

Monique da Silva Neves

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A INFECÇÃO POR
Clostridium difficile EM POTROS E SERES HUMANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2014

N518a Neves, Monique da Silva, 1980-
Avaliação de métodos diagnósticos para a infecção por *Clostridium difficile* em potros e seres humanos / Monique da Silva Neves. – 2014.
36 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Clostridium difficile – Teses. 2. Diarreia – Teses. 3. Colite – Teses. 4. Diagnóstico – Técnicas – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 616.931

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente - Orientador



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Felipe Masiero Salvarani
Universidade Federal do Pará

Aos meus pais, Urcisino e Rosaria, que sempre estiveram ao meu lado, me fazendo acreditar nos meus sonhos, me incentivando e auxiliando na busca dos meus ideais com o maior amor do mundo.

Ao meu namorado Júnior, por todo seu amor, apoio e incentivo.

Aos meus amigos, por tornarem a minha vida mais doce.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita grandeza, por me permitir viver cada momento aprendendo com os desafios encontrados e por sempre me proporcionar a abençoada oportunidade de conhecer e conviver com pessoas tão especiais.

Aos meus pais, pelo incentivo e por me ensinarem a importância da construção e coerência dos meus próprios valores sustentada em princípios de amor e honestidade. Obrigada pelos beijos, abraços apertados e mimos todas as vezes que eu retornava para a nossa casinha. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Andreia, Anderson e Michelle por acreditarem em mim com tanto orgulho. Obrigada por me fazerem sentir perto mesmo quando a saudade parecia infinita.

Aos meus sobrinhos, Carine, Dayene, Kaique, Thalia e Amanda, pelo carinho e prazer indiscutível dos nossos encontros, me proporcionando momentos de felicidade plena e abstração total.

Ao Júnior, pelo amor, paciência, apoio e incentivo nos momentos difíceis, por me fazer acreditar e ir além durante o desânimo, por me fazer sorrir quando meu coração estava apertadinho com saudade da minha família, e por tantas outras coisas que me fazem imensamente feliz. Obrigada por ser música em minha vida, “Amorめuzinho”!

A Ana Victória, pela convivência, pelos momentos de distração e brincadeiras junto com a Dorian, a cachorrinha mais fofa do mundo.

Pâmela, obrigada por ter sido muito mais que uma amiga. Você foi um presente de Deus na minha vida, dividindo os momentos de saudade da família e do nosso cantinho (Rio de Janeiro). Obrigada pelo incentivo, companheirismo e pelas risadas tornando minha vida mais leve e feliz.

A Rachel Abrahão e Maria Gamarra pelas risadas e afeto principalmente nos nossos almoços de domingo.

Agradeço com imenso carinho ao Prof. Francisco Lobato, pela sua orientação, pela atenção dispensada e conselhos nos momentos em que mais precisei. A sua simplicidade e preocupação com o próximo me fizeram o admirar mais. Obrigada por tudo!

A Luciana Aramuni, pela fundamental amizade, pela convivência, pelos risos e longas conversas que me trouxe a plena certeza de que a providência de Deus se manifesta através dos amigos. Obrigada por ser tão incrível comigo!

Ao Felipe Masiero, pelo aprendizado nas atividades desenvolvidas no laboratório e visitas à fazenda. Obrigada pela amizade em todos os momentos, pelos conselhos e incentivo que foram essenciais.

A Phriscilla Pires, pelo carinho, pelas conversas, amparo e momentos de alegria.

Ao Guilherme Guerra, pela agradável convivência durante o período do mestrado.

Ao Prof. Marcos Bryan, pelo entusiasmo contagiante no grupo de estudos e por ser inspiração como professor e pesquisador.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal e corpo docente da Escola de Veterinária da UFMG pelo aperfeiçoamento profissional e amadurecimento científico.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV – UFMG Grazielle Cossenno e Eduardo Nogueira por estarem sempre dispostos a ajudar.

As tias Rute e Carmélia, pelo tratamento tão afetuoso me fazendo sentir como se estivesse em casa.

Aos animais que me encantam desde a infância e são constante fonte de inspiração para mim. Em especial, aos meus gatos por todos os momentos vividos e pelo prazer do som de cada “ron ron” em nossos encontros.

A todos os meus amigos que mesmo distante nunca me deixaram esquecer o significado da verdadeira amizade.

“O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. HISTÓRICO.....	14
2.2. PATOGENIA.....	14
2.3. INFECÇÃO ASSOCIADA À <i>Clostridium difficile</i>	15
2.3.1. Equinos.....	15
2.3.2. Seres Humanos.....	16
2.4. DIAGNÓSTICO.....	17
2.4.1. Detecção das toxinas A e B.....	17
2.4.2. Isolamento e Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	18
2.5. CONTROLE.....	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	20
4.2. MEIOS DE CULTURA.....	20
4.3. AMOSTRAS DE FEZES.....	20
4.3.1. Equinos.....	20
4.3.2. Seres Humanos.....	20
4.4. COMITÊ DE ÉTICA.....	20
4.5. DIAGNÓSTICO.....	21
4.5.1. Isolamento de <i>C. difficile</i>	21
4.5.2. PCR <i>Multiplex</i>	21
4.5.3. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	22
4.5.4. Ensaio de citotoxicidade celular (CTA).....	23
4.5.5. ELISA.....	24
4.6. ESTATÍSTICA.....	24
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR *Multiplex* para amplificação dos genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB* de *C. difficile*.

Tabela 2: Resultados positivos e negativos no ensaio de citotoxicidade celular, no isolamento e PCR *Multiplex* e nos testes imunoenzimáticos, para diagnóstico da infecção *C. difficile* em potros diarreicos e não diarreicos (aparentemente saudáveis).

Tabela 3: Comparação de três testes imunoenzimáticos, isolamento e PCR *Multiplex* frente ao ensaio de citotoxicidade em células como “padrão-ouro” para o diagnóstico da infecção por *Clostridium difficile* em potros.

Tabela 4: Resultados positivos e negativos no ensaio de citotoxicidade celular, isolamento e PCR *Multiplex*, testes imunoenzimáticos e qRT-PCR, para diagnóstico da infecção *C. difficile* em seres humanos.

Tabela 5: Resultados positivos e negativos no ensaio de citotoxicidade celular, nos testes imunoenzimáticos, qRT-PCR, isolamento e PCR *Multiplex* para diagnóstico da infecção *C. difficile* em seres humanos.

Tabela 6: Comparação de qRT-PCR, três testes imunoenzimáticos, isolamento e PCR *Multiplex* frente ao ensaio de citotoxicidade em células como “padrão-ouro” para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em seres humanos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma geral do experimento.

Figura 2: Gráficos de possíveis curvas de amplificação, onde o eixo das abscissas corresponde ao número de ciclos e o eixo das ordenadas corresponde à fluorescência. A e B – Curvas de amplificação válidas (crescimento exponencial e progressivo); C – Curva de amplificação inválida.

RESUMO

Clostridium difficile tem sido apontado como importante enteropatógeno em potros e seres humanos causando diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa. O objetivo deste estudo foi comparar o isolamento seguido da tipificação por PCR Multiplex, três kits de ELISA e um kit de qRT-PCR comercialmente disponíveis, para o diagnóstico de *C. difficile*, em função dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) frente ao ensaio de citotoxicidade celular (CTA), utilizando amostras de fezes de potros e de seres humanos. Do total de 104 amostras de fezes de potros, 10 (9,6%) foram consideradas positivas no CTA, considerado o teste “padrão-ouro”, e 12 (11,5%) consideradas positivas para o isolamento e PCR Multiplex que apresentou 70% de sensibilidade, 94,7% de especificidade e valores preditivos positivo e negativo de 58,3% e 96,7%, respectivamente. Os três kits de ELISA foram capazes de identificar as amostras positivas no CTA apresentando 100% de sensibilidade, especificidade superior a 95%, valor preditivo positivo (VPP) entre 71% e 91% e valor preditivo negativo (VPN) igual a 100%. Das 78 amostras de fezes de seres humanos, 18 (23,07%) foram consideradas positivas no CTA e 13 (16,66%) destas, identificadas no isolamento e PCR Multiplex que apresentou 72,22% de sensibilidade, 81,66% de especificidade e valores preditivos positivo e negativo de 54,16% e 90,74%, respectivamente. Dois dos três kits de ELISA testados, identificaram 13 (16,66%) amostras igualmente positivas no CTA apresentando sensibilidade de 72,22%, e o outro kit, identificou 14 amostras apresentando 77,77% de sensibilidade. A especificidade dos três kits ELISA ficou entre 93 e 100%. O VPP ficou acima de 76% e o VPN acima de 90%. A qRT-PCR, utilizada para as amostras de fezes de seres humanos, apresentou sensibilidade de 61,11%, especificidade de 98,30% e valores preditivos positivo e negativo de 91,11% e 89,23%, respectivamente. Todos os kits de ELISA são adequados para o diagnóstico da CDI em potros devido à alta sensibilidade e especificidade apresentada. Já o isolamento seguido da PCR Multiplex apresentou baixa sensibilidade, não sendo adequado para o diagnóstico de CDI em potros. Todos os métodos empregados neste estudo para o diagnóstico de *C. difficile* em amostras de fezes de seres humanos, apresentaram baixa sensibilidade o que pode implicar em um maior número de resultados falso negativos contribuindo para a disseminação de esporos no ambiente e infecção de outros pacientes susceptíveis. Diante disto, nenhum dos métodos avaliados é indicado para o diagnóstico de CDI em seres humanos reforçando a necessidade de mais estudos a fim de se obter métodos com maior sensibilidade ou a padronização de algoritmos de diagnóstico, permitindo assim um controle mais eficiente da CDI em pacientes internados.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, diarreia nosocomial, colite pseudomembranosa, métodos de diagnóstico, potros, seres humanos.

ABSTRACT

Clostridium difficile has been identified out as an important pathogen in foals and human causing nosocomial diarrhea and pseudomembranous colitis. The aim of this study was to compare the isolation followed by the typification by Multiplex PCR, three kits of ELISA and a kit of qRT-PCR commercially available, for the diagnosis of *C. difficile*. The parameters evaluated were sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) against to cytotoxicity assay (CTA) by using stool samples of foals and humans. A total of 104 stool samples from foals, 10 (9.6%) were considered positive at CTA, considered the test "gold standard", and 12 (11.5 %) considered positive by isolation and Multiplex PCR that had 70% of sensitivity, 94.7% of specificity, positive predictive values of 58.3% and negative predictive values of 96.7%. The three kits of ELISA were able to identify the positive samples at CTA showing 100% of sensitivity, specificity greater than 95%, positive predictive value (PPV) between 71% and 91% and negative predictive value (NPV) of 100%. A total of 78 samples of feces from humans, 18 (23.07%) were considered positive at CTA and 13 (16.66%) were identified by isolation and Multiplex PCR presenting 72.22% of sensitivity, 81.66% of specificity, positive predictive values of 54.16% and negative predictive values of 90.74 %. Two of three kits of ELISA tested were able to identify 13 (16.66%) samples also positive at CTA and presenting sensitivity of 72.22%. The other kit identified 14 samples presenting 77.77% of sensitivity. The specificity of the three kits ELISA was between 93 and 100%. The PPV was above 76% and the NPV above 90%. The qRT-PCR used for samples from humans, presenting a sensitivity of 61.11%, specificity of 98.30%, positive predictive value of 91.11% and negative predictive value of 89.23%. All ELISA kits were suitable for diagnosis of CDI in foals due to the high sensitivity and specificity. Already, the isolation followed by Multiplex PCR showed low sensitivity, it is not suitable for diagnosis of CDI in foals. All methods employed in this study of stool samples from human showed low sensitivity, which could result in an increase in the number of false negative results, this contributes to the spread of spores in environment and possible infection of susceptible patients.

Key words: *Clostridium difficile*, nosocomial diarrhea, pseudomembranous colitis, diagnostic methods, foals, humans.

1. INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio estrito, capaz de esporular em condições adversas. É comumente encontrado no intestino de mamíferos e tem sido apontado como responsável por distúrbios entéricos em diferentes espécies animais, sendo mais comum em suínos e equinos (Baverud, 2002) além de causar diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos (Balassiano et al., 2011). Em equinos, a infecção por *C. difficile* acomete principalmente potros com até cinco meses de idade, sendo caracterizada por uma diarreia profusa (Songer et al., 2009), podendo evoluir para enterocolite necrotizante e óbito (Keel e Songer, 2006). Assim como em seres humanos, nesta espécie raramente a infecção ocorre de forma espontânea, sendo normalmente associada à depleção da microbiota intestinal, causada principalmente pela utilização prévia ou prolongada de antimicrobianos de amplo espectro (Weese et al., 2000). Os esporos de *C. difficile* desempenham papel fundamental na transmissão e infecção. Como são resistentes à maioria dos desinfetantes comerciais empregados, podem permanecer viáveis por longos períodos no ambiente. Alguns estudos apontam para a contaminação primária deste agente em ambiente hospitalar onde o profissional de saúde desempenha um importante papel no carreamento de esporos por meio das mãos e fômites expondo os pacientes mais suscetíveis (Poutanen e Simor, 2004; Rupnik et al., 2009). Os principais fatores de risco tanto para os seres humanos quanto para equinos é o uso de antimicrobiano e a permanência em ambiente hospitalar. Sendo assim, o aumento do tempo de hospitalização aumenta consideravelmente o risco de ocorrer a infecção por *C. difficile* (Kyne et al., 2002). Outros fatores

predisponentes relacionam-se à competência imunológica do paciente bem como aos fatores de virulência do agente (Bartlett, 2009).

As alterações da microbiota intestinal acarretadas pelo uso de antimicrobiano, contribuem para a germinação dos esporos com consequente proliferação das células vegetativas (Denève et al., 2009) e produção das toxinas A (enterotoxina) e B (citotoxina), que atuam em conjunto causando lesão no epitélio intestinal (Rupnik et al., 2009). Algumas estirpes produzem também uma terceira toxina conhecida como toxina binária, cujo real significado, tanto em seres humanos quanto em animais, ainda não foi elucidado.

O diagnóstico laboratorial da infecção por *C. difficile* (CDI) é baseado na detecção das toxinas A e B, em amostras de fezes por meio do ensaio de citotoxicidade celular (CTA), considerado o "padrão-ouro", ou pelo ELISA (Delmeé et al., 2001). Porém, todos os kits de ELISA disponíveis no mercado brasileiro são importados além de terem sido padronizados para a detecção das toxinas A e B a partir de amostras de fezes de seres humanos, fazendo com que a sensibilidade e especificidade sejam extremamente variáveis entre eles, e nas diversas espécies animais. A associação entre o isolamento e a produção de toxinas *in vitro* ou a tipificação dos fatores de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), também pode ser útil para o diagnóstico e tem se mostrado essencial para o estudo epidemiológico da CDI (Peterson et al., 2011). Geralmente, os genes alvo usados na PCR são os relacionados aos fatores de virulência como *tcdA* e *tcdB* que codificam as toxinas A e B respectivamente (Kononen et al., 2009; Crobach et al., 2009). Além disso, os genes que codificam a toxina binária, o RNA ribossomal 16S e a enzima glutamato desidrogenase foram descritos em alguns trabalhos previamente publicados (Crobach et al., 2009; Persson et al., 2008).

Estudos de validação tem sido propostos para implementar a PCR em tempo real (qRT-PCR) como diagnóstico na rotina laboratorial. Do mesmo modo como a PCR convencional, a qRT-PCR é capaz de amplificar os genes *tcdA* e *tcdB* além do gene constitutivo *tpi*, sendo muito mais sensível que a PCR convencional (Kononen et al, 2009). Mais recentemente, foi indicado para contribuir com o diagnóstico de CDI, um kit comercial de PCR em tempo real (qRT-PCR) capaz de detectar somente o gene *tcdB* diretamente de amostras de fezes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

Clostridium difficile foi descrito pela primeira vez como parte integrante da microbiota intestinal de neonatos saudáveis em 1935 por Hall e O'Toole, sendo denominado *Bacillus difficilis* dado a sua morfologia e dificuldade de isolamento em meio de cultura. Estes pesquisadores demonstraram que o microrganismo em questão era toxigênico, uma vez que provocava óbito em coelhos e cobaias quando inoculados como filtrado de cultura pura. Poucos relatos na literatura foram publicados sobre o isolamento desta bactéria durante 40 anos, entretanto, alguns pesquisadores consideravam a possibilidade dessa espécie ser capaz de causar doença em seres humanos (Voth e Ballard, 2005). Por volta de 1970, as bactérias anaeróbias foram apontadas como importantes agentes causadores de doenças sendo realizados vários estudos em busca de antimicrobianos eficientes contra esses agentes infecciosos, tendo sido a lincomicina um dos primeiros a serem usados com sucesso (Lyerly, 1988). Porém, o seu uso indiscriminado aumentou consideravelmente o número de casos de diarreia e de colite pseudomembranosa (CPM) em seres humanos. Mas foi em 1974 que Tedesco et al. apresentaram em um estudo prospectivo em seres humanos, a relação entre a administração de

Diante da importância de *C. difficile* como enteropatógeno em potros e seres humanos, o objetivo deste estudo foi avaliar o isolamento seguido da tipificação por PCR *Multiplex* para detecção dos genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*, três kits de ELISA e um kit de qRT-PCR comercialmente disponíveis, em função dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) frente ao CTA, utilizando-se amostras de fezes de potros e seres humanos.

clindamicina e apresentação CPM, que é a forma mais grave da infecção associada à *C. difficile*. Embora a CPM tenha sido descrita pela primeira vez em 1893 por Finney somente em 1978, *C. difficile* foi apontado como agente etiológico deste quadro clínico por George et al. (Rupnik et al, 2009). Neste mesmo ano, Bartlett et al. demonstraram que as fezes de pacientes que fizeram uso prévio de antimicrobiano e com CPM possuíam uma substância capaz de causar citotoxicidade em cultura de tecido e enterocolite quando inoculadas em hamsters. Os efeitos encontrados foram neutralizados com o uso de antitoxina para gangrena gasosa sugerindo então que o agente etiológico da CPM poderia ser algum clostrídio toxigênico. Ainda em 1978, George et al. publicaram um trabalho relatando o isolamento de *C. difficile* a partir de fezes de um paciente com CPM, e descreveram que as toxinas produzidas por esse microrganismo podiam ser neutralizadas pela antitoxina de *C. sordellii*. Além disso, Larson et al. (1978) corroboraram estes resultados e descreveram o isolamento de *C. difficile* a partir de fezes de diferentes pacientes com CPM.

2.2. PATOGENIA

Os esporos de *C. difficile* desempenham papel fundamental na transmissão, infecção e persistência do

agente por períodos prolongados no ambiente, já que resistem ao uso da maioria dos desinfetantes comerciais empregados, favorecendo a sua propagação. Alterações da microbiota intestinal como depleção provocada pela administração de antimicrobianos ou até mesmo antes do seu completo estabelecimento, como ocorre em leitões nas primeiras horas de vida, contribuem para a infecção endógena ou exógena por esporos, e sua germinação com consequente proliferação das células vegetativas e produção dos fatores de virulência (Denève, 2009; Baverud, 2002).

Os principais fatores de virulência de *C. difficile* descritos são as toxinas A e B, codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente. Estes, se encontram em uma região genômica denominada locus de patogenicidade (PaLoc) que além dos genes citados é constituído pelos genes *tcdC*, *tcdE* e *tcdR*. Acredita-se que estes últimos genes sejam responsáveis pela regulação da produção de toxinas. O *tcdR* está envolvido na regulação positiva dos genes *tcdA* e *tcdB* ou seja, sua expressão implica na produção das toxinas A e B. O gene *tcdC* atua como regulador negativo, e é altamente expresso durante a fase exponencial de multiplicação da bactéria, diminuindo quando se aproxima a fase estacionária. Esse declínio da expressão do *tcdC* é acompanhado pelo aumento na produção das toxinas A e B. Já *tcdE* pode estar envolvido com a liberação das toxinas A e B por meio da parede celular. Embora o PaLoc caracterize diferentes tipos toxigênicos por meio da variação da sequência de DNA, ele está presente no mesmo local de integração cromossômica em todas as estirpes toxigênicas analisadas até o momento, sendo substituído por uma sequência não codificadora em estirpes não toxigênicas (Voth e Ballard, 2005; Rupnik et al., 2009).

A toxina A possui receptores na lâmina basal das células epiteliais provocando ruptura das junções celulares permitindo a ligação da toxina B a seus receptores que encontram-se na região baso-

lateral das células, amplificando a lesão (Lyerly et al., 1988). A toxina A é uma enterotoxina capaz de provocar intensa secreção de fluidos, e liberação de mediadores inflamatórios que estimulam macrófagos, com consequente atração quimiotática de leucócitos. Já a toxina B é uma potente citotoxina capaz de provocar alterações morfológicas, geralmente irreversíveis, em diferentes tipos celulares. Além disso, a toxina B reduz a síntese proteica e inibe a divisão celular por promover a diminuição na síntese de ácidos ribonucleico e desoxirribonucleico. Dessa maneira, a toxina B apresenta uma atividade antiproliferativa (Florin, 1984). Ambas as toxinas atuam em conjunto causando a desorganização da actina do citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose culminando no surgimento dos sintomas da infecção (Kuehne et al., 2011).

Algumas estirpes são capazes de produzir outra toxina denominada binária (CDT) cujo real significado, tanto em seres humanos quanto em animais, ainda não foi elucidado. A CDT é codificada em uma região separada do cromossomo, conhecido como *Cdtloc*, que compreende três genes: *cdtA* e *cdtB*, responsáveis pela codificação do componente de ligação e componente enzimático, respectivamente e *cdtR*, que possui a função de regulação gênica (Rupnik et al., 2009). A CDT pode agir sinergicamente com as toxinas A e B podendo assim, aumentar a severidade da doença (Gonçalves et al., 2004). Poucos estudos foram realizados avaliando a presença dos genes relacionados com a codificação desse fator de virulência em estirpes isoladas de animais.

2.3. INFECÇÃO ASSOCIADA À *Clostridium difficile*

2.3.1. Equinos

Em equinos, a CDI manifesta-se por uma colite em animais adultos e diarreia

comumente profusa em potros (Songer et al, 2009). Geralmente observa-se marcante presença de gás no intestino grosso podendo evoluir para uma enterocolite necrotizante (Keel e Songer, 2006). A infecção acomete principalmente potros com até cinco meses de idade podendo ocorrer de forma espontânea (Baverud et al, 2004). Normalmente, CDI é encontrada associada a algum desequilíbrio da microbiota intestinal principalmente pela utilização de antimicrobianos, de forma semelhante como acontece em seres humanos (Weese et al., 2000). A eritromicina, ceftiofur, norfloxacino, florfenicol, lincomicina e os beta-lactâmicos em geral são os antimicrobianos comumente relacionados ao desenvolvimento da CDI em equinos (Baverud, 2002; Preis et al., 2012; Silva et al., 2012). É importante salientar ainda que a utilização de múltiplos antimicrobianos tem sido associada a um maior risco de desenvolvimento da CDI em potros (Magdesian et al., 2002; Preis et al., 2012).

No Brasil, a prevalência da doença nesta espécie permanece pouco conhecida devido à ausência de inquérito epidemiológico. Até o presente momento, trabalhos sobre a ocorrência de CDI em potros limitam-se a dois relatos de caso (Preis et al., 2012; Silva et al., 2012). Preis et al. (2012) descreveram um caso de enterite por *C. difficile* em um animal de 12 dias de vida, que desenvolveu a infecção quatro dias após a administração de ciprofloxacina seguido de florfenicol e enrofloxacino para tratamento de conjuntivite purulenta associada a candidíase. Já Silva et al. (2012) relataram a ocorrência de diarreia em dois animais de cinco meses de idade, que desenvolveu a doença cinco dias após a administração de penicilina para tratamento de uma possível pneumonia. Em ambos os relatos, a suspeita inicial para a causa da diarreia era salmonelose. Entretanto, o diagnóstico laboratorial realizado no segundo relato permitiu a alteração da antimicrobiana terapia com foco na CDI e o

restabelecimento dos animais. No relato descrito por Preis et al. (2012), a ausência de diagnóstico da CDI e consequente continuidade da administração de florfenicol e enrofloxacino tornou desfavorável o prognóstico do potro, que foi eutanasiado e necropsiado após onze dias de diarreia.

Estes trabalhos confirmam a ocorrência da doença em equinos no país e demonstram a necessidade da implementação do diagnóstico de CDI na rotina laboratorial para as diarreias em potros, em especial quando o início dos sinais clínicos ocorre poucos dias após a administração de antimicrobianos, ou em casos onde os fármacos comumente utilizados para outros agentes bacterianos causadores de diarreia, não resultam em melhora clínica significativa (Silva et al., 2011; Silva et al., 2012).

2.3.2. Seres Humanos

A principal manifestação clínica da CDI em seres humanos é a diarreia aquosa de volume variado, que pode evoluir para uma colite pseudomembranosa, caracterizada por uma severa inflamação da mucosa colônica e pela formação de uma pseudomembrana composta de fibrina, muco, células epiteliais necrosadas e leucócitos (George et al., 1978; Gröschel, 1996). Em geral, o quadro clínico produzido por *C. difficile* ocorre em pacientes que tiveram a microbiota intestinal alterada pelo uso prévio de antimicrobiano e/ou quimioterápico. Outros fatores predisponentes para CDI são o período de hospitalização, a gravidade de outras doenças associadas e a condição imunológica do paciente (Poutanen e Simor, 2004; Schoroder, 2005)

Desde a década de 70, *C. difficile* passou a ser reconhecido como o principal agente responsável pela diarreia associada ao uso de antimicrobiano de forma prolongada, em seres humanos, e um patógeno nosocomial de grande importância, sendo relacionado com morbimortalidade crescente em diversos países (Samie et al., 2008). Durante a década de 90, a incidência

de CDI 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 a resistência ao tratamento antimicrobiano convencional. Em dois levantamentos epidemiológicos realizados 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 se deve ao uso, muitas vezes indiscriminado, de antimicrobianos, considerado o principal fator de risco para essa infecção. Outros fatores predisponentes reconhecidos são a idade avançada, e a hospitalização ou a permanência em instituições de saúde (Bartlett, 2009).

No Brasil, o primeiro trabalho com foco na 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 (UTI). Desses, 22 (44,8%) foram diagnosticados com CDI. 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 imunodeprimidos com diarreia nosocomial após o uso de antimicrobiano de amplo espectro. A infecção por *C. difficile* foi confirmada em seis dos 21 pacientes (28,5%), sendo possível isolar o agente em quatro desses. As quatro estirpes isoladas foram positivas para os genes que codificam

os principais fatores de virulência, as toxina A (*tcdA*) e B (*tcdB*). 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 CDI. O período mais crítico foi entre 2007 e 2008, quando o hospital vivenciou um surto de diarreia nosocomial. Neste período, 101 amostras foram coletadas e em 32 (31,6%) delas foram detectadas as toxinas A e B. Aproximadamente 80% dos pacientes infectados no surto possuíam mais de 65 anos, todos encontravam-se imunodeprimidos e fazendo uso de antimicrobiano. Em 2011, Balassiano et al. publicaram um trabalho em que todos os pacientes estavam fazendo uso de antimicrobiano de amplo espectro e eram considerados imunodeprimidos. Dos 70 pacientes com diarreia nosocomial, 19 (27,1%) foram confirmados com CDI.

O avanço da biologia molecular permitiu a classificação das estirpes de acordo com a análise dos fragmentos de restrição, perfil obtido na eletroforese de campo pulsado e ribotipagem. De acordo com essa classificação, foi possível observar a similaridade entre estirpes isoladas de seres humanos com CDI e de animais domésticos, como bovinos, suínos e cães (Arroyo et al., 2005; Jhung et al., 2008, Norman et al, 2011) sugerindo um possível papel zoonótico de *C. difficile*.

2.4. DIAGNÓSTICO

2.4.1. Detecção das toxinas A e B

O diagnóstico laboratorial da CDI, tanto em seres humanos quanto em animais, pode ser realizado por meio da visualização do efeito citopático em cultura celular CTA (*Cell Cytotoxicity Assay*), a partir do uso de amostras de fezes, considerado por muitos autores como o método "padrão-ouro".

Diversas linhagens celulares são comumente utilizadas no CTA como fibroblastos, CHO (*Chinese Hamster Ovary*), VERO (*African Green Monkey Kidney*), e linhagens de origem tumoral como a HeLa (Henrietta Lacks – célula de adenocarcinoma humano extraído do colo do útero), Hep-2 (célula derivada de carcinoma humano da laringe) (Delméé, 2001).

O CTA consiste na inoculação de uma suspensão de filtrado fecal em cultivo celular e a observação da presença do efeito citopático, causado principalmente pela toxina B, que é considerada cerca de 1000 vezes mais citotóxica que a toxina A (Ciesla et al., 1998). A leitura é realizada após 24 a 48 horas de incubação e a confirmação é realizada pela neutralização do efeito citopático por anticorpos específicos contra as toxinas A e B de *C. difficile*, ou de *C. sordellii* que apresentam antígenos comuns (Delméé, 2001). Este método tem como principal vantagem a alta sensibilidade e especificidade (97,2% e 99,2% respectivamente) (Doern et al., 1992), por outro lado, o resultado é demorado podendo ser de 24 a 48 horas, e exige a necessidade de pessoal treinado e a manutenção de linhagens celulares que tem custo elevado, principalmente quando um pequeno número de amostras de fezes é processado por vez (Post et al., 2002).

Ainda para a detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, existem diversos kits comerciais de ELISA que são de fácil execução sendo o resultado obtido em poucas horas. Porém, todos os kits disponíveis no mercado brasileiro são importados, o que aumenta o custo do diagnóstico, além de serem padronizados para a detecção das toxinas A e B a partir de fezes de seres humanos, sendo necessários estudos para a avaliação da sensibilidade e especificidade desses kits, quando se deseja utilizá-los para o diagnóstico a partir de espécimes clínicos de animais. Mesmo para amostras de seres humanos, alguns estudos indicam que os kits de ELISA apresentam acurácia variável na sensibilidade e

especificidade. Crobach et al. (2009) realizaram uma sistemática revisão de estudos publicados entre 1991 e 2008 com o objetivo de determinar a sensibilidade e a especificidade de métodos diagnósticos para infecção por *C. difficile*, comparando-se com um teste padrão de referência (ensaio de citotoxicidade celular ou cultura toxigênica) formularam recomendações para otimizar o diagnóstico da CDI. Treze testes imunoenzimáticos comerciais capazes de detectar somente toxina A ou ambas as toxinas A e B que foram incluídos nesta revisão, apresentaram sensibilidade entre 31% e 99%, e especificidade entre 65% e 100%. Até o presente momento, nenhum dos kits de ELISA disponíveis no mercado brasileiro foi avaliado quanto à sensibilidade e especificidade em amostras de fezes de equinos no país. Tendo em vista a confirmação da infecção em equinos, se torna necessário um estudo que identifique dentre os kits disponíveis, o mais adequado para uso no diagnóstico de CDI nesta espécie, bem como o que apresenta melhor acurácia para seres humanos. Este estudo irá contribuir para a avaliação epidemiológica e para a implementação de medidas de controle e tratamento mais efetivos tanto em equinos quanto em seres humanos.

2.4.2. Isolamento e Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a descoberta do papel patogênico de *C. difficile* em seres humanos, George et al. (1978) propuseram a utilização do agar CCFa (Cefoxitina-15 Cicloserina-Fructose-Agar) para o isolamento deste agente a partir de amostras de fezes. Sendo o meio mais utilizado para esta finalidade, várias modificações como a adição de taurocolate foram implementadas, a fim de melhorar a sensibilidade por meio da maior recuperação de esporos (Delméé, 2001). O taurocolate é um sal presente na bile de seres humanos e de animais, sendo encontrado no intestino e, segundo Sorg e Sonenshein (2009), esporos de *C. difficile* parecem ter

receptores para este sal o que estimularia a germinação, aumentando assim o isolamento do agente (Ramirez et al. 2010).

Outra estratégia comumente utilizada é o tratamento prévio das amostras de fezes com álcool absoluto, antes do plaqueamento, que permite o aumento da sensibilidade por eliminar formas vegetativas e outras bactérias presentes nas fezes, preservando-se os esporos de *C. difficile* (Borriello e Honour, 1981).

As colônias de *C. difficile*, apresentam morfologia típica, sendo rizoides, com bordas irregulares ou com aspecto de vidro moido, com coloração acinzentada e odor semelhante ao de fezes de equinos. Quando avaliadas quanto à sua morfologia pela coloração de Gram é possível observar bastonetes Gram positivo com esporos subterminais (Delmeé, 2001).

Como *C. difficile* pode ser integrante 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 deve ser utilizado apenas na condução de investigações epidemiológicas e na avaliação da sensibilidade do microrganismo a antimicrobianos. Além disso, é um método de baixa especificidade e relativamente demorado (Delmeé, 2011).

O isolamento é considerado um método de diagnóstico presuntivo sendo, portanto, necessário, a confirmação da identidade pela PCR através da amplificação do gene constitutivo *tpi*. Além disso, é possível detectar a presença dos genes que codificam as toxinas A (*tcdA*) e B (*tcdB*) bem como outros genes relacionados à outros fatores de virulência como a toxina binária (Lemée et al., 2004). A pesquisa destes genes é importante uma vez que alguns trabalhos sugerem uma alta correlação entre as estirpes toxigênicas de *C. difficile* e uma maior gravidade da doença em seres humanos, e algumas espécies animais (Voth e Ballard, 2005; Arroyo et al., 2007).

Mais recentemente, um kit comercial de PCR em tempo real (qRT-PCR) para a detecção do gene *tcdB* que codifica a toxina B diretamente de amostras de fezes foi indicado para contribuir com o diagnóstico de CDI. Schmidt et al. (2009) apontaram a qRT-PCR como um método de diagnóstico de alta sensibilidade a partir de amostras de fezes de seres humanos. Porém, como nos outros métodos de diagnóstico citados, inexistem estudos avaliando a qRT-PCR em amostras de equinos.

2.5. CONTROLE

As principais medidas de controle da CDI, tanto em seres humanos quanto em animais domésticos, são o uso cauteloso de antimicrobianos e o isolamento de pacientes doentes evitando assim a disseminação de esporos no ambiente e a infecção por outros pacientes suscetíveis (Kelly e Lamont, 1998; Pépin et al, 2004; Kuijper et al, 2006). Os esporos podem permanecer viáveis por um período prolongado no ambiente devido a sua resistência a dissecação e ao uso da maioria dos desinfetantes comumente empregados. Diante disso, torna-se necessário a limpeza e desinfecção frequente do ambiente com produtos à base de cloro ou peróxido de hidrogênio em alta concentração (1600 ppm foi capaz de reduzir a contaminação de superfícies em 98% controlando o surto de CDI) (Rutala et al, 1997). Além disso, a higienização das mãos dos profissionais de saúde é de extrema importância para que este não atue como veiculador de esporos de um indivíduo com CDI para outro susceptível. Esta deve ser feita preferencialmente de forma mecânica, ou seja, com água e sabão já que o álcool comumente empregado para esta finalidade não possui atividade sobre os esporos (Oughton et al, 2009).

3. OBJETIVOS

- Comparar o isolamento, a PCR *Multiplex*, três kits de ELISA e a PCR em tempo real (qRT-PCR) disponíveis comercialmente no Brasil para diagnóstico de *C. difficile*, em amostras de fezes de seres humanos e potros, em função dos parâmetros de sensibilidade, especificidade diagnóstica relativa ao CTA, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo frente à CTA (*Cell Cytotoxicity Assay*).
- Estabelecer a técnica mais adequada para a detecção de *C. difficile* em amostras de fezes de potros e seres humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.2. MEIOS DE CULTURA

Para o isolamento e a avaliação da pureza das estirpes de *C. difficile* foram utilizados Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco Laboratories, Detroit, EUA) e CCFA (Agar Cicloserina-Cefoxitina-Frutose) (Himedia, Índia) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e 0,1% de taurocolate sódico (Sigma Corporation, EUA).

4.3. AMOSTRAS DE FEZES

4.3.1. Equinos

Foram coletadas 104 amostras de fezes de potros com até cinco meses de idade oriundos de haras do estado de Minas Gerais, do Hospital Veterinário da EV-UFMG e da UNESP (Universidade Estadual Paulista) – Botucatu. Destas, 68 amostras eram de potros diarreicos e 36 não diarreicos (aparentemente saudáveis). As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal, acondicionadas em tubos coletores para amostra clínica, mantidas a 4°C e em seguida, foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da EV-UFMG, onde foram processadas para isolamento e pesquisa das toxinas A e B de *C. difficile* em um período máximo de 48 horas.

4.3.2. Seres Humanos

Foram utilizadas amostras de fezes de 78 pacientes internados no Hospital das Clínicas da UFMG com idade superior a 18 anos, sem distinção de sexo, após a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, que apresentaram diarreia durante o período de internação hospitalar. As amostras foram coletadas e mantidas a 4°C por no máximo 48 horas até o devido processamento no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da EV-UFMG.

4.4. COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), sob os números 0710.0.203.0000.1 e 150/2010, respectivamente.

4.5. DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico de CDI a partir das amostras de fezes utilizadas, foram realizados isolamento, PCR *Multiplex*, qRT-PCR, CTA e ELISA (Figura 1).

4.5.1. Isolamento de *C. difficile*

Para o isolamento, as amostras de fezes foram misturadas em igual quantidade (p/v) de álcool absoluto e incubadas em aerobiose, a 37°C por 30 minutos com o objetivo de eliminar células vegetativas, preservando apenas os esporos incluindo de *C. difficile*. Após esse período, foi feito o plaqueamento de 20 µL em agar CCFA suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e 0,1% de taurocolate sódico. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose (Termo Scientific, Model 1025/1029, EUA) com mistura gasosa (90% N₂, 10% CO₂), a 37°C, por 72 horas. As colônias típicas foram avaliadas quanto à sua morfologia pela coloração de Gram.

4.5.2. PCR *Multiplex*

Após a multiplicação em CCFA, três a cinco unidades formadoras de colônias (UFC) típicas de cada amostra foram submetidas à extração térmica a 98°C por 20 minutos, em água ultrapura (Direct-Q, Millipore, EUA). Após a extração, as amostras foram centrifugadas (HT Micro centrífuga MCD 2000, MRC Ltda, Israel) a 11.000 x g por cinco minutos e o sobrenadante utilizado como molde de DNA, sem purificação deste DNA. As reações de PCR foram realizadas de acordo com Silva et al. (2011) utilizando-se iniciadores para confirmação de identidade por meio da amplificação do gene constitutivo *tpi* e tipificação pela detecção dos genes *tcdA* e *tcdB* que codificam as toxinas A e B, respectivamente, como indicado na tabela 1.

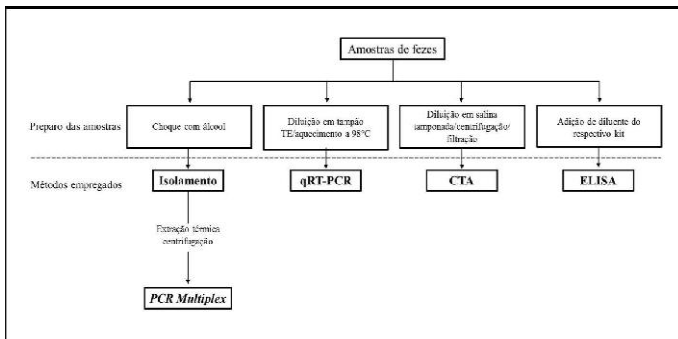


Figura 1: Fluxograma geral do experimento.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR *Multiplex* para amplificação dos genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB* de *C. difficile*.

Genes	Seqüência	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>tpi</i>	S 5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'	51,6°C	210	Dhalluin et al. (2003)
	AS 5'-CAATAATATGGGTCTATTCTCTAC-3'	48,1°C		
<i>tcdA</i>	S 5' AGATTCTATATTTACATGACAAAT 3'	48,1°C	365	Sambol et al. (2000)
	AS 5'-GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3'	49,1°C		
<i>tcdB</i>	S 5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3'	47,1°C	160	
	AS 5'-ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTT-3'	49,3°C		

Legenda: pb – pares de bases, S – senso, AS – anti-senso

4.5.3. PCR em tempo real (qRT-PCR)

Foi utilizado um kit de PCR em tempo real denominado Simplexa™ *C. difficile* Universal Direct desenvolvido pela Focus Diagnostics, EUA, destinado à detecção qualitativa *in vitro* do gene *tcdB* de *C. difficile* a partir de amostras de fezes sem extração prévia de DNA. Foram testadas 78 amostras de fezes de seres humanos que foram descongeladas em temperatura ambiente no momento do uso. Cada uma destas amostras foi coletada de seu respectivo tubo por meio da imersão de swab de fibra de nylon estéril. Em seguida, o swab foi colocado em um tubo de polipropileno de 2 mL contendo tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0) que tem como finalidade diminuir a hidrólise das bases por quebração dos íons divalentes inibindo a ação de DNAses. Todas as amostras em tampão TE foram vedadas e aquecidas a 98°C em bloco aquecedor (VHD Analítica, Brasil) por 10 minutos sem agitação. O kit Simplexa™ *C. difficile* Universal Direct continha reagentes tais como Simplexa™ *C. difficile* primer

mix, Master mix e Simplexa™ *C. difficile* Controle positivo, suficientes para 100 reações que foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Foi adicionado 8 µL da mistura dos reagentes para cada amostra em um dos orifícios do disco universal. Em seguida, foram adicionados controle positivo, amostras de fezes diluídas e aquecidas em tampão TE e controle negativo (tampão TE). Foi aplicado um selador na superfície dos orifícios do disco universal que foi colocado na plataforma do termociclador integrado Integrated Cycler 3M™ capaz de analisar simultaneamente múltiplos parâmetros através de um software integrado. A interpretação dos resultados foi dada através do exame dos controles negativo, positivo e de DNA interno para determinar a validade da corrida. Em seguida, foi realizada a análise dos resultados das amostras testadas com base nas curvas de amplificação que são consideradas válidas ao exibir crescimento exponencial progressivo (Figura 2).

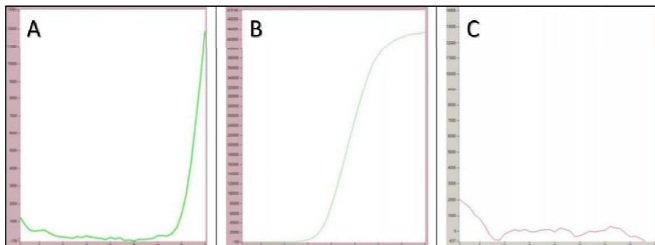


Figura 2: Gráficos de possíveis curvas de amplificação, onde o eixo das abscissas corresponde ao número de ciclos e o eixo das ordenadas corresponde à fluorescência. A e B – Curvas de amplificação válidas (crescimento exponencial e progressivo); C – Curva de amplificação inválida. (Fonte: Focus Diagnostics)

A amostra foi considerada negativa quando o valor do limiar do ciclo para *C. difficile* foi igual a zero, e o do controle interno de DNA foi inferior ou igual a 40 e diferente de zero. Já a amostra foi considerada positiva quando apresentou valor do limiar do ciclo para *C. difficile* inferior ou igual a 40 e diferente de zero, não se aplicando a detecção de DNA do controle interno. Foi considerado inválido o resultado com valores do limiar do ciclo tanto para *C. difficile* quanto para controle interno igual a zero, sendo necessária a repetição do teste. A amostra que apresentou o mesmo resultado após a repetição foi descrita como indeterminada.

4.5.4. Ensaio de citotoxicidade celular (CTA) (Sullivan et al., 1992)

O CTA foi realizado em linhagem contínua de células VERO (células epiteliais de rim de macaco verde africano – ATCC CCL81) cedida pelo Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFGM. Para o cultivo celular foi utilizado meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina nas concentrações de 40.000 UI/mL e 20.000 UI/mL, respectivamente, além de 0,1% fugizol (Andrade, 2000). As

células foram cultivadas em frascos de vidro com área de 70 a 80 cm² em estufa de CO₂ a 37°C até atingirem confluência de 90%. A lavagem da monocamada celular foi realizada com salina fosfatada tamponada (PBS - 0,01M PO₄⁻, 0,15M NaCl, pH 7,2) e solução de tripsina versene (STV - 97,75 mL de PBS, 2,0 mL de solução de tripsina a 2,5 % e 0,25 mL de solução de versene a 10%). Em seguida, foi feita a montagem da câmara de Neubauer (LaborOptik, Reino Unido) com uma alíquota de células (100 µl) mais corante azul de tripan (900 µl) para contagem em microscópio de luz invertida (Leitz Diavert, EUA). As amostras de fezes foram submetidas a filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) após diluição em solução salina tamponada estéril na proporção de 1:5 (v/v) e centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo plano, para cultivo celular. Foi feita a diluição seriada na base 2 do sobrenadante fecal filtrado. Em seguida, foi adicionada a concentração de 8,0 x 10³ células por poço e a placa foi incubada em estufa com atmosfera controlada (Espec, EUA) de 5% CO₂ e 95% O₂ a 37°C por 24h. Foi considerado como ponto de corte a maior diluição em que ocorreu 90% ou mais

de arredondamento celular (Sullivan et al., 1982).

4.5.5. ELISA

Foram avaliados três kits de ELISA comerciais para detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, denominados *C. difficile* Tox A/B II (Techlab Inc., EUA), Remel ProSpecT *C. difficile* Toxins A/B (Oxoid, UK) e Ridascreen *Clostridium difficile* toxins A/B (R-Biopharm, Alemanha). As reações foram realizadas de acordo com as recomendações de cada fabricante e as leituras foram feitas visualmente.

4.6. ESTATÍSTICA

A associação estatística de cada um dos testes imunoenzimáticos, da qRT-PCR e do isolamento seguido da PCR *Multiplex* frente ao CTA foi feita pelo teste McNemar no programa SAS versão 8, com 95% de intervalo de confiança. Foi calculada a concordância entre o CTA e demais métodos diagnósticos por meio do teste Kappa (STATA).

5. RESULTADOS

O CTA foi considerado como teste “padrão-ouro” e, portanto, todas as amostras que apresentaram resultado positivo e negativo para este método diagnóstico,

foram consideradas verdadeiramente positivas e negativas, respectivamente.

Do total de 104 amostras de fezes de potros, 12 (11,5%) foram consideradas positivas para *C. difficile* na PCR *Multiplex*, sendo nove classificadas como estirpes toxigênicas (A^+B^+) oriundas de animais diarreicos, e três não toxigênicas (A^-B^-) sendo duas de animais diarreicos e apenas uma amostra de um animal aparentemente saudável.

As toxinas A e B foram detectadas pelo CTA em 10 amostras somente de animais diarreicos (9,6%). Destas, três foram consideradas negativas na PCR *Multiplex* ao passo que três estirpes toxigênicas que foram isoladas de potros diarreicos obtiveram resultado negativo no CTA. Duas amostras foram coletadas do mesmo animal em diferentes tempos com histórico de diarreia, sendo uma delas considerada amostra não toxigênica e negativa no CTA, e a outra, coletada posteriormente, toxigênica e positiva no CTA. Os testes imunoenzimáticos da Oxoid, R-Biopharm e Techlab identificaram 14 (13,46%), 13 (12,5%) e 10 (9,61%) amostras positivas para as toxinas A e B de *C. difficile*, respectivamente. Todas as amostras consideradas positivas no CTA foram igualmente classificadas nos três testes imunoenzimáticos utilizados no diagnóstico sendo, portanto, consideradas verdadeiramente positivas (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados positivos e negativos no ensaio de citotoxicidade celular, no isolamento e PCR *Multiplex* e nos testes imunoenzimáticos, para diagnóstico da infecção por *C. difficile* em potros diarreicos e não diarreicos (aparentemente saudáveis).

Métodos	Resultados	POTROS		
		Diarreicos (n=68)	Não diarreicos (n=36)	Total (n=104)
CTA	Positivo	10	0	10
	Negativo	58	36	94
Isolamento de <i>C. difficile</i> e PCR <i>Multiplex</i>	Positivo	A ⁺ B ⁺ A ⁻ B ⁻	9 0	9 0
	Negativo		57	35
			12	2
Oxoid	Positivo			
	Negativo			
ELISA	R-Biopharm	Positivo	13	1
		Negativo	55	35
	Techlab	Positivo	10	1
		Negativo	58	35

Para o isolamento seguido de PCR *Multiplex*, sete amostras foram verdadeiramente positivas, cinco falso positivas, 89 verdadeiramente negativas e três falso negativas, frente ao CTA. Os três testes imunoenzimáticos apresentaram um total de 10 amostras verdadeiramente positivas, de um a quatro amostras falso positivas, de 90 a 93 amostras verdadeiramente negativas e nenhuma amostra falso negativa, frente ao CTA.

O isolamento e PCR *Multiplex* apresentaram 70% de sensibilidade, 94,7% de especificidade e valores preditivo positivo e negativo de 58,3% e 96,7%, respectivamente (Tabela 4). Os três kits de ELISA utilizados detectaram os 10 animais positivos no CTA, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade acima de 95%. O valor preditivo positivo dos kits de ELISA ficou entre 71% e 91% enquanto que o valor preditivo negativo foi de 100%, nos três testes.

Do total de 78 amostras de fezes de seres humanos, 24 (30,77%) foram consideradas positivas no isolamento e PCR

Multiplex para *C. difficile*, sendo 18 classificadas como estirpes toxigênicas (A⁺B⁺) e seis não toxigênicas (A⁻B⁻). As toxinas A e B foram detectadas pelo CTA em 18 amostras dos pacientes testados (23,08%). Destas, cinco foram consideradas negativas no isolamento e PCR *Multiplex*, ao passo que cinco estirpes toxigênicas isoladas obtiveram resultado negativo no CTA.

Os testes imunoenzimáticos da Oxoid, R-Biopharm e Techlab identificaram 17 (21,79%), 13 (16,66%) e 12 (15,38%) amostras positivas, respectivamente. Das 18 amostras positivas no CTA, 13 foram identificadas igualmente pelos testes da Oxoid e R-Biopharm e 14 pelo teste da Techlab.

A qRT-PCR identificou 11 das amostras positivas no CTA. Uma das amostras testadas pela qRT-PCR apresentou resultado inválido. Desta forma, foi realizada a repetição do teste que apresentou o mesmo resultado sendo portanto, esta amostra considerada como indeterminada (Tabela 4).

Tabela 3: Comparação de três testes imunoenzimáticos, isolamento e PCR *Multiplex* frente ao ensaio de citotoxicidade em células para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em potros.

MÉTODOS	POTROS			
	% (95% de intervalo de confiança)			
	S	E	VPP	VPN
Isolamento e PCR <i>Multiplex</i> a	70	94,7	58,3	96,7
Remel ProSpect <i>C. difficile</i> toxins A/B (Oxoid) b	100	95,7	71,4	100
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm) b	100	95,7	71,4	100
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab) a	100	98,9	91	100

Legenda: S – sensibilidade, E – especificidade, VPP – valor preditivo positivo, VPN – valor preditivo negativo

Tabela 4: Resultados positivos e negativos no ensaio de citotoxicidade celular, isolamento e PCR *Multiplex*, testes imunoenzimáticos e qRT-PCR, para diagnóstico da infecção por *C. difficile* em seres humanos.

SERES HUMANOS			
Metodos	Resultados		
Isolamento de <i>C. difficile</i> e PCR <i>Multiplex</i>	Positivo	A ⁺ B ⁺	18
		AB ⁻	6
	Negativo		54
CTA	Positivo		18
	Negativo		60
Oxoid	Positivo		17
	Negativo		61
ELISA	R-Biopharm	Positivo	13
		Negativo	65
	Techlab	Positivo	16
		Negativo	62
qRT-PCR	Positivo		12
	Negativo		65

Para o isolamento seguido da PCR *Multiplex*, 13 amostras foram consideradas verdadeiramente positivas, 11 falso positivas, 49 verdadeiramente negativas e cinco falso negativas, frente ao CTA. Os testes imunoenzimáticos apresentaram entre 13 e 14 amostras verdadeiramente positivas, zero a quatro amostras falso positivas, 56 a 60 amostras verdadeiramente negativas e quatro a cinco falso negativas, frente ao teste “padrão-ouro”. A qRT-PCR apresentou 11

amostras verdadeiramente positivas, uma falso positiva, 58 verdadeiramente negativas e sete falso negativas (Tabela 5).

O isolamento seguido da PCR *Multiplex* apresentou 72,22% de sensibilidade, 81,66% de especificidade e valores preditivos positivo e negativo de 54,16% e 90,74, respectivamente. Os kits de ELISA da Oxoid e R-Biopharm apresentaram sensibilidade de 72,22% e o da Techlab apresentou de 77,77%. A

especificidade dos três kits de ELISA utilizados ficou entre 93 e 100%, o VPP acima de 76% e o VPN acima de 91%. A qRT-PCR identificou 11 das amostras

positivas no CTA com sensibilidade de 61,11%, especificidade de 98,30%, VPP 91,66% e VPN de 89,23% (Tabela 6).

Tabela 5: Resultados positivos e negativos no ensaio de citotoxicidade celular, nos testes imunoenzimáticos, qRT-PCR, isolamento e PCR *Multiplex* para diagnóstico da infecção por *C. difficile* em seres humanos.

MÉTODOS	SERES HUMANOS			
	Positivo		Negativo	
	V	F	V	F
Ensaio de citotoxicidade ocular (CTA)	18	-	60	-
Isolamento e PCR <i>Multiplex</i>	13	11	49	5
Remel ProSpect <i>C. difficile</i> toxins A/B (Oxoid)	13	4	56	5
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm)	13	0	60	5
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab)	14	1	59	4
qRT-PCR Simplexa	11	1	58	7

Legenda: V – Verdadeiro, F - Falso

Tabela 6: Comparação da qRT-PCR, três testes imunoenzimáticos, isolamento e PCR *Multiplex* frente ao ensaio de citotoxicidade em células como “padrão-ouro” para o diagnóstico da infecção por *C. difficile* em seres humanos.

MÉTODOS	SERES HUMANOS			
	% (95% de intervalo de confiança)			
	S	E	VPP	VPN
Isolamento e PCR <i>Multiplex</i> a	72,22	81,66	54,16	90,71
Remel ProSpect <i>C. difficile</i> toxins A/B (Oxoid) a	72,22	93,33	76,47	91,80
Ridascreen <i>C. difficile</i> toxins A/B (R-Biopharm) b	72,22	100	100	92,30
<i>C. difficile</i> Tox A/B II (Techlab) b	77,77	98,33	93,33	93,65
qRT-PCR Simplexa a	61,11	98,30	91,66	89,23

Legenda: S – sensibilidade, E – especificidade, VPP – valor preditivo positivo, VPN – valor preditivo negativo

6. DISCUSSÃO

Todos os potros considerados positivos no CTA amostrados em haras (n=4) e no Hospital Veterinário (n=6), receberam tratamento prévio com antimicrobianos por causas diferentes de CDI, diagnosticadas pelo clínico responsável. De acordo com o

histórico, os potros não responderam efetivamente ao tratamento administrado, apresentando piora do quadro clínico indicando a importância do conhecimento do risco de CDI pelos veterinários e da necessidade de diagnóstico laboratorial, para diferenciação dos enteropatógenos em potros, permitindo a escolha adequada do

antimicrobiano a ser administrado. A ausência de potros não diarreicos positivos no CTA já foi relatada por outros autores (Weese et al, 2001; Baverud et al, 2003) e sugere que a doença subclínica não seja de grande importância nesta espécie, ao contrário do que foi relatado em estudos anteriores em cães e suínos, em que os animais não diarreicos foram considerados positivos no CTA (Chouicha e Marks, 2006; Clooten et al, 2008; Keessen et al, 2011; Silva et al, 2011; Wetterwik et al, 2013).

Três animais tiveram toxinas A e B detectadas no CTA, mas foram negativos para o isolamento. Entretanto, como não existe um protocolo padrão para isolamento de *C. difficile* a partir de amostras de fezes, torna-se difícil a comparação entre os trabalhos publicados. De qualquer maneira, resultados similares foram previamente descritos em potros (Baverud et al., 1997; Baverud 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 prováveis, destaca-se a possível sensibilidade de algumas estirpes de *C. difficile* a um ou a ambos antibiogramas 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 utilizados para a mesma finalidade (Thitaran et al., 2011). Uma possível justificativa seria a possibilidade de desidratação do agar através da evaporação e da menor difusão de nutrientes no meio de cultura sólido, quando comparado ao meio de cultura líquido.

Estirpes toxigênicas foram isoladas de dois animais diarreicos negativos no CTA. A presença de estirpe toxigênica com a ausência da detecção de toxinas A e B pode ser dada pela degradação das proteínas por proteases fecais evitando que as mesmas se mantenham em um nível mínimo de detecção no teste (Chouicha e Marks, 2006). É importante destacar que trabalhos anteriores com amostras de suínos e equinos

demonstraram que as toxinas permanecem detectáveis por pelo menos um mês quando armazenadas a -20°C (Weese et al., 2000; Keessen et al., 2011). Estes achados sugerem que a não detecção das toxinas A e B pelos kits de ELISA, no presente estudo, não foi devido ao acondicionamento e tempo de armazenamento das amostras, já que as mesmas foram mantidas a 4°C logo após a coleta e processadas em um período máximo de 48h após o envio para o laboratório.

A alta sensibilidade e especificidade dos três kits de ELISA testados para as amostras de fezes de potros corrobora com os resultados encontrados por Medina-Torrez et al. (2010), que testaram um kit de ELISA 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. Ao contrário do que foi relatado por Weese et al. (2001) e Baverud et al. (2003), quatro animais não diarreicos obtiveram resultados positivo nos kits testados e negativos no CTA. Isto sugere não ser adequada a inclusão desses espécimes clínicos quando se emprega os testes imunoenzimáticos para o diagnóstico de CDI nesta espécie pois, pode levar a uma diminuição do VPP se o teste não for 100% específico, principalmente em casos de baixa prevalência da doença.

O número de seres humanos confirmados (23,07%) por meio do CTA corresponde à prevalência de CDI entre 6% e 41% relatada em uma revisão de literatura que incluiu 43 estudos publicados no período de 1991 a 2008 (Crobach et al., 2009). Uma possível hipótese para essa variação da prevalência apresentada pelos estudos citados, pode ser devido a diferenças relativas relacionadas ao hospital, como dinâmica de desinfecção do ambiente e conduta dos profissionais de saúde, além do histórico e condição imunológica dos pacientes internados. Balassiano et al. (2009) identificaram 28,5% pacientes positivos para CDI em um hospital no Rio de Janeiro. Estes, apresentavam os principais

fatores de risco para o desenvolvimento da infecção como imunossupressão, terapia com antimicrobiano de amplo espectro e permanência prolongada em ambiente hospitalar. Além das amostras clínicas, foram coletadas amostras de superfícies de pisos, janelas, maçanetas, lavatórios, banheiros e comedores hospitalares que apresentaram resultados negativos no isolamento para *C. difficile*, podendo ser justificado pela mudança da rotina de desinfecção do hospital que empregou o uso do hipoclorito de sódio a 5% em áreas de internação e hipoclorito de sódio a 1% em áreas de trânsito de pacientes e profissionais de saúde.

É importante ressaltar que 76,92% dos pacientes suspeitos de CDI obtiveram diagnóstico negativo no CTA considerado o “padrão-ouro”, no presente estudo. Esta proporção encontrada é semelhante ao relatado em outros países (Shin et al., 2009; Litvin et al., 2009; Eastwood et al., 2009). O alto número de amostras negativas no CTA sugere a dificuldade de identificação clínica da diarreia nosocomial, pois existem outros patógenos que podem estar associados além de *C. difficile*, tais como *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* sp., *Microsporidia*, *Campylobacter* sp. e *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (Samie et al., 2008). Os pacientes suspeitos de CDI são comumente isolados com o objetivo de diminuir a disseminação do agente no ambiente (Zilberberg e Shorr, 2013) o que acarreta em um aumento nos custos pela instituição de saúde. Diante disso, se torna extremamente importante uma triagem de pacientes suspeitos por meio de um teste rápido e de alta sensibilidade evitando o isolamento desnecessário dos pacientes negativos, bem como a terapia com antimicrobianos de forma empírica (Strachan et al., 2013).

Estirpes toxigênicas isoladas de cinco pacientes foram negativas no CTA. Provavelmente, as toxinas A e B presentes nos espécimes clínicos desses pacientes se encontravam abaixo do nível de detecção do

teste, o que pode ser causado pela degradação das toxinas por proteases fecais (Chouicha e Marks, 2006).

Os kits de ELISA da Oxoid e R-Biopharm apresentaram sensibilidade de 72,22%, e o da Techlab apresentou de 77,77%, mantendo-se no intervalo de 57% a 92% apresentado na revisão realizada por Crobach et al. (2009). Embora sejam amplamente utilizados devido a facilidade de execução e rapidez na obtenção do resultado, se o kit de ELISA apresentar baixa sensibilidade poderá culminar na disseminação de esporos de *C. difficile* devido à falta de medidas preventivas, como a manutenção dos pacientes suspeitos de CDI em ambiente de isolamento. Além disso, poderia acarretar o agravamento clínico por interrupção da administração de antimicrobiano em pacientes diagnosticados erroneamente como negativos para CDI. A acurácia variável dos testes imunoenzimáticos foi apontada pela *Society for Healthcare Epidemiology (SHEA)* e *Infectious Diseases Society of American (IDSA)* como o principal entrave para seu uso como teste independente no diagnóstico de *C. difficile* (Cohen et al., 2010). Diante disso, alguns pesquisadores sugerem o emprego de um algoritmo de pelo menos duas etapas para o diagnóstico seguro de CDI em seres humanos, não havendo ainda consenso sobre quais testes devem ser empregados em cada etapa (Crobach et al., 2009; Shin et al., 2009; Peterson et al., 2011).

Como não existe um protocolo padrão para o isolamento de *C. difficile*, diferentes meios e períodos de incubação são empregados para esta finalidade, tornando difícil a comparação dos resultados encontrados neste trabalho com os de outros pesquisadores (Delmée, 2001). Algumas estirpes de *C. difficile* podem não crescer devido a susceptibilidade a um ou a ambos antimicrobianos utilizados no meio (Songer e Uzal, 2005), e a utilização de CCFA, mesmo com a suplementação de taurocolate, pode apresentar 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 agar seletivo (Thitaran et al., 2011). Estes fatores, podem ter contribuído para a baixa sensibilidade apresentada pelo isolamento e consequentemente na PCR *Multiplex*. De qualquer maneira, é importante destacar que o isolamento seguido de PCR não parece ser uma boa opção para o diagnóstico devido ao elevado tempo para obtenção dos resultados que no presente trabalho foi de pelo menos seis dias.

Alguns autores destacam o uso de kits de qRT-PCR com a vantagem de não ser necessário o isolamento prévio de *C. difficile*, e o tratamento da amostra fecal para extração de DNA (Eastwood et al., 2009; Humphries, 2012). Porém, a baixa sensibilidade apresentada pelo kit de qRT-PCR no presente estudo (61,11%) pode implicar em um maior número de amostras falso negativas e culminar com o agravamento clínico por interrupção do antimicrobiano além da disseminação da CDI pela interrupção do isolamento do paciente. Outra desvantagem para utilização

de kits de qRT-PCR é o alto custo de sua importação já que se encontram indisponíveis no mercado brasileiro.

7. CONCLUSÃO

Os kits de ELISA foram adequados para o diagnóstico da CDI em potros, devido à alta sensibilidade e especificidade encontradas.

O isolamento seguido da PCR *Multiplex* apresentou baixa sensibilidade, não sendo adequado para o diagnóstico uma vez que poderia levar a um aumento do número de resultados falso negativos e com isso tornar desfavorável o prognóstico do animal pela continuidade da administração de antimicrobiano inadequado.

Todos os métodos empregados neste estudo para o diagnóstico de *C. difficile* em amostras de fezes de seres humanos apresentaram baixa sensibilidade o que pode implicar em um aumento do número de resultados falso negativos contribuindo para a disseminação de esporos no ambiente e infecção por outros pacientes susceptíveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. M. *Meios e soluções comumente empregados em laboratórios*. Seropédica: EDUR, 2000, 353p.
- ARROYO, L. G.; KRUTH, S. A.; WILLEY, B. M.; STAEMPFLI, H. R.; LOW, D. E.; WEESE, J. S. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 163-166, 2005.
- ARROYO, L. G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J. S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, v. 120, p. 179-183, 2007.
- BALASSIANO, I. T.; MIRANDA, K. R.; BOENTE, R. F.; PAUER, H.; OLIVEIRA, I. C.; SANTOS-FILHO, J.; AMORIM, E. L.; CANINÉ, G. A.; SOUZA, C. F.; GOMES, M. Z.; FERREIRA, E. O.; BRAZIER, J. S.; DOMINGUES, R. M. 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.; DOS SANTOS-FILHO, J.; DE OLIVEIRA, M. P.; RAMOS, M. C.; JAPIASSU, A. M.; DOS REIS, A. M.; BRAZIER, J. S.; DE OLIVEIRA FERREIRA, E.; DOMINGUES, R. M. 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 68, n. 4, p. 449-455, 2010.
- BALASSIANO, I. T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; VITAL, J. M.; NOUËR, S. A.; SOUZA, C. R.; BRAZIER, J. S.; FERREIRA, EDE, O.; DOMINGUES, R. M. 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.
- BARTLETT, J. G. *Clostridium difficile* infection: historic review. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.227-229, 2009.
- BAVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; LINDHOLM, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Veterinary Journal*, v. 29, n. 4, p. 279-284, 1997.
- BAVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: A review. *Veterinary Quarterly Journal*, v.24, n. 4, p. 203-219, 2002.
- BAVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; ASPÁN, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Veterinary Journal*, v. 35, n. 5, p. 465-471, 2003.
- BAVERUD, V. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 20, p. 615-30, 2004.
- 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. 1124-1127, 1981.
- 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 Veterinary of Diagnostic Investigation*, v. 18, n. 2, p. 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 26, p.16021-16026, 1998.
- 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 of Microbiology*, v. 129, p. 209-14, 2008.
- COHEN, S. H.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; KELLY, C. P.; LOO, V. G.; MCDONALD, L. C.; PEPIN, J.; WILCOX, M. H. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 31, p. 431-455, 2010.
- CROBACH, M. J. T.; DEKKERS, O. M.; WILCOX, M. H.; KUIJPER, E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, p. 1053-1066, 2009.
- DHALLUIN, A.; LEMÉE, L.; PESTEL-CARON, M.; MORY, F.; LELUAN, G.; LEMELAND, J. F.; PONS, J. L. Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (tpi) gene. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, n. 1, p. 90-96, 2003.
- DELMEÉ, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 7, n. 8, p. 411-416, 2001.
- DENÈVE, C.; JANOIR, C.; POILANE, I.; FANTINATO, C.; COLLIGNON, A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, p. 24-28, 2009.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 8, p. 2042-2046, 1992.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 3211-3217, 2009.
- FERREIRA, C. E.; NAKANO, V.; DURIGON, E. L.; AVILA-CAMPOS, M. J. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in São Paulo city, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 4, p. 451-455, 2003.
- FINNEY, J. M. Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, v. 11, p. 53-55, 1893.
- FLORIN, I.; THELESTAM, M. Polyphosphate-mediated protection from cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 85, p. 131-136, 1984.

- GELLAD, Z. F.; ALEXANDER, B. D.; LIU, J. K. Severity of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in solid organ transplant patients. *Transplant Infectious Disease*, v. 9, p. 276-280, 2007.
- GEORGE, R.H.; SYMONDS, J. M.; DIMOCK, F.; BROWN, J. D.; ARABI, Y.; SHINAGAWA, N.; KEIGHLEY, M. R.; ALEXANDER-WILLIAMS, J.; BURDON, D. W. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *British Medical Journal*, v. 1, p. 695, 1978.
- GONÇALVES, C.; DECRÉ, D.; BARBUT, F.; BURGHOFFER, B.; PETIT, J. C. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 42, n. 5, p. 1933-1939, 2004.
- GRÖSCHEL, D. H. *Clostridium difficile* infection. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, v. 33, p. 203-245, 1996.
- HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *The American Journal of Disease of Children*, v. 49, p. 390-402, 1935.
- HUMPHRIES, R. M. Laboratory tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 34, p. 151-157, 2012.
- JHUNG, M. A.; THOMPSON, A. D.; KILLGORE, G. E.; ZUKOWSKI, W. E.; SONGER, G.; WARNY, M.; JOHNSON, S.; GERDING, D. N.; MCDONALD, L. C.; LIMBAGO, B. M. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infectious Disease*, v. 14, n. 7, p. 1039-1045, 2008.
- KEEL, M. K.; SONGER, J. G. The comparative pathology of *Clostridium difficile* associated disease. *Veterinary Pathology*, v. 43, n. 3, p. 225-240, 2006.
- KELLY, C. P.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection. *Annual Review of Medicine*, v. 49, p. 375-390, 1998.
- KELLY, C. P.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile*: more difficult than ever. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 18, p. 1932-1940, 2008.
- KEESSEN, E. C.; HOPMAN, N. E.; VAN LEENGOED, L. A.; VAN ASTEN, A. J.; HERMANUS, C.; KUIJPER, E. J.; LIPMAN, L. J. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1816-1821, 2011.
- KYNE, L., HAMEL, M.B., POLAVARAM, R. & KELLY, C.P. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Infectious Disease*, v. 34, p. 346-353, 2002.
- KONONEN, E.; RASINPERA, M.; VIROLAINEN, A.; MENTULA, S.; LYYTIKAINEN, O. Diagnostic trends in *Clostridium difficile* detection in Finnish microbiology laboratories. *Anaerobe*, v. 15, n. 6, p. 261-265, 2009.
- KUEHNE S. A.; CARTMAN, S. T.; MINTON, N. P. Both, toxin A and toxin B, are important in *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, v. 2, p. 252-255, 2011.
- KUIJPER, E. J.; COIGNARD, B.; TÜLL, P.; ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. *Emergence of Clostridium difficile*-associated disease in North America and

Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 6, p. 2-18, 2006.2

LARSON, H. E.; PRICE, A. B.; HONOUR, P.; BORRIELLO, S. P. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *The Lancet*, v. 1, p.1063-1066, 1978.

LEMÉE, L.; DHALLUIN, A.; TESTELIN, S.; MATTRAT, M. A.; MAILLARD, K.; LEMELAND, J. F.; PONS, J. L. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* 24 (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p.5710-5714, 2004.

LITVIN, M.; RESKE, K. A.; MAYFIELD, J.; MCMULLEN, K. M.; GEORGANTOPOULOS, P.; COPPER, S.; HOPPE-BAUER, J. E.; FRASER, V. J.; WARREN, D. K.; DUBBERKE, E. R. Identification of a pseudo-outbreak of *Clostridium difficile* infection (CDI) and the effect of repeated testing, sensitivity and specificity on perceived prevalence of CDI. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 30, n. 12, p. 1166-1171, 2009.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H.C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 1, n. 1, p. 1-18, 1988.

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). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 220, n. 1, p. 67-73, 2002.

MARCON, A. P.; GAMBA, M. A.; VIANNA, L. A. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, p. 384-389, 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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, n. 3, p. 628-32, 2010.

NORMAN, K. N.; SCOTT, H. M.; HARVEY, R. B.; NORBY, B.; HUME, M. E.; ANDREWS, K. Prevalence and genotypic characteristics of 10 *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 16, p. 5755-60, 2011.

OUGHTON, M. T.; LOO, V. G.; DENDUKURI, N.; FENN, S.; LIBMAN, M. D. Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of *Clostridium difficile*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 30, n. 10, p. 939-944, 2009.

PÉPIN, J.; VALIQUETTE, L.; ALARY, M. E.; VILLEMURE, P.; PELLETIER, A.; FORGET, K.; PÉPIN, K.; CHOUINARD, D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Québec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Canadian Medical Association Journal*, v. 171, n. 5, p. 466-472, 2004.

PERSSON, S.; TORPDAHL, M.; OLSEN, K.E.P. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection*, v.14, p. 1057-1064, 2008.

PETERSON, L. R.; MEHTA, M. S.; PATEL, P. A.; HACEK, D. M.; HARAZIN, M.; NAGWEKAR, P. P.; THOMSON, R. B. JR.; ROBICSEK, A. Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel.

- American Journal of Clinical Pathology*, v. 136, n. 3, p. 372-380, 2011.
- POST, K. W.; JOST, B. H.; SONGER, J. G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the 17 diagnosis of neonatal swine enteritis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, n. 3, p. 258-259, 2002.
- POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Canadian Medical Association Journal*, v. 171, n. 1, p. 51-58, 2004.
- PREIS, I. S.; SILVA, R. O. S.; PIRES, P. S.; LOBATO, F. C. F.; PALHARES, M. S.; MARANHÃO, R. P. A.; ECCO, R. 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.; LIGGINS, M.; ABEL-SANTOS, E. Kinetic evidence for the presence of putative germination receptors in *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 16, p.4215-4222, 2010.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M.H. & GERDING, D.N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 526-36, 2009.
- RUTALA, W. A.; WEER, D. J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 4, p. 597-610.
- SAMBOL, S. P.; MERRIGAN, M. M.; LYERLY, D.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infection Immunity*, v. 68, n. 10, p. 5480-5487, 2000.
- SAMIE, A., OBI, C. L.;FRANASIAK, J.; ARCHBALD-PANNONE, L.; BESSONG, P. O.; ALCANTARA-WARREN, C.; GUERRANT, R. L. 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 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. 270-273, 2009.
- SCHROEDER, M.S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *American Family Physician*, v. 71, n. 5, p. 921-928, 2005.
- SHIN, B. M.; KUAK, E. Y.; LEE, E. F.; SONGER, J. G. Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 2952-2956, 2009.
- 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*, v. 42, n. 3, p. 498-500, 2012.
- SILVA, R. O. S.; MOREIRA, F. M.; REZENDE, J. V.; PIRES, P. S.; MARANHÃO, R. P. A.; PALHARES, M. S.; LOBATO, F. C. F. 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, n. 6, p. 528-536, 2005.

- SONGER, J. G.; TRINH, H. T.; KILLGORE, G. E.; THOMPSON, A. D.; MCDONALD, L. C.; LIMBAGO, B. M. *Clostridium difficile* in retail meat products. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 5, p. 819-821, 2009.
- SORG, J. A.; SONENSHEIN, A. L. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 3, p. 1115-1117, 2009.
- STRACHAN, A. J.; EVANS, N. E.; WILLIAMS, O. M.; SPENCER, R. C.; GREENWOOD, R.; PROBERT, C. J. Comparison of a frozen human foreskin fibroblast cell assay to an enzyme immunoassay and toxigenic culture for the detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *Diagnostic Microbiol and Infectious Disease*, v. 75, p.42-45, 2013.
- SULLIVAN, N. M.; PELLETT S.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, v. 35, n. 3, p. 1032-1040, 1982.
- TEDESCO, F. J.; BARTON, R. W.; ALPERS, D. H. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Annals of Internal Medicine*, v. 81, p.429-433, 1974.
- THITARAN, S. N.; FRANK, J. F.; SIRAGUSA, G.R.; BAILEY, J. S.; LOMBRAD, J. E.; HALEY, C. A.; WAGNER, B. A.; DARGATZ, D. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *Journal of Food Protection*, v. 74, n. 1, p. 130-133, 2011.
- 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*. *Journal of Microbiology Methods*, v. 90, p. 83-85, 2012.
- VOTH D. E.; BALLARD J. D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology 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. *Journal of Veerinaryt Diagnostic Investigation*, v. 12, n. 4, 15 p. 332-336, 2000.
- WEESE, J. S.; WEESE, H. E.; BOURDEAU, T. L.; STAEMPFLI, H. R. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 218, n. 9, p. 1436-1439, 2001.
- WETTERWIK, K. J.; TROWALD-WIGH, G.; FERNSTRÖM, L. L.; KROVACEK, K. *Clostridium difficile* in faeces from healthy dogs and dogs with diarrhea. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 55, n. 23, p. 1-4, 2013.
- 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*, v. 19, n. 1, p. 52-59, 2007.
- ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A. F. Preventing *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Critical Care Clinics*, v. 29, n. 1, p. 11-18, 2013.