IUCN/SSC Cat Specialist Group; 1996. p. 41–4.
- [3] Caso A, Lopez-Gonzalez C, Payan E, Eizirik E, De Oliveira T, Leite-Pitman R, et al. *Leopardus pardalis*. In: IUCN 2012. IUCN red list of threatened species. Version 2012. <www.iucnredlist.org> [accessed 29.10.12].
- [4] Laurenson MK, Mlengeya T, Shiferaw F, Cleaveland S. Approaches to disease control in domestic canids for the conservation of endangered wild carnivores. In: Cleaveland S, editor. Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface – implications for wildlife, livestock and human health. Gland and Cambridge: IUCN Publications Services Unit; 2005.
- [5] Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol* 2010;140:399–404.
- [6] Silva ROS, Guedes RMC, Lobato FCF. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciênc Rural* 2013;43:73–80.
- [7] Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Med Microbiol* 2005;54:163–6.
- [8] Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Stalker M, Duffield T, Weese JS. Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol* 2007;124:166–72.
- [9] Arroyo LG, Staempfli H, Weese JS. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol* 2007;120:179–83.
- [10] Bandelj P, Trilar T, Racnik J, Zadavec M, Pirš T, Avbersek J, et al. Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. *FEMS Microbiol Lett* 2011;321:183–5.
- [11] Bojesen AM, Olsen KE, Bertelsen MF. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol* 2006;116:329–35.
- [12] Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982;16:473–7.
- [13] Vieira AAS, Guedes RMC, Salvarani FM, Silva ROS, Assis RA, Lobato FCF. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. *Arq Inst Biol* 2008;75:513–6.

- [14] Silva ROS, Salvarani FM, Cruz-Junior ECC, Pires PS, Santos RLR, Assis RA, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Cienc Rural* 2011;41:1130–5.
- [15] van den Berg RJ, van Coppenraet LSB, Gerritsen HJ, Endtz HP, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:5338–40.
- [16] Macêdo NR, Menezes CPL, Lage AP, Ristow LE, Reis A, Guedes RMC. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007;59:1117–23.
- [17] Siqueira FF, Almeida MO, Barroca TM, Horta CC, Carmo AO, Silva RO, et al. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet Microbiol* 2012;159:397–405.
- [18] Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med* 2001;15:374–8.
- [19] Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2002;15:533–40.
- [20] Silva ROS, Santos RLR, Pires PS, Assis RA, Salvarani FM, Lobato FCF. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. *Braz J Microbiol* 2013;44(1).
- [21] Brazier JS. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clin Infect Dis* 1993;S4:228–33.
- [22] Silva ROS, Moreira FM, Rezende JV, Pires PS, Maranhão RPA, Palhares MS, et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Cienc Rural* 2012;42:498–500.
- [23] Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol* 2012;61:169–79.
- [24] Silva ROS, Ribeiro MG, Palhares MS, Maranhão RPA, Borges AS, Silva MX, et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *C. perfringens* from foals. *Eq Vet J* 2013, <http://dx.doi.org/10.1111/evj.12046>.
- [25] Båverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q* 2002;24:203–19.
- [26] Murphy CP, Reid-Smith RJ, Boerlin P, Weese JS, Prescott JF, Janecko N, et al. Out-patient antimicrobial drug use in dogs and cats for new disease events from community companion animal practices in Ontario. *Can Vet J* 2012;53: 291–8.
- [27] Schrader GM, Whiteside DP, Slater OM, Black SR. Conservative management of pyothorax in an Amur tiger (*Panthera tigris altaica*). *J Zoo Wildl Med* 2012;43:425–9.
- [28] Steeil J, Schumacher J, Seibert R, Tobias K. Cefovecin (Convenia) for the treatment of septic peritonitis in a female lion (*Panthera leo*). *J Zoo Wildl Med* 2012;43:678–81.
- [29] Food and Drug Administration (FDA). Freedom of information summary. NADA 141–285. Downloaded from: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm062340.pdf>; 2008.
- [30] Jardine C, Reid-Smith RJ, Flockhart L, Rousseau J, Weese JS. *Clostridium difficile* in wild small mammals. 3rd International *Clostridium difficile* Symposium. Bled, Slovenia, Sept 22–24, 2010.
- [31] Miller MA, Byrne BA, Jang SS, Dodd EM, Dorfmeier E, Harris MD, et al. Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Vet Res* 2010;41:1.



Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals

R. O. S. SILVA, M. G. RIBEIRO[†], M. S. PALHARES, A. S. BORGES[†], R. P. A. MARANHÃO, M. X. SILVA, T. M. LUCAS[†], G. OLIVO[†] and F. C. F. LOBATO*

Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

[†]School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brazil.

*Correspondence email: flobato@vet.ufmg.br; Received: 21.07.12; Accepted: 29.12.12

Summary

Reasons for performing the study: Toxin detection and screening could contribute to knowledge of the transmission patterns, risk factors and epidemiology of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*.

Objective: To isolate *C. difficile* and *C. perfringens* and to detect A/B toxins in faecal samples from diarrhoeic and nondiarrhoeic foals.

Study design: Cross-sectional observational study.

Methods: A total of 153 samples from foals were collected: 139 samples from farms and 14 samples from diarrhoeic foals admitted to a veterinary hospital. The A/B toxins were detected by cytotoxicity assay. All suspected colonies of *C. perfringens* were subjected to polymerase chain reaction for detection of the major toxin genes (α , β , ϵ and ι) and for detection of β 2-, NetB- and enterotoxin-encoding genes. Furthermore, *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were evaluated for *in vitro* antimicrobial susceptibility.

Results: Seven of 153 (4.6%) samples, all from diarrhoeic foals, were positive for *C. difficile* A/B toxin. Of these, 5 of 14 (35.7%) were from hospitalised foals, and only 2 of 63 (3.2%) diarrhoeic foal samples were from farms ($P = 0.002$). *Clostridium perfringens* was isolated from 31 (20.3%) foals, of which 21 of 76 (27.6%) were diarrhoeic and 10 of 76 (13.2%) were nondiarrhoeic, demonstrating a difference between these 2 groups ($P = 0.045$). Only 4 strains were positive for the β 2-encoding gene (*cpb2*). All *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin.

Conclusions: The present report highlights the need for laboratory diagnostics to differentiate *C. difficile*-associated infection in foals from other causes of diarrhoea to facilitate adequate antimicrobial therapy.

Potential relevance: More studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* as a primary agent of diarrhoea in foals.

Keywords: horse; colitis; nosocomial diarrhoea; A/B toxins

Introduction

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, Gram-positive bacillus recognised as the pathogen responsible for most cases of antimicrobial-associated diarrhoea in human patients [1]. In horses, *C. difficile* is responsible for colitis in adults [2] and diarrhoea in foals, which can occur spontaneously or may be associated with antimicrobial use [3,4]. Moreover, recent studies also showed that isolates from human patients suffering from *C. difficile* infection (CDI) are highly related, genetically, to strains isolated from animals, suggesting hypothetical zoonotic potential [5,6].

Clostridium perfringens is an anaerobic, spore-forming, Gram-positive bacillus that has been associated with enteritis in adult horses and foals [7,8]. *Clostridium perfringens* isolates are conventionally classified as one of 5 toxigenic types (A–E) based on the capacity to produce one or more of the 4 major toxins (α , β , ϵ and ι) [9]. In addition to the major toxins, *C. perfringens* can produce additional virulence factors, such as β 2 toxin, which has been associated with diarrhoea in horses [10], and necrotic enteritis toxin B-like (NetB), a pore-forming toxin recently described as an important virulence factor for necrotic enteritis in broiler chickens [11]. *Clostridium perfringens* is commonly found in the enteric microbiota of healthy animals, complicating the laboratory diagnosis of infections caused by this microorganism. In addition, owing to the absence of control case studies with foals, the role of β 2 toxin, enterotoxin and NetB in this species remains unclear.

Toxin detection and screening could contribute to the knowledge of *C. difficile* and *C. perfringens* transmission patterns, risk factors and epidemiology [12]. In light of this, the objective of this study was to detect *C. difficile* A/B toxins and to identify *C. perfringens* and *C. difficile* strains in faecal samples from diarrhoeic and nondiarrhoeic foals.

Materials and methods

Samples

A total of 153 samples from foals were collected from farms and from animals admitted to the Veterinary Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais. A total of 139 samples from 17 different farms were cultured, comprising 63 samples from diarrhoeic foals and 76 samples from nondiarrhoeic foals. Samples from foals collected at the veterinary hospital accounted for a total of 14 diarrhoeic faecal samples. The samples from hospitalised animals were obtained at the time of clinical examination and were only collected from foals with active diarrhoea. All specimens were collected in sterile containers and were stored at -20°C until testing was performed.

Cytotoxicity assay (CTA)

The CTA for the detection of *C. difficile* A/B toxins was performed with Vero cells (Vero–ATCC CCL 81) as described earlier [13]. Briefly, faecal samples were diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (pH 7.0) and centrifuged at 3000 *g* for 5 min at 4°C . The resulting supernatant was filtered through a filter with a pore size of 0.22 μm and diluted 2-fold until a dilution of 1:1024 was reached. Serial dilutions and parallel samples with *Clostridium sordellii* antitoxin^a were added onto Vero cell monolayers. The cells were examined after 24 h of incubation at 37°C in an incubator containing air supplemented with 5% CO_2 . A specimen was considered positive for the CTA if at least 90% of cells were rounded and, at the same dilution of the parallel sample, the effect was neutralised by antitoxin.

TABLE 1: Detection of A/B toxin and isolation of Clostridium difficile and Clostridium perfringens from foals (n = 153)

Assay	Results	Foals			
		Nondiarrhoeic (farm)	Diarrhoeic		Total
			Hospitalised	Farm	
<i>Clostridium difficile</i> A/B toxin detection	Positive	0/76 (0%)	5/14 (35.7%) ^a	2/63 (3.2%) ^b	7/153 (4.6%)
	Negative	76/76 (100%)	9/14 (64.3%)	61/63 (96.8%)	146/153 (95.4%)
<i>Clostridium difficile</i> isolation	Positive	2/76 (2.6%)	4/14 (28.6%)	1/63 (1.6%)	7/153 (4.6%)
	A ⁺ B ⁺	0/76 (0%)	3/14 (21.4%)	1/63 (1.6%)	4/153 (2.6%)
	A ⁻ B ⁻	2/76 (2.6%)	1/14 (7.2%)	0/63 (%)	3/153 (2%)
	Negative	74/76 (97.4%)	10/14 (71.4%)	62/63 (98.4%)	146/153 (95.4%)
<i>Clostridium perfringens</i> isolation	Positive	10/76 (13.2%)	1/14 (7.1%)	20/63 (31.8%)	31/153 (20.3%)
	cpb2+	3/76 (4%)	0/14 (0%)	1/63 (1.6%)	4/153 (2.6%)
	cpb2-	7/76 (9.2%)	1/14 (7.1%)	19/63 (30.2%)	27/153 (17.7%)
	Negative	66/76 (86.8%)	13/14 (92.9%)	43/63 (68.3%)	122/153 (79.7%)

Values within a row with unlike superscript letters were significantly different (P<0.01).

Isolation and polymerase chain reaction (PCR) of *C. difficile*

To select *C. difficile* spores, equal volumes of faecal samples and 96% ethanol (v/v) were mixed and, after incubation for 30 min at room temperature, aliquots of 50 µl were inoculated on plates containing cycloserine-cefoxitin fructose agar^b supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate^c. After anaerobic incubation at 37°C for 72 h, all colonies with suggestive morphology were subjected to a previously described multiplex-PCR for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*) [12].

Isolation and PCR of *C. perfringens*

For isolation of *C. perfringens*, 0.08–0.12 g of faeces was serially diluted by factors of 10, ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁶. Aliquots of 50 µl of each dilution were plated on sulfite polymyxin sulfadiazine agar^d and incubated anaerobically at 37°C for 24 h. After incubation, characteristic colonies were subjected to previously described PCR [14] for the detection of genes encoding the β2 toxin (*cpb2*), enterotoxin (*cpe*) and major *C. perfringens* toxins (α, β, ε and ι). In addition, a previously described PCR was applied for the detection of the NetB-encoding gene (*netb*) [15]. For all PCRs, amplifications were carried out in a thermocycler (Thermal Cycler Px2^e), and the products were visualised under ultraviolet light in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide^f.

Antimicrobial susceptibility

The minimal inhibitory concentration (MIC) for isolated *C. difficile* and *C. perfringens* strains was determined by the agar dilution method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [16]. The following antimicrobials were evaluated: penicillin, florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, vancomycin, metronidazole and tylosin. *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) was used as a control strain.

Data analysis

Fisher's exact test was used to evaluate associations between variables. Significance was set at a P value of <0.05 (Stata)^g.

Results

Seven samples, all from diarrhoeic foals, were positive for *C. difficile* A/B toxins (Table 1). Of these, 5 (35.7%) were from 14 hospitalised foals and only 2 (3.2%) were from diarrhoeic samples from 63 visited farms, demonstrating a significant difference (P = 0.002). Two positive foals had a history of antimicrobial treatment before diarrhoea, and 4 had a spontaneous onset of the disease. There was no information about the clinical history for the remaining A/B toxin-positive foal. None of the nondiarrhoeic foals was positive for A/B toxins by CTA.

Clostridium difficile was isolated from 7 animals: 5 isolates were from diarrhoeic foals and 2 from nondiarrhoeic foals. Four of 7 strains were toxigenic (A⁺B⁺), while the remaining 3 were nontoxigenic by PCR. Four animals positive for A/B toxin were negative for *C. difficile* isolation, whereas a toxigenic strain was isolated from a diarrhoeic foal that was negative by CTA.

Clostridium perfringens was isolated from 31 (20.3%) foals, of which 21 of 76 (27.6%) were diarrhoeic and 10 of 76 (13.2%) were nondiarrhoeic animals, indicating a difference between these 2 groups (P = 0.045). Among the diarrhoeic foals, 20 strains were isolated from samples from farms, while one of 14 (7.1%) was isolated from hospitalised foals. All *C. perfringens* isolates were classified as type A, and 4 strains were positive for β2-encoding gene (*cpb2*), with 3 strains coming from nondiarrhoeic foals and one strain from a diarrhoeic foal. The Net-B-encoding gene (*netb*) and the enterotoxin-encoding gene (*cpe*) were not detected.

All *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin. *Clostridium difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline and florfenicol, while 3 strains were resistant to penicillin, and 2 were resistant to erythromycin and tylosin. *Clostridium perfringens* strains were susceptible to penicillin (Table 2), while 3, 4 and 5 strains were resistant to oxytetracycline, florfenicol and tylosin, respectively. For erythromycin, a clearly bimodal distribution was observed, with 17 (58.6%) resistant strains, all with an MIC >256.0 µg/ml, and 12 susceptible strains, with an MIC ≤2.0 µg/ml.

Discussion

Detection and isolation of *C. difficile* A/B toxin

The A/B toxin was not observed in nondiarrhoeic foals in the present study, suggesting that subclinical CDI in foals is not an important event, in contrast

TABLE 2: Classification (susceptible, intermediate and resistant) of the 29 *C. perfringens* strains isolated from foals

Antimicrobial	Classification (%) [*]		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Metronidazole	29 (100)	0	0
Penicillin	29 (100)	0	0
Vancomycin	29 (100)	0	0
Tylosin	24 (82.8)	0	5 (17.2)
Florfenicol	19 (65.5)	6 (20.7)	4 (13.8)
Erythromycin	12 (41.4)	0	17 (58.6)
Oxytetracycline	10 (34.5)	5 (17.2)	14 (48.3)

^{*}According to the Clinical and Laboratory Standards Institute [16].

to previous reports for dogs and piglets [12,17,18]. The absence of A/B toxin in nondiarrhoeic foals has also been previously reported [19,20] and, although this information has been established, a recent survey showed that clinicians and pathologists commonly submit normal faecal samples from foals for laboratory diagnosis of CDI [21]. Testing nondiarrhoeic foals might decrease the positive predictive value if the test is not 100% specific and there is a low prevalence of the organism, as shown in the present report. It is also important to note that in the present study, A/B toxins were detected by CTA, which is considered the 'gold standard' method; however, most laboratories report the use of commercial enzyme immunoassays for A/B toxin detection in equine faecal samples, which are more rapid and economical but might have less sensitivity and specificity [21]. The results of this study and previous reports suggest that there is no justification for testing the faeces of nondiarrhoeic foals for the presence of A/B toxins.

In the diarrhoeic group, 7 of 77 (9.1%) foals, of which 4 were 5 months old, one was 3 months and 2 were 13 days old, were positive for A/B toxin detection. The prevalence found here is higher than the 5% reported by Frederick *et al.* [22] in the USA but lower than the 16.7% reported by Weese *et al.* [19] in Canada. It is also interesting to note the significant difference ($P = 0.002$) between the positive rate in animals from farms and animals from the veterinary hospital; in the foals we examined, an animal sampled in the veterinary hospital had 16 times greater probability of being positive for A/B toxin than a diarrhoeic animal from a farm.

This higher rate found in hospitalised foals could not be interpreted as a nosocomial infection, because all samples were collected at the time of clinical examination. However, foals admitted to the veterinary hospital commonly have been treated previously with antimicrobials on the farm but have not responded. In fact, in this report, all positive animals from the veterinary hospital were initially diagnosed by clinicians with causes of diarrhoea other than *C. difficile*. Indeed, the higher rate of foals positive for A/B toxin at the veterinary hospital was most probably caused by a lack of awareness of CDI by veterinarians on the farm, leading to unsuccessful treatment and worsening of clinical signs. In addition, this report highlights the need for laboratory diagnostics that differentiate enteropathogens in foals, allowing for adequate antimicrobial therapy.

Two foals positive for A/B toxins had a history of diarrhoea 2 days after antimicrobial treatment with penicillin G for clinical suspicion of pneumonia. These cases were also the first confirmed description of *C. difficile* infection in foals in Brazil [4]. Among the animals examined, there were no data about antimicrobial administration or clinical history for one positive foal that was sampled on a farm. However, 4 positive foals (3 hospitalised and one from a farm) had a history of spontaneous onset of the diarrhoea. In addition, these 4 animals were negative for other enteropathogens (*Salmonella* spp., rotavirus and *Lawsonia intracellularis*), suggesting that *C. difficile* was the aetiology of the diarrhoea in these cases. In these 4 cases, a worsening of clinical signs was observed after antimicrobial therapy other than metronidazole, which is considered the first choice for CDI in foals. Three foals received metronidazole after diagnosis of CDI (by toxin detection) and recovered well, although one foal that was treated with ceftiofur died [23].

Four toxigenic strains of *C. difficile* were isolated, all from diarrhoeic foals. Of these foals, 3 were positive for A/B toxins, and one, aged one-day-old, was negative. An asymptomatic carrier status must be considered for this animal, because previous reports have shown that it is a common event in foals younger than 14 days [20]. Moreover, it should be emphasised that the incidence of carrier status among the young animals examined in the present study was much lower than previously reported [20,24]. From a total of 16 animals younger than 14 days old, only 2 (12.5%) were positive for the isolation of *C. difficile*, of which one strain was toxigenic and the other was nontoxigenic. Another possible explanation for the presence of a toxigenic strain in a CTA-negative foal is toxin degradation by proteases found in faeces [17], but this suggestion must be considered with caution because studies have shown great stability of the A/B toxins in equine faeces [20,25]. Three nontoxigenic strains were also isolated from 2 nondiarrhoeic foals, aged 7 days and 12 months old, and another from a diarrhoeic foal, aged 5 months. Notably, *C. difficile* was recovered from only one of 68 (1.5%) nondiarrhoeic foals older than one-month-old, agreeing with previous studies that have shown that isolation in healthy foals older than one month is rare but can sometimes occur, mainly after antimicrobial

treatment [3,20]. Unfortunately, there are no data regarding antimicrobial administration in this healthy foal.

Four animals were positive for A/B toxin detection, but *C. difficile* was not isolated from faecal samples. However, there is no standard method for the isolation of *C. difficile*, making it difficult to compare results from other studies, although similar results have been described in foals [19,20,26,27], as well as in other species, such as dogs and piglets [12,17]. It is well known that some *C. difficile* strains cannot grow due to susceptibility to one or both antimicrobials used in medium [28]. In addition, the use of cycloserine-cefoxitin-fructose-agar supplemented with taurocholate, even with the supplementation of taurocholate, could lead to variable sensitivity for *C. difficile* spore recovery when compared with other media, such as TCCFB (cefoxitin-cycloserine-broth, supplemented with taurocholate) [29].

***Clostridium perfringens* isolation and genotype**

Clostridium perfringens strains were isolated from animals of all ages, including one 1-day-old diarrhoeic foal, showing early colonisation by this enteric agent. The high detection rate of *C. perfringens* type A is not surprising, because this type is considered to be the most common in animal faeces and also in the environment [9]. *Clostridium perfringens* type C was not detected, and no strains were positive for *cpe* or *netb* genes. To our knowledge, the *netb* gene has not been described in equine *C. perfringens* isolates [11], while the absence of the *cpe* gene observed here contrasts with previous studies [19,22] that have reported a low rate of the *cpe* gene (between 2 and 12.5%) in equine *C. perfringens* isolates, commonly without association with diarrhoea or worsening clinical signs. Only one animal positive for *C. difficile* A/B toxins was also positive for *C. perfringens* isolation, suggesting that an association between these 2 enteropathogens is uncommon, as previously reported [19].

Only 4 strains were positive for the $\beta 2$ -encoding gene, suggesting that this gene is not a good virulence factor marker for *C. perfringens* in foals. There are few data about the role of *cpb2* in foals, because the majority of studies focus on adult horses, and the importance of $\beta 2$ toxin remains controversial [30]. Disregarding the genotyping, there was a significant association between the isolation of *C. perfringens* and the presence of diarrhoea ($P = 0.045$), corroborating Netherwood *et al.* [31]. These results suggest that, despite the presence *cpb2*, *cpe* or *netb* genes, the isolation of *C. perfringens* from diarrhoeic foals could implicate the involvement of this agent in diarrhoea. However, given that *C. perfringens* could be recovered from nondiarrhoeic foals, a positive isolation of *C. perfringens* cannot be interpreted alone, and the absence of other enteropathogens might be necessary to confirm the diagnosis [10].

Antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* and *C. difficile* strains

All *C. difficile* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin, which have been recommended for the treatment of CDI in horses [3]. However, vancomycin is a critically important antimicrobial for human medicine and thus, its use in horses should be restricted to life-threatening situations where alternatives are not available [32]. These results are similar to previous studies in various species [20,33] and, at present, metronidazole-resistant isolates have been found only in American horses [34,35]. Likewise, all *C. difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline. A wide range of susceptibilities to tetracycline is commonly reported in *C. difficile* isolates from human patients and swine, but in general, nearly all isolates are susceptible [36,37].

Two *C. difficile* strains that were resistant to penicillin were isolated from foals that had signs of diarrhoea before treatment with penicillin G for pneumonia [4]. According to B  verud [38], β -lactams are commonly implicated in *C. difficile*-associated diarrhoea after antimicrobial treatment in both foals and adult horses.

Two strains were resistant to erythromycin, which was previously reported in horses by B  verud *et al.* [20] and is also commonly found among *C. difficile* isolates from human patients [39]. All *C. difficile* isolates were susceptible to florfenicol, while only one strain was resistant to enrofloxacin, but no data regarding these 2 compounds were found for *C. difficile* isolates from foals. With tylosin, only one strain showed an intermediate susceptibility, whereas the remaining 6 *C. difficile* isolates

were susceptible to the drug. Previous studies reported *in vitro* tylosin activity against *C. difficile* isolates from piglets with enteritis, but in contrast with our findings, some strains were also resistant [37]. The MIC results must be interpreted with caution because most *C. difficile* isolates from cases of antimicrobial-induced CDI in humans were susceptible to the implicated drug [40], suggesting that successful treatment is most probably dependent on both the susceptibility of *C. difficile* and other components of the enteric microbiota [19].

All *C. perfringens* strains were susceptible to penicillin, vancomycin and metronidazole, corroborating other studies with equine isolates and also other domestic animal species [41,42]. In this report, resistance of *C. perfringens* strains was observed for 2 macrolides tested, erythromycin and tylosin. Similar results were previously reported for isolates from various sources [33,37,43]. A clear bimodal distribution could also be observed for erythromycin, suggesting a genetic mechanism of resistance, which is probably due to the presence of the *ermQ* genes [44]. These resistance genes were previously described in *C. perfringens* isolates from several domestic species [43], but until now, they were not found in foal isolates.

With oxytetracycline, 5 (17.2%) strains were also resistant. It was previously reported that *Clostridium* species can carry tetracycline resistance genes that encode a ribosome-protecting cytoplasmic protein that mediates the active efflux of tetracycline from the cell [45]. As it is common to see oxytetracycline-resistant *C. perfringens*, the resistance rate found in this study is not surprising and is also lower than that of previous reports on *C. perfringens* isolates from foals and other species, including poultry, cattle, dogs, swine and man [46,47].

Conclusions

This report highlights the need for laboratory testing to differentiate *C. difficile*-associated infection in foals from other causes of diarrhoea, allowing for adequate antimicrobial therapy. More studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* as a primary agent of diarrhoea in foals, because there is no consensus about the role of $\beta 2$ toxin and other additional virulence factors. Finally, although not routinely performed, the evaluation of antimicrobial susceptibility of *C. difficile* and *C. perfringens* isolates from foals might be useful in the treatment of the enteric diseases associated with these pathogens in foals.

The next step following this study is to evaluate the presence of antimicrobial resistance genes in these isolates. In addition, the ribotyping of the *C. difficile* strains would be interesting, because until now, it has not been performed on *C. difficile* isolates from any animal source in Brazil.

Authors' declaration of interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and publication of this article.

Ethical animal research

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita (CETEA-UNESP, protocol number 150/2010).

Sources of funding

This work was supported by funds from Fapemig, Capes, PRPq-UFMG and CNPq.

Acknowledgements

We thank Amanda N. Diniz and Carlos A. Oliveira Junior for the help with the minimal inhibitory concentration assay.

Authorship

R.O.S.S. was responsible for A/B toxin detection and isolation of *C. difficile*. M.S.P. and R.P.A.M. were responsible for the clinical selection and

treatment of the foals. A.S.B. and M.X.S. were responsible for visiting the farms and for the statistical analysis. T.M.L. and G.O. were responsible for the isolation, PCR and antimicrobial susceptibility of *C. perfringens*. F.C.F.L. and M.G.R. are the coordinators of this experiment. F.C.F.L. was responsible for the UFMG team, while M.G.R. was responsible for the UNESP team.

Manufacturers' addresses

^aNIBSC, National Institute for Biological Standards and Control, London, UK.

^bHi-media, Mumbai, India.

^cSigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA.

^dSPS, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

^eThermo Electron Corporation, Milford, Massachusetts, USA.

^fStata Corp., College Station, Texas, USA.

References

- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.D., Wehland, J. and Aktories, K. (2009) *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.* **5**, e1000626.
- Songer, J.G., Trinh, H.T., Dial, S.M., Brazier, J.S. and Glock, R.D. (2009) Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 377-380.
- Båverud, V. (2004) *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **20**, 615-630.
- Silva, R.O.S., Moreira, F.M., Rezende, J.V., Pires, P.S., Maranhão, R.P.A., Palhares, M.S. and Lobato, F.C.F. (2012) First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural* **42**, 498-500.
- Jhung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C. and Limbago, B.M. (2008) Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1039-1345.
- Norman, K.N., Scott, H.M., Harvey, R.B., Norby, B., Hume, M.E. and Andrews, K. (2011) Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5755-5760.
- Schotte, U., Truyen, U. and Neubauer, H. (2004) Significance of $\beta 2$ -toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors – a review. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**, 423-426.
- Furr, M., Cohen, N.D., Axon, J.E., Sanchez, L.C., Pantaleon, L., Haggett, E., Campbell, R. and Tennent-Brown, B. (2012) Treatment with histamine-type 2 receptor antagonists and omeprazole increase the risk of diarrhoea in neonatal foals treated in intensive care units. *Equine Vet. J.* **41**, 80-86.
- Siqueira, F.F., Almeida, M.O., Barroca, T.M., Horta, C.C., Carmo, A.O., Silva, R.O., Pires, P.S., Lobato, F.C. and Kalapothakis, E. (2012) Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.* **159**, 397-405.
- Hazlett, M.J., Kircanski, J., Slavic, D. and Prescott, J.F. (2011) Beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* type A colitis in a three-day-old foal. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**, 373-376.
- Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J. and Rood, J.I. (2010) NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* **2**, 1913-1927.
- Silva, R.O.S., Salvarani, F.M., Cruz Júnior, E.C.C., Pires, P.S., Santos, R.L.R., Assis, R.A., Guedes, R.M.C. and Lobato, F.C.F. (2011) Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural* **41**, 1130-1135.
- Van den Berg, R.J., Bruijnesteijn Van Coppenraet, L.S., Gerritsen, H.J., Endtz, H.P., Van Der Vorm, E.R. and Kuijper, E.J. (2005) Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5338-5340.
- Vieira, A.A.S., Guedes, R.M.C., Salvarani, F.M., Silva, R.O.S., Assis, R.A. and Lobato, F.C.F. (2008) Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. *Arq. Inst. Biol.* **75**, 513-516.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I. and Moore, R.J. (2008) NetB, a new toxin that is associated

- with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* **4**, e26.
16. CLSI (2011) Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Test. Twenty-first Information Supplement v.31, no.1, January, 2011, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
 17. Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L. and Weese, J.S. (2008) Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet. Microbiol.* **129**, 209-214.
 18. Keessen, E.C., Hopman, N.E., van Leengoed, L.A., van Asten, A.J., Hermanus, C., Kuijper, E.J. and Lipman, L.J. (2011) Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1816-1821.
 19. Weese, J.S., Staempfli, H.R. and Prescott, J.F. (2001) A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Vet. J.* **33**, 403-409.
 20. Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán, A. and Gunnarsson, A. (2003) *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet. J.* **35**, 465-471.
 21. Medina-Torres, C.E., Weese, J.S. and Staempfli, H.R. (2011) Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet. Microbiol.* **152**, 212-215.
 22. Frederick, J., Giguère, S. and Sanchez, L.C. (2009) Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003–2008). *J. Vet. Intern. Med.* **23**, 1254-1260.
 23. Preis, I.S., Silva, R.O.S., Pires, P.S., Lobato, F.C.F., Palhares, M.S., Maranhão, R.P.A. and Ecco, R. (2012) Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz. J. Vet. Pathol.* **5**, 7-11.
 24. Magdesian, K.G., Hirsh, D.C., Jang, S.S., Hansen, L.M. and Madigan, J.E. (2002) Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993–1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **220**, 67-73.
 25. Weese, J.S., Staempfli, H.R. and Prescott, J.F. (2000) Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 332-336.
 26. Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A. and Gunnarsson, A. (1997) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet. J.* **29**, 279-284.
 27. Arroyo, L.G., Staempfli, H. and Weese, J.S. (2007) Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet. Microbiol.* **120**, 179-183.
 28. Songer, J.G. and Uzal, F.A. (2005) Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, 528-536.
 29. Thitaram, S.N., Frank, J.F., Lyon, S.A., Siragusa, G.R., Bailey, J.S., Lombard, J.E., Haley, C.A., Wagner, B.A., Dargatz, D.A. and Fedorka-Cray, P.J. (2011) *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J. Food Prot.* **74**, 130-133.
 30. Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H. and Straub, R. (1999) Prevalence of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 358-361.
 31. Netherwood, T., Wood, J.L., Townsend, H.G., Mumford, J.A. and Chanter, N. (1996) Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiol. Infect.* **117**, 375-383.
 32. Barr, B.S., Walldridge, B.M., Morressey, P.R., Reed, S.M., Clark, C., Belgrave, R., Donecker, J.M. and Weigel, D.J. (2013) Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet. J.* **45**, 154-158.
 33. Marks, S.L. and Kather, E.J. (2003) Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet. Microbiol.* **94**, 39-45.
 34. Jang, S.S., Hansen, L.M., Breher, J.E., Riley, D.A., Magdesian, K.G., Madigan, J.E., Tang, Y.J., Silva, J. Jr and Hirsh, D.C. (1997) Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin. Infect. Dis.* **25**, S266-S267.
 35. Magdesian, K.G., Dujowich, M., Madigan, J.E., Hansen, L.M., Hirsh, D.C. and Jang, S.S. (2006) Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **228**, 751-755.
 36. Delmée, M. and Avesani, V. (1988) Correlation between serogroup and susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**, 325-331.
 37. Post, K.W. and Songer, J.G. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe* **10**, 47-50.
 38. Båverud, V. (2002) *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet. Q.* **24**, 203-219.
 39. Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P. and European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2011) Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2227-2234.
 40. Dzink, J. and Bartlett, J.G. (1980) *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 695-698.
 41. Watkins, K.L., Shryock, T.R., Dearth, R.N. and Saif, Y.M. (1997) *In-vitro* antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet. Microbiol.* **54**, 195-200.
 42. Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., de Gussem, K., Decostere, A. and Haesebrouck, F. (2004) Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chicken to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.* **33**, 3-7.
 43. Slavić, D., Boerlin, P., Fabri, M., Klotins, K.C., Zoethout, J.K., Weir, P.E. and Bateman, D. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can. J. Vet. Res.* **75**, 89-97.
 44. Benning, V.R. and Mathers, J.J. (1999) Comparison of agar dilution and broth microdilution methods of anaerobic antimicrobial susceptibility testing using several veterinary antibiotics against *Clostridium perfringens* strains originating from porcine and avian sources. *Anaerobe* **5**, 561-569.
 45. Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232-260.
 46. Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J. and Boerling, P. (2008) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chicken at a commercial farm. *Vet. Microbiol.* **127**, 116-127.
 47. Silva, R.O.S., Salvarani, F.M., Assis, R.A., Martins, N.R.S., Pires, P.S. and Lobato, F.C.F. (2009) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 261-263.

Evaluation of three enzyme immunoassays and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enteritis in piglets

Rodrigo O. S. Silva, DVM, MSc; Roberto M. C. Guedes, DVM, PhD; Marcos X. Silva, DVM, PhD; Francisco C. F. Lobato, DVM, PhD

Summary

The aim of this study was to compare test performances of three commercial enzyme immunoassays (EIAs) for A and B toxin detection and that of a simple toxigenic culture protocol to the cytotoxicity assay (CTA) as the gold standard for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enteritis in piglets. A total of 73 piglets submitted to the Veterinary School of Universidade Federal de Minas Gerais were included in this study. Intestinal content was collected from 62

diarrheic and 11 non-diarrheic piglets, 1 to 7 days old. Vero cells were used in the CTA protocol to detect A and B toxins. Fecal samples were inoculated on cycloserine-cefoxitin fructose agar for isolation of *C. difficile*. The EIAs were performed according to the manufacturers' instructions. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated for each EIA and for toxigenic culture against CTA. The CTA was positive for 22 of the 73 samples (30.1%). Sensitivities of all EIAs

and toxigenic culture for the piglet samples were low (41% to 64%), whereas specificities were 80% to 98%. These results suggest that the EIAs and toxigenic culture protocol tested are not suitable for diagnosis of *C. difficile* infection in individual piglets.

Keywords: swine, *Clostridium difficile* toxins A and B, neonatal diarrhea, colitis

Received: November 4, 2012

Accepted: March 8, 2013

Resumen - Evaluación de tres inmunoensayos de enzimas y de cultivo toxigénico para el diagnóstico del *Clostridium difficile* asociado con la enteritis en lechones

El propósito de este estudio fue comparar el desempeño de tres pruebas comerciales de inmunoensayo de enzimas (EIAs por sus siglas en inglés) y el del protocolo del cultivo toxigénico simple con el del ensayo de citotoxicidad (CTA por sus siglas en inglés) como el estándar de oro para el diagnóstico del *Clostridium difficile* asociado con la enteritis en lechones. Un total de 73 lechones enviados a la Escuela Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais se incluyeron en este estudio. Se recolectó el contenido intestinal de 62 lechones diarreicos y 11 no diarreicos de 1 a 7 días de edad. Se utilizaron células Vero en el protocolo CTA para detectar toxinas A y B. Se inocularon muestras fecales en agar fructosa-cicloserina-cefoxitina para el aislamiento de *C. difficile*. Las EIAs se desarrollaron de

acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se calcularon la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo para cada EIA y para el cultivo toxigénico contra el CTA. El CTA resultó positivo para 22 de las 73 muestras (30.1%). Las sensibilidades de todas las EIAs y el cultivo toxigénico para las muestras de los lechones fueron bajas (41% a 64%), mientras que las especificidades fueron de 80% a 98%. Estos resultados sugieren que las EIAs y el protocolo de cultivo toxigénico probados no son adecuados para el diagnóstico de la infección por *C. difficile* en lechones individuales.

Résumé - Évaluation de trois épreuves immuno-enzymatiques et d'une méthode de culture toxigénique pour le diagnostic d'entérite associée à *Clostridium difficile* chez les porcelets

L'objectif de la présente étude était de comparer les performances de trois épreuves

immuno-enzymatiques commerciales (EIA) et d'un protocole de culture toxigénique à l'épreuve de cytotoxicité (CTA) considérée comme l'épreuve étalon pour le diagnostic de l'entérite associée à *Clostridium difficile* chez les porcelets. Au total, 73 porcelets soumis à la Faculté vétérinaire de l'Université Fédérale de Minas Gerais ont été inclus dans l'étude. Le contenu intestinal a été prélevé de porcelets diarrhéiques (62) et non-diarrhéiques (11), âgés de 1 à 7 jours. Des cellules Vero ont été utilisées dans l'épreuve CTA afin de détecter les toxines A et B. Des échantillons de fèces ont été ensemencés sur gélose cycloserine-cefoxitin-fructose pour l'isolement de *C. difficile*. Les EIA ont été effectuées selon les instructions des manufacturiers. La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive, et la valeur prédictive négative ont été calculées pour chaque EIA et pour la culture toxigénique versus le test CTA. Ce dernier était positif pour 22 des 73 échantillons (30,1%). Les sensibilités de toutes les EIA et de la culture toxigénique pour les échantillons de porcelets étaient faibles (41% à 64%), alors que les spécificités étaient de 80% à 98%. Ces résultats suggèrent que les EIA et le protocole de culture toxigénique testés ne sont pas appropriés pour le diagnostic de l'infection à *C. difficile* chez des porcelets pris individuellement.

Veterinary School of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author: Dr Francisco C. F. Lobato, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Antonio Carlos Avenue, 6627, Belo Horizonte, MG - Brazil, 31.270-901; Tel: 55 31 3409-2103; Fax: 55 31 3409 2086; E-mail: flobato@vet.ufmg.br.

This article is available online at <http://www.aasv.org/shap.html>.

Silva ROS, Guedes RMC, Silva MX, et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enteritis in piglets. *J Swine Health Prod.* 2013;21(6):300-303.

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, gram-positive bacillus that has been recognized as responsible for 95% of all pseudomembranous colitis cases and most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans.¹ In veterinary medicine, this organism is considered the most important uncontrolled cause of neonatal diarrhea in pigs in some countries, including the United States and Brazil.^{2,3} In addition, recent studies also showed that the strains isolated from humans suffering from *C. difficile* infection (CDI) have a high genetic relatedness to strains of animal origin,⁴ suggesting that CDI is a zoonosis.

For most authors, the “gold standard” for diagnosis of CDI is the cytotoxicity assay (CTA), but this test is both labor intensive and time consuming. Therefore, commercial enzyme immunoassays (EIAs) remain the most common method used for diagnosis of CDI in humans and animals.^{5,6} Recently, toxigenic culture has also been described as a sensitive method for human samples,⁷ but little is known with regard to its application for samples from domestic animals.

Despite the importance of *C. difficile* as a swine enteropathogen and even as a potential zoonotic agent, no established guidelines are available for diagnosing CDI, and performance is unknown for most commercially available detection methods.⁸ In light of this fact, the aim of the present study was to compare test performances of three different EIAs and toxigenic culture to the CTA as the gold standard.

Materials and methods

Ethics approval for this study was granted by the Animal Experiments Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

The piglets included in this study were submitted to the Veterinary School of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, for routine diagnosis of piglet neonatal diarrhea. Live animals were euthanized and necropsied, and intestinal content was collected in sterile containers and stored at -20°C until tested up to 7 days later. A total of 73 samples from 32 farms were included in the study, with 62 samples from diarrheic piglets and 11 from non-diarrheic piglets.

The CTA for *C. difficile* A and B toxins was performed with Vero cells (ATTC CCL 81) as described previously.⁹ Briefly, fecal samples were diluted 1:4 in phosphate-buffered

saline (pH 7.0) and centrifuged at 3000g for 5 minutes at 4°C. The resulting supernatant was filtered through a 0.22-μm pore size filter and diluted twofold until a dilution of 1:1024 was reached. Serial dilutions and parallel samples with *Clostridium sordellii* antitoxin (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, England) were added onto the Vero cell monolayers. The cells were examined after 24 hours of incubation at 37°C in a 5% CO₂ incubator. A specimen was considered positive if at least 90% of the cells were rounded and the effect was neutralized by antitoxin at the same dilution in a parallel sample.

For toxigenic culture, the fecal samples were subjected to alcohol shock,¹⁰ and 50-μL aliquots were inoculated onto cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA) plates (Hi-media, Mumbai, India) supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (Sigma-Aldrich Co, St Louis, Missouri). After incubation in an anaerobic chamber at 37°C for 72 hours, colonies with morphology suggestive of *C. difficile* and a positive Gram stain were subjected to a previously described multiplex polymerase chain reaction (PCR) for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*), and binary toxin genes (*cdtB*).¹¹ In addition, all toxigenic isolates in the PCR were tested by CTA for in vitro toxin production as previously described.⁵ *Clostridium difficile* ATCC 9689 was used as a control for the PCR and toxigenic culture.

Three commercial enzyme immunoassays (EIAs) for A and B toxin detection were tested: *Clostridium difficile* Tox A/B II (Techlab Inc, Blacksburg, Virginia), Remel ProSpecT *Clostridium difficile* Toxin A/B Microplate Assay (Oxoid, Hampshire, United Kingdom), and Ridascreen *Clostridium difficile* toxins A/B (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). All EIAs were performed according to the manufacturers' recommendations. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and 95% confidence intervals were calculated for each EIA and for toxigenic culture against CTA (Stata 12; StataCorp LP, College Station, Texas).

Results

The CTA was positive in 22 of the 73 samples (30.1%). Six of the positive samples were from non-diarrheic piglets. Sensitivities of the EIAs evaluated were ≤ 63.6%, and specificities were 80.3% to 98% (Table 1).

Clostridium difficile was isolated from 13 of the 73 samples (18.3%), with 10 strains toxigenic by PCR. All toxigenic isolates were positive for the *tcdA* and *tcdB* genes, and one was also positive for the binary toxin gene (*cdtB*). One toxigenic strain isolated from a diarrheic piglet was negative for A and B toxins by CTA. All PCR-toxigenic strains were able to produce toxin in vitro. Sensitivity and specificity of toxigenic culture are provided in Table 1.

Discussion

All EIAs tested had sensitivities < 65% when used for piglet fecal samples. This undesirable EIA performance with regard to piglet fecal samples is not surprising and was previously reported for other EIAs.^{8,12} Some authors attributed the low specificity of EIAs for swine fecal samples to inhibitors in animal feces; however, to date, no evidence confirms this possibility.^{8,13} In contrast, similar to a previous report,⁸ false-positive results varied widely among EIAs, suggesting that the incorrect results were due to the test and not to an interfering substance in the samples. It is also interesting to note that an older version of the Techlab EIA was previously tested on porcine fecal samples, with a sensitivity of 91% and a specificity of 86% reported.¹⁴ In the present study, the new version of the Techlab test had a much lower sensitivity (59.1%), but the specificity was 98.0%.

In contrast to a previous report,⁸ the sensitivity of toxigenic culture in this study was low (40.9%). Unfortunately, there is no standard method for toxigenic culture of *C. difficile*, making it difficult to compare reported results. A great variety of media have been reported, in addition to differences in isolation protocol, such as the use of alcohol shock and variations in incubation time. Accordingly, this study reports a simple isolation method that would be more applicable for diagnosis than previously reported protocols.^{5,8,15} In this protocol, the samples were subjected to alcohol shock, plated on CCFA supplemented with 0.1% sodium taurocholate, and incubated for 72 hours. It is well known that some *C. difficile* strains fail to grow on CCFA because of susceptibility to one or both antibiotics used in the medium.¹⁶ In addition, the use of CCFA, even with supplemental taurocholate, may result in variable sensitivity for recovery of *C. difficile* spores, compared with other isolation protocols, such as use of pre-enrichment broth.¹⁷ All these factors might

Table 1: Comparison of three commercial enzyme immunoassays and toxigenic culture to the cytotoxicity assay (CTA) as the gold standard for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets*

Method	Piglets samples (n = 73)			
	% (95% CI)			
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Toxigenic culture	41.0 (23.3-61.3)	98.0 (89.7-99.7)	90.9 (59.6-98.2)	79.7 (67.8-87.5)
Ridascreen <i>Clostridium difficile</i> toxins A/B†	54.5 (34.7-73.1)	88.2 (76.7-94.4)	76.7 (43.8-83.7)	81.8 (69.7-89.8)
<i>Clostridium difficile</i> Tox A/B II Microplate Assay‡	59.1 (38.7-76.7)	98.0 (89.7-99.6)	92.9 (68.5-98.7)	84.7 (73.5-91.8)
Remel ProSpecT <i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B§	63.6 (42.9-80.2)	80.3 (67.5-88.9)	58.3 (38.8-75.5)	83.6 (70.9-91.5)

* 73 piglets 1 to 7 days old were submitted to the Veterinary School of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, for routine diagnosis of piglet neonatal diarrhea. The CTA for *C. difficile* was positive in 22 of the piglets and negative in 51.

† R-Biopharm, Darmstadt, Germany.

‡ Techlab Inc, Blacksburg, Virginia.

§ Oxoid, Hampshire, United Kingdom.

PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.

have contributed to the low sensitivity of the toxigenic culture protocol tested and suggest that this protocol is not acceptable for diagnosis of CDI in piglets, in contrast to the previous reports for human samples.^{6,7}

All toxigenic isolates in the present study were positive for the *tcdA* and *tcdB* genes, whereas one strain was also positive for the binary toxin gene (*cdtB*). It is interesting to note that all the piglet *C. difficile* isolates that were considered to be toxigenic by PCR were also able to produce toxins A and B in vitro. This result suggests a good correlation between toxin gene detection by PCR and in vitro toxin production in porcine *C. difficile* strains. Therefore, the toxin production test after isolation may not be necessary when A and B toxin genes have been detected. The removal of this step would save time and reduce the cost of diagnosis. Further studies with a larger number of strains are needed to confirm this hypothesis.

In the present study, one toxigenic strain isolated from a diarrheic piglet was negative for A and B toxins by CTA. Several hypotheses should be considered. First, the toxins might not have been detected by CTA, which does not exhibit 100% sensitivity.⁵ Second, the piglet might have been an asymptomatic carrier, and other enteropathogens might

have been responsible for the diarrhea. Another possibility is that A and B toxins that had been present were degraded by fecal proteases. It should be emphasized that the time between sample collection and processing in the present study was short (only 7 days). In a previous study, A and B toxins remained detectable in piglet fecal samples for at least a month at -20°C.⁸ These data suggest that failure to detect A and B toxins using the EIAs in the present study was not caused by storage conditions. Some authors contend that protease activity in animal fecal specimens may cause rapid toxin degradation such that toxin may not be detectable by EIAs or CTA; to date, to the authors' knowledge, there is no study confirming this hypothesis.¹³

The sensitivity and specificity of all the EIAs tested were unacceptable for testing individual piglet samples. Similar results have been reported in humans, and some studies suggest that at least a two-step algorithm is needed to reliably diagnose CDI;⁷ however, there is no consensus thus far on which tests should be used in each step. One possible approach is use of an EIA with a high sensitivity as the primary test, followed by CTA as the confirmatory test for positive samples. Another option is use of a high-specificity method associated with a large number of

samples from each swine farm. In the present study, one of the EIAs had a specificity of 98% (95% CI, 89.7%-99.6%) for piglet samples, allowing a great degree of confidence in the positive results, with a PPV of 92.9% (95% CI, 68.5%-98.7%) and an NPV of 84.7% (95% CI, 73.5%-91.8%). Therefore, we suggest this EIA (Techlab) might be useful for screening for CDI in a herd when multiple samples are collected.

Implications

- Under the conditions of this study, sensitivity and specificity of the three EIAs tested are unacceptable for diagnosis of *C. difficile* in individual piglet fecal samples.
- Use of a high-specificity EIA associated with a large number of samples from each swine farm could be used to screen for *C. difficile* infection in a herd when multiple samples are collected.

Acknowledgments

The authors thank the following: Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia.

Conflict of interest

None reported.

References

1. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of micro-tubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLOS Pathogens*. 2009;5:e1000626. doi:10.1371/journal.ppat.1000626.
2. Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*. 2006;12:1–4.
3. Silva ROS, Guedes RMC, Lobato FCF. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*. 2013;43:73–80.
4. Norman KN, Scott HM, Harvey RB. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *Appl Environ Microbiol*. 2001;77:5755–5760.
5. Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med*. 2010;24:628–632.
6. René P, Frenette CP, Schiller I, Dendukuri N, Brassard P, Fenn S, Loo VG. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:94–96.
7. Peterson LR, Mehta MS, Patel PA, Hacek DM, Harazin M, Nagwekar PP, Thomson RB Jr, Robicsek A. Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel. *Am J Clin Pathol*. 2011;136:372–380.
8. Keessen EC, Hopman NE, van Leengoed LA, van Asten AJ, Hermanus C, Kuijper EJ, Lipman LJ. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1816–1821.
9. van den Berg RJ, Bruijnesteijn CLS, Gerritsen HJ. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5338–5340.
10. Silva ROS, Ribeiro MG, Palhares MS, Borges AS, Maranhão RP, Silva MX, Lucas TM, Olivo G, Lobato FC. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet J*. 2013. doi:10.1111/evj.12046.
11. Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Júnior ECC. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*. 2011;41:1130–1135.
12. Anderson MA, Songer JG. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in swine. *Vet Microbiol*. 2008;128:204–206.
13. Chouicha N, Marks SL. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *J Vet Diagn Invest*. 2006;18:182–188.
14. Post KW, Jost GH, Songer JG. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest*. 2002;14:258–259.
15. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C. Diff Quik Chek Complete assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2082–2086.
16. Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest*. 2005;17:528–536.
17. Thitaram SN, Frank JF, Lyon SA, Siragusa GR, Bailey JS, Lombard JE, Haley CA, Wagner BA, Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J Food Prot*. 2011;74:130–133.



***Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil**

Infecção por *Clostridium difficile*: principais características e ocorrência em animais domésticos no Brasil

Rodrigo Otávio Silveira Silva¹ Roberto Maurício de Carvalho Guedes¹ Francisco Carlos Faria Lobato^{*}

- REVIEW -

ABSTRACT

Clostridium difficile is an emerging enteropathogen of humans and domestic animals. The bacterium was recently confirmed to be present in foals and dogs in Brazil, with some recent studies suggesting that *C. difficile* is one of the most important causes of piglet diarrhea in the country. Moreover, some reports also suggest the transmission of this microorganism between animals and humans, raising the possibility that *C. difficile* is a zoonotic disease. Therefore, the aim of the present review is to describe the main features of *C. difficile* infection in domestic animals and outline the occurrence of the disease in horses, dogs and pigs in Brazil.

Key words: enteritis, zoonosis, clostridiosis, nosocomial, piglets, foals, dogs.

RESUMO

Clostridium difficile é considerado um enteropatógeno emergente que acomete humanos e animais domésticos. A presença da doença em equinos e cães já foi relatada no Brasil e trabalhos sugerem que atualmente *C. difficile* seja um dos principais causadores de diarreia neonatal em suínos no país. Além disso, relatos recentes sugerem a transmissão do agente entre o homem e animais, gerando a hipótese de *C. difficile* ser um agente zoonótico. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo revisar as principais características da doença, além de fornecer dados recentes sobre a ocorrência no Brasil da infecção por *C. difficile* nas principais espécies de animais domésticos.

Palavras-chave: enterite, zoonose, clostridiose, nosocomial, leitões, potros, cães.

INTRODUCTION

Clostridium difficile is an anaerobic gram-positive bacterium that is considered an emerging pathogen and currently responsible for the majority of the nosocomial diarrhea and pseudomembranous colitis cases in humans. *C. difficile* infection is common in pigs and horses but also occurs in dogs, calves and laboratory animals, such as guinea pigs, rabbits and hamsters (KEEL & SONGER, 2006). *C. difficile* has emerged as an important enteric pathogen in piglets and now is considered the primary cause of uncontrolled neonatal diarrhea in the U. S. and Europe (SONGER, 2010). This bacterium was not reported in domestic animals in Brazil until 2011. Since then, studies have confirmed *C. difficile*-associated infections in piglets, foals and dogs (SILVA et al., 2011; PREIS et al., 2012; SILVA et al., 2013). Despite the growing importance of *C. difficile*-associated infections, the basic aspects of the disease, such as clinical presentation, diagnostic methods and methods for preventing and controlling the disease, are largely unknown. Thus, the present article aims to review the primary features of the disease and provide recent data on the occurrence of *C. difficile* infection in domestic animal species in Brazil.

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: lobato.francisco@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

Background and Pathogenesis

C. difficile was first isolated from the feces of newborns by HALL and O'TOLLE in 1935. Because this microorganism was not yet recognized as a pathogen, few studies were published before the 1970s. In this decade, concomitant with the extensive use of clindamycin, reports of diarrhea and pseudomembranous colitis started to emerge (LYERLY et al., 1988). Few years later, *C. difficile* was confirmed as the principle causative agent of diarrhea associated with prolonged antibiotic therapy in humans. Nowadays, the impact of the disease is still not entirely known, but it has been estimated that approximately three million cases occur annually in the United States alone (OLDFIELD, 2004). Unfortunately, studies about *C. difficile* in humans in Brazil are rare.

C. difficile was first isolated from piglets and horses in the 1980s (JONES and HUNTER, 1983; EHRLICH et al., 1984), but it was not until the mid-1990s that this microorganism gained greater appreciation as a cause of diarrhea in these two species (SONGER, 2010). Several recent studies have attempted to standardize diagnostic methods and evaluate the hypothesis that *C. difficile* is a zoonotic agent, while other studies have researched immunoprophylactic treatments that can prevent the diarrhea caused by this emerging microorganism (SONGER et al., 2007).

The pathogenesis of *C. difficile*-associated diarrhea is still largely unknown for the majority of animals. It is believed that infection is initiated by ingesting spores, which are primarily transmitted by infected animals or healthy carriers. In general, the intestinal microbiota prevents the agent from colonizing, as infection requires the absence of microbiota that inhibit colonization. Thus, *C. difficile* commonly colonizes the intestine after the antibiotic-mediated depletion of intestinal microorganisms or prior to the complete establishment of the microbiota, which occurs in piglets shortly after birth (BÅVERUD, 2004). It is also possible for strains already inhabiting healthy horses and dogs to experience exacerbated growth after the impairment of the intestinal microbiota (HOPMAN et al., 2011).

Once in the intestines, *C. difficile* can produce two toxins: toxin A, an enterotoxin, and toxin B, a cytotoxin. Intestinal lesions appear to be initiated by toxin A, the receptors for which are present on the basal lamina of intestinal epithelial cells. The cell junctions are destroyed, allowing toxin B, whose receptors are believed to be located on the basolateral region of the epithelium, to enhance the lesion. After internalization by endocytosis, both of the toxins condense actin, causing disruption of the cytoskeleton, cell rounding and

ultimately apoptosis. Following injury to the intestinal epithelium, the toxins can disseminate systemically and act on other organs. In addition, the destruction of cell junctions causes an intense intestinal leukocyte migration that result in the formation of a pseudomembrane, which is a characteristic of the disease in humans (LYERLY et al., 1988).

A third toxin, binary toxin, has caught the attention of both researchers and clinicians but, despite many discussions, the real significance of this additional virulence factor is still unknown. Human studies have reported greater disease severity in patients infected with binary toxin-producing strains (RUPNIK et al., 2005). Recent studies showed that the binary toxin may act synergistically with toxins A and B, increasing the depolymerization of the cytoskeleton through a complementary mechanism, and it also appears to form protrusions in target cells and cause the consequent expulsion of material from the cytosol. This material forms a dense network on the cell surface that facilitates the adhesion and multiplication of *C. difficile* in the intestine (SCHWAN et al., 2009).

The disease in piglets

C. difficile infections in pigs occur almost exclusively in piglets younger than seven days old. Unlike humans, the development of the disease in this species is not necessarily correlated with the use of antibiotics (SONGER & UZAL, 2005). *C. difficile* is widespread in the environment and is potentially present in the feces of sows; thus, the intestinal colonization of piglets occurs shortly after birth (HOPMAN et al., 2011). *C. difficile* infections are clinically characterized by weak body growth and mesocolon edema. Other signs, such as hydrothorax, respiratory distress, scrotal and facial edema and even sudden death, can also occur (SONGER & UZAL, 2005). Approximately 30% of the animals on affected farms are positive for the presence of toxins A/B, with the prevalence reaching 100% in some cases (SONGER et al., 2004). It is worth noting that only some of the infected animals have diarrhea, which may vary in consistency from pasty to watery. The simple absence of diarrheal content in the colon does not rule out the possibility of infection, as the disease is commonly subclinical in pigs (YAEGER et al., 2007).

Mesocolon colitis and edema (Figure 1C) are the macroscopic changes that best correlate with the presence of *C. difficile* infections in piglets, especially when the edema is severe. Notably, however, it is common on affected farms to find several seemingly healthy piglets that test positive for the A/B toxins and exhibit histopathological intestinal lesions. Thus,

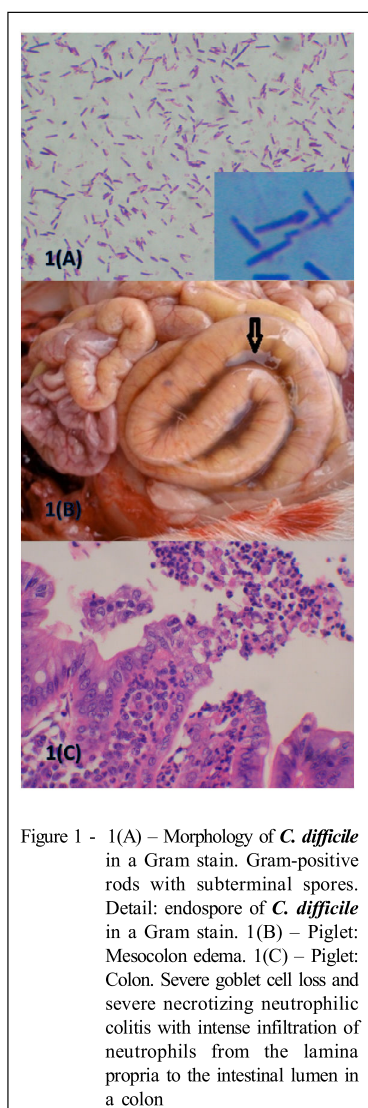


Figure 1 - 1(A) – Morphology of *C. difficile* in a Gram stain. Gram-positive rods with subterminal spores. Detail: endospore of *C. difficile* in a Gram stain. 1(B) – Piglet: Mesocolon edema. 1(C) – Piglet: Colon. Severe goblet cell loss and severe necrotizing neutrophilic colitis with intense infiltration of neutrophils from the lamina propria to the intestinal lumen in a colon

microscopic evaluations are extremely valuable in confirming a diagnosis, as several clinical signs are often observed in positive animals, including suppuration in the lamina propria of the colon, edema, the infiltration of neutrophils into the serosa and mesentery, a marked reduction in the number of goblet cells and the presence of stereotypical lesions known as “volcano lesions” (Figure 1D) (YAEGER et al., 2007).

In Brazil, two different surveys conducted in Rio Grande do Sul and Minas Gerais found that approximately 16% of the animals were positive for the A/B toxins (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011). Interestingly, 53% of the farms sampled in the latter

study had at least one positive animal, suggesting widespread dissemination of the disease. CRUZ-JUNIOR et al. (2010) evaluated the main causative agents (rotavirus, enterotoxigenic *E. coli*, *Isospora suis*, *C. perfringens* and *C. difficile*) of neonatal diarrhea in pigs in Minas Gerais. The A/B toxins and/or histological lesions characteristic of *C. difficile* were present in 50% of the animals examined. Thus, similar to reports from the U. S. and Europe, these results suggest that infection by this agent is one of the most important causes of neonatal diarrhea in pigs in Brazil.

The disease in horses and foals

C. difficile is responsible for colitis in adult horses, mostly nosocomial, and for diarrhea ranging from a mild self-limiting form to a per-acute and fatal disease in foals (MEDINA-TORRES et al., 2010). In foals, as in humans, infection rarely occurs spontaneously and is usually associated with an imbalance in the gastrointestinal microbiota, especially when the imbalance occurs after the use of antibiotics (WEESE et al., 2000). The antimicrobials commonly associated with the development of *C. difficile*-associated infections in horses include erythromycin, ceftiofur, norfloxacin, florfenicol, lincomycin and general beta-lactams (BÄVERUD, 2004). Interestingly, the use of multiple antibiotics has been associated with an increased risk of developing *C. difficile* infection in foals (BÄVERUD, 2002). Infected animals present clinically with diarrhea that is often profuse, dehydration, depression and a significant amount of gas in their large intestines (BÄVERUD, 2004). Recently, UZAL et al (2012) reported a possible association between *C. difficile* and *C. perfringens* type C as a cause of acute diarrhea in foals, but further studies are needed to confirm this hypothesis.

There are currently only two diagnostic descriptions of *C. difficile* infections in foals in Brazil (PREIS et al., 2012; SILVA et al., 2012), both at Minas Gerais. The prevalence of the disease in adult horses and foals remains unclear in Brazil because of a lack of epidemiological surveys. SILVA et al. (2012) reported the occurrence of diarrhea in three five-month-old animals two days after the administration of penicillin to treat suspected pneumonia. PREIS et al. (2012) have already described a case of *C. difficile* enteritis that was associated with candidiasis and prolonged antibiotic therapy in a 12-day-old animal. In both reports, the infection was initially suspected to be salmonellosis. Only in the first report was an *ante mortem* laboratory diagnosis performed, allowing the antibiotic therapy to be adjusted to focus on the *C. difficile* infection and recovery of the animals. PREIS

et al. (2012) explained that the absence of a laboratory diagnosis might have further aggravated the disease because the antibiotics were chosen based on the suspected salmonellosis and ultimately lead to the animal's death. In both cases, the A/B toxins were detected by the cytotoxicity assay and also toxigenic strains of *C. difficile* were isolated. These studies confirmed the occurrence of the disease in horses in Brazil and demonstrate the need for a differential diagnosis for diarrhea in foals, especially when the clinical signs of diarrhea begin a few days following antibiotic therapy or in cases where some compounds, such as ceftiofur, norfloxacin or florfenicol, do not result in a significant clinical improvement.

In adult horses, *C. difficile* has been reported as a nosocomial causative agent of acute diarrhea or cramping during hospitalization, which occurs after antibiotic therapy for another disease (BÄVERUD et al., 2004). However, to date, there are no reports of *C. difficile*-associated infections in adult horses in Brazil.

The disease in dogs

The importance of *C. difficile*-associated diarrhea in dogs is still not fully known. It was initially believed that this agent was only responsible for rare cases of chronic recurrent diarrhea. However, studies have demonstrated that the risk of colonization increases significantly with hospitalization and that infection with a toxigenic strain of *C. difficile* during hospitalization is correlated with the development of diarrhea (STRUBLE et al., 1994). The administration of antibiotics and immunosuppressive drugs during hospitalization promotes the intestinal colonization of dogs, suggesting that the use of these drugs in conjunction with hospitalization is the main risk factor for the development of *C. difficile*-associated diarrhea. Since the publication of these studies, this agent has been recognized as a nosocomial pathogen in dogs, as it is in adult humans and horses (CLOOTEN et al., 2008).

Only one study on *C. difficile* has confirmed the occurrence of infection in dogs in Brazil (SILVA et al., 2013). This study evaluated isolates to determine whether the toxins A/B were present in diarrheic dogs at a veterinary hospital and apparently healthy animals outside a hospital setting. Similar to the results reported in other studies, SILVA et al. (2013) showed a significant association between the occurrence of diarrhea and the presence of toxins A/B, suggesting the involvement of *C. difficile* in canine diarrhea (STRUBLE et al., 1994; CLOOTEN et al., 2008).

Despite recent advances, additional research is needed to clarify some of the questions regarding *C.*

difficile infection in dogs. These questions include determining the role of *C. difficile* in diarrhea occurring in non-hospitalized animals that did not previously receive antibiotic therapy. Although there are several reports on this topic, there is still no convincing evidence, leaving this question unresolved.

Clostridium difficile as a zoonotic agent

With the development and application of molecular biology techniques, studies examining *C. difficile* strains from various sources have become more common. Ribotyping is currently the most commonly used technique and allows a library of more than 160 patterns (ribotypes) to be generated from *C. difficile* strains isolated from animals, humans and the environment (SONGER et al., 2010). Recent studies have used this ribotyping technique to show that the *C. difficile* strains isolated from meat products are very similar to those strains isolated from humans with pseudomembranous colitis, suggesting the possibility of transmission through foods of animal origin (SONGER et al., 2009). Consequently, some studies were conducted to evaluate the similarity of the strains isolated from humans and domestic animals. These studies noted that many of the ribotypes isolated from cattle, pigs and dogs were the same ribotypes found in humans with pseudomembranous colitis (JHUNG et al., 2008). Moreover, a recent study reported that occupational exposure to pigs significantly increases the likelihood of humans being colonized by *C. difficile*. Furthermore, the same study demonstrated that the strains isolated from animals and their handlers had the same ribotype, suggesting transmission between species (NORMAN et al., 2011). Another fact that has attracted attention is the large increase in the isolation of one specific ribotype, known as 078, from humans living in the United States and England. This strain is commonly isolated from calves and represents 83% of the isolates obtained from pigs in the United States (KEEL et al., 2007).

These results reinforce the hypothesis that *C. difficile* is transmitted between animals and humans. In parallel with this hypothesis, recent events indicate changes in the epidemiology of *C. difficile* infections, including the occurrence of disease in patients with immunodeficiency, transplanted patients and otherwise healthy humans and those without prior exposure to a hospital environment (SAMIE et al., 2008; COLLINI et al., 2012). More studies are needed to confirm the hypothesis that *C. difficile* is a zoonotic agent, so that, if this suspicion is confirmed, preventing the disease (and even preventing colonization) in domestic animals can be made a priority (SONGER, 2010).

Unfortunately, *C. difficile* ribotyping studies in Brazil are scarce and restricted to human isolates (BALASSIANO et al., 2009). To date, there are no Brazilian studies evaluating the ribotypes of *C. difficile* isolates from domestic animals, which impedes the evaluation of strains isolated from humans and animals.

Diagnostics

Detection of the toxins

Detecting toxins A/B by visualizing their cytopathic effects in cell culture (cell cytotoxicity assay - CTA) is considered the gold standard for diagnosing *C. difficile* infections. The CTA consists of inoculating filtered feces into a cell culture and observing its cytopathic effect. The cytotoxic effect is primarily mediated by toxin B, which is 1000 times more cytotoxic than toxin A. Readings are taken 24-48 hours later and confirmed by seroneutralization of the cytopathic effect with antibodies against the A/B toxins of *C. difficile* or *C. sordellii* (DELMEÉ, 2001).

One of the primary advantages of the CTA is its high sensitivity and specificity. Conversely, the assay requires at least two days and can only evaluate a few samples at one time, in contrast to other techniques such as commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) or immunochromatography (ICG) kits. Another disadvantage is the maintenance of cell lines, which is also time consuming, relatively expensive and requires trained personnel (POST et al., 2002).

The commercial kits that detect toxins A and B are easy to use and provide results quickly, taking only a few hours. Unfortunately, all of the commercially available kits are imported, increasing the costs associated with a diagnosis. In addition, all of these kits are standardized to detect toxins A/B from human feces, and the sensitivity and specificity are highly variable between kits and animal species. Notably, some kits are only standardized for detecting toxin A. Studying both toxins is essential because some *C. difficile*-associated infections, including major outbreaks in humans, have been caused by variant strains that produce only toxin B (KUIJPER et al., 2001).

Studies evaluating the effectiveness of kits at detecting the A/B toxins in pig specimens suggest that such products are less effective for this species (KEESSEN et al., 2011; SONGER and ANDERSON, 2006). In general, the sensitivity or specificity of the kits tested thus far is unacceptably low. However, one exception has been reported by POST et al. (2002), who evaluated a kit exhibiting 91% sensitivity and 86% specificity for swine feces. CHOUICHA & MARKS (2006) evaluated five commercial ELISA kits for their effectiveness on dog feces, concluding that all were inadequate because

of low sensitivity (the sensitivities ranged from 7% to 33%). Thus, the use of commercial kits for pigs or dogs does not seem to yield an adequate individual diagnosis. It has been speculated that, for both dogs and pigs, the sensitivity and specificity of ELISA kits are compromised by the presence of inhibitors and fecal proteases, which decrease the binding specificity and/or degrade the toxins in the feces, respectively (CHOUICHA & MARKS, 2006). To date only one kit has been evaluated on horses and with 84% sensitivity and 96% specificity its performance was considered adequate (MEDINA-TORRES et al., 2010).

No studies have evaluated the commercial kits from Brazil using clinical samples from horses, pigs or dogs, complicating the diagnosis of *C. difficile* infections in domestic species in the country. Given that the significant prevalence of the disease in pigs has been confirmed and that the infection has also been confirmed in dogs and horses, evaluating these kits and standardizing the diagnosis of *C. difficile*-associated infections in each domestic species will be crucial in achieving a more complete epidemiological assessment and implementing control measures and more effective treatments.

Isolation and PCR

The most commonly used agar for isolating *C. difficile* from feces is the CCFA agar (cycloserine cefoxitin fructose agar) (DELMEÉ, 2001). Several modifications of CCFA agar have been proposed over the years. Of these modifications, the addition of taurocholate to CCFA (TCCFA) has proven to be effective at improving the recovery of *C. difficile* spores (RAMIREZ et al., 2010). Another approach commonly used to improve the isolation of *C. difficile* is alcohol shock prior to plating. Alcohol shock increases the sensitivity of the isolation by eliminating the vegetative forms and other bacteria present in the feces while allowing the *C. difficile* spores to persist (BORRIELLO & HONOUR, 1981). According to SONGER & UZAL (2005), some strains cannot grow because they are sensitive to one or both of the antibiotics used in the selective medium.

C. difficile colonies are easily recognizable by their morphology, which includes an aspect known as "ground glass", and gram-positive rods with subterminal spores can be observed with a Gram stain (Figure 1A and 1B). However, in addition to a presumptive diagnosis based on colony and Gram stain morphology, additional tests are required to confirm its identity. Currently, the polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used technique for identity confirmation. In addition to confirming identity, most

techniques also detect the genes encoding toxin A (*tedA*), toxin B (*tedB*) and additional virulence factors such as the binary toxin (*cdtB*) (SILVA et al., 2011).

Because *C. difficile* can be a normal inhabitant of the intestinal microbiota, simply isolating the microorganism does not confirm the disease in humans or domestic animals. Thus, isolation is only used in epidemiological investigations and to assess the antibiotic sensitivity of the microorganism. However, recent studies have shown that evaluating the *in vitro* production of toxins A/B by the strain (a technique known as toxigenic culture, or TC) after isolation yields a relatively high correlation to disease occurrence (KEESSEN et al., 2011). Thus, many studies have supported TC as the “gold standard” for diagnosis in some species (KEESSEN et al., 2011). In general, the technique has good sensitivity, but variable specificity. By all indications, this test would be an interesting test for screening, but, like the CTA, TC is labor intensive and requires a relatively long time (at least 72 hours) to obtain results.

Other diagnostic options still unavailable in Brazil include the commercial real-time PCR (rPCR) kits for detecting the *tedB* gene from DNA extracted directly from the feces. The rPCR technique has not been evaluated in horse samples, but reports suggest that rPCR has a high sensitivity for human and pig samples (SCHMIDT et al., 2009; KEESSEN et al., 2011). Conversely, specificity has been widely discussed because of the possibility of asymptomatic carriers, which would generate false positives. The current proposal is to use rPCR as a primary screening method and CTA, TC or commercial ELISA kits to confirm positive results (KEESSEN et al., 2011).

In Brazil, *C. difficile* infections are currently diagnosed by detecting the A/B toxins with a CTA or ELISAs. In addition, a histopathological evaluation has proven to be an essential auxiliary tool to confirm the presence of the disease in pigs or, in cases of death, horses. For pigs, obtaining multiple samples from a suspected farm appears to significantly increase the sensitivity of ELISA kits that have a low sensitivity but high specificity (KEESSEN et al., 2011). In any case, studies evaluating the commercially available Brazilian ELISA kits are essential in determining which kits are suitable for diagnostics and which are the most suitable for each domestic species.

Treatment and control of *C. difficile* infections

Because *C. difficile* vaccines are not currently available, the control of *C. difficile* infections in domestic animals is based on general management measures. *C. difficile* spores can remain viable for long

periods of time and are resistant to most disinfectants, thus permitting *C. difficile* to become a major environmental contaminant, especially in hospitals (BUGGY et al., 1983). Reducing environmental contamination and dissemination is essential, and two strategies of paramount importance are the correct use of products containing active chlorine and proper hand hygiene. Isolating suspect horses and dogs is also essential. It is also important to note that using alcohol gels on the hands to eliminate the spores of this microorganism is ineffective (MACLEOD-GLOVER & SADOWSKI, 2010).

In humans, a toxoid vaccine aimed at preventing *C. difficile*-associated diarrhea is in the final phase of testing and has shown great potential (GREENBERG et al., 2012). Unfortunately, the same cannot be said for domestic animals, as few studies have evaluated the immunity of horses and pigs against *C. difficile* and its toxins. Another alternative that may be used for prevention and treatment in the future is the administration of non-toxigenic *C. difficile* strains. Experiments have demonstrated that humans and animals that have been previously colonized by these strains have a lower chance of being infected by a toxigenic strain and developing diarrhea (SILVA et al., 2011). Since the publication of these reports, other studies have evaluated the potential of administering non-toxigenic *C. difficile* strains orally, with encouraging results reported in humans and pigs (SONGER et al., 2010).

Until now, there is no work evaluating the susceptibility of Brazilians' isolates from animals to commonly used antimicrobials. Studies examining the antimicrobial sensitivity of *C. difficile* strains isolated from pigs in EUA suggest that tiamulin, virginiamycin and tylosin, which are included in animal feed, may be useful in prophylaxis or therapy (SONGER & ANDERSON, 2006). In horses and dogs, it is recommended that for diarrheic animals, in addition to basic support therapy, the infection-causing antibiotic be immediately replaced by metronidazole, the first-choice drug, or vancomycin (BÄVERUD, 2004).

REFERENCES

- BALASSIANO, I.T. et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v.15, n.3, p.61-64, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154793>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.12.007.
- BÄVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary Quarterly*, v.24, n.4, p.203-219, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540137>>. Accessed: nov 2, 2012.

- BÄVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. **Veterinary Clinics of North American Equine Practice**, v.20, n.3, p.615-630, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519822>>. Accessed: nov 2, 2012.
- BORRIELLO, S.P.; HONOUR, P. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. **Journal of Clinical Pathology**, v.34, n.10, p.1124-7, 1981. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7031097>>. Accessed: nov 2, 2012.
- BUGGY, B.P. et al. Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.2, p.348-52 1983. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6619285>>. Accessed: nov 2, 2012.
- CHOUICHA, N.; MARKS, S.L. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.182-188, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16617699>>. Accessed: nov 2, 2012.
- CLOOTEN, J. et al. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.209-214, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164560>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.11.013.
- COLLINI, P.J. et al. *Clostridium difficile* infection in HIV-seropositive individuals and transplant recipients. **Journal of Infection**, v.64, n.2, p.131-147, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178989>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.jinf.2011.12.003.
- CRUZ JUNIOR, E.C.C. **Diagnóstico de enteropatógenos em leitões até sete dias de idade**. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, n.8, p.411-416, 2001. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591203>>. Accessed: nov 2, 2012.
- EHRLICH, M. et al. Acute diarrhea in horses of the Potomac River area: examination for clostridial toxins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, n.4, p.433-435, 1984. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6469842>>. Accessed: nov 2, 2012.
- GREENBERG, R.N. et al. Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine. **Vaccine**, v.30, n.13, p.2245-9, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306375>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.065.
- HALL, I.C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants. **American Journal of Diseases of Children**, v.49, p.390-402, 1935.
- HOPMAN, N.E. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. **Veterinary Microbiology**, v.149, n.1, p.186-192, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111541>>. Accessed: nov 2, 2012.
- JHUNG, M.A. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. **Emerging Infectious Disease**, v.14, n.7, p.1039-1045, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598622>>. Accessed: nov 2, 2012.
- JONES, M.A., HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. **Veterinary Record**, v.112, n.11: p.253, 1983. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6845597>>. Accessed: nov 2, 2012.
- KEEL, M.K.; SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. **Veterinary Pathology**, v.43, n.3, p.225-40, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672570>>. Accessed: nov 2, 2012.
- KEEL, M.K. et al. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.1963-1964, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1933037>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1128/JCM.00224-07.
- KEESSEN, E.C. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.5, p.1816-1821, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411571>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1128/JCM.00242-11.
- KUIJPER, E.J. et al. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.20, n.8, p.528-534, 2001. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11681431>>. Accessed: nov 2, 2012.
- LIPPKE, R.T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.6, p.505-510, 2011.
- LYERLY, D.M. et al. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n.1, p.1-18, 1988. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3144429>>. Accessed: nov 2, 2012.
- MACLEOD-GLOVER, N.; SADOWSKI, C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. **Canadian Family Physician**, v.56, n.5, p.417-423, 2010. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463269>>. Accessed: nov 2, 2012.
- MEDINA-TORRES, C.E. et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.212-215, 2010. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570780>>. Accessed: nov 2, 2012.
- NORMAN, K.N. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.16, p.5755-5760, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724899>>. Accessed: nov 2, 2012.
- OLDFIELD, E.C. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: risk factors, diagnostic methods, and treatment. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, v.4, n.4, p.186-195, 2004.

- Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580153>>. Accessed: nov 2, 2012.
- POST, K.W. et al. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, n.3, p.258-259, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033686>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1177/104063870201400314.
- PREIS, I.S. et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5, n.1, p.7-11, 2012.
- RAMIREZ, N. et al. Kinetic evidence for the presence of putative germination receptors in *Clostridium difficile* spores. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.16, p.4215-4222, 2010. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562307>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1128/JB.00488-10.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A. Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*. **Veterinary Microbiology**, v.124, n.2, p.166-172, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17481830>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.016.
- RUPNIK, M. et al. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.113-117, 2005. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673503>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1099/jmm.0.45810-0.
- SAMIE, A. et al. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdtA*, *cdtB*), and *tcdC* genes in Vhembe District, South Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.4, p.577-585, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385352>>. Accessed: nov 2, 2012.
- SCHMIDT, M.L. et al. *Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible? **Anaerobe**, v.6, p.270-273, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853666>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.10.005.
- SCHWAN, C. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. **PLoS Pathogens**, v.5, n.10, e1000626, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834554>>. Accessed: nov 2, 2012.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. **Ciência Rural**, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2013. In press.
- SILVA, R.O.S. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p. 498-500, 2012.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.399-404, 2010. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19402980>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.003.
- SONGER, J.G. et al. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.5, p.819-821, 2009. Available from: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/5/08-1071.htm>>. Accessed: nov 2, 2012.
- SONGER, J.G. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxicogenic organisms. **Veterinary Microbiology**, v.124, n.3-4, p.358-361, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493774>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.019.
- SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal Health Research Reviews**, v.5, n.2, p.321-326, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984348>>. Accessed: nov 2, 2012.
- SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.6, p.528-536, 2005. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475510>>. Accessed: nov 2, 2012.
- SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. **Anaerobe**, v.12, n.1, p.1-4, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701605>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.anaerobe.2005.09.001.
- STRUBLE, A.L. et al. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.342-347, 1994. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7948204>>. Accessed: nov 2, 2012.
- UZAL F.A. et al. *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. **Veterinary Microbiology**, v.156, n.4, p.395-402, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177970>>. Accessed: nov 2, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.11.023.
- WEESE, J.S. et al. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, n.4, p.332-336, 2000. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907862>>. Accessed: nov 2, 2012.
- YAEGER, M. J. et al. 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**, v.19, n.1, p.52-59, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459832>>. Accessed: nov 2, 2012.

An outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets in Brazil

Surto de diarreia por *Clostridium difficile* em leitões no Brasil

Rodrigo Otávio Silveira Silva¹; Carlos Augusto Oliveira Junior²;
Adrienny Trindade Reis Costa³; Amanda Nádia Diniz²; Monique da Silva Neves²;
Francisco Carlos Faria Lobato^{4*}

Abstract

In spite of the substantial role of *Clostridium difficile* in causing diarrhea in piglets, there have been few reports of the disease caused by this bacterium in Rio Grande do Sul, Brazil. In this paper, we describe an outbreak of *C. difficile*-associated diarrhea in a pig farm in Brazil. The diarrhea rate increased in piglets 1-to-7 days old from an average of 2% to approximately 20%. Necropsied piglets showed mesocolon edema, and in a histological evaluation, severe necrotizing neutrophilic colitis was observed. The intestinal contents were positive for the A/B toxins of *C. difficile* and negative for other tested enteropathogens. The association between the clinical signs, *post mortem* findings and laboratory exams confirmed the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. The present report confirms *C. difficile* as a pathogen in swine in Brazil and highlights the need for up to date routine laboratory protocols for the diagnosis of this disease in swine.

Key words: Neonatal diarrhea, colitis, enteritis

Resumo

Apesar da crescente importância de *Clostridium difficile* como causador de diarreia em leitões, são escassos os estudos e relatos da doença no Brasil. O objetivo do presente trabalho é descrever um surto de diarreia por *C. difficile* em uma granja localizada no Rio Grande do Sul, Brasil. A frequência de diarreia em leitões com até 7 dias de vida aumentou de uma média de 2% para aproximadamente 20%. Leitões necropsiados apresentavam edema de mesocólon e, na avaliação histopatológica, uma colite neutrofílica necrotizante severa foi observada. O conteúdo intestinal foi positivo para as toxinas A e B e negativo para outros patógenos pesquisados. A associação dos sinais clínicos, achados *post mortem* e resultados dos exames laboratoriais permite confirmar o diagnóstico de diarreia por *C. difficile*. O presente relato confirma *C. difficile* como um patógeno de suínos no Brasil e destaca a necessidade de inclusão desse enteropatógeno no diagnóstico laboratorial para as diarreias em leitões.

Palavras-chave: Diarreia neonatal, colite, enterite

¹ Médico Veterinário, Discente de Doutorado em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com

² Médicos Veterinários, Discentes de Mestrado em Ciência Animal, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. E-mail: carlos.dirgel@hotmail.com; amanda.ndiniz@gmail.com; moniquesn2005@yahoo.com.br

³ Médico Veterinário. Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas Ltda, Belo Horizonte, Brasil. E-mail: adrienny@ipeve.com.br

⁴ Médico Veterinário, Prof. Titular, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. E-mail: lobato.francisco@yahoo.com.br

* Author for correspondence

Introduction

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, Gram-positive bacillus that has been recognized as an important bacterial pathogen in both humans and animals. It may be responsible for 95% of all pseudomembranous colitis cases and most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans (SCHWAN et al., 2009). In swine, it is considered to be the most important cause of diarrhea in piglets in EUA (SONGER; ANDERSON, 2006), and some reports have raised the possibility that *C. difficile* acts as a zoonotic agent (ARROYO; STAEMPFLI; WEESE, 2007).

Brazil is currently the third largest producer of pork in the world, with a flock of approximately 39 million animals (IBGE, 2010). Despite this high production, little is known about the occurrence of *C. difficile* infection in piglets. Recently, the occurrence of the disease was confirmed by survey studies (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011); additionally, a prevalence study about the most important enteric pathogens in swine suggested that *C. difficile* is one of the main causes of neonatal diarrhea in piglets in Brazil (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2013). Despite the increased importance of *C. difficile* as a swine pathogen, until now, there has been no description of an outbreak of the disease in piglets in Brazil. Therefore, the aim of this paper is to describe an outbreak of neonatal diarrhea caused by *C. difficile* at a pig farm in Brazil.

Case Report

The farm is located in Gaurama, Rio Grande do Sul state, Brazil. It is a large-scale commercial breed with 2000 sows and followed an all-in-all-out indoor production flow. The pigs were housed in bins that were cleaned and disinfected before the next set of pigs was placed in them.

In December of 2011, the farm owner reported an increase in the occurrence of diarrhea, mainly in 1- to 3-day-old piglets, with a reduction in weight

gain but with a low mortality rate (approximately 1.5%). According to the farm records, the diarrhea rate increased in piglets 1-to-7 days old from an average of 2% to between 19 and 23% in the last three months. Despite the use of a vaccine (the alpha and beta toxins of *C. perfringens* and enterohemorrhagic *Escherichia coli*), the incidence of diarrhea did not decrease.

In the farm, 18 diarrheic and two apparently healthy piglets (n=20), from different litters and between 1 and 7 days old, were euthanized by electrocution and exsanguinated. All macroscopic lesions were recorded, and stool samples from seven animals (two apparently healthy and five diarrheic) were collected directly from the rectum and stored at 4°C for up to 48 hours. In addition, two diarrheic piglets were selected, and samples of the jejunum, ileum, cecum and colon were fixed in 10% buffered formalin for histological assays.

Stool samples were submitted to coccidian oocyst detection by the flotation method (HOFFMANN, 1987), rotavirus detection by polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining (HERRING et al., 1982), isolation of *C. perfringens* and *C. difficile* (SILVA et al., 2011; VIEIRA et al., 2008) and routine bacteriologic culture for aerobic bacteria in MacConkey agar (Biobrás®, Prodimol Biotechnology) and Muller-Hinton agar supplemented with 5% of equine blood (Difco Laboratories, Detroit, USA). For A/B toxin detection, a cytotoxicity assay method (CTA) was used with African green monkey kidney cells (Vero-ATCC CCL 81) (VAN DER BERG et al., 2005).

Results and Discussion

In the *post mortem* examination, 18 out of 20 piglets (16 diarrheic and two that appeared to be healthy) had mesocolon edema. Of these, samples from two diarrheic piglets were subjected to histological evaluation, revealing severe necrotizing neutrophilic colitis with intense infiltration of neutrophils from the lamina propria to the intestinal lumen.

The parasitological exam was negative for oocysts, and only *E. coli* was obtained in the routine bacteriologic culture of the stool samples. Using a previously described PCR method for the detection of *E. coli* virulence factors (MACÊDO et al., 2007) it was determined that all isolated strains were not enterotoxigenic. *C. perfringens* type A was isolated from one diarrheic and one non-diarrheic piglet, but both strains were negative for the beta-2 toxin gene, which is a known virulence factor previously associated with *C. perfringens* diarrhea in piglets (SCHOTTE; TRUYEN; NEUBAUER, 2004).

Seven of the stool samples were positive for the A/B toxins by the cytotoxicity assay using Vero cells. In addition, *C. difficile* was isolated from three samples, two from diarrheic piglets and one from a non-diarrheic piglet, and all strains were positive by PCR for the toxin A (*tdcA*) and B (*tdcB*) genes but were negative for the binary toxin gene (*cdtB*). The minimal inhibitory concentration (MIC) of these three isolates was determined by the agar dilution method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011). All isolates were susceptible to metronidazole, vancomycin, oxytetracycline and florfenicol, whereas the isolates showed an intermediate sensitivity to lincomycin and penicillin and resistance to erythromycin and tylosin.

In the present work, 18 out of 20 piglets, including two that appeared to be healthy, displayed a mesocolon edema, which is considered the main *post mortem* alteration associated with *C. difficile* infection (CDI) (YAEGER; KINYON; SONGER, 2007). Despite the mesocolon edema and the diarrheic content of some animals, no other relevant alterations were observed, which is common for CDI in piglets. Other reported signs, such as hydrothorax, respiratory distress, scrotal and facial edema and even sudden death, can also occur but are rare (SONGER; UZAL, 2005). In addition to this macroscopic lesion, the two diarrheic piglets that were submitted to a histological evaluation showed neutrophilic colitis, a common histological

alteration attributed to *C. difficile*-associated disease (YAEGER; KINYON; SONGER, 2007).

Despite the known association between these macro- and microscopic alterations and the occurrence of CDI in piglets, these factors could not unequivocally confirm the diagnosis, which required the detection of A/B toxin, commonly performed by cell culture (the “gold-standard”) or by ELISAs (DELMÉE, 2001). In some cases, the association between isolates and the detection of toxin genes may also be useful. In the present report, all of the aforementioned assays were conducted and the A/B toxins were detected by a cytotoxicity assay in all samples tested, including the two from the non-diarrheic piglets. Toxigenic strains of *C. difficile* were recovered from three animals.

It is interesting to note that three of the piglets were positive for A/B toxin detection but were negative for *C. difficile* isolation. This result corroborates previous studies with piglets and other domestic species (BÅVERUD et al., 2003; CLOOTEN et al., 2008; SILVA et al., 2011) and may be due to the susceptibility of some *C. difficile* strains to one or both of the antibiotics used in the medium (SONGER; UZAL, 2005). The detection of A/B toxins in non-diarrheic piglets is also a previously reported event. According to Yaeger, Kinyon and Songer (2007), the absence of diarrheic content in the colon does not exclude the possibility of infection, and once in piglets, the CDI commonly causes a subclinical disease.

In the present work, 18 out of 20 necropsied animals showed mesocolon edema, while all stool samples tested were positive for A/B toxins. According to Songer (2004), at farms with CDI, approximately 30% of the piglets are positive for A/B toxin, but it can reach 100% in rare cases. Considering that CDI is commonly a subclinical disease in piglets (YAEGER; KINYON; SONGER, 2007), the high incidence of diarrhea (approximately 20%) is an interesting feature of this case. It is also important to note that no other enteropathogens

were detected, and all piglets sampled were positive for A/B toxins. This high diarrhea rate, which was associated with *post mortem* alterations and laboratorial assay results, suggests an outbreak of *C. difficile* diarrhea in this farm.

Currently, CDI is considered the most important cause of diarrhea in neonatal piglets in EUA (SONGER; ANDERSON, 2006). On the other hand, little is known about the prevalence of this disease in all of Latin America. Until now, only two reports were conducted in Brazil and both showed a prevalence of approximately 16% in piglets (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011). It is also interesting to note that, according to Silva et al. (2011), 53% of the sampled farms had at least one animal positive for A/B toxins, suggesting a high dissemination of the disease in Brazilian farms. In light of this, similar to reports in EUA and Europe, this entire work has indicated that *C. difficile* is an important enteropathogen in swine in Brazil and the need for more studies regarding the prevention and control of this disease.

All *C. difficile* isolates in the present report were susceptible to metronidazole and vancomycin, which are commonly used antibiotics for the treatment of CDI in humans and horses (BÅVERUD, 2004; SPIGAGLIA; BARBANTI; MASTRANTONIO, 2011). These results are similar to previous studies in various species (MARKS; KATHER, 2003; BÅVERUD et al., 2003; SPIGAGLIA; BARBANTI; MASTRANTONIO, 2011), and at present, metronidazole-resistant isolates have been found only in humans and horses (JANG et al., 1997; MAGDESIAN, et al. 2006). Likewise, all *C. difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline and florfenicol. It is also interesting to note that oxytetracycline was one of the compounds commonly used in this farm. A wide range of susceptibilities to tetracycline is commonly reported in *C. difficile* isolates from swine, but in general, nearly all isolates are susceptible (POST; SONGER, 2004). No data regarding the MIC of florfenicol were found for the *C. difficile* isolates from swine.

All of the *C. difficile* strains showed an intermediate susceptibility to penicillin and lincomycin. The resistance of human and animal *C. difficile* isolates to penicillin was also previously reported (BÅVERUD, 2004; SILVA et al., 2012; SPIGAGLIA; BARBANTI; MASTRANTONIO, 2011). It is also important to note that, according to Båverud (2002), beta-lactams are commonly implicated in *C. difficile*-associated diarrhea after antibiotic treatment in foals and horses.

The resistance to erythromycin and tylosin, both macrolides, was not a surprise and corroborates previous works with *C. difficile* isolates from other sources, including humans (DELMÉE; AVESANI, 1988; SPIGAGLIA, BARBANTI; MASTRANTONIO, 2011). It is known that *Clostridium* species can carry the *ermQ* gene, which encodes for an erythromycin resistance methylase (SLAVIĆ et al., 2011). Studies examining the antimicrobial sensitivity of *C. difficile* strains isolated from piglets suggest that tylosin, which is included in animal feed, may be useful in prophylaxis or therapy, but similar to our findings, some strains were also resistant (SONGER; ANDERSON, 2006). It is noteworthy that tylosin was also commonly used in the pigs feed of this farm. Nevertheless, the MIC results must be interpreted with caution, as most *C. difficile* isolates from cases of antimicrobial-induced CDI in humans were susceptible to the implicated drug (DZINK; BARTLETT, 1980), suggesting that successful antibiotic therapy is most likely dependent on both the susceptibility of *C. difficile* and other components of the enteric microbiota (BÅVERUD et al., 2003).

Because *C. difficile* vaccines are not currently available in Brazil, the control of *C. difficile* infections in domestic animals is based on general management measures (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2013). Recently, some reports raised the possibility that *C. difficile* is a zoonotic agent (ARROYO; STAEMPFLI; WEESE, 2007). More studies are needed for confirmation, as, until this moment, no evidence for transmission between

humans and animals was found (MCNAMARA et al., 2011). If this suspicion is confirmed, preventing the disease (and even preventing colonization) in domestic animals should be made a priority (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2013).

The association of the macroscopic and microscopic alterations and laboratory results confirmed the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. This report reveals the possibility of an underestimated incidence of diarrhea caused by this agent in piglets in Brazil and highlight the possibility of outbreaks of the *C. difficile*-associated diarrhea in piglets, which is consider a rare presentation of the disease.

Acknowledgments

This work was supported by funds from FAPEMIG, CAPES, INCT-Pecuária e CNPQ and PRPq-UFMG.

References

- ARROYO, L. G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J. S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 179-183, 2007.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: Infection control in horses. *Veterinary Clinics of North American: Equine Practice*, Filadélfia, v. 20, n. 3, p. 615-630, 2004.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary Quartely*, Boston, v. 24, n. 4, p. 203-219, 2002.
- BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; ASPÁN, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile*: Prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Veterinary Journal*, Newmarket, v. 35, n. 5, p. 465-471, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. *Performance standards for antimicrobial suceptibility testing*. Wayne, Pennsylvania: Twenty-first Information Supplement, CLSI M100-S21, 2011.
- CLOOTEN, J.; KRUTH, S.; ARROYO, L.; WEESE, J. S. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 209-214, 2008.
- DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection*, Bruxelas, v. 7, n. 8, p. 411-416, 2001.
- DELMÉE, M.; AVESANI, V. Correlation between serogroup and susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Londres, v. 22, n. 3, p. 325-331, 1988.
- DZINK, J.; BARTLETT, J. G. *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 17, n. 4, p. 695-698, 1980.
- HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.
- HOFFMANN, R. P. *Diagnóstico de parasitismo veterinário*. Porto Alegre: Sulina, 1987. 379 p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. *Produção pecuária nacional*. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2010.
- JANG, S. S.; HANSEN, L. M.; BREHER, J. E.; RILEY, D. A.; MAGDESIAN, K. G.; MADIGAN, J. E.; TANG, Y. J.; SILVA JUNIOR, J.; HIRSH, D. C. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clinical Infection Disease*, Chicago, v. 25, n. 2, p. 266-267, 1997.
- LIPPKE, R. T.; BOROWSKI, S. M.; MARQUES, S. M. T.; PAESI, S. O.; ALMEIDA, L. L.; MORENO, A. M.; CORBELLINI, L. G.; BARCELLOS, D. E. S. N. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, v. 31, n. 6, p. 505-510, 2011.
- MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGE, A. P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R. M. C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, p. 1117-1123, 2007.

- MAGDESIAN, K. G.; DUJOWICH, M.; MADIGAN, J. E.; HANSEN, L. M.; HIRSH, D. C.; JANG, S. S. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Nova York, v. 228, n. 5, p. 751-755, 2006.
- MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 39-45, 2003.
- MCNAMARA, S. E.; ABDUJAMILOVA, N.; SOMSEL, P.; GORDONCILLO, M. J.; DEDECKER, J. M.; BARTLETT, P. C. Carriage of *Clostridium difficile* and other enteric pathogens among a 4-H avocational cohort. *Zoonoses Public Health*, Berlin, v. 58, n. 3, p. 192-199, 2011.
- POST, K. W.; SONGER, J. G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe*, Londres, v. 10, n. 1, p. 47-50, 2004.
- SCHOTTE, U.; TRUYEN, U.; NEUBAUER, H. Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors - a review. *Journal Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases Veterinary Public Health*, Berlin, v. 51, n. 10, p. 423-426, 2004.
- SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T.; VAN HAM, M.; ROHDE, M.; HARDT, W. D.; WEHLAND, J.; AKTORIES, K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLOS Pathogens*, Califórnia, v. 5, n. 10, p. 1-14, 2009.
- SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. C.; LOBATO, F. C. F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 73-80, 2013.
- SILVA, R. O. S.; MOREIRA, F. M.; REZENDE, J. V.; PIRES, P. S.; MARANHÃO, R. P. A.; PALHARES, M. S.; LOBATO, F. C. F. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 498-500, 2012.
- SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; CRUZ JÚNIOR, E. C. C.; PIRES, P. S.; SANTOS, R. L. R.; ASSIS, R. A.; GUEDES, R. M. LOBATO, C.; F. C. F. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1130-1135, 2011.
- SLAVIĆ, D.; BOERLIN, P.; FABRI, M.; KLOTINS, K. C.; ZOETHOUT, J. K.; WEIR, P. E.; BATEMAN, D. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Ottawa, v. 75, n. 2, p. 89-97, 2011.
- SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, Wallingford, v. 5, n. 2, p. 321-326, 2004.
- SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Califórnia, v. 17, n. 6, p. 528-536, 2005.
- SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, Londres, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2006.
- SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Londres, v. 66, n. 10, p. 2227-2234, 2011.
- VAN DEN BERG, R. J.; VAN COPPENRAET, L. S. B.; GERRITSEN, H. J.; ENDTZ, H. P.; VAN DER VORM, E. R.; KUIJPER, E. J. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, n. 10, p. 5338-5340, 2005.
- VIEIRA, A. A. S.; GUEDES, R. M. C.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O. S.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 513-516, 2008.
- YAEGER, M. J.; KINYON, J. M.; SONGER J. G. 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*, Califórnia, v. 19, n. 1, p. 52-59, 2007.



Case report

Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal

Ingred S. Preis¹, Rodrigo O. S. Silva¹, Prhiscylla S. Pires¹, Francisco C. F. Lobato¹,
Maristela S. Palhares¹, Renata P. A. Maranhão¹, Roselene Ecco^{1*}

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

* Corresponding Author: Roselene Ecco^{1*} Avenida Antônio Carlos, 6627. São Francisco.
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP 30123-970. Email ecco@vet.ufmg.br

Submitted December 6th 2011, Accepted February 27th 2012

Abstract

A twelve-day-old foal was admitted to the Veterinary School of UFMG with profuse diarrhea. The animal was treated with several medications, including antibiotics. Despite the clinical care, the clinical condition did not improve. Due to poor prognosis, the foal was euthanized. Gross and histopathological examinations, showed pseudomembranous and/or membranous glossitis, esophagitis and gastritis with intense amount of pseudohyphae and blastoconidia compatible with *Candida* spp. Also, fibrinous and necrotizing typhlocolitis was observed. *Clostridium difficile* was isolated from intestinal contents which were also positive for toxins A/B by ELISA. Using a multiplex-PCR assay, genes encoding toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) were detected. The severe lesions caused by *Candida* in this foal probably occurred due to changes in the microbiota induced by the treatment with antibiotics. However, the possibility of an acquired immunodeficiency cannot be excluded because information about quantity and quality of the colostrum ingested by this foal was not obtained.

Key Words: Foal, *Clostridium difficile*, enteritis, candidiasis, gastritis.

Introduction

Diarrhea is one of the more common conditions in foals that require veterinary intervention. Approximately 80% of the foals will have at least one episode of diarrhea during the first six months of life. Many infectious agents have been reported to cause diarrhea in foals, including *Clostridium* (*C.*) *difficile* and multiple *Salmonella* spp (10). *C. difficile* is a Gram-positive anaerobic bacterium that causes colitis in several species including horses worldwide (19). In many species, including humans, antibiotics therapy appears to be a major factor leading to infections by *C. difficile*, (22) but in foals, *C. difficile*-associated diarrhea can also occur in the absence of antimicrobial therapy (2). The small intestine and colon of diseased foals may be hemorrhagic and have patchy mucosal erosions or ulcers, with exudation of fibrin and adhered ingesta. Marked necrosis of the epithelium with

adherent gram-positive, rod-shaped bacteria is observed on histology. Colitis has been reported, but such cases apparently are rare (15). Fungal infections are commonly opportunistic and arise from the microbiota (4). Members of the *Candida* genus are ubiquitous fungi found on many plants and are considered part of microbiota of the alimentary tract, upper respiratory tract, and genital mucosa of mammals (11). *Candida* spp are dimorphic fungi that are often identified as small ovoid yeasts that reproduce by budding. *Candida* (*C.*) *albicans* is the most common species isolated from healthy and sick humans and animals. Others common species include *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. famata* (7) and *C. guilliermondii* (17). Infection by *Candida*, particularly *C. albicans*, has been associated with gastric and/or esophageal ulceration in humans, foals, swine, kangaroos and dolphins (12). The oral candidiasis occurs most commonly in foals, swine, and dogs. It involves the

proliferation of yeasts and hyphae in the parakeratotic superficial layers of the oral epithelium. It appears grossly as patchy pale-gray pseudomembranous material on the oral mucosa and back of the tongue (5). Birds are affected more frequently with *Candida* than mammals and the lesions occur mainly in the oral cavity, esophagus, crop and ventriculus (1). This report describes a case of opportunistic fungal (candidiasis) infection in a foal with enteritis caused by *C. difficile*.

Case report

A twelve-day-old female Mangalarga foal was presented to a local veterinarian with a four days history of diarrhea, purulent conjunctivitis and hypopyon. The animal was treated with eye drops containing chondroitin sulfate "A" and ciprofloxacin. In addition to the ocular medication, florfenicol (Zelotril®), enrofloxacin (Nuflor®), flunixin meglumine (Niglumine®), butylscopolamine bromide (Buscopan®) were administered. Five days later, the foal was admitted to the Veterinary Hospital. Clinically, the foal was weak, with prominent loss of body condition. The animal also had mild fever (40 Celsius degree), severe dehydration, prominent intestinal hypermotility, and greenish diarrhea. At this time, as the primary suspected disease was salmonellosis, the foal was treated with intravenous fluid therapy, and identical intramuscular antibiotics, anti-inflammatory and anti-spasmodic medication used by the local veterinarian. In addition, an adsorbent (activated charcoal), vitamin B1 (cobalamin®) and probiotics were administered to the foal. Despite the intensive care, the clinical condition did not improve. Fibrinous pseudomembranes were recovered from the diarrheic feces. Eleven days after the onset of the disease, the foal was hypothermic. Due to an unfavorable prognosis, the foal was euthanized and a necropsy performed.

At necropsy, the foal was in poor body condition. In the anterior chamber of the right ocular bulb, there was a small quantity of fibrin. On the dorsal and ventral surfaces of the tongue and on the mucosa of the esophagus, multifocal to coalescing friable creamy white plaques weakly adhered (pseudomembranous material) to the mucosa were observed. In addition, there were multifocal ulcerated areas (0.3 -1.0 cm of diameter) on the mucosa of the esophagus. The squamous stomach mucosa was diffusely thickened, with a grayish-white and friable membrane that was easily detached (Fig. 1). The mucosa of the small intestine, cecum and colon was hyperemic and edematous. Multiple small ulcerations (0.5 cm of diameter) were observed in the cecum and large colon (Fig. 2). In addition to the small ulcers, multiple fibrinous pseudomembranes were adhered to the mucosa.

Tissue samples were collected for histopathological and bacteriological examination. Contents of the large intestine, jejunum and ileum were collected for aerobic and anaerobic bacterial culture and

isolation. For *C. difficile* toxins A/B detection from the intestinal contents, two assays were used: a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Ridascreen *C. difficile* toxins A/B, R-Biopharm, Darmstadt, Germany) and the detection of cytotoxic effect in Chinese-Ovary-Hamster (CHO) cells as previously described by Schleupner et al. (20).



Figure 1 – Increased thickness of nonglandular mucosa and a diffuse grayish-white pseudomembrane, which was easily detached.



Figure 2 – Cecum, foal. A pseudomembrane of fibrin was removed and revealed the mucosa diffusely edematous with reddish areas associated with multifocal erosions.

The intestinal contents were positive for *C. difficile* toxins A/B by ELISA and a cytotoxic effect, neutralized by *C. sordellii* antiserum, was also detected in CHO cells. *C. difficile* was isolated in TCCFA agar (cycloserine-cefoxitin-fructose agar supplemented with 5% of horse blood and 0.1% of sodium taurocholate). Using a previously described multiplex-PCR assay (21), genes encoding toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) were detected, whereas the binary toxin gene (*cdtB*), an additional virulence factor of *C. difficile*, was not detected. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the agar dilution method, as recommended by the CLSI (8). The isolated strain was susceptible to metronidazole,

vancomycin, oxytetracyclin and lincomycin, whereas showed an intermediate sensitivity to penicillin and resistance to erythromycin and enrofloxacin. Culture for *Salmonella* spp and *C. perfringens* were negative.

For histology, lungs, heart, tongue, esophagus, stomach, intestines, lymph nodes, spleen, liver and kidney samples were fixed in 10% neutral formalin and routinely processed. Histological sections were cut at 5 microns and stained with hematoxylin and eosin (HE). Periodic acid-Schiff (PAS) special staining was also performed on sections of the tongue, esophagus, stomach and intestines.

Histopathology examination of the tongue disclosed multifocal moderate hyperkeratosis, and numerous blastoconidia (1.5 - 5 x 1.5 to 5 um) and pseudohyphae (5-10 x 2.5-7.5 um) were adhered to the stratified epithelium and among the layers of keratin. Also, involving the glossal surface was a focally extensive area of ulceration associated with an intense infiltration of neutrophils, cellular debris, and numerous bacterial colonies. In the esophagus, there was marked multifocal to coalescing membranous and pseudomembranous esophagitis with myriads of fungal organisms morphologically similar to those previously described. The non-glandular stomach was diffusely thickened due to hyperplasia of the squamous epithelium, and parakeratosis. Neutrophilic infiltrates were present throughout the parakeratotic regions (Fig. 3). In some areas, circumferential and lamellar keratinization of the squamous epithelium could be seen. Numerous blastoconidia and pseudohyphae were observed attached to the epithelium or within the ulcerated areas. The fungal structures were also observed among layers of keratin, neutrophils and debris. In many sections detachment of the ulcerated or eroded epithelium with pseudomembranes composed of keratin, debris, neutrophils and yeasts could be seen. Blastoconidia and pseudohyphae stained positively with Periodic acid-Schiff (PAS) and were morphologically consistent with yeasts organisms of *Candida* spp (Fig. 4). Compatible lesions in the cecum and large intestine with *C. difficile* infection were characterized by moderate to marked necrosis of the superficial epithelium, mild neutrophilic infiltration and many gram-positive bacilli. These lesions were seen especially in the large colon and cecum.

Discussion

Gross and histological lesions observed in the cecum and colon of this foal were suggestive of an infection with *C. difficile*. The laboratory diagnosis of *C. difficile* infection is based on the detection of toxin A and/or toxin B (9). In some cases, the association between bacterial isolation and toxin detection may be useful. In the present report, all of the common assays were conducted: the A/B toxins were detected by a commercial ELISA and by a cytotoxicity assay and *C. difficile* was isolated. Thus, compatible gross and histopathological changes in

combination with intralesional bacilli (confirmed by isolation) and toxin detection allowed the diagnosis of diffuse typhlocolitis caused by *C. difficile* in the foal. Fibrinous colitis with hemorrhage, edema and mild neutrophilic infiltration has been reported in foals (15, 16). In addition, deep ulcerative lesions, transmural venous infarction and colonic torsion were also described (16).

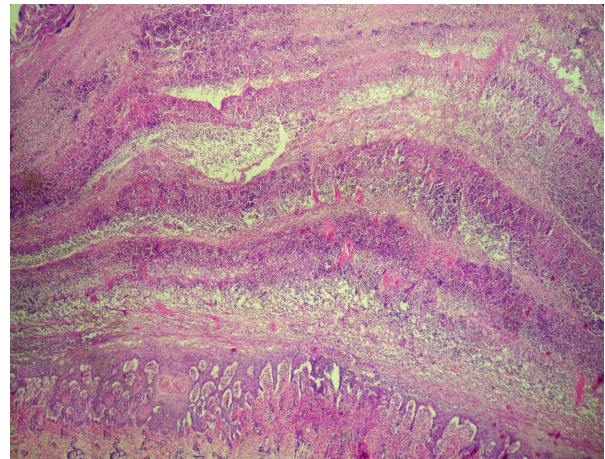


Figure 3 – Non-glandular stomach, foal. Marked parakeratotic hyperplasia of the epithelium in a lamellar pattern interposed by neutrophils and debris. An extensive focal area with circumferential and lamellar keratinization of the squamous epithelium could be seen. Hematoxylin and eosin staining. 200 x.

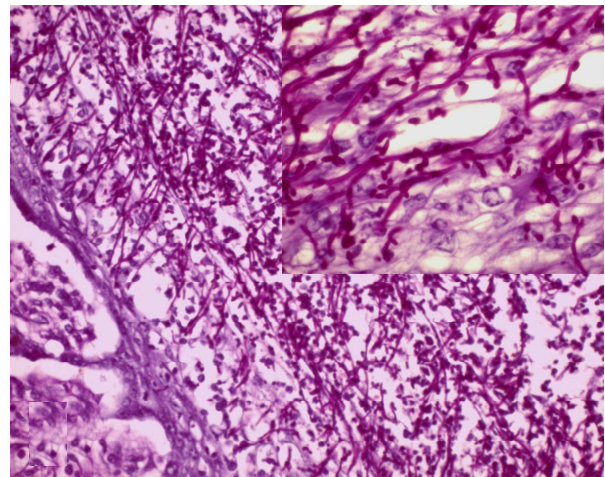


Figure 4 – Non-glandular stomach, foal. Numerous pseudohyphae stained in red are seen adhered to squamous cells. 200 x. Inset: Magnification of figure 4. Numerous blastoconidia stained in magenta. Periodic Acid-Schiff staining. 400 x.

In the present report, the *C. difficile* isolated strain was susceptible to metronidazole, vancomycin, oxytetracyclin and lincomycin. These results corroborate previous reports in foals (2, 13). Metronidazole and vancomycin are the first and second choice, respectively, for the treatment of *C. difficile* associated-diarrhea in foals.

Metronidazole-resistant strains of *C. difficile* are rare, but have been reported in American horses (13). The isolated strain also showed an intermediate sensitivity to penicillin and, according to Baverud et al. (2), previous use of beta-lactamic antibiotics are commonly associated with the onset of *C. difficile*-associated diarrhea in foals, mares and also in humans. *C. difficile* strains resistant to erythromycin or enrofloxacin are also common (2, 13). The resistance to erythromycin, likely occurs due to the presence of the *erm* gene, encoding for an erythromycin-resistant methylase (3). It is interesting to note that enrofloxacin was one of the antibiotics used during the treatment of the foal of this present report, what can explain at least partially the failure of the treatment.

The essential virulence factors of *C. difficile* are toxin A (*tcdA* gen) and toxin B (*tcdB* gen) which act directly on the mucosal epithelial cells. The toxins disrupt cell adhesion molecules and initiate an inflammatory cascade that can result in increasing damage to host tissues and exudation of fluid. A neurogenic effect of toxin A involving mast cell degranulation and excitation of submucosal plexuses also may contribute to diarrhea (15).

Infections caused by *Candida* spp are generally related to predisposing factors as immunodeficiency and/or therapy with antibiotics and glucocorticoids (18). The acquired form of immunodeficiency in foals can occur when there is a failure on passive transfer of colostral immunoglobulins. This cannot be excluded as a possible cause for the *Candida* spp infection in this foal since information regarding the quantity and quality of the colostrum ingested was not available. Multiple antibiotics can suppress or change the normal microbiota favoring the proliferation of *Candida* spp resident yeasts (6). Extensive therapy using antibiotic-corticosteroid combination can contribute significantly to the development of candidiasis (18). In a healthy individual, the presence of a normal intestinal microbiota keeps *Candida* species under control by competing for available glucose (5, 6). Virulence factors of *Candida* species include, among others, production of different hydrolytic enzymes and adhesins which allow the microorganism accession to the surface of the squamous epithelium (14). A few species of *Candida*, chiefly *C. albicans* can digest keratin *in vitro* in the presence of glucose. Electron microscopic studies have implicated mechanical as well as enzymatic factors on the invasion of the epithelium and traversing the stratum corneum (12).

Conclusion

Foals with bacterial infections in the respiratory tract and/or candidiasis in the digestive tract need further attention for passive or acquired immunodeficiency. The opportunistic fungal infection described can alert veterinarians and farm personnel toward management issues concerning the amount and quality of colostrum ingested and the use of multiple antibiotics. Reports

regarding prevalence or occurrence of *C. difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil were not found.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPEMIG, CNPq and CAPES.

References

1. AFIP. The Armed Forces Institute of Pathology. Department of Veterinary Pathology, Wednesday Slide Conference 2010-2011. Conference 7, case 3. Available from <http://www.afip.org/>. Accessed May 20, 2011.
2. BAVERUD, V. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. **Equine Vet. J.**, 2003, 35, 465-71.
3. BENNING, V.R., MATHERS J.J. Comparison of agar dilution and broth microdilution methods of anaerobic antimicrobial susceptibility testing using several veterinary antibiotics against *Clostridium perfringens* strains originating from porcine and avian sources. **Anaerobe**, 1999, 5, 561-569.
4. BYRNE, B.A. Laboratory diagnosis of fungal diseases. In: SELLON DC, LONG MT. **Equine infectious diseases**. Saunders Elsevier. pp. 385-393. 2007.
5. BROWN, C.C., BAKER, D.C., BAKER, I.K. Alimentary system. In: Maxie MG, editor. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Saunders Elsevier. pp. 01-296. 2007.
6. BRUIJN, C.M.; WIJNBERG, I.D. Potential role of *Candida* species in antibiotic-associated diarrhea in a foal. **Vet. Rec.**, 2004, 135, 26-28.
7. CARRILO, N.A. Candidiasis. In: SELLON DC, LONG MT. **Equine infectious diseases**. Saunders Elsevier. pp.406-408. 2007.
8. CLSI. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Test. Twenty-first Information Supplement, 2011, v.31, n.1.
9. DELMEÉ, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **Clinic. Microbiol. Infect.**, 2001, 8, 411-416.
10. FREDERICK, J.; GIGUÈRE, S.; SANCHEZ, LC. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008). **J. Vet. Intern. Med.**, 2009, 23, 1254-1260.
11. GINN, P.E., MANSELL, J.E.K.L., RAKICH, P.M. Skin and appendages. In: MAXIE MG, editor. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Saunders Elsevier. pp.553-781. 2007.
12. GROSS, T.L., MAYHEW, I.G. Gastroesophageal ulceration and candidiasis in foals. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, 1983, 182, 1370-1373.
13. JANG, S.S., HANSEN, I.M., BREHER, J.E., RILEY, D.A., MAGDESIAN, K.G., MADIGAN, J.E., TANG, Y.J., SILVA, J.Jr., HIRSH, D.C. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. **Clin. Infect. Dis.**, 25, Supl. 2, S266-267.
14. KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M., KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim. Pol.**, 2009, 56, 211-224.

15. KEEL, M.K., SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. **Vet Pathol.**, 2006, 43, 225-240.
16. MAGDESIAN, K.G., HIRSH, D.C., JANG, S.S., HANSEN, L.M., MADIGAN, J.E. Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993 – 1997). **JAMVA**, 2002, 220, 67 – 73.
17. MUELLER, R.S., BETTENAY, S.V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **Vet Rec.**, 2002, 150, 728-730.
18. MCCLURE, J.J., ADDISON, J.D., MILLER, R.I. Immunodeficiency manifested by oral candidiasis and bacterial septicemia in foals. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, 1985, 186, 1195-1197.
19. MEDINA-TORRES, C.E., WEESE, J.S., STAEMPFLI, H.R. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. **Vet. Microbiol.**, 2011, 152, 212-215.
20. SCHLEUPNER, M.A., GARNER, D.C., SOSNOWSKI, K.M., SCHLEUPNER, C.J., BARRETT, L.J., SILVA, E., HIRSCH, D., GUERRANT, R.L. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. **J. Clin. Microbiol.**, 1995, 33, 1755-1759.
21. SILVA, R.O.S., GUEDES, R.M.C., ASSIS, R.A., SANTOS, R.L.R., LOBATO, F.C.F. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. **Ciência Rural**. 2011, 41, 1430-1435.
22. THEAN, S., ELLIOTT, B, RILEY, T. *Clostridium difficile* in horses in Australia - a preliminary study. **J. Med. Microbiol.**, 2011, 60, 188-1192.

First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil

Primeiro relato de diarreia associada à *Clostridium difficile* em potros no Brasil

Rodrigo Otávio Silveira Silva¹ Felipe Moraghi Moreira¹ Jackeline Viana Rezende¹
Prhiscylla Sadanã Pires¹ Renata de Pino Albuquerque Maranhão¹ Maristela Silveira Palhares¹
Francisco Carlos Faria Lobato¹ *

- NOTE -

ABSTRACT

Despite of the substantial role of *Clostridium difficile* in causing diarrhea and colitis in foals, there have been no confirmed diagnoses of disease caused by this bacteria in Brazil. In this paper, we describe confirmed cases of colitis caused by *C. difficile* in two foals in Brazil. Two five-month-old foals with a five-day history of diarrhea after antibiotic treatment for a respiratory disease were treated at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais. *C. difficile* A/B toxins were detected, and toxigenic strains of *C. difficile* were isolated from the foals' feces. The treatment was based on fluid therapy and antibiotics (metronidazole and ceftiofur), and the animals experienced a gradual recovery. The association between the medical history, clinical signs, laboratory exam results and therapeutic success confirmed the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. The present report raises the possibility that *C. difficile* is also a pathogen in equines in Brazil and highlights the need for up to date routine laboratory protocols for the diagnosis of this disease.

Key words: colitis, equine, nosocomial diarrhea.

RESUMO

Apesar da importância de *Clostridium difficile* como agente causador de diarreia e colite em potros, inexistem relatos confirmados de tal doença no Brasil. O objetivo deste trabalho foi descrever dois casos confirmados de diarreia causados por *C. difficile* em potros, ocorridos em Minas Gerais, Brasil. Os animais, com cinco meses de idade, foram encaminhados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com histórico de cinco dias de diarreia após antibioticoterapia com penicilina para uma possível pneumonia. Ambos os animais foram positivos para detecção das toxinas A/B de *C. difficile* e isolados toxigênicos de *C. difficile*

foram isoladas de amostras de fezes. Os animais apresentaram melhora gradual com o tratamento baseado em metronidazol e fluidoterapia e receberam alta após sete dias. A associação do quadro clínico, exames laboratoriais e o sucesso terapêutico permitem confirmar o diagnóstico de colite por *C. difficile*. O presente trabalho chama a atenção para a possibilidade de diarreia causada por *C. difficile* em equinos no Brasil e reforça a necessidade do diagnóstico para tal infecção na rotina laboratorial.

Palavras-chave: colite, equinos, diarreia nosocomial.

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, Gram-positive bacillus which has been recognized as an important bacterial pathogen in both humans and animals. It may be responsible for 95% of all pseudomembranous colitis cases and most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans (SCHWAN et al., 2009). In adult horses, this pathogen can cause colitis often associated with antibiotic use but can also be nosocomial (SONGER et al., 2009). In foals, *C. difficile* causes diarrhea and colitis (BAVERUD et al., 2004). Despite the importance of *C. difficile* as a foal pathogen, there have been no confirmed diagnoses of diseases caused by this bacteria in Brazil, where to date all cases have been non confirmed cases. Therefore, the aim of this paper is to describe the first confirmed cases of colitis caused by *Clostridium difficile* in two foals in Brazil.

Two five-month-old Mangalarga Marchador foals with a five-day history of diarrhea

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: flobato@vet.ufmg.br. *Autor para correspondência.

were examined and treated at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The owner reported that three animals that shared the same stall had diarrhea on the fifth day of treatment with penicillin (Novapen®) for a suspected pneumonia. With the onset of diarrhea, the treatment with penicillin was discontinued, and the foals began to receive Nuflor® (florfenicol). Four days after the onset of diarrhea, one of the animals died. The other two animals were then sent to the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais.

On the day of admission to the clinic, both foals were dehydrated, and green watery diarrhea was observed. There was no hyperthermia. The two primary suspected diseases were salmonellosis and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Blood from both animals were collected for a complete blood count (CBC) and for serum biochemistry evaluation. Stool samples were collected for parasitological detection, routine bacteriologic culture, *Lawsonia intracellularis* detection by PCR (JONES et al., 1993), isolation of *C. difficile* (SILVA et al., 2011) and A/B toxin detection using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Ridascreen *Clostridium difficile* toxins A/B, R-Biopharm, Germany) and using African green monkey kidney cells (Vero-ATCC CCL 81) to analyze the cytotoxic effect. *C. sordellii* antitoxin (NIBSC - National Institute for Biological Standards and Control, England) was used to neutralize any A/B toxin present in the cytotoxicity assay. Initially, the treatment consisted in fluid therapy with ringer lactate, saline and glucose (3:2:1 - 130mL kg⁻¹ day⁻¹ with a total of 1.5g kg⁻¹ day⁻¹ of glucose), omeprazole (4mg kg⁻¹ SID) and antibiotics (metronidazole: 20mg kg⁻¹ BID, IV, and ceftiofur: 4.4mg kg⁻¹ SID, IM).

The CBC of both animals indicated an initial anemia, with a packed cell volume of 24 and 20% and 9.2 and 8.8g DL⁻¹ of hemoglobin, respectively. Both foals had also a decrease of total protein (4.7 and 4.0g DL⁻¹) and albumin (1.5 and 1.3g DL⁻¹). All those results are commonly found in cases of *C. difficile*-associated diarrhea (BAVERUD, 2004). The parasitological exam was negative, and only few colonies of *Escherichia coli* were obtained in the routine bacteriologic culture of the stool samples. Ruling out the initial suspicion, *Salmonella* was not isolated. *Lawsonia intracellularis* was not detected by PCR. The two stool samples were positive for A/B toxins by EIAs and by the cytotoxicity assay using Vero cells. In addition, *C. difficile* was isolated from both foals, and the two strains were positive by PCR for the toxin A (*tdcA*) and B (*tdcB*) genes but negative for the binary toxin gene (*cdtB*). In an *in vitro* toxin production test performed according to the method of BRAZIER (1993), the isolated strains had a

cytotoxic effect on Vero cells, which was neutralized by *C. sordellii* antitoxin (NIBSC, England), confirming that both strains were toxigenic.

On the second day after admission, the foals were hydrated and more active and experienced fewer episodes of diarrhea but still produced liquid feces. The consistency of the fecal material gradually changed from liquid to pasty between the third and fourth days of hospitalization, returning to solid with the characteristic odor on the fifth day. The animals were discharged from the Hospital seven days after admission.

The laboratory diagnosis of *C. difficile* infection is based on the detection of toxin A and/or toxin B by cell culture, the “gold-standard”, or by ELISAs (DELMÉE, 2001). In some cases, the association between isolation and *in vitro* toxin production may be useful. In the present case report, all of these assays were conducted: the A/B toxins were detected by a commercial EIA and by a cytotoxicity assay using Vero cells, *C. difficile* was isolated from both animals, and these strains were toxigenic in an *in vitro* test.

According to BAVERUD et al. (2003), *C. difficile*-associated diarrhea in foals can occur in the absence of antimicrobial therapy, but treatment with some antibiotics also can lead to the excretion of *C. difficile*. Under these circumstances, antibiotics would lead to a depletion of the indigenous microbiota, allowing colonization and toxin production by *C. difficile* (BAVERUD et al., 2002). The foals described in the present developed diarrhea after a five-day course of penicillin suggesting that this antibiotic treatment was associated with the pathogenesis of the *C. difficile* infection. A similar observation was described by BAVERUD (2004), which suggested that penicillin predisposes establishment of *C. difficile* in the equine intestine. It also important to note that in adult horses, *C. difficile* is the major cause of antibiotic-associated colitis and may even be a nosocomial agent, as reported for humans (SONGER et al., 2009). These findings emphasize the need to include *C. difficile* in the differential diagnosis of diarrhea in foals and of colitis after antibiotic therapy in horses, especially in cases in which the disease developed after admission to a veterinary hospital.

At the moment, there no commercial products available for immunoprophylaxis against *C. difficile* infections, but this is subject of ongoing research. For treatment, the first step is the withholding antibiotics followed by fluid therapy to maintain hydration and acid base balance. In the case of severe disease, metronidazole is the preferred drug (BAVERUD, 2004). Antimicrobial susceptibility testing of *C. difficile* isolates from horses has not been performed routinely,

but previous studies shown that most isolates were susceptible to metronidazol. However, metronidazole-resistant isolates have been found in American horses (JANG et al., 1997) and in those cases, vancomycin is recommended (BAVERUD et al., 2004).

It is also interesting to note that predominant ribotypes in horses are also well-known in humans with colitis (AVBERSEK et al., 2009). In light of this, some recently reports raised the possibility of *C. difficile* as zoonotic agent (ARROYO et al., 2007). More studies are needed for confirmation as, until this moment, no evidence for transmission between humans and animals, including horses, was found (McNAMARA et al., 2011).

Although *antemortem* diagnosis is difficult due to the necessity to rule out a large number of other potential causes of diarrhea that may be discounted in *postmortem* examinations, the association of the clinical findings, laboratory results and result of treatment confirmed the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. This report reveals the possibility of an underestimated incidence of diarrhea caused by this agent in foals in Brazil and suggests that the detection of the A/B toxins of *C. difficile* should be considered an important exam in the routine analysis of diarrhea cases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE APPROVAL

The authors clarify that the present study is a clinical case report, with no need of an ethical approval by an Animal Experiments Committee.

REFERENCES

- ARROYO, L.G. et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, v.120, p.179-183, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17112686>>. Accessed: Sept. 20, 2011. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.10.013.
- AVBERSEK, J. et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.252-255, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19632350>>. Accessed: Sept. 20, 2011. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.07.004.
- BAVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q Journal*, v.24, n.4, p.203-219, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540137>>. Accessed: may 20, 2011. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.015.
- BAVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.20, p.615-30, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519822>>. Accessed: Aug. 20, 2011.
- BAVERUD, V. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Veterinary Journal*, v.35, p.465-71, 2003. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875324>>. Accessed: Aug. 20, 2011.
- BRAZIER, J.S. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, Suppl.4, p.228-233, 1993. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8324124>>. Accessed: Sept. 12, 2011.
- DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection*, v.7, n.8, p.411-416, 2001. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591203>>. Accessed: Aug. 20, 2011.
- JANG, S.S. et al. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clinical Infectious Diseases*, v.25, p.266-7, 1997. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310701>>. Accessed: Sept. 30, 2011. doi: 10.1086/516235.
- JONES, G.F. et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.10, p.2611-2615, 1993. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253956>>. Accessed: Sept. 12, 2011.
- McNAMARA, S.E. et al. Carriage of *Clostridium difficile* and other enteric pathogens among a 4-H avocational cohort. *Zoonoses Public Health*, v.58, n.3, p.192-199, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529211>>. Accessed: Oct. 30, 2011. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01338.x.
- SCHWAN, C. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*, v.5, n.10, e1000626, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834554>>. Accessed: may, 20, 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.1000626.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural*, v.41 n.8 p.1130-1135, 2011. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782011005000100&script=sci_arttext>. Accessed: Aug. 20, 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000100>.
- SONGER, J.G. et al. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.21, n.3, p.377-380, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407094>>. Accessed: Aug. 20, 2011.

Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from animals and humans in Brazil

Sensibilidade antimicrobiana de *Clostridium difficile* isoladas de animais e humanos no Brasil

Rodrigo Otávio Silveira Silva^{*} Carlos Augusto Oliveira Junior¹ Amanda Nádia Diniz¹
Guilherme Guerra Alves¹ Roberto Maurício Carvalho Guedes¹ Eduardo Garcia Vilela¹¹
Francisco Carlos Faria Lobato¹

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate antimicrobial susceptibility in *Clostridium difficile* strains isolated from animals and humans in Brazil. The 54 *C. difficile* strains used were isolated from stool samples from piglets (n=16), dogs (n=13), humans (n=13), foals (n=8) calves (n=2), an ocelot (n=1) and a maned wolf (n=1). Antimicrobial susceptibility was determined using the serial plate agar dilution method for penicillin, florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, vancomycin, metronidazole and tylosin. The *C. difficile* strains assessed were susceptible to metronidazole and vancomycin. Florfenicol resistance was rarely observed; 52 (96.4%) strains were sensitive to this antimicrobial. Five (9.3%), five (9.3%), 14 (25.9%) and 20 (37.0%) strains were resistant to oxytetracycline, penicillin, tylosin and erythromycin respectively.

Key words: nosocomial diarrhea, pseudomembranous colitis, resistance.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade antimicrobiana de estirpes de *Clostridium difficile* isoladas de animais e humanos no Brasil. Foram utilizados 54 estirpes de *C. difficile* isoladas de fezes de leitões (n=16), cães (n=13), seres humanos (n=13), potros (n=8), bezerros (n=2), jaguatirica (n=1) e um lobo-guará (n=1). A sensibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método de diluição seriada em ágar para penicilina, florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina, vancomicina, metronidazol e tilosina. Todos os isolados foram sensíveis ao metronidazol e à vancomicina. Resistência ao florfenicol foi rara, sendo que 52 (96,4%) das estirpes foram sensíveis a esse antimicrobiano. Cinco (9,3%), cinco (9,3%), 14 (25,9%) e 20 (37,0%) foram resistentes a oxitetraciclina, penicilina, tilosina e eritromicina, respectivamente.

Palavras-chave: diarreia nosocomial, colite pseudomembranosa, resistência.

INTRODUCTION

Clostridium difficile is a Gram-positive, spore-forming bacillus responsible for most human antibiotic-associated diarrhea cases. The main risk factors associated to *C. difficile* infection (CDI) in humans are age older than 65, previous antibiotic therapy and prolonged hospitalization. An increase of the occurrence of community-acquired CDI, mainly in pregnant or puerperal women and children, has drawn attention to possible changes in the disease epidemiology (SILVA JÚNIOR, 2012).

In veterinary medicine, it produces diarrhea and colitis in several species and primarily affects domestic animals (SILVA et al., 2013a). However recently, its effects on wild species have been reported (BOJESSEN et al., 2006; SILVA et al., 2013b). Similar to the human disease, *C. difficile* infections (CDIs) in animals are commonly associated with antimicrobial treatments (BÅVERUD, 2004; SONGER et al., 2009; HOPMAN et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Recent studies have shown that isolates from human cases of pseudomembranous colitis caused by *C. difficile* are genetically similar to strains isolated from domestic animals, which suggest that this disease could be zoonotic (JHUNG et al., 2008; NORMAN et al., 2011). Although *C. difficile* is a major cause of enteric disorders in humans and animals as well as a possible zoonotic agent, few studies have evaluated the antimicrobial susceptibility

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com. *Autor para correspondência.

¹¹Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

of *C. difficile* strains in Brazil. Most current reports are not robust and are limited to human isolates. Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility of *C. difficile* strains isolated from animals and humans in Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Fifty-four *C. difficile* strains isolated from piglets (n=16), dogs (n=13), humans (n=13), foals (n=8), calves (n=2), an ocelot (n=1) and a maned wolf (n=1) were used in this study. Table 1 summarizes the species and strains included in this study as well as their clinical history. These isolates belong to the *Clostridium* strains library of the Veterinary School of Federal University of Minas Gerais (UFMG) and were isolated in previous published works (between 2009 and 2013) or ongoing projects (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2013b, Silva et al., 2013c; SILVA et al., 2013d). After isolation and confirmation of identity by a previous described multiplex PCR (SILVA et al., 2011), all strains were lyophilized and kept at -20°C until reconstitution for this work.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the serial agar dilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011) and The European Committee on Antimicrobial

Susceptibility Testing (EUCAST, 2011). The following antimicrobials were tested: penicillin, florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, vancomycin, metronidazole and tylosin. For an assay control, the reference specimen *Bacterioides fragilis* (ATCC 25285) was used. For the antimicrobials, the following concentrations were tested: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0 and 256.0 µg ml⁻¹. Tests were performed on Brucella agar (Difco Laboratories, USA) supplemented with 5% horse blood, hemin and vitamin K (CLSI, 2011).

RESULTS

The MIC results for the 54 *C. difficile* strains analyzed are in table 2. The strains were susceptible to metronidazole and vancomycin. Susceptibility to florfenicol and oxytetracycline was observed in 96.3% and 79.6% of the strains respectively. Five (9.3%), five (9.3%), 14 (25.9%) and 20 (37.0%) strains were resistant to oxytetracycline, penicillin, tylosin and erythromycin respectively.

DISCUSSION

The *C. difficile* strains assessed were susceptible to metronidazole and vancomycin, which are the antimicrobials commonly used to treat CDI

Table 1 - Number of *Clostridium difficile* strains used to evaluate antimicrobial susceptibility in each animal species and their clinical history. Tabelas para CR têm no máximo três linhas contínuas. As demais devem ser deletadas ou substituídas por linha tracejadas

Species	Clinical history	Number of strains	Total
Dogs	Diarrheic (other causes)	5	13
	Apparently healthy	8	
Piglets	Confirmed CDI	8	16
	Diarrheic (other causes)	4	
	Apparently healthy	4	
Foals	Confirmed CDI	4	8
	Diarrheic (other causes)	2	
	Apparently healthy	2	
Calf	Diarrheic (other causes)	2	2
Ocelot	Confirmed CDI	1	1
Maned wolf	Diarrheic (other causes)	1	1
Human	Confirmed CDI	13	13
Total			54

Table 2 - The MIC in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and antimicrobial susceptibility classification for 54 *Clostridium difficile* strains isolated from human and animal feces.

Antimicrobial	-----Number of strains and MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)-----												-----Classification (%)-----		
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	S ¹	MS ²	R ³
Metronidazole	20	30	3	1									100	0	0
Vancomycin	28	19	7										100	0	0
Florfenicol			10	42		2							96.3	3.7	0
Oxytetracycline	34	7				2	6					5	79.6	11.1	9.3
Penicillin	3	24	22	5									50.0	40.7	9.3
Tylosin	7	29	1	1	1		1			3		11	72.2	1.9	25.9
Erythromycin	13	10	7	4			2			2	4	12	63.0	0	37.0

Legend: S¹: susceptible, MS²: moderately susceptible. R³: resistant (R). Classification based on the CLSI (2011) and EUCAST (2011).

in humans, horses and dogs (BÅVERUD, 2002; MARKS & KATHER, 2003; BÅVERUD, 2004; SPIGAGLIA et al., 2011; SILVA et al., 2013c). These results are similar to previous studies for several domestic animal species (BÅVERUD et al., 2003; MARKS & KATHER, 2003; POST & SONGER, 2004; FRY et al., 2012). Currently, metronidazole-resistant strains have only been isolated from horses in the USA (JANG et al., 1997; MAGDESIAN et al., 2006). Similar to observations in animals, metronidazole-resistant *C. difficile* strains are rarely isolated from humans (SHAH et al., 2010; SPIGAGLIA et al., 2011).

Vancomycin-resistant *C. difficile* isolates are also extremely rare for both animal and human strains. In addition, vancomycin is considered clinically more effective and generates fewer relapse cases following CDI treatment in humans (SHAH et al., 2010); therefore, it is considered the best option by many clinicians. In addition to this study, only one other study in Brazil has evaluated antimicrobial susceptibility in six *C. difficile* strains isolated from humans with CDI; similar to this study, the isolates were also susceptible to metronidazole and vancomycin (BALASSIANO et al., 2009).

None of the strains were resistant to florfenicol, whereas five isolates (9.3%) (two pig isolates, two human isolates and one ocelot isolate) were resistant to oxytetracycline. In general, a large variation in the MIC values were observed for tetracycline, what has also been reported in studies with *C. difficile* strains isolated from pigs and humans (DELMÉE & AVESANI, 1988; POST & SONGER, 2004; SHAH et al., 2010). However, almost all isolates from the earlier studies were susceptible to this antimicrobial. Resistance to this class of antimicrobials is commonly associated with

the *tet* genes, especially *tetM* (HUANG et al., 2009). The high susceptibility of *C. difficile* to tetracyclines differs from other *Clostridium* species, especially for *C. perfringens*, which is a species commonly resistant to tetracycline (SLAVIĆ et al., 2011).

The five penicillin-resistant strains were isolated from three foals, all of which had a confirmed CDI diagnosis, and two piglets. Interestingly, in two of the foals, the diarrhea caused by *C. difficile* began after penicillin G was administered under suspicion of pneumonia (SILVA et al., 2012). This result is consistent with observations by BÅVERUD (2002), who reported that beta-lactams are commonly associated with CDI in foals and adult horses. In contrast to reports in other countries (HUANG et al., 2009; SHAH et al., 2010), none of the human isolates were resistant to penicillin in this study, and only one of the 13 strains tested (7.7%) was moderately susceptible to this compound.

In this study, most strains were resistant to the macrolides erythromycin and tylosin. Detection of *C. difficile* resistance to these compounds was previously reported in strains from various sources, including equine and human isolates (DELMÉE & AVESANI, 1988; BÅVERUD et al., 2003; SPIGAGLIA et al., 2011). In this study, of the 20 (37%) erythromycin-resistant strains, ten (18.5%) were isolated from piglets, four (7.4%) from dogs, three (5.6%) from humans, two (3.7%) from horses and one (1.9%) from a calf. Of these isolates, 16 (80%) had an MIC greater than or equal to 256.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In humans, certain macrolides are listed as antimicrobials commonly involved in CDI cases (ZILBERBERG & SHORR, 2013). Unfortunately, few studies have examined strains from animals, but erythromycin has been reported as a major cause of colitis in mares (BÅVERUD, 2002). Interestingly, the erythromycin-

resistant *C. difficile* strains isolated from humans vary greatly between countries, with reports ranging from 87% of isolates with resistance in England to 0% in Switzerland (HUANG et al., 2009).

The striking bimodal behavior of these isolates for erythromycin resistance suggests a genetic factor that encodes resistance. In fact, studies have shown that the resistance of *Clostridium* strains to this antimicrobial is primarily related to the *erythromycin ribosomal methylase (erm)* genes, which encode a methylase that inhibits erythromycin activity (SLAVIĆ et al., 2011). Studies that have examined antimicrobial-resistance genes are rare for *C. difficile* strains isolated from animals. However, FRY et al. (2012) recently reported a high correlation between erythromycin resistance and the *ermB* gene in *C. difficile* strains isolated from pigs, which confirms this hypothesis. Notably, however, not all strains with high levels of erythromycin resistance encode the *erm* genes, suggesting that there are other unknown mechanisms involved in resistance (HUANG et al., 2009).

Certain studies have reported high susceptibility of *C. difficile* strains to tylosin, which suggests that this antimicrobial could be used in pig feed to decrease or eliminate *C. difficile* in animal feces (POST & SONGER, 2004; SONGER & ANDERSON, 2006). In contrast, 14 strains (25.9%) in this study were resistant to tylosin; eight were isolated from piglets and three were isolated from dogs, suggesting that this antimicrobial would not be effective for CDI prevention, control or treatment in the species evaluated herein.

Interestingly, tylosin is an antimicrobial commonly used in Brazilian pig production, and all the strains included in this study were from farms that reported using tylosin at some stage in the animal life cycle. In contrast, oxytetracycline is a compound that has been banned from animal feed in Brazil since 1998 (BRASIL, 1998). Two oxytetracycline-resistant strains were isolated from two different pigs on the same farm; both pigs had CDI. On the investigated farm, the owner reported using oxytetracycline in animal feed despite the ban.

Six strains (11.1%) were had high MIC values for three different antimicrobials (tylosin, erythromycin and oxytetracycline); five of the strains were isolated from pigs and one from a human. One of these strains was isolated from a piglet with CDI and was also resistant to penicillin. Antibiotic therapy plays a central role in CDI development, and the risk increases considerably when *C. difficile* is also resistant to the antimicrobial used (OWENS et al., 2008). Considering that CDIs may be zoonotic,

this study indicates that antimicrobials must be used rationally, especially in pig production. Moreover, further studies are needed aiming alternative methods to prevent, control and treat CDIs in domestic animals, what would further reduce the need for antimicrobials in these species.

The results from these antimicrobial susceptibility tests should be interpreted with caution because *in vitro* results do not always reflect the *in vivo* behavior of the evaluated drug. Furthermore, studies have shown that the majority of *C. difficile* isolates from drug-induced CDI cases in humans were susceptible *in vitro* to the drug used (DZINK & BARTLETT, 1980), which suggests that successful treatment depends on both *C. difficile* susceptibility to antimicrobials and other factors related to the microbiota (BÄVERUD, 2002). In any case, because it is not routinely performed, assessing antimicrobial susceptibility of *C. difficile* strains isolated from humans and animals, including the two strains isolated from wild animals, may be useful in treating enteric disorders caused by this agent. This is the first study to evaluate antimicrobial susceptibility in *C. difficile* strains isolated from animals in Brazil and showed the necessity of control measures of CDI in both humans and animals to avoid the spread of multi resistant strains. Additional studies should also include the ribotyping and evaluation of resistance genes for the strains used herein.

ACKNOWLEDGMENTS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) and PRPq-UFMG.

REFERENCES

- BALASSIANO, I.T. et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v.15, p.61-64, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154793>>. Accessed: January 1st of 2014. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.12.007.
- BÄVERUD, V. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Veterinary Journal*, v.35, p.465-71, 2003.
- BÄVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.20, p.615-630, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519822>>. Accessed: January 1st of 2014. doi: 10.1016/j.cveq.2004.07.005.
- BÄVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary Quarterly*

- Journal**, v.24, p.203-219, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540137>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1080/01652176.2002.9695137.
- BOJESSEN, A.M. et al. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.329-335, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16737787>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.025.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária, **Portaria n.193**, de 12 de Maio de 1998 [BRAZIL, Ministry of Agriculture and Land Reform, ordinance n.193, 12 May 1998].
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Test. **Twenty-first Information Supplement** v.31, n.1, p.111, 2011.
- DELMÉE, M.; AVESANI V. Correlation between serogroup and susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.22, p.325-331, 1988. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053559>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1093/jac/22.3.325.
- DZINK, J.; BARTLETT, J.G. *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.17, p.695-698, 1980. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7396460>>. Accessed: January 1th of 2014. doi:10.1128/AAC.17.4.695.
- EUCAST (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING). **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Switzerland, 2011. V.3.1.
- FRY, P.R. et al. Antimicrobial resistance, toxinotype, and genotypic profiling of *Clostridium difficile* isolates of swine origin. **Journal of Clinical Microbiology** v.50, p.2366-2372, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518873>>. Accessed: January 1th of 2014. doi:10.1128/JCM.06581-11.
- HOPMAN, N.E. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.186-192, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111541>>. Accessed: January 1th of 2014. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.013.
- HUANG, H. et al. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, p.516-522, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828299>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.09.012.
- JANG, S.S. et al. Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**, v.25 p.266-7, 1997. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310701>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1086/516235.
- JHUNG, M.A. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1039-1045, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598622>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.3201/eid1407.071641.
- MAGDESIAN, K.G. et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, p.751-755, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506942>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.2460/javma.228.5.751.
- MARKS, S.L.; KATHER, E.J. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.39-45, 2003. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742714>>. Accessed: January 1th of 2014. doi:10.1016/S0378-1135(03)00061-0.
- NORMAN, K.N. et al. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.5755-5760, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3165271>>. Accessed: January 1th of 2014. doi:10.1128/AEM.05007-11.
- OWENS, R.C.Jr. et al. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, S19-31, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177218>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1086/521859.
- POST, K.W., SONGER, J.G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. **Anaerobe**, v.10, p.47-50, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701500>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1016/j.anaerobe.2004.01.003.
- SHAH, D. et al. *Clostridium difficile* infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.8, p.555-564, 2010. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455684>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1586/eri.10.28.
- SILVA JÚNIOR, M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. **Einstein**, v.10, p.105-109, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045838>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1590/S1679-45082012000100023.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. **Equine Veterinary Journal**, v.45, p.671-675, 2013c. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452044>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1111/evj.12046.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.41 n.8 p.1430-1435, 2011. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782011005000100&script=sci_arttext>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1590/S0103-84782011005000100.
- SILVA, R.O.S. et al. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. **Ciência Rural**, v.43, p.73-80, 2013a. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782013000100013&script=sci_

arttext>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1590/S0103-84782012005000137.

SILVA, R.O.S. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82-84, 2013b. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467074>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.02.007.

SILVA, R.O.S. et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural*, v.42, p.498-500, 2012. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000300018>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1590/S0103-84782012000300018.

SILVA, R.O.S. et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enteritis in piglets. *Journal of Swine Health and Production*, v.21, p.261-269, 2013d. Accessed: January 1th of 2014. Available from: <<https://www.aasv.org/shap/issues/v21n6/v21n6p300.html>>.

SLAVIĆ D. et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin

from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.75, p.89-97, 2011.

SONGER, J.G. et al. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.21, p.377-380, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407094>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1177/104063870902100314.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, p.1-4, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701605>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1016/j.anaerobe.2005.09.001.

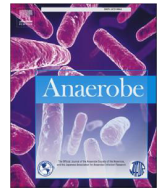
SPIGAGLIA, P. et al. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.66, p.2227-2234, 2011. doi: 10.1093/jac/dkr292.

ZILBERBERG, M.D.; SHORR, A.F. Preventing *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Critical Care Clinics*, v.29, p.11-18, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182524>>. Accessed: January 1th of 2014. doi: 10.1016/j.ccc.2012.10.006.



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Clinical microbiology

Clostridium difficile and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil



Rodrigo Otávio Silveira Silva ^{a,*}, Mirella Lauria D'Elia ^a, Érika Procópio Tostes Teixeira ^a, Pedro Lúcio Lithg Pereira ^a, Danielle Ferreira de Magalhães Soares ^a, Álvaro Roberto Cavalcanti ^b, Aleksander Kocuvan ^c, Maja Rupnik ^{c,d,e}, André Luiz Quagliatto Santos ^f, Carlos Augusto Oliveira Junior ^a, Francisco Carlos Faria Lobato ^{a,*}

^a Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Antônio Carlos Avenue, 6627, Belo Horizonte, MG 31.270-901, Brazil

^b Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), Desembargador Leão Neto do Carmo Avenue S/N, Quadra 3, Lote 3, Campo Grande, MS 79.031-90, Brazil

^c Faculty of Medicine, University of Maribor, Slovenia

^d National Laboratory for Health, Environment and Food, Maribor, Slovenia

^e Center of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, Ljubljana, Slovenia

^f Veterinary School, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Pará Avenue 1720, Jardim Umuarama, Uberlândia, MG 38.400-902, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2013

Received in revised form

13 June 2014

Accepted 16 June 2014

Available online 27 June 2014

Keywords:

Felids

Canids

Captivity

Colitis

Antimicrobial susceptibility

ABSTRACT

Despite some case reports, the importance of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* for wild carnivores remains unclear. Thus, the objective of this study was to identify *C. perfringens* and *C. difficile* strains in stool samples from wild carnivore species in Brazil. A total of 34 stool samples were collected and subjected to *C. perfringens* and *C. difficile* isolation. Suggestive colonies of *C. perfringens* were then analyzed for genes encoding the major *C. perfringens* toxins (alpha, beta, epsilon and iota) and the beta-2 toxin (*cpb2*), enterotoxin (*cpe*) and NetB (*netb*) genes. *C. difficile* strains were analyzed by multiplex-PCR for toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*) and also submitted to a PCR ribotyping. Unthawed aliquots of samples positive for *C. difficile* isolation were subjected to the detection of A/B toxins by a cytotoxicity assay (CTA). *C. perfringens* was isolated from 26 samples (76.5%), all of which were genotyped as type A. The *netb* gene was not detected, whereas the *cpb2* and *cpe* genes were found in nine and three *C. perfringens* strains, respectively. *C. difficile* was isolated from two (5.9%) samples. A non-toxigenic strain was recovered from a non-diarrheic maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Conversely, a toxigenic strain was found in the sample of a diarrheic ocelot (*Leopardus pardalis*); an unthawed stool sample was also positive for A/B toxins by CTA, indicating a diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea in this animal. The present work suggests that wild carnivore species could carry *C. difficile* strains and that they could be susceptible to *C. difficile* infection.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Clostridium perfringens isolates are conventionally classified as one of five toxigenic types (A–E) based on the capacity to produce one or more of the four major toxins (alpha, beta, epsilon and iota) [1]. In addition to the major toxins, *C. perfringens* can produce additional virulence factors, such as beta-2 toxin, which has been

associated with diarrhea in horses and piglets [2–4], necrotic enteritis toxin B-like (NetB), a pore-forming toxin described as an important virulence factor for necrotic enteritis in broiler chickens [5] and enterotoxin, which is responsible for human foodborne disease and is also associated with diarrhea in dogs and cats [6–8]. *C. perfringens* is commonly found in the enteric microbiota of healthy animals, thus complicating the laboratory diagnosis of infections caused by this microorganism. The knowledge of *C. perfringens* in wild carnivore species is limited to few case reports [9,10] and the role of the most common additional virulence factors of *C. perfringens*, such as beta-2 toxin, enterotoxin and NetB, are

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rodrigo.otaviosilva@gmail.com (R.O.S. Silva), flobato@vet.ufmg.br, lobato.francisco@yahoo.com.br (F.C.F. Lobato).

unknown, and which genotypes of *C. perfringens* are more prevalent in these species, including in healthy animals, is also uncertain.

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, Gram-positive bacillus recognized as the pathogen responsible for most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans [11] and is an important cause of enterocolitis in various domestic animals, including horses, piglets and dogs [12,13]. Moreover, recent studies have also shown that isolates from humans suffering from *C. difficile* infection (CDI) are highly genetically related to strains isolated from animals, suggesting a hypothetical zoonotic potential [14].

Despite the importance of *C. difficile* as an enteropathogen for human and domestic animals and even as a possible zoonotic agent, the role of CDI in most wild species remains unclear. Indeed, there are only few studies, limited to case reports, that examine its role [15,16]. In addition, some reports have recently raised the importance of wild animals as a reservoir of *C. difficile* for humans and domestic animals, though there are few works on this subject [17,18].

The isolation and screening for virulence factor genes could contribute to the knowledge of *C. difficile* and *C. perfringens* risk factors and epidemiology [19,20]. In light of this, the objective of this study was to identify *C. perfringens* and *C. difficile* strains in stool samples from wild carnivore species in Brazil.

2. Material and methods

2.1. Samples

A total of 34 samples from wild carnivores were collected, 11 from *Cerdocyon thous* (crab-eating fox), nine from *Puma concolor* (cougar), four from *Leopardus tigrinus* (oncilla), three from *Leopardus pardalis* (ocelot), four from *Chrysocyon brachyurus* (maned wolf) and one each from *Puma yagouaroundi* (jaguarundi), *Leopardus wiedii*, (margay or tree ocelot) and *Lycalopex vetulus* (hoary fox). The animals were sampled while in captivity and the time of captivation varied between 24 h and 3 years, as shown in Table 1. These species were trapped in farms or around urban areas by the Brazilian group for wildlife. After submitted to laboratory tests, some animals were released in protected areas or kept in captivity when they were unhealthy or unable to readapt into the wild. All stool specimens were collected in sterile containers, and three aliquots were stored at -20°C until testing was performed.

2.2. Isolation and genotyping of *C. perfringens*

For the isolation of *C. perfringens*, 0.08–0.12 g of feces was serially diluted by factors of 10, ranging from 10^{-1} to 10^{-3} . Aliquots of 10 μl of each dilution were plated on sulfite polymyxin

sulfadiazine agar (SPS, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and were anaerobically incubated at 37°C for 24 h. After incubation, at least three characteristic colonies from each dilution were subjected to a previously described PCR protocol [21] for the detection of genes encoding the major *C. perfringens* toxins (alpha, beta, epsilon and iota), beta-2 toxin (*cpb2*) and enterotoxin (*cpe*). In addition, a previously described PCR protocol was applied for the detection of the NetB-encoding gene *netb* [22]. For all of the PCR reactions, the amplifications were performed in a thermocycler (Thermal Cycler Px2 – Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA), and the products were visualized under UV light in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

2.3. *Clostridium difficile* isolation, PCR and A/B toxin detection

To isolate *C. difficile* spores, equal volumes of stool samples and 96% ethanol (v/v) were mixed; after incubation for 30 min at room temperature, 50- μl aliquots were inoculated on plates containing cycloserine-cefoxitin fructose agar (Hi-media, Mumbai, India) supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). After anaerobic incubation at 37°C for 72 h, all colonies with suggestive morphology were subjected to a previously described multiplex-PCR for a house-keeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*) [20]. Unthawed aliquots of stool samples positive for *C. difficile* isolation were subjected to A/B toxin detection by CTA using Vero cells [23] and by a commercial ELISA kit (*C. difficile* Tox A/B II – Techlab Inc., Blacksburg, VA, USA). In addition, all *C. difficile* isolates were tested by CTA for *in vitro* toxin production, as previously described [24]. *C. difficile* ATCC 9689 was used as a control for PCR and *in vitro* toxin production.

2.4. PCR ribotyping of *C. difficile*

All *C. difficile* strains were submitted to PCR ribotyping. Inter-genic spacer regions were amplified using Bidet primers as previously described [25]. Amplification products were separated by electrophoresis in 3% agarose gel (Bio-Rad, California, USA) for 5 h at 2.5 V/cm and the gel was analyzed with BioNumerics 7.00 (Applied Maths, Belgium). PCR ribotypes for which the reference strains were available are designated by international Cardiff nomenclature.

2.5. Antimicrobial susceptibility

The minimum inhibitory concentration (MIC) of 16 *C. perfringens* and two *C. difficile* strains were determined using the serial agar

Table 1
Isolation of *Clostridium perfringens* and *C. difficile* from stool samples of wild carnivore species in Brazil.

Species	Common name	Time in captivity			Samples (%)	Isolation					
						<i>C. perfringens</i>			<i>C. difficile</i>		
		<1 week	1-to-4 weeks	>4 weeks		Positives	<i>cpb2</i> ⁺	<i>cpe</i> ⁺	Positives	A ⁺ B ⁺	A [−] B [−]
<i>C. thous</i>	Crab-eating fox	1	2	9	12 (35.3)	9	4	—	—	—	—
<i>P. concolor</i>	Cougar			9	9 (26.5)	8	1	2	—	—	—
<i>L. tigrinus</i>	Oncilla			4	4 (11.8)	2	2	1	—	—	—
<i>L. pardalis</i>	Ocelot	1	2		3 (8.8)	1	—	—	1	1 ^a	—
<i>C. brachyurus</i>	Maned wolf	2		1	3 (8.8)	3	1	—	1	—	1 ^b
<i>P. yagouaroundi</i>	Jaguarundi			1	1 (2.9)	1	1	—	—	—	—
<i>L. wiedii</i>	Tree ocelot			1	1 (2.9)	1	—	—	—	—	—
<i>Lycalopex vetulus</i>	hoary fox	1			1 (2.9)	1	—	—	—	—	—
Total		5 (14.7)	4 (11.8)	25 (73.5)	34 (100)	26 (76.5%)	9 (34.6%)	3 (11.5%)	2 (5.9%)	1 (50%)	1 (50%)

^a PCR Ribotype 046.

^b PCR Ribotype 053.

dilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [26] and The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [27]. The following antimicrobials were tested: penicillin, florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, vancomycin, metronidazole and tylosin. For an assay control, the reference specimen *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) was used. For the antimicrobials, the following concentrations were tested: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0 and 256.0 µg/ml. Tests were performed on Brucella agar (Difco Laboratories, USA) supplemented with 5% horse blood, hemin and vitamin K [26].

3. Results and discussion

C. perfringens was isolated from 26 samples (76.5%) (Table 1). There was no statistical association between isolation by *C. perfringens* and time in captivity. All *C. perfringens* isolated strains were genotyped as type A, the most common type in the environment and some domestic species [1]. The recovery rate found was similar to previous studies with other animals, such as dogs, foals and swine [2,23,28], suggesting that *C. perfringens* is commonly part of the microbiota of these animals, as would be suspected.

Nine out of the 26 isolated strains (34.6%) were positive for the beta-2 toxin-encoding gene (*cpb2*). Some authors have suggested that *cpb2* could be a virulence marker in piglets and horses, though there is no work to date confirming that hypothesis [3,4,29]. Furthermore, other studies in dogs and broiler chickens suggest that there is no association between the occurrence of enteric disease and the isolation of *C. perfringens* positive for *cpb2* [30]. The enterotoxin-encoding gene (*cpe*) was found in three *C. perfringens* strains (11.5%), one of which was also *cpb2*⁺. Some studies have suggested that the detection of *cpe* in *C. perfringens* strains isolated from dogs is associated with the presence of diarrhea, but a small percentage of dogs and cats without diarrhea also harbor *C. perfringens* strains positive for *cpe* or even for the enterotoxin itself [8,31,32]. It is important to note that the present study was not a case-control, and only few stool samples from diarrheic animals were included, disallowing the possibility of conclusions about the role of the detection of *cpb2* or *cpe*. Further studies including diarrheic animals are needed to clarify if these genes could be used as a virulence marker for *C. perfringens* isolated from wild carnivore species.

Regarding the antimicrobial susceptibility, all *C. perfringens* strains tested ($n = 16$) were susceptible to florfenicol, metronidazole, penicillin, vancomycin, erythromycin and tylosin, while only one strain (6.2%), isolated from an ocelot, was resistant to oxytetracycline. *C. perfringens* resistance to this class of antibiotics could be considered common and has been attributed to the presence of tetracycline resistance genes, such as *tetM* and *tetW* [33–35]. It is also important to note that this ocelot has no history of antimicrobial therapy and was sampled one day after captivity.

Little is known about *C. perfringens* as a cause of enteric disease in wild carnivores. Recently, Zhang et al. [9] reported the death of a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) and a lion (*Panthera leo*) by hemorrhagic enterocolitis associated with *C. perfringens* type A. Both animals developed depression, anorexia and bloody diarrhea, which quickly led to death. However, neither the *cpe* nor *cpb2* genes were found in the *C. perfringens* isolates from these animals. Although the source of infection in their report was not confirmed, the authors suggest that an association between a high-protein diet and the incomplete thawing of chicken meat given to the felines could have contributed to the development of disease in both animals. Another interesting report is a suspected case of neurotoxicity due to *C. perfringens* type B in a tiger (*P. tigris*) [10]. In this case, the tiger was referred with acute onset of severe abnormal

consciousness with suspected diffuse forebrain lesion. *C. perfringens* type B was found in high levels in the feces and no other possible etiologies were found despite the efforts to detect other possible causes of the clinical signs such as other infection, metabolic abnormalities, and traumatic or vascular lesion. In the present work, no *C. perfringens* isolates were classified as type B, and only type A was recovered from the stool samples.

C. difficile was isolated from two (5.9%) samples, one from a diarrheic ocelot (*L. pardalis*) and other from a non-diarrheic maned wolf (*C. brachyurus*). The isolated strain from the maned wolf was negative for all virulence factors (A[−]B[−]CDT[−]), classified as PCR ribotype 053 and was also unable to produce toxin *in vitro*. Corroborating these findings, the stool sample from this animal was negative for A/B toxins by ELISA and CTA. At the time of collection, this animal was under antibiotic therapy to prevent secondary bacterial infections in a myiasis in his left ear.

The other isolated strain was considered toxigenic (A⁺B⁺CDT[−]), classified as PCR ribotype 046 and also positive in the *in vitro* toxin production test. In addition, the thawed aliquot of the stool sample was positive by ELISA and CTA, confirming the presence of A/B toxins in the feces of this female ocelot. This ocelot developed diarrhea after the administration of a cephalosporin. According to the laboratory diagnosis of *C. difficile* infection, as based on the detection A/B toxins and by isolation of toxigenic strains [13], we could suggest that this ocelot had *C. difficile*-associated diarrhea. This was the first case of CDI in a wild felid and is described in more details in a case report [36]. It is also interesting to note that the ribotype 046, isolated from this ocelot, is considered uncommon in most countries and was not previously identified in Brazil [37]. On the other hand, a recent study showed that 046 is the most common ribotype in neonatal pigs in Sweden and it is also associated to recent outbreaks in humans in this country and also in Poland [38,39].

In the present work, both animals that were positive for *C. difficile* isolation were under antibiotic therapy at the time of sample collection, suggesting an association between antibiotic administration and the risk of colonization by *C. difficile*. The administration of antibiotics is a well-known risk factor for CDI in humans and various domestic animal species, particularly dogs and adult horses and foals [13,37,40]. It also important to note CDI has been reported in domestic cats though appears to be rare [41,42]. Regarding the antimicrobial susceptibility, both *C. difficile* strains assessed were susceptible to almost all compounds tested: metronidazole, vancomycin, florfenicol, penicillin, tylosin and erythromycin. The toxigenic strain isolated from the ocelot was resistant only to oxytetracycline (MIC > 256.0 µg/ml). The absence of resistance to metronidazole and vancomycin corroborates previous studies [43–46]. Currently, metronidazole-resistant strains have only been reported from horses in the USA [47] and recently from a Zebra (*Equus quagga burchellii*) in a Canadian zoo [48]. In the other hand, *C. difficile* strains resistant to oxytetracycline and macrolides are not rare in domestic species and humans [45,49–51].

The role of most wild species as a reservoir of *C. difficile* strains for humans and domestic animals is largely unknown, and there are few works on this subject. Miller et al. [52] detected a low prevalence (4%) of *C. difficile* in free-living sea otters (*Enhydra lutris nereis*) from Canada, but no toxinotyping was performed. In two studies with small mammals such as procyonids, marsupials and rodent species, Jardine et al. [17] and Himsworth et al. [18] observed a varied prevalence of *C. difficile*, varying from 0% to 46% depending on the species and also of the geographical location where the animals were sampled. In contrast, a study with 465 samples of wild birds in Slovenia showed zero prevalence of *C. difficile* in this taxon, indicating that the sampled migrating passerine birds are unlikely to serve as a reservoir and a carrier of *C. difficile* [16].

In addition to the hypothesis of some animals as reservoirs of *C. difficile* strains, some authors reported CDI cases in wild species, including boar, lagomorphs, rodents and primates [53]. Bojesen et al [15], also reported an outbreak of CDI in captive Asian elephants in Denmark. Regardless, the few examples of the occurrence and prevalence of *C. difficile* in wild animals imply little awareness of their importance in the epidemiology of the disease.

In conclusion, the present work suggests that wild carnivore species do not have a great importance as reservoirs of *C. difficile* strains but suggest that *C. difficile* could cause diarrhea in these species, particularly in captive animals and when the clinical signs began during or after antimicrobial use. Additional studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* as a primary agent of diarrhea in wild carnivore species.

Acknowledgments

This work was supported by funds from Fapemig, Capes, CNPq, INCT and PRPq-UFMG. We thank the CRAS-MS, Green Farm CO2 Free, CETAS-Serra, CERELAS-ES and CETAS-BH for the support and animal samples; CENAP, IBAMA and IEF for the permission to work with wild species; Daniel Vilela, Vinícius de Seixas Queiroz, Gustavo Athayde, Luiz Samartano, Guilherme Cavalcanti, Elson B. Santos, Rodrigo C. Leal and Luisa O. Marques for their valuable help with wild animal sample collection.

References

- [1] Siqueira FF, Almeida MO, Barroca TM, Horta CC, Carmo AO, Silva ROS, et al. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet Microbiol* 2012;159:397–405.
- [2] Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:528–36.
- [3] Hazlett MJ, Kircanski J, Slavic D, Prescott JF. Beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* type A colitis in a three-day-old foal. *J Vet Diagn Invest* 2011;23:373–6.
- [4] Silva ROS, Lobato FCF, Pires OS, Gabardo MP, Paladino ES, Guedes RMC. Neonatal diarrhea in piglets associated with *cpb-2* positive *Clostridium perfringens*. *Braz J Vet Pathol* 2013;6:11–4.
- [5] Keyburn AL, Bannam TL, Moore RJ, Rood JL. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* 2010;2:1913–27.
- [6] Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med* 2011;25:1195–208.
- [7] Queen EV, Marks SL, Farver TB. Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from Northern California. *J Vet Intern Med* 2012;26(1):54–60.
- [8] Silva ROS, Santos RLR, Pires PS, Pereira LC, Duarte MC, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. *Braz J Microbiol* 2013;44(1):133–7.
- [9] Zhang Y, Hou Z, Ma J. Hemorrhagic enterocolitis and death in two felines (*Panthera tigris altaica* and *Panthera leo*) associated with *Clostridium perfringens* type A. *J Zoo Wildl Med* 2012;43(2):394–6.
- [10] Zeira O, Briola C, Konar M, Dumas MP, Wrzosek MA, Papa V. Suspected neurotoxicity due to *Clostridium perfringens* type B in a tiger (*Panthera tigris*). *J Zoo Wildl Med* 2012;43(3):666–9.
- [11] Silva Júnior M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. *Einstein* 2012;10(1):105–9.
- [12] Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol* 2010;140:399–404.
- [13] Silva ROS, Guedes RMC, Lobato FCF. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciênc Rural* 2013;43:73–80.
- [14] Hensgens MP1, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MG, de Boer E, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect* 2012 Jul;18(7):635–45.
- [15] Bojesen AM, Olsen KE, Bertelsen MF. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol* 2006;116:329–35.
- [16] Bandelj P, Trilar T, Blagus R, Oceppek M, Rousseau J, Weese JS, et al. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European barn swallows (*Hirundo rustica*) during migration. *BMC Vet Res* 2014 Feb 8;10:40.
- [17] Jardine CM, Reid-Smith RJ, Rousseau J, Weese JS. Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild mammals in southern Ontario, Canada. *J Wildl Dis* 2013 Apr;49(2):418–21.
- [18] Himsforth CG, Patrick DM, Mak S, Jardine CM, Tang P, Weese JS. Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Appl Environ Microbiol* 2014 Feb;80(4):1299–305.
- [19] Arroyo LG, Staempfli H, Weese JS. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol* 2007;120:179–83.
- [20] Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Júnior ECC, Pires PS, Santos RLR, Assis RA, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciênc Rural* 2011;41:1130–5.
- [21] Vieira AAS, Guedes RMC, Salvarani FM, Silva ROS, Assis RA, Lobato FCF. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. *Arq Inst Biol* 2008;75:513–6.
- [22] Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 2008;4:e26.
- [23] Silva Ros, Ribeiro MG, Palhares MS, Maranhão RPA, Borges AS, Silva MX, et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *C. perfringens* from foals. *Equine Vet J* 2013;45(6):671–5.
- [24] Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med* 2010;24:628–32.
- [25] Janežic S, Rupnik M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. In: Mullany P, Roberts A, editors. *Clostridium difficile*, methods and protocols. Walker JM, Series editor. Springer protocols – Methods Mol Biol, vol. 646. Humana Press; 2010. pp. 55–66.
- [26] CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility test. Twenty-first information supplement. v.31, n.1, p.111; 2011.
- [27] EUCAST (European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Switzerland; 2011. v.3.1.
- [28] Goldstein MR, Kruth SA, Bersenas AM, Holowaychuk MK, Weese JS. Detection and characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of healthy and diarrheic dogs. *Can J Vet Res* 2012;76(3):161–5.
- [29] Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gibert M, et al. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol* 1999;37:358–61.
- [30] van Asten AJ, Nikolaou GN, Gröne A. The occurrence of *cpb2*-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet J* 2010 Feb;183(2):135–40.
- [31] Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol* 2014 Mar;9:361–77.
- [32] Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 2012;241(3):331–7.
- [33] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:232–60.
- [34] Johansson A, Greko C, Engström BE, Karlsson M. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol* 2004;99:251–7.
- [35] Slavić D, Boerlin P, Fabri M, Klotins KC, Zoethout J, Weir PE, et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res* 2011;75:89–97.
- [36] Silva ROS, D'Elia ML, Soares DFm, Cavalcanti AR, Leal RC, Cavalcanti G, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe* 2013;20:82–4.
- [37] Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol* 2012;61:169–79.
- [38] Norén T, Johansson K, Unemo M. *Clostridium difficile* PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(1):O2–6.
- [39] Obuch-Woszczatynski P, Dubiel G, Harmanus C, Kuijper E, Duda U, Wultańska D, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection in tuberculosis patients due to a highly rifampicin-resistant PCR ribotype 046 clone in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32(8):1027–30.
- [40] Båverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q* 2002;24:203–19.
- [41] Schneeberg A, Rupnik M, Neubauer H, Seyboldt C. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe* 2012;18(5):484–8.
- [42] Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med* 2001;15:374–8.
- [43] Båverud V, Gustafsson A, Franklin A, Aspán A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J* 2003;35:465–71.

- [44] Marks SL, Kather EJ. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet Microbiol* 2003 Jun 24;94(1):39–45.
- [45] Post KW, Songer JG. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe* 2004;10:47–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.01.003>. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701500> [accessed January 1th of 2014].
- [46] Fry PR, Thakur S, Abley M, Gebreyes WA. Antimicrobial resistance, toxinotype, and genotypic profiling of *Clostridium difficile* isolates of swine origin. *J Clin Microbiol* 2012;50:2366–72.
- [47] Magdesian KG, Dujowich M, Madigan JE, Hansen LM, Hirsh DC, Jang SS. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *J Am Vet Med Assoc* 2006;228(5):751–5.
- [48] Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Martínez-Nevado E, Peláez T, Harmanus C, Kuijper E, et al. Shedding of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (*Equus quagga burchellii*). *Vet Microbiol* 2014 Mar 14;169(3–4): 218–22.
- [49] Delmée M, Avesani V. Correlation between serogroup and susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1988;22: 325–31.
- [50] Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(6):516–22.
- [51] Shah D, Dang MD, Hasbun R, Koo HL, Jiang ZD, DuPont HL, et al. *Clostridium difficile* infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance. *Expert Rev Anti Infective Ther* 2010;8(5):555–64.
- [52] Miller MA, Byrne BA, Jang SS, Dodd EM, Dorfmeier E, Harris MD, et al. Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Vet Res* 2010;41:1.
- [53] Keel MK, Songer JG. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet Pathol* 2006;43(3):225–40.

Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil

Rodrigo Otávio Silveira Silva^[1], Eduardo Garcia Vilela^[2], Monique Silva Neves^[1]
and Francisco Carlos Faria Lobato^[1]

[1]. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. [2]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ABSTRACT

Introduction: Despite the known importance of *Clostridium difficile* as a nosocomial pathogen, few studies regarding *Clostridium difficile* infection (CDI) in Brazil have been conducted. To date, the diagnostic tests that are available on the Brazilian market for the diagnosis of CDI have not been evaluated. The aim of this study was to compare the performances of four commercial methods for the diagnosis of CDI in patients from a university hospital in Brazil. **Methods:** Three enzyme immunoassays (EIAs) and one nucleic acid amplification test (NAAT) were evaluated against a cytotoxicity assay (CTA) and toxigenic culture (TC). Stool samples from 92 patients with suspected CDI were used in this study. **Results:** Twenty-five (27.2%) of 92 samples were positive according to the CTA, and 23 (25%) were positive according to the TC. All EIAs and the NAAT test demonstrated sensitivities between 59 and 68% and specificities greater than 91%. **Conclusions:** All four methods exhibited low sensitivities for the diagnosis of CDI, which could lead to a large number of false-negative results, an increased risk of cross-infection to other patients, and overtreatment with empirical antibiotics.

Keywords: Nosocomial. Pseudomembranous colitis. Diagnosis. ELISA.

INTRODUCTION

Clostridium difficile was first isolated in 1935, but this microorganism was only recognized as a human pathogen in the late 1970s. Currently, *Clostridium difficile* infection (CDI) is recognized as the main cause of nosocomial diarrhea. In the last few years, the emergence of highly virulent strains of *C. difficile* in several countries¹ and cases in outpatients with no history of antibiotic therapy have been reported, demonstrating the need for further studies related to the diagnosis and control of this pathogen².

For many years, the detection of A/B toxins in feces via a cell cytotoxicity assay (CTA) was considered the *gold standard* method for the diagnosis of CDI². More recently, studies have shown that toxigenic culture (TC) is more sensitive; therefore, it has been used as the new *gold standard* method³. However, both techniques are time consuming, laborious, and require

trained personnel. Thus, commercial enzyme immunoassays (EIA) are currently the most widely used techniques for the diagnosis of CDI³.

Other potential options that have been widely cited include commercial real time polymerase chain reaction (PCR) kits and nucleic acid amplification tests (NAATs). Studies investigating these assays found that they exhibit high sensitivity, suggesting that they could be useful for screening patients with CDI^{2,4}. Currently, the main limitation of these kits is their high cost, which is typically up to ten times more expensive than EIAs⁵.

Despite the known importance of *C. difficile* as a nosocomial pathogen, few studies have been conducted regarding CDI in Brazil. To date, the diagnostic tests that are available on the Brazilian market for the diagnosis of CDI have not been evaluated. Therefore, the aim of this study was to compare the performance of three commercial EIAs and one NAAT for the diagnosis of diarrhea attributed to *C. difficile* versus cytotoxicity and toxigenic culture assays.

METHODS

Between December 2011 and June 2013, 92 stool samples were collected from patients at the University Hospital of the Federal University of Minas Gerais. All samples were obtained from inpatients with suspected *C. difficile*-associated diarrhea. Specimens were collected in sterile containers, and aliquots

Address to: Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva. EV/UFGM. Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil.

Phone/Fax: 55 31 3409-2103

e-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com

Received 8 May 2014

Accepted 31 July 2014

were held at -20°C until all tests were performed. All procedures were previously approved by the Research Ethics Committee of the School of Medicine of Federal University of Minas Gerais (CAAE - 0710.0.203.0000.11).

Cytotoxicity assays were performed using Vero (African green monkey kidney) cells (ATCC CCL 81)⁶. Briefly, fecal samples were diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (pH 7.0) and centrifuged at 3,000 x g for 5min at 4°C. The resulting supernatants were filtered through a 0.22-µm pore size filter and subject to 2fold dilutions until a dilution of 1:1024 was achieved. Serial dilutions and parallel samples with *Clostridium sordellii* antitoxin were added onto Vero cell monolayers. The cells were examined after 24 h of incubation at 37°C in a 5% CO₂ incubator. A specimen was considered positive by the CTA if at least 90% of cells were rounded and if the effects were neutralized by an antitoxin at the same dilution in a parallel sample.

For toxigenic culture, equal volumes of stool samples and 96% ethanol (v/v) were mixed. After incubation for 30min at room temperature, 50µl aliquots were inoculated on plates containing cycloserine-cefoxitin fructose agar supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate⁶. After anaerobic incubation at 37°C for 96h, all colonies with suggestive morphologies were subjected to a previously described multiplex-PCR protocol involving a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*), and a binary toxin gene (*cdtB*)⁷. All strains positive for *tcdA* or/and *tcdB* were considered toxigenic. In addition, all toxigenic isolates from the PCR were tested by CTA for *in vitro* toxin production as previously described⁸.

The following three commercial EIAs for A/B toxin detection were tested: *C. difficile* Tox A/B II (Techlab Inc., USA), Remel ProSpecT *C. difficile* Toxin A/B (Oxoid, UK), and Ridascreen *Clostridium difficile* toxins A/B (R-Biopharm, Germany). In addition, one commercial NAAT kit (Simplexa™ *C. difficile* Universal Direct Kit, Focus Diagnostics, USA) that directly detects the *tcdB* gene in stool samples was also tested. All EIAs and the NAAT were performed according to the manufacturers' recommendations. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and 95% confidence interval were calculated for each EIA and NAAT versus CTA and TC. Additionally, the kappa coefficient⁹ was calculated to compare the CTA and TC (Stata 12, College Station, Texas, USA).

RESULTS

From the 92 sampled patients, 25 (27.2%) were positive according to CTA. *C. difficile* was isolated from 29 (31.5%) samples, of which six isolates were considered non-toxigenic and 23 (25%) were toxigenic according to PCR. The kappa concordance between TC and CTA was 0.71 (95% confidence interval, 0.51-0.9). The three tested EIAs and the NAAT exhibited sensitivities between 59 and 68% and specificities greater than 91% (Table 1).

TABLE 1 - Evaluation of three immunoassays and RT-PCR compared with a cell cytotoxicity assay and toxigenic culture assay as the gold standards for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection in patients at a university hospital in Brazil.

Method	Cytotoxicity assay				Toxigenic culture			
	SE	SPE	PPV	NPV	SE	SPE	PPV	NPV
Cytotoxicity assay (CTA)	-	-	-	-	73.9 (53.5-87.5)	88.4 (78.8-94)	68 (48.4-82.8)	91 (81.8-95.8)
Toxigenic culture (TC)	68 (48.4-82.8)	91 (81.8-95.8)	73.9 (53.5-87.5)	88.4 (78.8-94)	-	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>								
Tox A/B II (Techlab)	68 (48.4-82.8)	97 (89.8-99.2)	89.5 (68.6-97.1)	89 (79.8-94.3)	65.2 (44.9-81.2)	98.5 (91.9-99.7)	93.8 (71.7-98.9)	89 (79.8-94.3)
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	64 (44.5-79.8)	94 (85.6-97.7)	80 (58.4-91.9)	87.5 (77.9-93.3)	60.9 (40.8-77.8)	91.3 (82.3-96)	70 (48.1-85.5)	87.5 (77.9-93.3)
Ridascreen <i>C. difficile</i> Toxins A/B (R-Biopharm)	64 (44.5-79.8)	100 (94.5-100)	99.9 (80.5-100)	88.2 (79-93.6)	60.9 (40.8-77.8)	97.1 (90-99.2)	87.5 (64-65)	88.2 (79-93.6)
Simplexa™ <i>C. difficile</i> Universal Direct Kit (Focus Diagnostics)	59.1 (38.7-76.7)	98.3 (90.9-99.7)	92.9 (68.5-98.7)	86.4 (76.1-92.7)	61.9 (40.9-79.2)	98.3 (91-99.7)	92.9 (68.5-98.7)	87.9 (77.9-93.7)

RT-PCR: real-time polymerase chain reaction; SE: sensitivity; SPE: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; CI: confidence interval of 95%.

DISCUSSION

Approximately ten years ago, it was believed that the CTA demonstrated sensitivity and specificity values greater than 99% and was thus considered the primary technique to diagnose CDI^{10,11}. However, when compared with toxigenic culture, the sensitivities of CTA protocols range between 60 and 86% with specificities greater than 90%⁵. Corroborating these findings, the CTA protocol used in the present study demonstrated a sensitivity of 73.9% (**Table 1**). It is also important to note that no standard protocol exists for CTAs. In this study, Vero cells were used; this cell line is considered to be the most sensitive to A/B toxins, and a similar CTA protocol was used successfully in previous studies^{6,8,12-15}.

In the TC assay, 23 (25%) patients were positive for toxigenic strains. Of these patients, 15 (65.2%) were A⁺B⁺CDT⁻, six (26.1%) were A⁺B⁺CDT⁺, and two (8.7%) were A⁻B⁺CDT⁻. All of the *C. difficile* isolates considered to be toxigenic by PCR produced toxins A and B *in vitro*. Conversely, the TC protocol had a sensitivity that was lower (73.9%) than the values commonly reported in previous studies, which have recorded sensitivities close to 100%^{2,16}. No standard method for TC assays with *C. difficile* is available, making it difficult to compare results from other studies. A wide variety of media and differences in isolation protocols, such as the use of shock alcohol and variations in incubation time, are common^{5,10}. In this study, we opted for a simple isolation protocol, which would be more applicable for diagnosis when compared with previous methods¹⁷. It is well known that some strains of *C. difficile* may not grow due to susceptibility to either one or both antibiotics used in the medium¹⁸. Recently, Malik et al.¹⁹ demonstrated that antibiotics used in selective media are responsible for the addition of stress in the recovery of *C. difficile* spores, which might reduce isolation rates. In addition, the use of CCFA, even with supplemental taurocholate, can result in a variable sensitivity for the recovery of *C. difficile* spores compared with protocols that use pre-enrichment broth before plating on selective agar¹⁹. All of these factors potentially contributed to the sensitivity exhibited in the TC assay in this study. It should be noted that, even with a TC protocol with sensitivity slightly lower than commonly reported, the concordance (kappa) between TC and CTA was 0.71. This value could be considered reflective of substantial agreement⁹ and is similar to that reported by Keessen et al.¹³

It also important to note that asymptomatic colonization by toxigenic or non-toxigenic *C. difficile* is considered rare in healthy adults. However, asymptomatic colonization is estimated to occur in approximately 9 to 20% in some groups, such as residents of long-term care facilities^{2,5,20}. The detection of the *tcdA* and *tcdB* genes by PCR may decrease the occurrence of false-positive results by TC after patients with non-toxigenic strains have been identified as not positive; in the present study, four (4.3%) patients who were suspected of having nosocomial diarrhea caused by *C. difficile* were negative for A/B toxins and carried non-toxigenic strains. Conversely, eight (8.7%) patients

were positive for TC but negative for A/B toxins by CTA and the three EIAs tested. In this case, a false-positive result should be considered a possibility. According to Peterson et al.²⁰, the false-positive rate for TC is approximately 10%. Therefore, comparisons of tests for the diagnosis CDI should be performed in parallel with CTA and TC as the gold standard methods.

Due to its ease of use, low cost and the fast turnaround for results, EIA remains the most commonly used test for the diagnosis of CDI in humans and animals worldwide^{10,12,20}. However, the three EIAs tested in this study demonstrated low sensitivities ranging from 61 to 68%. This result is similar to previous studies with EIA kits and rapid tests, which reported sensitivities between 50 and 77% and specificities of approximately 90%^{5,21,22}.

The NAAT tested in this study also exhibited a low sensitivity (less than 62%). This result contrasts with previous studies that have used other NAAT tests, which reported specificities and sensitivities greater than 90%^{5,21-23}. Compared with other kits on the market, the main advantage of the NAAT tested in this study is the lack of a protocol for deoxyribonucleic acid (DNA) extraction from stool samples, which could save time and labor. Briefly, in this test, the contents of a clinical specimen swab are immersed in a lysis solution, followed by heating and centrifugation. The resulting supernatant is directly used as a DNA template in a PCR reaction. Some authors have stated that false-negative results in the NAAT are primarily caused by the presence of gene copy numbers below the detection limits of the test²⁰⁻²⁴. Considering the number of false negative results obtained in the present work, the potential use of a more accurate extraction protocol should be considered for better performance of diagnostic tests; this modification might increase the number of gene copies and also reduce the presence of inhibitors in the sample reactions.

One sample exhibited an undetermined result in the NAAT. An additional unfrozen aliquot of this sample was retested, but an undetermined result was obtained. Thus, this sample was not considered when calculating the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for the NAAT test. This stool sample was also positive in TC (A⁺B⁺CDT⁻) but negative for A/B toxins in the CTA and in all three EIAs tested. Undetermined results are mainly caused by the presence of inhibitors in the stool sample⁵. It appears that this is not a common event, given that it occurred in only one sample out of 81 (1.2%) stool samples tested in the NAAT. This rate is similar to previous reports with other NAATs^{5,21}.

Several alternatives have been proposed to improve the diagnosis of CDI. In contrast to our results, the vast majority of commercial NAATs demonstrated high sensitivities in previous studies, but their high costs prevent their wide use^{2,5,21}. At institutions where EIAs are still used for the diagnosis of CDI, some authors have suggested the submission of more than one sample from the same patient, but this practice remains controversial given that some studies have demonstrated that multiple samples do not significantly increase the positive predictive value of the test and may even increase the rate of false positives^{5,25,26}. Some authors have also suggested that an

algorithm with at least two steps is required for the accurate diagnosis of CDI in humans, but there is still no consensus on which tests should be used in each step^{5,16,22,27}.

In conclusion, all four methods tested in this study demonstrated low sensitivities for the diagnosis of CDI under the conditions tested. This might lead to a large number of false-negative results, which could increase the risk of cross-infection to other patients and also overtreatment with empirical antibiotics²¹. The present study reinforces the need for research focusing on new methods or algorithms for the diagnosis of *C. difficile*, given that control of CDI is nearly impossible and the risk of its dissemination is high without a secure diagnosis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Pró-Reitoria de Pesquisa-Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG).

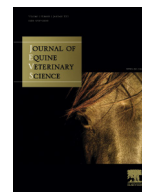
REFERENCES

- Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. J Med Microbiol 2012; 61:169-179.
- Silva Júnior M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. Einstein 2012; 10:105-109.
- René P, Frenette CP, Schiller I, Dendukuri N, Brassard P, Fenn S, et al. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 73:94-96.
- Viala C, Le Monnier A, Maataoui N, Rousseau C, Collignon A, Poilane I. Comparison of commercial molecular assays for toxigenic *Clostridium difficile* detection in stools: BD GeneOhm Cdiff, XPert C. *difficile* and illumigene C. *difficile*. J Microbiol Methods 2012; 90:83-85.
- Humphries RM. Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. Clin Microbiol Newsletter 2012; 34:151-157.
- Silva RO, Ribeiro MG, Palhares MS, Borges AS, Maranhão RP, Silva MX, et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. Equine Vet J 2013; 45:671-675.
- Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Junior ECC, Pires PS, Santos RLR, Assis RA, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. Ciênc Rural 2011; 41:1130-1135.
- Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. J Vet Intern Med 2010; 24:628-632.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33:159-174.
- Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001; 7:411-416.
- Wilcox MH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection: in a state of transition or confusion or both? J Hosp Infect 2011; 79:1-3.
- van den Berg RJ, Bruijnesteijn van Coppenraet LS, Gerritsen HJ, Endtz HP, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. J Clin Microbiol 2005; 43:5338-5340.
- Keessen EC, Hopman NE, van Leengoed LA, van Asten AJ, Hermanus C, Kuijper EJ, et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. J Clin Microbiol 2011; 49:1816-1821.
- Silva ROS, Moreira FM, Rezende JV, Pires PS, Maranhão RPA, Palhares MS, et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. Ciênc Rural 2012; 42:498-500.
- Silva RO, D'elia ML, Magalhães Soares DF, Cavalcanti AR, Leal RC, Cavalcanti G, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). Anaerobe 2013; 20:82-84.
- Shin BM, Kuak EY, Lee EJ, Songer JG. Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2009; 47:2952-2956.
- Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. J Clin Microbiol 2010; 48:2082-2086.
- Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. J Vet Diagn Invest 2005; 17:528-536.
- Malik DJ, Patel KV, Clokie MR, Shama G. On the difficulties of isolating *Clostridium difficile* from hospital environments. J Hosp Infect 2013; 84:181-183.
- Peterson LR, Manson RU, Paule SM, Hacek DM, Robicsek A, Thomson Jr RB, et al. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis 2011a; 45:1152-1160.
- Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. J Clin Microbiol 2009; 47:3211-3217.
- Alcalá L. Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: past, present, and future. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013; 31:65-67.
- Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, Babiker W, Wehrin J, Ikpeama I, et al. Comparison of a commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J Clin Microbiol 2009; 47:373-378.
- Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, et al. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. J Clin Microbiol 2010; 48:889-893.
- Litvin M, Reske KA, Mayfield J, McMullen KM, Georgantopoulos P, Copper S, et al. Identification of a pseudo-outbreak of *Clostridium difficile* infection (CDI) and the effect of repeated testing, sensitivity, and specificity on perceived prevalence of CDI. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30:1166-1171.
- Gade R, Turett G. The utility of repeated stool toxin testing for diagnosing *Clostridium difficile* colitis. South Med J 2009; 102:1007-1009.
- Peterson LR, Mehta MS, Patel PA, Hacek DM, Harazin M, Nagwekar PP, et al. Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel. Am J Clin Pathol 2011; 136:372-380.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com

Short Communication

Evaluation of Three Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea in Foals

Rodrigo Otávio Silveira Silva PhD^{a,*}, Monique Silva Neves M.Sc.^a, Márcio Garcia Ribeiro PhD^b, Maristela Silveira Palhares PhD^a, Renata de Pino Albuquerque Maranhão PhD^a, Francisco Carlos Faria Lobato PhD^a

^a Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Universidade Estadual Paulista—UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2014

Received in revised form 2 May 2014

Accepted 9 May 2014

Available online xxxx

Keywords:

Colitis

Enteritis

Diarrhea

Zoonosis

Equine

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the test performances of three commercial enzyme immunoassays (EIAs) against the toxigenic culture using the cytotoxicity assay as the gold standard. All EIAs showed >78% sensitivity, and the lowest specificity was 92.6%. These results suggest that EIAs could be useful for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection in foals.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, gram-positive bacillus responsible for most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans [1]. In veterinary medicine, this bacterium is the major cause of diarrhea and colitis in several domestic animals and some wildlife [2,3]. In foals, *C. difficile* causes diarrhea, ranging from a mild, self-limiting form to a peracute and fatal disease [4]. In addition, studies have also shown that strains isolated from humans suffering from *C. difficile* infection (CDI) exhibit high genetic relatedness with strains isolated from animals, suggesting the possibility of a zoonotic disease [5].

There is no “gold standard” for the diagnosis of CDI in foals. In contrast, for humans, the cytotoxicity assay (CTA)

and, more recently, toxigenic culture (TC) are considered to be “gold-standard” diagnostic assays [1]. Both assays are labor intensive and time consuming. Thus, commercial enzyme immunoassays (EIAs) remain the most common method used for the diagnosis of CDI in humans [6,7]. However, only one study has evaluated the use of a single EIA for equine stool samples, thus the performance of most commercially available detection methods remains unknown [6]. Therefore, the aim of the present study was to compare the test performances of three commercial EIAs to the performances of the gold-standard CTA and TC for the diagnosis of *C. difficile* in foal stool samples.

2. Methods and Materials

A total of 104 samples were obtained from foals aged between 1 day and 6 months; 68 of these samples were obtained from diarrheic foals submitted to the Veterinary Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for the routine diagnosis of diarrhea, and 36 were normal

* Corresponding author at: Rodrigo Otávio Silveira Silva, PhD, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Antônio Carlos Avenue, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: rodrigo.otaviosilva@gmail.com (R.O.S. Silva).

stool samples collected from clinically healthy foals. All specimens were collected at the time of clinical examination in sterile containers and were stored at -20°C until further analysis up to 7 days.

The CTA for the detection of *C. difficile* A/B toxins was performed using Vero cells (Vero–ATCC CCL 81) as previously described [8]. Briefly, the fecal samples were diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (pH 7.0) and centrifuged at $3,000 \times g$ for 5 minutes at 4°C . The resulting supernatant was filtered through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ pore size filter and diluted twofold until a dilution of 1:1,024 was achieved. The serial dilutions and parallel samples containing *Clostridium sordellii* antitoxins (National Institute for Biological Standards and Control, England) were applied onto the Vero cell monolayers. The cells were examined after 24 hours of incubation at 37°C in a 5% CO_2 incubator. A specimen was considered positive if at least 90% of the cells were rounded, and the effect was neutralized with antitoxin at the same dilution in a parallel sample.

For isolation, the stool samples were submitted to alcohol shock, and 50 μL of aliquots were inoculated onto plates containing cycloserine-cefoxitin fructose agar (TCCFA–Hi-media, Mumbai, India) supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (Sigma-Aldrich Co, St. Louis) [9]. After anaerobic incubation at 37°C for 72 hours, all colonies with morphology and Gram staining suggestive of *C. difficile* were subjected to a multiplex polymerase chain reaction for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*), and a binary toxin gene (*cdtB*) as previously described [10]. A toxigenic *C. difficile* strain (ATCC 9689) was used as a control for the TC method.

Three commercial EIAs for A/B toxin detection were tested: *C. difficile* Tox A/B II (Techlab Inc), Remel ProSpecT *C. difficile* Toxin A/B (Oxoid, UK), and Ridascrreen *C. difficile* toxins A/B (R-Biopharm, Germany). The EIAs were performed according to the manufacturer's instructions. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value, and 95% confidence interval were calculated for each EIA against CTA and TC, and kappa coefficient was calculated to compare CTA and TC (STATA 12, College Station, TX).

3. Results

The A/B toxins were detected by CTA in 10 foals (14.7%) from the diarrheic group. *Clostridium difficile* strains were recovered from 12 (11.5%) animals, of which nine strains were considered toxigenic and three were nontoxigenic ($\text{A}^{-}\text{B}^{-}\text{CDT}^{-}$) by polymerase chain reaction. Three toxigenic strains were $\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{+}$, whereas the remaining six strains were $\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{-}$. The clinical status and age of the animals that were positive for A/B toxins or/and TC are summarized in Table 1. The kappa concordance between TC and CTA was 0.71 (0.51–0.9 in a 95% confidence interval). All EIAs showed sensitivities of 77.8% and 100% compared with TC and CTA, respectively, whereas the specificity was $>92.6\%$ (Table 2).

4. Discussion

The high sensitivity and specificity of the EIAs for the foal stool samples were consistent with the results of

Table 1

Details of all foals positive for toxin detection and/or toxigenic culture.

Foal Age	Clinical Status	Toxin Detection ^a	Toxigenic Culture
20 d	Mild diarrhea	–	Nontoxigenic ($\text{A}^{-}\text{B}^{-}\text{CDT}^{-}$)
2 d	Nondiarrheic	–	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{-}$)
2 mo	Nondiarrheic	–	Nontoxigenic ($\text{A}^{-}\text{B}^{-}\text{CDT}^{-}$)
5 d	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{-}$)
15 d	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{-}$)
15 d	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{+}$)
27 d	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{-}$)
30 d	Profuse diarrhea	+	Negative
2 mo	Profuse diarrhea	+	Negative
2 mo	Profuse diarrhea	+	Negative
3 mo	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{-}$)
5 mo	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{+}$)
5 mo	Profuse diarrhea	+	Toxigenic ($\text{A}^{+}\text{B}^{+}\text{CDT}^{+}$)

^a Toxin detection by cytotoxicity assay and three commercial enzyme immunoassays.

Medina-Torrez et al [6], who examined a single EIA and reported a sensitivity and specificity of 84% and 96%, respectively. These results suggest that EIAs could be useful for diagnosis of *C. difficile*–associated diarrhea in foals.

The TC showed a sensitivity of 70% compared with CTA; three samples were negative by TC but positive by CTA. These samples were also positive in the three EIAs tested, suggesting that the absence of isolation was associated with the TC protocol and did not result from a false-positive result by CTA. This result might have underestimated the sensitivity of the EIAs tested. Compared with CTA, all EIAs showed 100% sensitivity, but showed 77.8% sensitivity compared with TC. Notably, even with this potential underestimation, the resulting sensitivity of the tested EIAs could be considered high. Unfortunately, there is no standard method for the TC of *C. difficile*, making it difficult to compare the results of TC from similar studies. Various mediums have been reported, and differences in the isolation protocols, such as the use of alcohol shock, and differences in incubation time have also been proposed. Thus, the present study reported a simple isolation method, which would be faster and easier to perform compared with previous studies [6,11,12]. In this protocol, the samples were submitted to an alcohol shock and were directly plated onto TCCFA agar, followed by 72-hour incubation. Some *C. difficile* strains did not grow, reflecting a susceptibility to one or both of the antibiotics used on this medium [13]. Recently, Malik et al [14] also showed that the antibiotics used in the selective media are responsible for an additional stress to the recovery of *C. difficile* spores, potentially reducing the isolation rates. In addition, the use of TCCFA, even with the supplementation of taurocholate, could have a variable sensitivity compared with enrichment medium, such as TCCFB (cefoxitin-cycloserine broth, supplemented with taurocholate) [14,15]. These factors might have influenced the low sensitivity observed by TC for the foal samples. However, even with this slightly lower sensitivity, the concordance (kappa) between TC and CTA was 0.71, which could be considered a substantial agreement [16]. Anyway, the results of TC took at least 6 days to obtain, even with the simple protocol used in the present study. Considering that CDI in foals is commonly a clinical emergency [4], TC might not be applicable for diagnosis.

Table 2
Comparison of the three commercial enzyme immunoassays to cytotoxicity assay and toxigenic culture as gold standards for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals (n = 104).

Method	Cytotoxicity Assay % (95% CI)				Toxigenic Culture % (95% CI)			
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Cytotoxicity assay	—	—	—	—	77.8 (45.3–93.7)	96.8 (91.1–98.9)	—	—
Toxigenic culture	70 (39.7–89.2)	97.9 (92.6–99.4)	77.8 (45.3–93.7)	96.8 (91.1–98.9)	—	—	70 (39.7–89.2)	97.9 (92.6–99.4)
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	100 (72.1–100)	98.9 (94.2–99.8)	90.9 (62.3–98.4)	100 (96–100)	77.8 (45.3–93.7)	95.8 (89.7–98.4)	63.6 (35.4–84.8)	97.8 (92.5–99.4)
Remel ProSpecT <i>C. difficile</i> Toxin A/B (Oxoid)	100 (72.1–100)	95.7 (89.6–98.3)	71.4 (45.4–88.3)	100 (95.9–100)	77.8 (45.3–93.7)	92.6 (85.6–96.4)	50 (26.8–73.2)	97.8 (92.3–99.4)
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	100 (72.1–100)	95.7 (89.6–98.3)	71.4 (45.4–88.3)	100 (95.9–100)	77.8 (45.3–93.7)	92.6 (85.6–96.4)	50 (26.8–73.2)	97.8 (92.3–99.4)

Abbreviations: CI, confidence interval of 95%; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Although the absence of A/B toxins in nondiarrheic foals has been previously reported [8,17,18], a recent survey showed that clinicians and pathologists commonly request the inclusion of normal stool samples from foals for the laboratory diagnosis of CDI [6]. Similar to previous studies reported for human samples, the inclusion of normal samples might lead to a decrease in the PPV [1,6,19]. A total of 36 nondiarrheic samples were included in the present study, and none of these samples were positive by CTA. However, four nondiarrheic samples showed false-positive results in the EIAs tested. Similar to a previous report by Medina-Torres et al [6], our findings suggest that non-diarrheic samples should not be tested when using an EIA for the diagnosis of CDI in foals.

In the present study, a toxigenic strain was isolated from a nondiarrheic 2-day-old foal, negative for A/B toxins by CTA and all EIAs tested. The main hypothesis in this case is related to an asymptomatic carrier status. This possibility was already reported for equines, particularly for animals younger than 14-days-old [20]. The asymptomatic carrier status is a known event in human, although it is considered rare in healthy adults; however, asymptomatic carrier status could account for approximately 9%–20% in some groups, such as residents of long-term care facilities [1,21].

Acknowledgments

This work was supported by funds from FAPEMIG, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, INCT-Pecuária, and PRPq-UFMG.

References

- [1] Silva Júnior M. Recent changes in *Clostridium difficile* infection. *Einstein* 2012;10:105–9.
- [2] Silva RO, Guedes RM, Lobato FC. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciênc Rural* 2013;43:73–80.
- [3] Silva RO, Déllia ML, de Magalhães Soares DF, Cavalcanti AR, Leal RC, Cavalcanti G, Pereira PL, Lobato FC. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe* 2013;20:82–4.
- [4] Diab SS, Songer G, Uzal FA. *Clostridium difficile* infection in horses: a review. *Vet Microbiol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.032>. pii: S0378-1135(13)00205-8.
- [5] Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol* 2010;140:399–404.
- [6] Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med* 2010;24:628–32.
- [7] René P, Frenette CP, Schiller I, Dendukuri N, Brassard P, Fenn S, Loo VG. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:94–6.
- [8] Silva RO, Ribeiro MG, Palhares MS, Borges AS, Maranhão RP, Silva MX, Lucas TM, Olivo G, Lobato FC. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet J* 2013;45:671–5.
- [9] Avbersek J, Janežic S, Pate M, Rupnik M, Zidaric V, Logar K, Vengust M, Zemljic M, Pirs T, Ocepek M. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe* 2009;15:252–5.
- [10] Silva RO, Salvarani FM, Cruz-Junior EC, Pires PS, Santos RL, Assis RA, Lobato FC. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciênc Rural* 2011;41:1130–5.

- [11] Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. J Clin Microbiol 2010;48:2082–6.
- [12] Keessen EC, Hopman NE, van Leengoed LA, van Asten AJ, Hermanus C, Kuijper EJ, Lipman LJ. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. J Clin Microbiol 2011;49:1816–21.
- [13] Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. J Vet Diagn Investig 2005;17:528–36.
- [14] Malik DJ, Patel KV, Clokie MR, Shama G. On the difficulties of isolating *Clostridium difficile* from hospital environments. J Hosp Infect 2013;84:181–3.
- [15] Thitaram SN, Frank JF, Lyon SA, Siragusa GR, Bailey JS, Lombard JE, Haley CA, Wagner BA, Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. J Food Prot 2011;74:130–3.
- [16] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977;33:159–74.
- [17] Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. Equine Vet J 2001;33:403–9.
- [18] Bäverud V, Gustafsson A, Franklin A, Aspán A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. Equine Vet J 2003;35:465–71.
- [19] Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001;7:411–6.
- [20] Bäverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. Vet Q J 2002;24:203–19.
- [21] Humphries RM. Laboratory tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Newsl 2013;34:151–7.

Padronização de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*

Standardization of a model of *Clostridium difficile* infection in syrian hamsters *Mesocricetus auratus*

Rodrigo Otávio Silveira Silva^{*} Roberto Maurício Carvalho Guedes¹
Michelle de Paula Gabardo¹ Carlos Augusto Oliveira Junior¹ Felipe Masiero Salvarani¹
Prhiscylla Sadanã Pires¹ Guilherme Guerra Alves¹ Francisco Carlos Faria Lobato¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi padronizar um modelo de infecção por *Clostridium difficile* (ICD) em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*). Para seleção dos isolados capazes de causar letalidade, cinco animais por grupo receberam uma dose de clindamicina (30mg kg⁻¹) por gavagem. Após 48 horas, administraram-se 10⁷ unidades formadoras de colônia (UFC), por animal, de quatro diferentes isolados toxigênicos de *C. difficile*. Selecionou-se um dos isolados capazes de causar diarreia e letalidade e administrou-se 4x10²; 4x10⁴; 4x10⁶; 4x10⁸ UFC por animal, novamente com cinco hamsters por grupo. Em todas as diluições testadas, foi possível observar a ocorrência de diarreia e morte. A maior concentração testada (4x10⁸ UFC por animal) causou óbito de 100% dos hamsters do grupo. Todos os animais que vieram a óbito apresentaram tíflite hemorrágica, foram positivos para as toxinas A/B e foi possível isolar *C. difficile* do conteúdo intestinal, confirmando a reprodução experimental da doença. A dose letal para 50% da população foi estabelecida em 6,3x10⁴ UFC por animal. O modelo de indução de ICD em hamsters descritos no presente estudo passa a ser uma ferramenta valiosa para estudos relativos à patogênica, tratamento e controle dessa doença.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, diarreia nosocomial, modelo animal, infecção hospitalar.

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize a model of *Clostridium difficile* infection (CDI) in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). In order to evaluate strains capable of causing lethality, five hamsters per group received clindamycin (30mg kg⁻¹) by gavage. After 48 hours, 10⁷ colony forming units (CFU) of spores' solution of four strains were administered per animal. One strain capable of causing diarrhea and death was selected and administered at the following concentrations: 4x10²; 4x10⁴; 4x10⁶; 4x10⁸ CFU per animal. All dilutions tested were able to cause diarrhea and death. The highest concentration showed 100% of mortality. Post mortem evaluation revealed hemorrhagic

typhlitis in all death animals. In addition, all intestinal contents were positive for A/B toxins, and toxigenic *C. difficile* strains were isolated, confirming the induction of infection by this microorganism. The dose lethal to 50% of the population was calculated: 6.3x10⁴ CFU per animal. The standardized model of CDI in hamster is now available for studies on pathogenesis, treatment and control of this disease.

Key words: *Clostridium difficile*, nosocomial diarrhea, animal model, hospital infection.

INTRODUÇÃO

Considerando um patógeno emergente, *Clostridium difficile* é responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos (BALASSIANO et al., 2011). Em animais, a infecção por *C. difficile* (ICD) foi recentemente confirmada no Brasil em potros, cães e descrita em uma jaguatirica criada em cativeiro (SILVA et al., 2013a; SILVA et al., 2013b; SILVA et al., 2013c). Em suínos, estudos recentes sugerem uma grande disseminação da doença em granjas brasileiras com elevado número de matrizes (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011), dado semelhante ao relatado nos últimos anos em países da Europa e nos Estados Unidos, onde a ICD é considerada a principal causa não controlada de diarreia em leitões (SONGER, 2010).

Apesar da crescente importância de *C. difficile* como enteropatógeno para animais domésticos e humanos, não existem produtos

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com. *Autor de correspondência.

imunoprolifáticos para a doença. Em animais, somado aos prejuízos causados pelo agente, especialmente na suinocultura e equinocultura, pesquisas sugerem ainda que a infecção por *C. difficile* seja uma possível zoonose (ARROYO et al., 2005; JHUNG et al., 2008). Caso essa hipótese seja confirmada, a prevenção da doença e até mesmo da colonização por *C. difficile* no trato gastro intestinal de animais domésticos passará a ser uma prioridade (SILVA et al., 2013d).

Para o desenvolvimento e avaliação de métodos de controle e tratamento da infecção por *C. difficile*, faz-se necessário a utilização de modelos animais de indução da doença. A principal espécie utilizada para tal são os hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), devido a sua alta sensibilidade a ICD, fazendo com que seja possível realizar a indução com diversas classes de antimicrobianos e sem a necessidade de obtenção de animais livres de patógenos. Porém, a maioria dos trabalhos sobre modelos animais de ICD são pouco descritivos e deixam em aberto pontos essenciais para reprodução do protocolo de indução, tais como estirpe utilizada, dose de antimicrobiano e forma de administração (BEST et al., 2012). Além disso, a maioria dos estudos relata o uso de amostras de *C. difficile* não disponíveis no Brasil, dificultando a reprodução em nosso meio (HOWERTON et al., 2013; NAGARO et al., 2013). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi padronizar um protocolo de infecção por *C. difficile* em hamsters sírios, disponibilizando-o para futuros estudos sobre patogenia, tratamento e métodos de controle da ICD no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados cinco fêmeas de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), com quatro a oito semanas de idade, por grupo experimental. Água, maravalha, ração e gaiolas foram esterilizadas por autoclavagem (121°C por 20 minutos). Os animais foram acondicionados em estantes ventiladas, equipadas com filtros absolutos (Alesco Co., Inglaterra) para minimizar a contaminação do ambiente e entre os grupos experimentais.

Estirpes avaliadas

Quatro estirpes toxigênicas (A⁺B⁺) de *C. difficile*, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, foram pré-selecionadas para avaliação quanto à toxigenicidade *in vivo*, sendo elas: ATCC 9689, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz;

EQ5, estirpe isolada de um potro com ICD (PREIS et al., 2012); Z14, estirpe isolada de um cão aparentemente saudável; I4, estirpe isolada de um suíno com ICD.

Produção dos esporos das estirpes de *C. difficile*

Os esporos de *C. difficile* foram produzidos de acordo com YANG et al. (2009). As estirpes de *C. difficile* foram inoculadas em erlenmeyer contendo 250mL de BHI (Difco Laboratories, EUA), seguindo de incubação a 37°C por 72 horas em ambiente de anaerobiose. Após esse período, as culturas foram mantidas por cinco dias em temperatura ambiente para induzir a esporulação. O conteúdo foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos e ressuscitado com 10mL de salina esterilizada 0,85% por duas vezes. Posteriormente, a suspensão foi submetida ao aquecimento de 80°C por 30 minutos, e repetição do protocolo de centrifugação. As soluções foram alíquotadas em microtubos esterilizados, contendo 300µL, e armazenadas a -20°C até a utilização.

Uma semana após a produção, as soluções de esporos foram avaliadas por meio de coloração de Gram, coloração de esporos (Wirtz-Conklin) e teste respiratório em ágar sangue, constituído de ágar Muller-Hinton (Difco Laboratories, EUA) suplementado com 5% de sangue ovino. Para determinação da concentração de unidades formadoras de colônia por mL, diluições seriadas na base 10 (variando de 10⁻³ a 10⁻⁸) foram inoculadas em ágar sangue. Após incubadas por 48 horas em ambiente de anaerobiose produzido por mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂), placas com 30 a 300 colônias foram contadas e calculou-se a média de UFC/mL.

Para determinação da viabilidade da solução de esporos armazenada à -20°C, uma alíquota da solução da estirpe ATCC9689 foi descongelada mensalmente, durante um período total de seis meses, e submetida à contagem de UFC/mL, como descrito anteriormente. As contagens obtidas ao longo do período de avaliação foram comparadas pelo teste do qui-quadrado e pelo teste de Fisher, em um nível de significância de 95% (P<0,05) (STATA, College Station, Texas, EUA).

Avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*

O objetivo desta etapa foi avaliar quais estirpes eram capazes de infectar os hamsters e, consequentemente, causar diarreia e óbito desses. A avaliação de toxigenicidade *in vivo* foi realizada segundo SAMBOL et al. (2002). Dois dias após uma dose de clindamicina (30mg kg⁻¹), administrou-

se 100µL de solução de esporos contendo 10^7 UFC das estirpes toxigênicas em cada animal. As administrações foram realizadas por gavagem. Os grupos, contendo cinco hamsters em cada, foram divididos da seguinte forma: no grupo 1 (G1), os animais receberam esporos da estirpe ATCC9689; no grupo 2 (G2), foram administrados esporos da estirpe EQ5; no grupo 3 (G3), os animais receberam esporos da estirpe Z14; no grupo 4 (G4), administrou-se a estirpe I4; no grupo 5 (C1), os animais receberam apenas a dose de clindamicina e, 48 horas depois, uma dose de 100µL de salina esterilizada 0,85%; no grupo 6 (C2), os animais receberam apenas esporos da estirpe toxigênica ATCC9689, sem a administração prévia de clindamicina.

Os animais foram observados diariamente por 30 dias quanto à ocorrência de diarreia (presença de fezes amolecidas na gaiola, cauda e focinho com sujidades indicativas) e morte. Após o término do experimento ou quando ocorria o óbito, os animais eram necropsiados e fragmentos do ceco eram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, foi feito o processamento pela técnica de desidratação, diafanização, inclusão, secção de 5 micras e coração pela hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e avaliação histológica, realizada em microscópio de luz clara. Coletou-se ainda o conteúdo intestinal para detecção das toxinas A/B pelo teste de citotoxicidade celular (CTA) e isolamento de *C. difficile*, como descrito por SILVA et al. (2013d).

Determinação da dose mínima mortal (DMM) e da dose letal para 50% (DL_{50})

Dentre as estirpes capazes de causar infecção e letalidade, selecionou-se uma para avaliação da DMM e cálculo da DL_{50} . Foram formados

cinco grupos contendo cinco hamsters em cada. Administrou-se uma solução de esporos contendo 4×10^2 (grupo A1), 4×10^4 (grupo A2), 4×10^6 (grupo A3) e 4×10^8 (grupo A4) UFC por animal. No quinto grupo (grupo controle), houve administração de apenas 100µL de salina esterilizada 0,85%. Utilizou-se mesmo esquema de indução e acompanhamento descrito para a avaliação da toxigenicidade *in vivo*. O total de óbitos ocorridos em cada grupo ao final do período de avaliação foi comparado pelo teste de Fisher, em um nível de significância de 95% ($P < 0,05$) (STATA, College Station, Texas, EUA).

RESULTADOS

Na produção das soluções de esporos, a contagem de unidades formadoras de colônia variou de $2,0 \times 10^8$ a $4,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ entre as estirpes trabalhadas. A contagem inicial da estirpe ATCC9689 foi de $2,2 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, sendo que a média das sete contagens foi de $2,1 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ e o desvio padrão de $\pm 1,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, não havendo alteração significativa da contagem bacteriana ao longo do tempo testado.

Na avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*, todas as amostras testadas foram consideradas toxigênicas, uma vez que foram capazes de causar diarreia e morte dos animais (Tabela 1). No exame *post mortem*, a mucosa e a serosa do ceco dos animais que vieram a óbito encontravam-se extensamente hemorrágicas e com conteúdo líquido de aspecto sanguinolento (Figura 1: B1). Na avaliação histopatológica, foi possível observar uma extensa destruição da mucosa intestinal com infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrocíticas, caracterizando uma tíflite necro-hemorrágica (Figura 1: B2).

Tabela 1 - Ocorrência de diarreia, morte, lesões intestinais e resultado de isolamento e detecção das toxinas A/B por CTA nos grupos inoculados (G1 a G4) e nos grupos controle (C1 e C2) com diferentes estirpes toxigênicas de *Clostridium difficile*.

Grupo (Estirpe)	-----Ocorrência (%)-----		Lesões ¹	Isolamento ²	Toxinas A/B
	Diarreia	Morte			
G1 (ATCC)	4/5 (80)	5/5 (100)	Sim	Positivo	Positivo
G2 (EQ5)	3/5 (60)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
G3 (Z14)	4/5 (80)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
G4 (I4)	3/5 (60)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
C1 (Nenhuma)	0/5 (0)	0/5 (0)	Não	Negativo	Negativo
C2 (ATCC)	0/5 (0)	0/5 (0)	Não	Negativo	Negativo

¹Presença de lesões macroscópicas e microscópicas nos animais que vieram a óbito. ²Isolamento de estirpes de *C. difficile* toxigênicas.

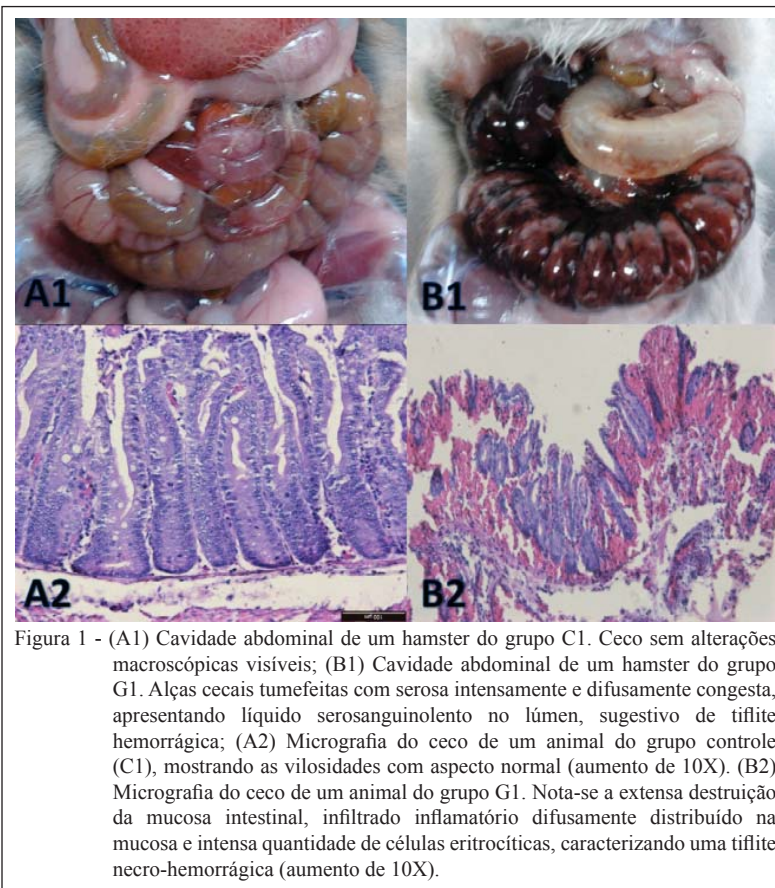


Figura 1 - (A1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo C1. Ceco sem alterações macroscópicas visíveis; (B1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo G1. Alças cecais tumefeitas com serosa intensamente e difusamente congesta, apresentando líquido serosanguinolento no lúmen, sugestivo de tífite hemorrágica; (A2) Micrografia do ceco de um animal do grupo controle (C1), mostrando as vilosidades com aspecto normal (aumento de 10X). (B2) Micrografia do ceco de um animal do grupo G1. Nota-se a extensa destruição da mucosa intestinal, infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrocíticas, caracterizando uma tífite necro-hemorrágica (aumento de 10X).

A partir do conteúdo intestinal, coletado durante a necropsia dos hamsters que vieram espontaneamente a óbito, foi possível detectar as toxinas A/B e isolar *C. difficile* de todos os animais avaliados (Tabela 1). Já nos grupos controle (C1 e C2), nenhum animal desenvolveu diarreia ou veio a óbito durante o período de observação. Tais hamsters foram eutanasiados 30 dias pós-desafio e nenhuma alteração *post mortem* significativa foi observada (Figura 1: A1 e A2). O conteúdo do ceco encontrava-se com consistência pastosa a sólida e não foi possível detectar as toxinas A/B ou isolar *C. difficile* de nenhum animal dos grupos controle (Tabela 1).

Selecionou-se a estirpe ATCC9689 para prosseguimento do trabalho. A figura 2 mostra o tempo de sobrevivência nos 30 dias de observação dos animais inoculados com diferentes concentrações da estirpe ATCC9689 durante a determinação da DMM e DL₅₀. Comparando com o grupo controle, foi possível perceber uma diferença significativa na ocorrência de morte nos grupos A2, A3 (P=0,038) e no grupo A4 (P=0,001). Todos os hamsters que vieram a óbito possuíam lesões hemorrágicas no ceco e foram positivos para as toxinas A/B de *C. difficile*, confirmando novamente a indução da doença.

DISCUSSÃO

O protocolo de produção de esporos permitiu a obtenção de uma suspensão rica de esporos livres (sem a presença do corpo celular), com alto grau de pureza e sem contaminação no teste respiratório. Resultados semelhantes de pureza e concentração foram relatados por YANG et al. (2009) para obtenção de esporos de *Clostridium sporogenes* e *Clostridium hungatei*, sugerindo que esse protocolo, apesar de simples, é suficiente para a obtenção de uma solução de esporos de alta concentração e de elevada pureza.

Enquanto alguns trabalhos com modelos de ICD em hamsters não especificam a forma bacteriana administrada (ANTON et al., 2004), outros autores relatam o uso de apenas células vegetativas (MCVAY & ROLFE, 2000; KOKKOTOU et al., 2008), apenas esporos (SAMBOL et al., 2002; NAGARO et al., 2013) ou proporções estimadas de ambos (OCHSNER et al., 2009). No presente estudo, optou-se por trabalhar com soluções de esporos livres que, devido à alta resistência típica dessa forma bacteriana, sofrem menos alterações na concentração de UFC após armazenamento. Como o esperado, as

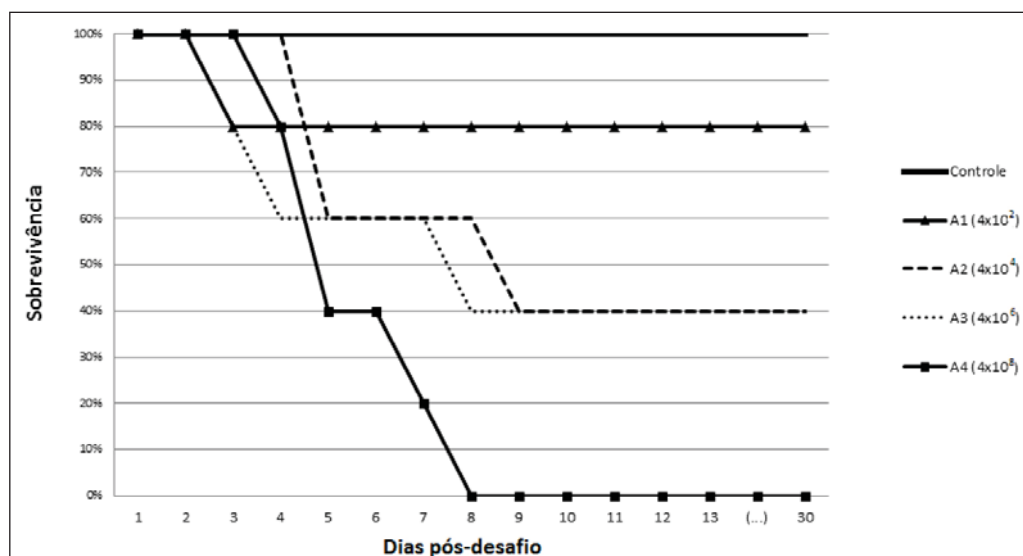


Figura 2 - Sobrevivência de hamsters durante o período de observação de 30 dias dos grupos de animais inoculados com diferentes concentrações de esporos da estirpe ATCC9689 (A1 a A4) de *Clostridium difficile* e do grupo controle.

contagens seguintes à inicial apresentaram resultados semelhantes em todos os sete tempos avaliados, totalizando seis meses de armazenagem sem alteração significativa da contagem. Tal resultado demonstra a resistência dos esporos de *C. difficile* armazenados a -20°C e confirma a possibilidade de armazenamento da solução nessas condições, facilitando o protocolo de indução, devido à não necessidade de contínua produção e dosagem da estirpe a ser utilizada.

Na avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*, as lesões observadas foram similares às comumente relatadas em infecções por *C. difficile* em hamsters e outros roedores de laboratório (SAMBOL et al., 2002; BEST et al., 2012; HOWERTON et al., 2013; NAGARO et al., 2013). Tais alterações foram ainda encontradas em todos os animais que vieram a óbito durante o experimento, incluindo aqueles que não apresentaram diarreia previamente. Além das lesões características, o isolamento e detecção das toxinas A/B nesses animais confirmam a indução da doença (Tabela 1).

Nos grupos controle (C1 e C2), não foram observados indícios de colonização ou infecção por *C. difficile* (Tabela 1). Tais resultados confirmam que não houve infecção cruzada no grupo C1, uma vez que tais animais receberam antimicrobiano e estariam susceptíveis à colonização por *C. difficile*. No grupo C2, a ausência de infecção demonstra que não houve colonização pela estirpe ATCC9689, provavelmente, devido ao “efeito barreira” da microbiota íntegra (BÄVERUD, 2002).

Três animais, dos grupos G1, G2 e G4, vieram a óbito antes que o quadro clínico de diarreia

pudesse ser observado. A infecção por *C. difficile* em hamsters é comumente fulminante, culminando com um quadro hiperagudo da doença, que é caracterizado por extensa necrose intestinal e toxemia, podendo ocorrer óbito dos animais antes mesmo da visualização do quadro clínico de diarreia (CHEN et al., 2008; BEST et al., 2012; HOWERTON et al., 2013).

Nos três animais que sobreviveram, dos grupos G2, G3 e G4, não foram observadas alterações *post mortem* significativas e não foi possível detectar as toxinas A/B. Além disso, *C. difficile* não foi isolado do conteúdo intestinal, semelhante aos animais dos dois grupos controle. Acredita-se que a falha de indução possa ter ocorrido pela administração de uma dose insuficiente de esporos de *C. difficile* ou a microbiota não tenha sido suficientemente agredida pela dose de antibiótico administrada, permanecendo o efeito barreira (BÄVERUD, 2002).

Como todas as estirpes trabalhadas foram capazes de induzir a diarreia, optou-se por prosseguir o trabalho com a estirpe ATCC9689, por tratar-se de uma estirpe de referência certificada, internacionalmente reconhecida e fornecida gratuitamente pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), as universidades e órgãos de pesquisa brasileiros. Na figura 2, percebe-se que os óbitos iniciaram 24 horas após a administração dos esporos, mas concentraram-se principalmente entre 72 e 96 horas pós-desafio, resultado semelhante ao relatado em trabalhos anteriores com hamsters (SAMBOL et al., 2002; NAGARO et al., 2013). Além da utilização de diferentes estirpes de *C. difficile*, o grande número de

diferentes protocolos de administração em modelos de ICD dificulta comparações. Em geral, as doses variam de 10^7 a 10^4 UFC por animal, porém a via de administração (gavagem, via oral), o tempo após antibioticoterapia que a estirpe é administrada e até mesmo a forma bacteriana utilizada (esporos, células vegetativas) variam, impedindo conclusões. Por outro lado, independente da forma e estirpe utilizada, a grande maioria dos trabalhos utilizam doses que causam entre 60 e 100% de letalidade (SAMBOL et al., 2002; CHEN et al., 2008; BEST et al., 2012; HOWERTON et al., 2013; NAGARO et al., 2013). Considerando a diferença estatística apresentada entre os grupos desafiados, quando comparados com o grupo controle, seria possível utilizar qualquer dose entre 4×10^4 e 4×10^8 UFC da estirpe ATCC9689, por animal, para estudos de avaliação de métodos de proteção ou de tratamento. Alguns trabalhos de indução de infecções para outros micro-organismos utilizam também a DL_{50} . No presente estudo, a DL_{50} calculada segundo REED & MUENCH (1938) foi de $6,3 \times 10^4$ UFC por animal.

O protocolo padronizado no presente estudo permitiu a utilização de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) como modelo de indução da infecção por *C. difficile*, disponibilizando-o como uma ferramenta valiosa para estudos relativos à patogenia, tratamento e controle dessa doença no Brasil.

APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Protocolo número 142/2012, CEUA-UFMG.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT). FCFL e RMCG possuem bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

- ANTON, P.M. et al. Rifalazil treats and prevents relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n.10, p.3975-3979, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388461>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1128/AAC.48.10.3975-3979.2004.
- ARROYO, L.G. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, p.163-6, 2005. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673511>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1099/jmm.0.45805-0.
- BALASSIANO, I.T. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, n.2, p.249-255, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20623188>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1007/s10482-010-9483-8.
- BÄVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Veterinary Quarterly*, v.24, n.4, p.203-219, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540137>>. Accessed: May 04, 2013.
- BEST, E.L. et al. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, v.2, p.145-167, 2012. doi: 10.4161/gmic.19526.
- CHEN, X. et al. A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, v.135, p.1984-1992, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848941>>. Accessed: May 04, 2013.
- HOWERTON, A. et al. A new strategy for the prevention of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Infectious Diseases*, v.207, p.1498-504, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420906>>. Accessed: Dec. 04, 2013. doi: 10.1093/infdis/jit068.
- JHUNG, M.A. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.7, p.1039-1045, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598622>>. Accessed: May 04, 2013.
- KOKKOTOU, E. et al. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.52, n.3, p.1121-1126, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598622>>. Accessed: May 04, 2013. Doi: 10.1128/AAC.01143-07.
- LIPPKE, R.T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.6, p.505-510, 2011. doi: 10.1590/S0100-736X2011000600008.
- LUNA, L.G. Routine staining procedures. In: LUNA, L.G. (Ed). *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. New York: McGraw- Hill Book, 1968. p.32-29.
- MCVAY, C.S.; ROLFE, R.D. *In vitro* and *in vivo* activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p.2254-2258, 2000. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90054>>. Accessed: May 04, 2013.
- NAGARO, K.J. et al. Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57, p.5266-5270, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939887>>. Accessed: Dec. 01, 2013. doi: 10.1128/AAC.00580-13.
- OCHSNER, U.A. et al. Inhibitory effect of REP3123 on toxin and spore formation in *Clostridium difficile*, and *in vivo* efficacy in a hamster gastrointestinal infection model. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v.63, p.964-971, 2009. doi:10.1093/jac/dkp042.

- PREIS, I.S. et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5, n.1, p.7-11, 2012.
- REED, L.J; MUENCH, H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.494-497, 1938.
- SAMBOL, S.P. et al. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. **Journal of Infection Diseases**, v.186, n.12, p.1781-1789, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447764>>. Accessed: May 04, 2013.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p.131-137, 2013a. doi:10.1590/S1517-83822013005000008.
- SILVA, R.O.S. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). **Anaerobe**, v.20, p.82-84, 2013b. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467074>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.02.007.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. **Equine Veterinary Journal**, v.45, p.671-675, 2013c. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452044>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1111/evj.12046.
- SILVA, R.O.S. et al. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. **Ciência Rural**, v.43, n.1, p.73-80, 2013d. doi:10.1590/S0103-84782012005000137.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. **Ciência Rural**, v.41 n.8, p.1130-1135, 2011. doi:10.1590/S0103-84782011005000100.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.399-404, 2010. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.003.
- YANG, W. et al. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p-27-33, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120612>>. Accessed: May 04, 2013. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03931.x.