

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Victor Santos do Amarante

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA COMERCIAL PARA
A PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* EM SUÍNOS.**

BELO HORIZONTE

2024

Victor Santos do Amarante

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA COMERCIAL PARA
A PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* EM SUÍNOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

**BELO HORIZONTE
2024**

A485a Amarante, Victor Santos do, 1997 -
Avaliação da imunogenicidade de uma vacina comercial para a prevenção da infecção por Clostridioides difficile em suínos/ Victor Santos do Amarante. -2024.

58: il.

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência animal.

Inclui Bibliografia

1. Suíno - Doenças - Teses - 2. Clostridioides difficile - Teses -
3. Clostridioses - Teses - 4. Diarreia em animais - Teses - I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD - 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - VICTOR SANTOS DO AMARANTE

Às 09:00 horas do dia 19 de fevereiro de 2024, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

“AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA COMERCIAL PARA A PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR Clostridioides difficile EM SUÍNOS”

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina Veterinária Preventiva**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Rodrigo Otávio Silveira Silva**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. Dr.	Aprovado	Reprovado
Rodrigo Otávio Silveira Silva	X	
Roberto Mauricio Carvalho Guedes	X	
Jenner Karlisson Pimenta Reis	X	
Cecília Leite Costa	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado	X	Reprovado	
-----------------	---	------------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2024.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otavio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior**, em 19/02/2024, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cecilia Leite Costa, Usuário Externo**, em 20/02/2024, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Membro**, em 20/02/2024, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2024, às 23:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2894370** e o código CRC **4E929108**.

*À minha família, por ser a base sólida que me
impulsiona a voar cada vez mais alto.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão, que acreditam no meu sonho de transformar o mundo através da educação e amor à pesquisa.

Aos meus amigos, sem esquecer nenhum, que sempre seguraram a minha mão, mesmo à distância, não me deixando cair.

À Thayanne, pelo apoio fundamental, escuta afetiva e mãos dispostas a sempre ajudar na execução desse estudo.

À professora Kellyanne, por me abrir as portas do laboratório, da ciência e da pesquisa, de onde nunca mais saí.

Ao professor Carlos Augusto, por acreditar no meu potencial e me incentivar a trilhar esse caminho na UFMG.

Ao médico veterinário Carlos Marques e aos funcionários da Granja Bocaina, pelo apoio fundamental durante a realização das imunizações dos animais.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, especialmente ao professor Ricardo Fujiwara e à doutoranda Ana Cristina Ruas, essenciais para a realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários da Escola de Veterinária, em especial Grazi e Agda.

À equipe do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária, pelo apoio, risos e farras nesses anos difíceis.

Ao sr. João Chumbinho pelo acolhimento em sua casa quando cheguei a Belo Horizonte, e por manter um ambiente tranquilo durante a minha estadia por aqui.

Ao professor Francisco Lobato, pelos ensinamentos, conselhos e por ter desbravado com muita sabedoria a estrada que hoje começo a trilhar.

Às instituições de apoio e fomento à pesquisa, especialmente CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRPq.

Ao professor Rodrigo Otávio, por ser um exemplo de profissional, por acreditar em mim quando nem eu acreditei; pela escuta, paciência, conselhos, caronas, piadas e por ser um norte nos momentos difíceis.

“O tempo faz tudo valer a pena, e nem o erro é desperdício.” (ANA CAROLINA, 1999)

RESUMO

A infecção por *Clostridioides difficile* é uma das principais causas de diarreia em seres humanos e animais. Em suínos, *C. difficile* é um importante causador de doença entérica na primeira semana de vida, levando a perdas econômicas pela redução de ganho de peso nos animais acometidos. Em adição à importância como patógeno em suínos, a similaridade entre isolados de seres humanos e animais sugere a possibilidade de transmissão zoonótica. Os isolados toxigênicos de *C. difficile* produzem as toxinas A (TcdA) e B (TcdB), principais fatores de virulência no quadro clínico da doença. As medidas de controle do agente são dificultadas pela formação de esporos, que possibilita à bactéria permanecer viável nos mais diversos ambientes por longos períodos. Dessa forma, a utilização de métodos imunoproláticos deve ser uma alternativa na prevenção à ocorrência da doença. No ano de 2021, foi disponibilizada no mercado brasileiro a primeira vacina comercial contra *C. difficile* em suínos, composta das toxinas A e B inativadas. Entretanto, até o momento, não existem estudos publicados avaliando esse imunógeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de anticorpos séricos em matrizes suínas e leitões neonatos após a ingestão de colostro de fêmeas imunizadas com a vacina comercial contra *C. difficile*. Fêmeas suínas gestantes foram divididas em dois grupos. No grupo vacinado, 12 fêmeas foram imunizadas às 6 e 3 semanas anteriores ao parto, enquanto no grupo controle (n=6) os animais foram vacinados no mesmo intervalo com um imunógeno contendo o mesmo adjuvante, mas sem os toxoides A e B de *C. difficile*. Soro sanguíneo das porcas foi coletado antes de cada vacinação. Entre 24 e 48 horas após o parto, foi coletado soro das porcas e de seis leitões de cada fêmea (n=72 leitões no grupo vacinado e 36 no grupo controle). Todas as amostras de soro foram submetidas à detecção de IgG por meio de ensaios imunoenzimáticos utilizando fragmentos das toxinas TcdA e TcdB. A vacina induziu a formação de anticorpos IgG anti-TcdA e TcdB em matrizes suínas após a primeira e segunda dose (T1 e T2). Os leitões passivamente imunizados via colostro apresentaram níveis superiores de IgG frente aos antígenos TcdA e TcdB quando comparados com leitões amamentados por matrizes do grupo controle. Dessa forma, é possível inferir que a vacina comercial testada é capaz de induzir resposta imune humoral contra os fragmentos recombinantes de TcdA e TcdB de *C. difficile* em fêmeas suínas. Os anticorpos contra essas toxinas no soro desses animais são transmitidos passivamente para leitões neonatos, através do colostro.

Palavras-chave: diarreia neonatal; imunização passiva; resposta humoral; zoonoses.

ABSTRACT

Clostridioides difficile infection is one of the main causes of diarrhea in humans and animals. In pigs, *C. difficile* is an important cause of enteric disease in the first week of life, leading to economic losses due to reduced weight gain in affected animals. In addition to the importance of the pathogen in swine, the similarity between isolates from humans and animals suggests the possibility of zoonotic transmission. Toxigenic isolates of *C. difficile* produce toxins A (TcdA) and B (TcdB), the main virulence factors in the clinical picture of the disease. Measures to control the agent are made difficult by the formation of spores, which allows bacteria to remain viable in the most diverse environments for long periods. Therefore, the use of immunoprophylactic methods should be an alternative in preventing the occurrence of the disease. In 2021, the first commercial vaccine against *C. difficile* in pigs was made available on the Brazilian market, consisting of inactivated toxins A and B. However, to date, there are no published studies evaluating this immunogen. The objective of this work was to evaluate the levels of serum antibodies in swine sows and neonatal piglets after ingestion of colostrum from females immunized with the commercial vaccine against *C. difficile*. Pregnant female pigs were divided into two groups. In group 1, 12 females were immunized at 6 and 3 weeks prior to parturition, while in the control group (n=6) the animals were vaccinated at the same interval with an immunogen containing the same adjuvant, but without toxoids A and B of *C. difficile*. Blood serum from sows was collected before each vaccination. Between 24 and 48 hours after birth, serum was collected from the sows and six piglets from each sow (n=72 piglets in group 1 and 36 in the control group). All serum samples were subjected to IgG detection through immunoenzymatic assays using fragments of the tcdA and tcdB toxins. The vaccine induced the formation of IgG anti-TcdA and TcdB antibodies in swine sows after the first and second dose (T1 and T2). Piglets passively immunized via colostrum showed higher levels of IgG against TcdA and TcdB antigens when compared to piglets suckled by dams in the control group. Therefore, it is possible to infer that a tested commercial vaccine is capable of inducing a humoral immune response against recombinant fragments of TcdA and TcdB from *C. difficile* in female pigs. Antibodies against these toxins in the serum of these animals are passively transmitted to neonatal piglets through colostrum.

Keywords: humoral response; neonatal diarrhea; passive immunization; zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>C. difficile</i> em visualização microscópica após coloração de Gram.....	15
Figura 2: Representação gráfica do esquema de vacinação e coleta de soro de suínos	29
Figura 3: Execução do ensaio imunoenzimático.....	30
Figura 4: Absorbância de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes do grupo de matrizes suínas imunizadas	32
Figura 5: Absorbância de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes do grupo controle.	33
Figura 6: Comparação de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes entre grupos de matrizes.....	33
Figura 7: Comparação de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes entre grupos de leitões.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESP	Espanha
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICD	Infecção por <i>C. difficile</i> .
IgG	Imunoglobulina G
IM	Via de inoculação intramuscular
LIGP	Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos
M	Molar
MG	Minas Gerais
µl	Microlitros
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PBS	Tampão de fosfato e bicarbonato de sódio
PRPq-UFMG	Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
T0	Tempo de coleta anterior à 1ª dose de vacina
T1	Tempo de coleta anterior à 2ª dose de vacina
T2	Tempo de coleta 24 horas após o parto
TcdA	Toxina A de <i>C. difficile</i> .
TcdB	Toxina B de <i>C. difficile</i> .
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	LITERATURA CONSULTADA	15
2.1	Histórico	15
2.2	Epidemiologia	15
2.3	Patogenia e fatores de virulência	17
2.4	ICD em suínos	19
2.5	Diagnóstico	20
2.6	ICD em seres humanos	21
2.7	Controle e prevenção	23
2.8	Importância da resposta humoral	24
2.9	Primeira vacina contra <i>C. difficile</i> em suínos	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Imunização de matrizes suínas	28
4.2	Avaliação da transmissão passiva de anticorpos para leitões neonatos	29
4.3	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	30
4.4	Análises estatísticas	31
5	RESULTADOS	32
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÕES	40
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXOS	58
	Aprovação do projeto pela CEUA/UFMG	58

1 INTRODUÇÃO

Clostridioides (Clostridium) difficile é uma bactéria anaeróbia estrita, bastonete gram-positivo, capaz de colonizar o intestino de animais domésticos, silvestres e seres humanos (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; DIAB; UZAL; SONGER, 2016; LAWSON et al., 2016; LICCIARDI et al., 2021). O agente foi isolado pela primeira vez em seres humanos em 1935 e em diversos animais domésticos na década de 1980 (FREEMAN et al., 2010; HALL; O'TOOLE, 1935). Sua capacidade de formar esporos possibilita a permanência em diversos locais por longos períodos, incluindo água, solo, alimentos e ambientes hospitalares (LAWSON et al., 2016; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016).

Nas últimas décadas, *C. difficile* tem sido apontado como um dos principais causadores de diarreia em pacientes hospitalizados, com elevadas taxas de morbidade, mortalidade e aumento do tempo de internação, bem como custos com tratamento (LAWSON et al., 2016; TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019). O uso de antimicrobianos tem sido apontado como o principal fator de risco associado à infecção por *C. difficile*, em que a depleção da microbiota intestinal favorece a colonização e proliferação desse agente (MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016; PROCTOR et al., 2021).

Em suínos, porém, a infecção é comum na primeira semana de vida, quando a microbiota está em formação, sendo incapaz de inibir a colonização por *C. difficile* (LOBATO, 2013; PROCTOR et al., 2021). Nesta espécie, as perdas econômicas estão relacionadas ao baixo desenvolvimento corporal, que leva à redução do ganho de peso no lote acometido (DIAB; UZAL; SONGER, 2016; OLIVEIRA JÚNIOR, 2019).

A produção das toxinas A (TcdA) e B (TcdB) por *C. difficile* é responsável pelo desencadeamento do quadro clínico (KNETSCH et al., 2014; MONOT et al., 2015). Na presença de ácidos biliares primários e glicina no intestino, ocorre germinação dos esporos toxigênicos ingeridos pelo animal, seguido da produção das toxinas pelas formas vegetativas da bactéria (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018). As toxinas A e B se ligam a receptores específicos nos enterócitos, causando alterações no citoesqueleto, o que leva a modificações na conformação estrutural, como arredondamento celular, perda de junções intercelulares e aumento da permeabilidade na mucosa intestinal, além de resposta inflamatória aguda (CZEPIEL et al., 2019; DIAB; UZAL; SONGER, 2016). Assim, os leitões acometidos comumente apresentam diarreia, edema de mesocólon e colite (SONGER et al., 2007; SONGER; ANDERSON, 2006; SQUIRE; RILEY, 2012a).

A utilização de métodos imunoprolifáticos deve ser uma alternativa na prevenção à ocorrência da doença (LOBATO, 2013; SONGER; UZAL, 2005). Nesse contexto, apenas uma

vacina foi, até o momento, aprovada para uso comercial em todo o mundo. Esse imunógeno, comercializado desde 2021, pode ser utilizado exclusivamente em suínos. A vacina possui as toxinas A (TcdA) e B (TcdB) inativadas, além de toxoide alfa de *Clostridium perfringens* tipo A.

Até o momento inexistem estudos publicados demonstrando a potência da vacina comercial contra *C. difficile*. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar a imunogenicidade dessa vacina, através sua administração em fêmeas suínas gestantes e avaliação da resposta humoral ativa e transmissão passiva de anticorpos aos leitões neonatos através do colostro.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Histórico

C. difficile é uma bactéria anaeróbia estrita, bastonete gram-positivo, capaz de colonizar o intestino de animais domésticos, silvestres e seres humanos (CZEPIEL et al., 2019; LICCIARDI et al., 2021; SILVA et al., 2014a). As colônias possuem morfologia típica, de aspecto conhecido como “vidro moído” e odor característico (semelhante ao de fezes de equinos); quando submetidas à luz ultravioleta em ágar *Brucella* suplementado com vitamina K e hemina, apresentam coloração esverdeada (DELMÉE, 2001; DIAB; UZAL; SONGER, 2016). Na coloração de Gram observam-se bastonetes gram-positivos com esporos subterminais (FULGIONE, 1998) (Figura 1). Foi isolada pela primeira vez nas fezes de recém-nascidos saudáveis, em 1935. Desde então, passou por algumas reclassificações taxonômicas, sendo anteriormente chamado de *Bacillus difficile*, *Clostridium difficile*, *PeptoClostridium difficile* e, mais recentemente, devido a uma análise baseada na sequência do gene rRNA do 16S, *Clostridioides difficile* (HALL; O'TOOLE, 1935; LAWSON et al., 2016).

Com a descoberta de algumas novas bases e intensificação da utilização dos antimicrobianos, *C. difficile* despontou como um patógeno causador de distúrbios intestinais, com destaque para a colite pseudomembranosa e diarreia em pacientes hospitalizados (BUDDLE; FAGAN, 2023; CZEPIEL et al., 2019; FREEMAN et al., 2010; SIMOR, 2010).

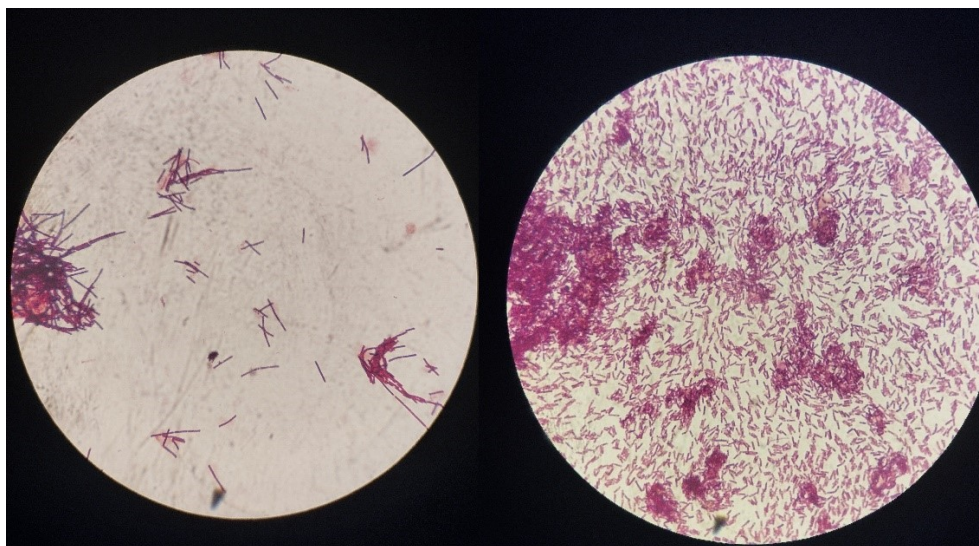


Figura 1: *C. difficile* em visualização microscópica após coloração de Gram (100 e 40x). Fonte: arquivo pessoal.

2.2 Epidemiologia

A infecção por *C. difficile* é uma das principais causas de diarreia associada a cuidados hospitalares em todo o mundo, sendo responsável por até 30% desses quadros (DE BRUYN et al., 2016; SLIMINGS; RILEY, 2014; VEHRESCHILD et al., 2014). Atualmente, são mais de 120.000 casos de infecção por *C. difficile* (ICD) por ano na União Europeia, enquanto o número de óbitos chega a 1.800 (BUDDLE; FAGAN, 2023). Nos EUA são mais de 220.000 casos de ICD, com mais de 10.000 óbitos e custos que passam de 6,3 bilhões de dólares (HEIMANN et al., 2018; O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021).

No Brasil, os dados sobre a incidência e prevalência de ICD em seres humanos não são precisos (BRAGA et al., 2023). Alguns estudos realizados em hospitais de referência no país demonstram prevalência entre 17,7 e 31,8% (CANÇADO et al., 2018a; MAESTRI et al., 2020). Já a incidência, representada pelo número de casos positivos em relação aos indivíduos com risco de infecção ao longo do tempo, foi de 9,2 casos por 10.000 pacientes-dia no único estudo desse tipo até então, realizado no Hospital das Clínicas da UFMG. A incidência encontrada foi superior ao relatado na maioria dos estudos realizados na América do Norte e Europa (BRAGA et al., 2023).

A mortalidade pode chegar a 30% quando na presença de colite pseudomembranosa, um dos sinais clínicos da doença (KUIJPER; COIGNARD; TÜLL, 2006; VEHRESCHILD et al., 2014). Outras manifestações clínicas envolvem cólicas abdominais, diarreia aquosa de leve a moderada, febre baixa e leucocitose, além de lesão tecidual, megacólon tóxico e colite fulminante (BUDDLE; FAGAN, 2023; TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019).

O surgimento de cepas epidêmicas (anteriormente chamadas de hipervirulentas) também colabora para o aumento dos casos comunitários da ICD. Comumente classificadas nos ribotipos RT027 e RT078, essas cepas apresentam maior patogenicidade e resistência a antimicrobianos, o que impede a eliminação do agente, possibilitando a permanência das estirpes no organismo hospedeiro e propiciando a recorrência da doença (BUDDLE; FAGAN, 2023; DINIZ et al., 2022; SIMOR, 2010).

O ribotipo 027 produz altas concentrações de TcdA e TcdB, além da toxina binária (CDT), características associadas à ocorrência de surtos e maior gravidade dos quadros de ICD (STEWART; BERG; HEGARTY, 2013, 2014; WARNY et al., 2005), além de possuir mecanismos de resistência a antimicrobianos, maior motilidade e aderência a enterócitos (DINIZ et al., 2022; STABLER et al., 2009).. Além disso, apresentam maior taxa de esporulação e germinação, o que facilita sua disseminação e proporciona maior sucesso na infecção, que tende a ser mais grave (FREEMAN et al., 2007; WARNY et al., 2005). Esse ribotipo é associado a surtos de ICD em diversos países (BOUZA et al., 2017; OFORI et al.,

2018; OLEASTRO et al., 2014; VAN BEURDEN et al., 2016) e teve sua ampliação e disseminação possivelmente impulsionadas pelo uso generalizado de cefalosporinas e aquisição de resistência a fluoroquinolonas a partir dos anos 2000 (DINIZ et al., 2022; KNIGHT; RILEY, 2019; LEAV et al., 2010; SAHA et al., 2019).

Já o RT078 é comumente encontrado em animais de fazenda em todo o mundo e o mais prevalente em suínos (KEEL et al., 2007; KOENE et al., 2012; PROCTOR et al., 2021; RODRIGUEZ et al., 2012; WEESE et al., 2010). Em seres humanos, esse ribotipo está associado a casos comunitários da doença, indicando que diversas fontes podem estar relacionadas à infecção, incluindo contato com animais e produtos de origem animal (BAUER et al., 2011; GOORHUIS et al., 2008; LIM; KNIGHT; RILEY, 2020; PATTERSON et al., 2012).

2.3 Patogenia e fatores de virulência

A capacidade de *C. difficile* de formar esporos permite sua permanência em diversos ambientes por longos períodos, incluindo água, solo, alimentos e ambientes hospitalares (CHITNIS et al., 2013; DIAB; UZAL; SONGER, 2016; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016). Os esporos são resistentes à radiação ultravioleta, calor, dessecação, diversos antimicrobianos e desinfetantes, além de sobreviverem ao baixo pH estomacal (BUDDLE; FAGAN, 2023). Esse fator de virulência também é importante na patogenia da doença, já que possibilita a disseminação de *C. difficile* entre a população e a permanência no intestino do hospedeiro, propiciando a recorrência da ICD (CASTRO-CÓRDOVA et al., 2021; DINIZ et al., 2022). Um episódio de ICD é classificado como recorrente se houver reaparecimento de sintomas em até 8 semanas após o início do episódio anterior, resolvido com ou sem o auxílio de antimicrobianos (MCDONALD et al., 2007).

Após a ingestão dos esporos toxigênicos pelos animais, na presença de ácidos biliares primários e glicina, ocorre germinação desses esporos no intestino, que se transformam em formas vegetativas (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; FRANCIS et al., 2013; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016). Em situações de normalidade da microbiota, outras bactérias convertem os ácidos biliares primários em secundários, inibindo a germinação dos esporos de *C. difficile* (FRANCIS et al., 2013; THANISSERY; WINSTON; THERIOT, 2017). Após a germinação, a produção de enzimas (colagenase, hialuronidase, condroitina-sulfatase) e toxinas causa alterações no citoesqueleto de células epiteliais (CZEPIEL et al., 2019). Essas modificações na conformação estrutural, como arredondamento celular e perda de junções intercelulares, levam ao aumento da permeabilidade na mucosa intestinal, secreção de

fluidos, além de resposta inflamatória aguda, com adesão de neutrófilos, fibrina, mucina e detritos celulares, além de necrose tecidual (CZEPIEL et al., 2019; DIAB; UZAL; SONGER, 2016; SIMOR, 2010).

As cepas patogênicas de *C. difficile* produzem as toxinas A (TcdA, 308 kDa), e B (TcdB, 270 kDa) (KNETSCH et al., 2014; KUIJPER; COIGNARD; TÜLL, 2006; MONOT et al., 2015). As toxinas A e B ligam-se a receptores celulares e sofrem endocitose, estimulando a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, diretamente associadas à intensidade do quadro clínico e prognóstico do paciente (BUDDLE; FAGAN, 2023; EL FEGHALY et al., 2013; KELLY; KYNE, 2011; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016).

Além dessas, uma toxina binária (CDT), presente em cerca de 10% das cepas de *C. difficile*, pode ter um papel relevante na patogenia da doença. Alguns estudos in vitro apontam que CDT contribui para a gravidade da ICD, sendo responsável por arredondamento celular e supressão da resposta imune (COWARDIN et al., 2016; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2022). Além disso, CDT parece ser um fator predisponente para a recorrência do quadro de ICD, onde os pacientes acometidos necessitam de maior tempo de tratamento e apresentam maior taxa de mortalidade (BACCI et al., 2011; STEWART; BERG; HEGARTY, 2013, 2014).

Além da produção de toxinas, *C. difficile* possui outros fatores de virulência. As estirpes que possuem uma maior capacidade de colonização podem causar graves infecções, mesmo produzindo baixas concentrações de toxinas (DINIZ et al., 2022). As proteínas de superfície auxiliam na colonização do epitélio intestinal, além de estimularem a resposta do hospedeiro devido à sua alta imunogenicidade (FAGAN; FAIRWEATHER, 2014; RYAN et al., 2011; WRIGHT et al., 2008).

A resistência a lisozima, mediada pela camada S e por peptidoglicanos, evita a hidrólise da parede celular de *C. difficile* pela resposta imune inata do hospedeiro (BUDDLE; FAGAN, 2023). A formação de biofilme é outro fator que contribui para a virulência do agente, aumentando sua sobrevivência no lúmen intestinal e conferindo resistência a ação oxidativa e compostos antimicrobianos (DAWSON et al., 2012; FROST; CHENG; UNNIKRISSHANN, 2021). *C. difficile* participa da formação de biofilmes multiespécie e associados à presença de muco, importantes na virulência do agente (BUDDLE; FAGAN, 2023). A presença de flagelos aumenta a patogenicidade do agente, promovendo a formação de biofilmes e estimulando a resposta inflamatória; além de possibilitar maior sucesso na colonização do hospedeiro, conferindo maior capacidade de sobrevivência em ambientes hospedeiros hostis e facilitando o acesso a nutrientes (STEVENSON; MINTON; KUEHNE, 2015)

2.4 ICD em suínos

Em suínos, a infecção é comum em animais com até sete dias de idade, quando a microbiota está em formação, sendo incapaz de inibir a colonização por *C. difficile* (LOBATO, 2013; PROCTOR et al., 2021; WEESE, 2020). Nesses animais, a ICD não tem relação com a exposição a antimicrobianos (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012; SONGER; UZAL, 2005). Ao contrário do observado em hamsters e seres humanos, os enterócitos de leitões neonatos parecem ter receptores que possibilitam a ligação com as toxinas de *C. difficile*, propiciando o desenvolvimento da infecção (BORRIELLO; WILCOX, 1998; SQUIRE; RILEY, 2012a).

Entre as estirpes encontradas nessa espécie, aquelas pertencentes ao RT078 são frequentemente encontradas em casos de infecção em leitões (PROCTOR et al., 2021). O primeiro relato de *C. difficile* infectando suínos ocorreu em 1983 (YAEGER; FUNK; HOFFMAN, 2002). A infecção em suínos é, ainda, uma questão de saúde pública, uma vez que estudos relataram a transmissão de *C. difficile* desses animais para seres humanos, além de disseminar genes de resistência a antimicrobianos entre as espécies (DEBAST et al., 2009; KEESSEN et al., 2013; KNETSCH et al., 2014; REDDING et al., 2021).

Um estudo acerca da prevalência de *C. difficile* em suínos no Brasil encontrou 23,3% dos leitões diarreicos positivos para o agente, enquanto cerca de 10% dos animais não diarreicos também apresentavam toxinas nas fezes (CRUZ JUNIOR et al., 2013). No Canadá, onde a ICD em suínos também foi investigada, *C. difficile* é relatado como um importante agente causador de diarreia neonatal, aparecendo como agente isolado e em coinfeção com outros agentes (FARZAN et al., 2013).

Os leitões acometidos comumente apresentam baixo desenvolvimento corporal, fezes amareladas pastosas a aquosas, desidratação, edema de mesocólon e colite (LOBATO, 2013; SONGER et al., 2007; SONGER; ANDERSON, 2006; SQUIRE; RILEY, 2012a; YAEGER; FUNK; HOFFMAN, 2002). Casos de leitões infectados, inclusive com lesões intestinais, mas sem diarreia ou até constipados parecem comuns, levando à conclusão de que a doença pode ser subclínica nessa espécie (CRUZ JUNIOR et al., 2013; SONGER; ANDERSON, 2006; YAEGER; FUNK; HOFFMAN, 2002). Também podem ocorrer hidrotórax, desconforto respiratório, edema escrotal e morte súbita (KEEL; SONGER, 2006; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012).

Estudos demonstram que, conforme o leitão se desenvolve, sua microbiota vai se tornando mais diversificada e competitiva, o que justifica a redução da colonização por *C. difficile* nesses animais (PROCTOR et al., 2021; SQUIRE; RILEY, 2012a).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da ICD pode ser realizado através da detecção de isolados toxigênicos (por cultura toxigênica ou técnicas moleculares) ou de toxinas nas amostras de fezes. A cultura toxigênica consiste no isolamento microbiológico de *C. difficile* em meio seletivo, seguido pela detecção de genes que codificam as toxinas A e B (CARVALHO et al., 2022; GATEAU et al., 2018; PLANCHE; WILCOX, 2011). Para melhorar a recuperação de *C. difficile* nas amostras, pode ser realizado choque térmico ou alcoólico, a fim de selecionar os esporos do agente antes do cultivo em ágar (PLANCHE; WILCOX, 2011). As limitações dessa técnica envolvem a necessidade de equipamentos especializados e demora nos resultados (CROBACH et al., 2016; MCDONALD et al., 2018). Outra opção para o diagnóstico de *C. difficile* é a utilização de kits comerciais para a amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, do inglês *nucleic acid amplification tests*), para detecção de genes das toxinas A, B e binária (CARVALHO et al., 2022; CROBACH et al., 2016). Esses testes são altamente sensíveis mas de especificidade variada; além disso, os custos elevados impedem sua utilização na rotina de diagnóstico em vários locais, incluindo no Brasil (CARROLL; MIZUSAWA, 2020; RAMOS et al., 2020).

O diagnóstico de *C. difficile* pode ser realizado a partir da detecção da enzima glutamato-desidrogenase (GDH), produzida por todas as estirpes de *C. difficile* (CROBACH et al., 2016; MCDONALD et al., 2018). Sua detecção se dá através de ensaio imunoenzimático (ELISA), ou teste rápido (imunocromatografia lateral). Em seres humanos e suínos, esses devem ser utilizados para triagem, já que as formas toxigênicas e não-toxigênicas do agente, relativamente comuns nessas espécies, produzem essa enzima (CANÇADO et al., 2018b; GATEAU et al., 2018; RAMOS et al., 2020; WILKINS; LYERLY, 2003). Assim, após um resultado positivo para GDH, a amostra deve ser submetida a um teste de detecção de toxina (ARIMOTO et al., 2016; MCDONALD et al., 2018).

A detecção de toxinas pode ser realizada através de ELISA, teste rápido e ensaio de neutralização da citotoxicidade celular (CCNA, do inglês *cell cytotoxicity neutralization assay*). Em suínos, a utilização de ELISA e testes rápidos para detecção das toxinas A e B parece ter baixa sensibilidade (CARVALHO et al., 2022; KEESSEN et al., 2011; RAMOS et al., 2020; SILVA et al., 2014b). O CCNA é realizado a partir da observação do efeito citopático da amostra em determinada cultura celular, como fibroblastos, células Vero e HeLa (CROBACH et al., 2016; KEEL; SONGER, 2006; WHITTIER et al., 1993). A neutralização pode ser realizada com antitoxinas de *C. sordelli* ou *C. difficile* (BARTLETT, 1990; DELMÉE, 2001). Apesar da alta sensibilidade e especificidade, esse teste é demorado e carece de padronização,

o que dificulta sua utilização na rotina laboratorial (CHOUICHA; MARKS, 2006; GATEAU et al., 2018; MCDONALD et al., 2018).

Exames histopatológicos podem direcionar o diagnóstico, através da observação de lesões como edema de mesocólon, necrose no epitélio intestinal, aumento de atividade mitótica nas células das criptas intestinais e “lesões vulcânicas”, caracterizadas por erosões irregulares na mucosa do cólon, de onde exsudam fibrina e neutrófilos (CARVALHO et al., 2022; NYBLADE et al., 2022; SONGER; UZAL, 2005; YAEGER; KINYON; SONGER, 2007).

2.6 ICD em seres humanos

De forma geral, o uso de antimicrobianos tem sido apontado como o principal fator de risco associado à ICD em seres humanos e alguns animais. Esses compostos podem levar a uma depleção da microbiota intestinal, favorecendo a colonização e proliferação desse agente (MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016; PROCTOR et al., 2021). Além do fator de risco associado ao uso de antimicrobianos, fatores relacionados ao hospedeiro (idade, presença de comorbidades) ou intervenções clínicas (tempo de hospitalização, uso de sonda, permanência em unidade de terapia intensiva e cirurgia) são importantes no desenvolvimento da ICD (DE BRUYN et al., 2016).

A idade do paciente é um fator de risco associado à ocorrência da doença e está relacionada a desfechos clínicos desfavoráveis, incluindo elevadas taxas de morbidade, mortalidade e aumento do tempo de internação, bem como custos com tratamento (LAWSON et al., 2016; LOO et al., 2005; TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019). A microbiota de pacientes mais velhos parece ser menos resistente à colonização por *C. difficile* (BORRIELLO; WILCOX, 1998; SHIN; HIGH; WARREN, 2016; SHIN; PAWLOWSKI; WARREN, 2021). Além disso, em pacientes idosos, a resposta imune humoral é menos eficaz (imunossenescência), fato associado à recorrência da ICD; e as terapias com antimicrobianos tendem a ser menos eficazes (FRASCA; BLOMBERG, 2011; LOUIE et al., 2013; MCGLAUCHLEN; VOGEL, 2003). Pessoas acima dos 65 anos são mais propensas a terem comorbidades e necessitarem de terapia farmacológica e atendimento hospitalar, aumentando a chance de exposição a *C. difficile* (LOUIE et al., 2013; RAO et al., 2013; SHIN; HIGH; WARREN, 2016). Além dos custos diretos com o tratamento do paciente e o aumento no tempo de internação, destacam-se ainda despesas por redução da capacidade produtiva dos indivíduos acometidos e morte (HEIMANN et al., 2018).

Apesar da idade ser um fator de risco conhecido, estudos indicam que a ICD tem atingido cada vez mais indivíduos com idade inferior a 65 anos (CENTERS FOR DISEASE

CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2005; KHANNA; PARDI, 2010). Ainda, tem chamado a atenção a ocorrência de casos comunitários da doença, em que não há histórico de hospitalização do paciente nas 12 semanas anteriores ao aparecimento dos sintomas; ou aqueles em que o início de sintomas for observado menos de 48 horas após internação hospitalar (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020; MCDONALD et al., 2007). Acredita-se que essa mudança na epidemiologia da doença se deve ao contato com portadores assintomáticos ou reservatórios ambientais alternativos, como alimentos de origem animal e vegetal, água, solo, superfícies e contato com animais de companhia ou de produção (KNETSCH et al., 2014; LIM; KNIGHT; RILEY, 2020; RODRÍGUEZ-PALLARES et al., 2022; SQUIRE; RILEY, 2012b). O uso de cefalosporinas nas medicinas humana e veterinária é apontado como impulsionador da colonização por *C. difficile* em animais de produção e disseminação dos esporos pelo ambiente, resultando em aumento de casos comunitários de ICD (KNIGHT; RILEY, 2019).

A similaridade entre isolados de seres humanos e animais indica a possibilidade de transmissão zoonótica e/ou antropozoonótica (DIAB; UZAL; SONGER, 2016; FREEMAN et al., 2010; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016; WEESE, 2020). O contato direto ou indireto com animais é apontado como uma das possíveis explicações para a ocorrência de casos comunitários de ICD (DUMYATI et al., 2012; HENSGENS et al., 2012; METCALF et al., 2011). Sob esse aspecto, a transmissão do agente entre animais e seres humanos já foi relatada; entretanto, é difícil estabelecer se essa observação se deve ao contato direto ou à alta carga de contaminação ambiental, comum em locais onde há um indivíduo portador de *C. difficile* (KEESSEN et al., 2013; KNETSCH et al., 2014; OTTEN et al., 2010; RODRÍGUEZ-PALLARES et al., 2022).

As opções de tratamento para ICD em humanos são limitadas. Atualmente, a ICD é tratada principalmente com vancomicina e fidaxomicina em vários países (LACHOWICZ et al., 2020; OFORI et al., 2018). Especificamente no Brasil, o tratamento com metronidazol permanece como a opção principal, enquanto a fidaxomicina, apesar de aprovada para uso, não é comercializada no país (ALVES et al., 2022). O metronidazol já foi indicado como a primeira escolha para o tratamento de casos leves a moderados, por seu baixo custo e sucesso no desfecho clínico; entretanto, essa recomendação tem caído em desuso devido à considerável taxa de recorrência em pacientes tratados com esse antimicrobiano (KELLY et al., 2021; MOURA et al., 2013; SHANE et al., 2017). Um estudo recente relacionou o gene *nimB* de *C. difficile* com a resistência ao metronidazol, apontando esse fator como um dos responsáveis pelo aumento de ICD causada por cepas epidêmicas, resistentes a esse e outros antimicrobianos, como fluoroquinolonas (OLAITAN et al., 2023).

Em relação à vancomicina, os relatos de cepas resistentes têm crescido desde 2012, período onde o uso desse antimicrobiano foi intensificado em todo o mundo (MCDONALD et al., 2018; SAHA et al., 2019; ZAR et al., 2007). Esse antimicrobiano também induz a formação de biofilme que, como mencionado, é um dos fatores de virulência de *C. difficile* (O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021). Além disso, o uso de vancomicina gera preocupação devido à seleção de outros microrganismos resistentes, como aqueles do gênero *Enterococcus* (DUBIN et al., 2019). Já a fidaxomicina tem como principal limitação o custo elevado (HEIMANN et al., 2015; RAO; MALANI, 2020).

Na medicina veterinária, o uso de vancomicina deve ser uma alternativa apenas quando o tratamento com metronidazol não for satisfatório (KEESSEN; GAASTRA; LIPMAN, 2011). Assim, o tratamento dos casos recorrentes em animais é limitado (DINIZ et al., 2021). Vale salientar que, em muitos países, o uso da vancomicina é proibido em animais.

2.7 Controle e prevenção

As medidas de controle do agente são dificultadas pela formação de esporos, que possibilita à bactéria permanecer viável nos mais diversos ambientes por longos períodos (CZEPIEL et al., 2019). A descontaminação do ambiente com cloro ativo e a higienização das mãos com água e sabão são recomendadas para reduzir a presença desse patógeno no ambiente (DINLEYICI; VANDENPLAS, 2019; LOBATO, 2013; SONGER; UZAL, 2005). A utilização de álcool para antisepsia não é eficaz contra *C. difficile*, já que os esporos são resistentes à sua ação (VONBERG et al., 2008). Indivíduos com quadro clínico de ICD eliminam uma grande quantidade de esporos, importantes na disseminação da doença; assim, a restrição de contato com esses pacientes pode ser adotada, a fim de reduzir a exposição de indivíduos saudáveis (BARBUT, 2015; WILCOX et al., 2003). O diagnóstico precoce e tratamento desses indivíduos auxiliam na interrupção da disseminação ambiental (BARBUT, 2015; VONBERG et al., 2008). O uso criterioso de antimicrobianos é importante para reduzir o número de pacientes suscetíveis à ICD (DELLIT et al., 2007; DINLEYICI; VANDENPLAS, 2019; REBMANN; CARRICO, 2011).

A colonização por *C. difficile* no intestino de leitões neonatos ocorre nas primeiras horas de vida (HOPMAN et al., 2011). Assim, promover uma maior diversidade na microbiota intestinal desses animais pode oferecer proteção contra *C. difficile* por exclusão competitiva do agente (ARRUDA et al., 2016; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019; SHIM et al., 1998). O uso de probióticos é alvo de diversos estudos visando a prevenção da ICD, entretanto, não há um consenso sobre os reais efeitos da sua utilização em ensaios clínicos (BARBOSA et al., 2023;

LEFFLER; LAMONT, 2015; VERNAYA; MCADAM; HAMPTON, 2017). Estudos sugerem que a administração de cepas não-toxigênicas em espécies animais impede a eliminação de toxinas A/B e reduz a presença de cepas toxigênicas nas fezes (MERRIGAN et al., 2003; NAGARO et al., 2013; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019). Além disso, a administração de cepas não-toxigênicas parece reduzir as taxas de ICD e recorrência em humanos (ETIFA et al., 2023; GERDING et al., 2015; GERDING; SAMBOL; JOHNSON, 2018).

Em suínos, o tratamento não é usual, devido à quantidade de animais que pode ser acometida, elevando os custos com a medicação e manejo (KEESSEN; GAASTRA; LIPMAN, 2011). Dessa forma, a utilização de métodos imunoprolifáticos deve ser uma alternativa na prevenção à ocorrência da doença (LOBATO, 2013; SONGER; UZAL, 2005).

2.8 Importância da resposta humoral

Em seres humanos, a resposta humoral tem papel importante no curso da doença, onde indivíduos com elevada produção de anticorpos IgG tendem a ser assintomáticos ou apresentar quadros mais brandos, além de terem menor incidência de recorrência após o tratamento (CZEPIEL et al., 2019; KELLY; KYNE, 2011; KYNE et al., 2001; LEAV et al., 2010). A utilização de anticorpos monoclonais anti-TcdB em seres humanos evita a recorrência de ICD (DE BRUYN et al., 2016). Um desses compostos, conhecido como Bezlotoxumab, reduz ainda mais a recorrência de ICD quando administrado com o anticorpo monoclonal anti-TcdA, conhecido como Actoxumab (CHAI; LEE, 2018; DANZ et al., 2020). Em leitões, a proteção contra ICD também se demonstrou eficaz com a utilização de anticorpos monoclonais humanos e colostro bovino hiperimune contra as toxinas de *C. difficile* (COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013a, 2013b).

Essas observações indicam que uma vacina com toxoide de *C. difficile* poderia prevenir ou reduzir a ocorrência de ICD. As toxinas clostridiais purificadas são altamente imunogênicas (LEWIS, 2011). Nesse contexto, alguns estudos foram desenvolvidos a fim de produzir um imunizante eficaz para usos nas medicinas humana e veterinária. Em 2021 foi publicado um estudo de fase 3, financiado pela empresa de produtos farmacêuticos Sanofi Pasteur, avaliando a eficácia de uma vacina composta por toxinas de *C. difficile* inativadas com formalina. Esse imunizante induziu a produção de anticorpos neutralizantes em hamsters e seres humanos, resultado comprovado através de ensaio imunoenzimático e neutralização de toxina in vitro; entretanto, a ocorrência de ICD entre os grupos controle e vacinado foi semelhante, e os estudos foram descontinuados (DE BRUYN et al., 2021; QUEMENEUR et al., 2018).

Em um estudo de fase 2 financiado pela empresa farmacêutica Pfizer, Remich e colaboradores (2023) demonstraram a segurança e imunogenicidade de uma vacina com toxoides de *C. difficile* administrada em adultos com idade entre 65 e 85 anos, e persistência de anticorpos acima do nível basal por até 48 meses após a última imunização (REMICH et al., 2023). Além de toxinas, alguns estudos tentaram induzir a resposta imune contra *C. difficile* utilizando outros antígenos do agente, como flagelos e proteínas da camada S de superfície. A imunização ativa de camundongos com um antígeno recombinante contendo fragmentos das proteínas de ligação FliC e FliD de *C. difficile* e a administração de soro hiperimune contra os mesmos antígenos parece induzir resposta imunológica, protegendo os animais da ICD e reduzindo a quantidade de esporos e toxinas eliminados nas fezes (WANG et al., 2023). As proteínas da camada S de superfície desempenham papel crítico na ICD, atuando na ligação às células epiteliais do intestino, promovendo ruptura de junções celulares e induzindo forte resposta imune (CHANDRA et al., 2023). Isso a torna um alvo interessante para o desenvolvimento de uma vacina contra ICD (SHIRVAN; AITKEN, 2016).

Uma vacina recombinante, composta por fragmentos de domínios de ligação de TcdA e TcdB induziu resposta humoral em camundongos e conferiu proteção significativa contra os sinais clínicos da ICD, indicando que esse é um alvo possível no desenvolvimento de imunizantes (LUO et al., 2019). A empresa farmacêutica Valneva avaliou, em estudo de fase 1, a eficácia de uma proteína recombinante contendo domínios de ligação das toxinas A e B de *C. difficile*, que demonstrou alta imunogenicidade e elevada indução de anticorpos contra ambas as toxinas (BÉZAY et al., 2016). Apesar dos resultados promissores na fase 2, o estudo foi descontinuado (CHAI; LEE, 2018). Outro imunizante está em fase inicial de estudo e envolve o antígeno flagelar F2 recombinante (GSK Farmacêutica) (COSTANZO; ROVIELLO, 2023; GONZALES-LUNA; CARLSON; GAREY, 2023; STEVENSON; MINTON; KUEHNE, 2015). Métodos computacionais já foram utilizados com o objetivo de desenvolver uma vacina com duas proteínas-alvo: CdeC, que afetaria a germinação de esporos de *C. difficile*, reduzindo o número de portadores assintomáticos e evitando a colonização dos indivíduos; e fliD, que afetaria a colonização pelas formas vegetativas do agente (TAN et al., 2022).

2.9 Primeira vacina contra *C. difficile* em suínos

No ano de 2021, a primeira vacina contra *C. difficile* em suínos foi disponibilizada no mercado, contendo as toxinas A e B inativadas, além de toxoide alfa de *Clostridium perfringens* tipo A. O imunizante é destinado a fêmeas suínas gestantes, a fim de prevenir diarreia neonatal por *C. difficile*, através da imunização passiva via colostro. Um estudo clínico de fase I,

conduzido pelo fabricante, relatou que leitões neonatos imunizados passivamente sobreviveram ao desafio com *C. difficile*, enquanto o grupo controle apresentou mortalidade de 100% (dados não publicados). Além de prevenir a morte por ICD, a vacina demonstrou reduzir os sinais clínicos associados à infecção, como diarreia e lesões intestinais. Entretanto, não existem estudos publicados avaliando a presença de anticorpos em fêmeas suínas ativamente imunizadas, nem aqueles circulantes em neonatos após a ingestão do colostro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de anticorpos séricos em matrizes suínas e leitões neonatos após a ingestão de colostro de fêmeas imunizadas com a vacina comercial contra *C. difficile*.

3.2 Objetivos específicos

I - Imunizar fêmeas suínas gestantes com duas doses da vacina;

II - Avaliar a presença de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB no soro de suínos imunizados ativamente e passivamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Imunização de matrizes suínas

A realização da fase de estudos com suínos ocorreu em uma granja comercial, localizada no município de Ponte Nova (MG). Antes da realização do estudo, os animais da propriedade foram testados, com resultado negativo, para a presença de *C. difficile* e toxinas TcdA e TcdB. As matrizes foram acondicionadas em gaiolas individuais, onde recebiam ração correspondente à fase gestacional e água *ad libitum*. Segundo o cálculo amostral (CHARAN; KANTHARIA, 2013; SAMPAIO, 2015), foram utilizados dois grupos experimentais: controle e vacinado, com 6 e 12 animais, respectivamente. O grupo vacinado recebeu duas doses da vacina Suiseng Diff A®, contendo os toxoides A e B de *C. difficile*, às seis e três semanas anteriores ao parto (T0 e T1, respectivamente), conforme indicação do fabricante, por via intramuscular (IM). O grupo controle foi imunizado com a vacina Suiseng®, composta por fatores de adesão e enterotoxóide de *Escherichia coli*, além dos toxoides de *Clostridium perfringens* tipo C e *Clostridium novyi* tipo B, seguindo o mesmo cronograma do grupo vacinado com o toxóide de *C. difficile*. Ambas as vacinas estavam sendo introduzidas no manejo da granja no momento do experimento. Assim, todos os animais receberam as duas aplicações, com exceção daqueles presentes no grupo controle, que foram imunizados apenas com a vacina sem toxoides de *C. difficile*. Anteriormente a cada uma das inoculações, 5 mL do sangue de cada animal foi coletado através da veia jugular, a fim de acompanhar a produção de anticorpos ao longo do tempo (SALVARANI et al., 2013) (Figura 2).

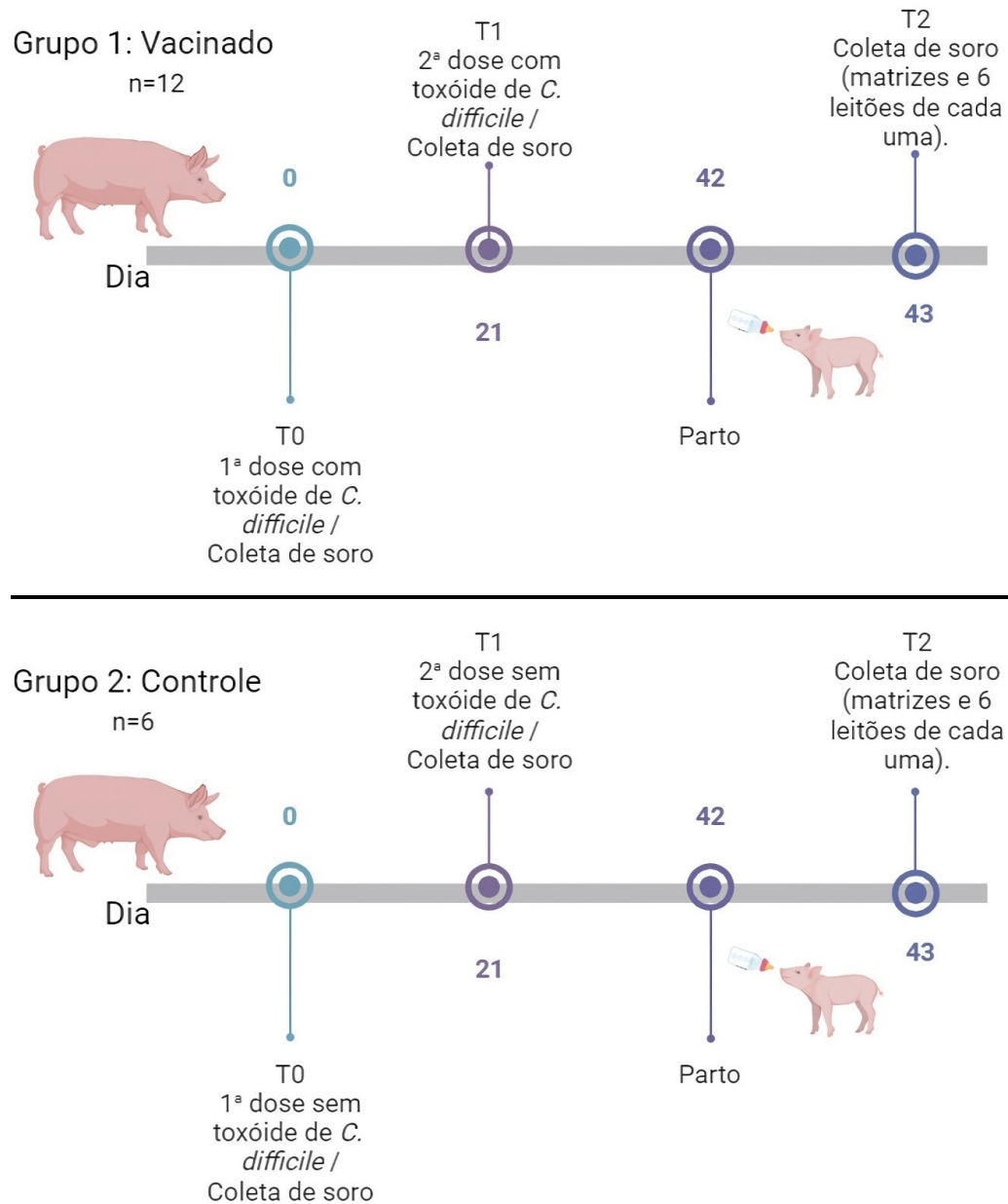


Figura 2: Representação gráfica do esquema de vacinação e coleta de soro de suínos, para detecção e titulação de anticorpos anti-fragmentos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*. (Criado com BioRender® <https://www.biorender.com/>)

4.2 Avaliação da transmissão passiva de anticorpos para leitões neonatos

Entre 24 e 48 horas após o nascimento, foram selecionados aleatoriamente seis leitões de cada matriz para coleta de 1 mL sangue, através da veia jugular, para obtenção de soro (SALVARANI et al., 2013). Também foi coletado sangue das matrizes (T2) (Figura 3). Todas as amostras individuais de sangue foram armazenadas em tubos estéreis acondicionados em caixa de isopor contendo gelo reciclável até o momento da centrifugação e armazenamento do soro, realizados no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), com o número de protocolo 184/2022.



Figura 3: Coleta de sangue, pela veia jugular, de porcas vacinadas e leitões recém-nascidos, para obtenção de soro. Local: Granja comercial (Ponte Nova, MG). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). As proteínas recombinantes TcdA (57 kDa) e TcdB (32 kDa) foram produzidas em um estudo anterior, a partir de sequências de aminoácidos imunodominantes presentes em fragmentos da porção C-terminal (região CROP) das toxinas A e B (estirpe VPI10463 / CD630) e produzidos em *Escherichia coli* Arctic Express (DE3) (RAMOS, 2023). Essas proteínas já foram empregadas na titulação de anticorpos em animais (coelhos e suínos) vacinados.

As amostras de soro de todos os animais foram submetidas a ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB. Placas de fundo chato com 96 poços em poliestireno (Maxisorp, ThermoFisher, EUA) foram revestidas com 0,25 µg/poço da proteína recombinante de TcdA ou 0,5 µg/poço de TcdB. O bloqueio foi realizado com 200 µl/poço de PBS 1x com 5% de albumina bovina (BSA). Em seguida, foram aplicados 100 µL/poço de soro na diluição de 1:400. A diluição dos soros foi realizada em PBS 1x contendo 2,5% de BSA.

Após incubação, foram adicionados 100 µL/poço de solução de ureia a 4M por um minuto, seguida de lavagem. Posteriormente foram adicionadas imunoglobulinas anti-IgG de suínos conjugadas a peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) na diluição de 1:10.000. A revelação dos anticorpos conjugados ocorreu com a adição de 0,05% de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,1% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tampão citrato fosfato (0,1M de citrato e 0,2M de fosfato). A mensuração da densidade óptica (DO) foi realizada em um leitor de microplacas (Thoth 6800) a 492 nm (ROBERTS et al., 2012).

4.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram gerados com o programa GraphPad 9.0. A homoscedasticidade e normalidade dos dados referentes aos títulos de anticorpos frente às proteínas recombinantes TcdA e TcdB foram avaliadas com os testes F e Shapiro-Wilks, respectivamente. Em situações de distribuição normal de dados, foram utilizados ANOVA de medidas repetidas (dados longitudinais pareados) e pós-teste de Tuckey; e teste T não pareado (comparação entre grupos controle e vacinado). Na ausência de normalidade, mesmo após transformação, foram utilizados o teste de Mann Whitney (comparação entre grupos) e teste de Friedman e pós-teste de Dunn (dados longitudinais pareados). Diferenças entre os resultados foram consideradas significativas quando o valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A vacina em estudo induziu a formação de anticorpos IgG em matrizes suínas após a primeira dose (T1) frente aos antígenos TcdA e TcdB recombinantes (médias de densidade óptica [DO] de $2,12 \pm 0,65$ e $1,69 \pm 0,5$, respectivamente) (Figura 4). Após a segunda dose (T2) as médias para os antígenos A e B foram $2,11 \pm 0,65$ e $1,85 \pm 0,44$, respectivamente. A estimativa da quantificação de anticorpos em T1 e T2 foi estatisticamente superior àquela apresentada antes da primeira dose (T0), com média de $0,65 \pm 0,63$ frente ao antígeno TcdA e $0,9 \pm 0,53$ frente ao antígeno TcdB.

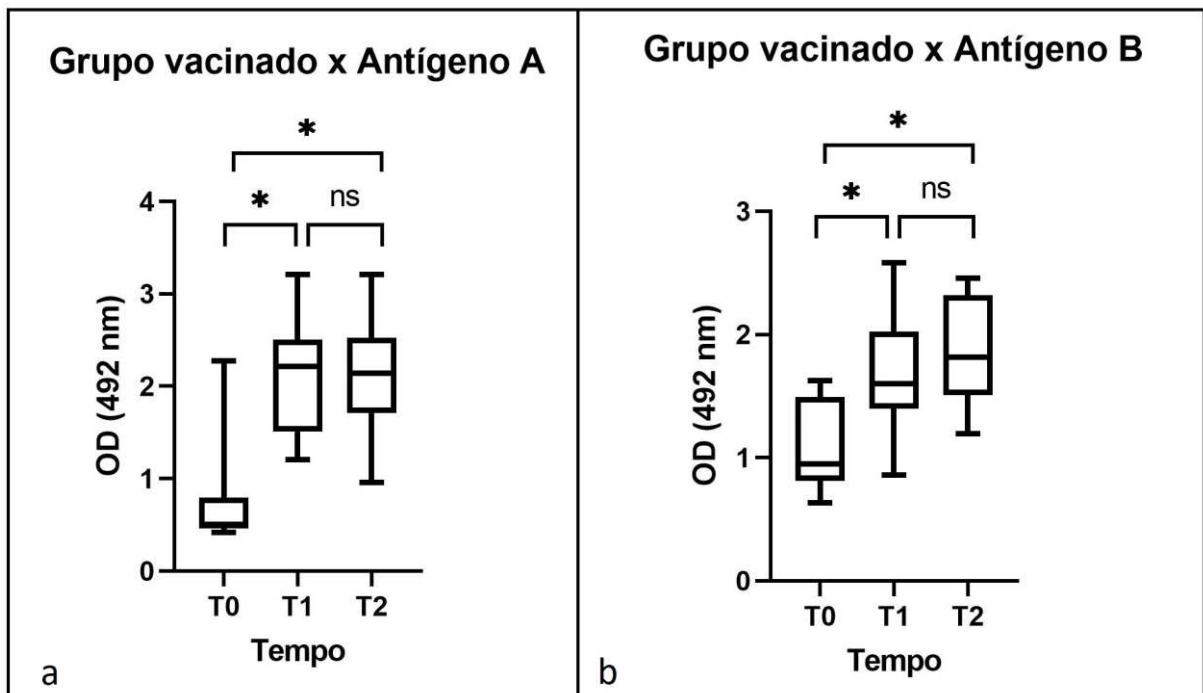


Figura 4: Absorbância (DO 492 nm) de IgG anti-TcdA (4.a) e anti-TcdB recombinantes (4.b) do grupo de matrizes suínas imunizadas com a vacina contendo toxoides A e B de *C. difficile*, avaliados por ELISA indireto. T0: Tempo de coleta anterior à 1ª dose de vacina; T1: Tempo de coleta anterior à 2ª dose de vacina; T2: Tempo de coleta 24 horas após o parto. *: Diferenças significativas entre diferentes tempos pelo teste de Friedman (figura 4.a) ou ANOVA (figura 4.b) ($p \leq 0,01$); ns: sem diferença significativa.

No grupo controle, os níveis de anticorpos não apresentaram diferença estatística ao longo do tempo frente a ambos os antígenos (Figura 5).

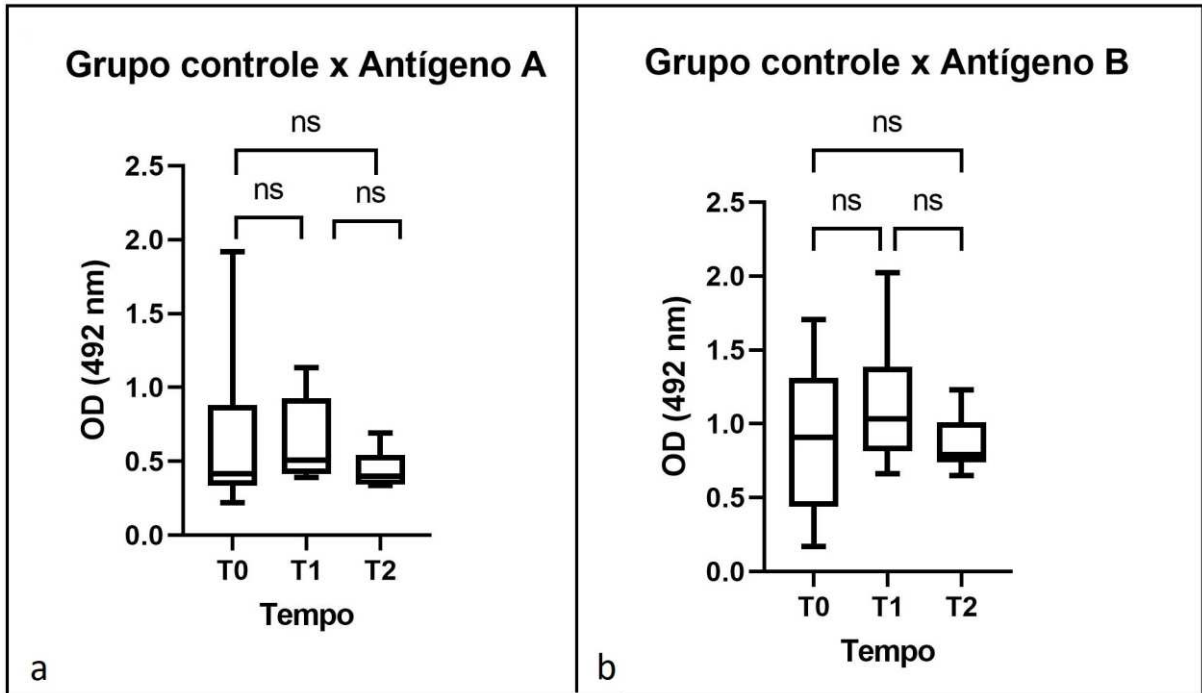


Figura 5: Absorbância (DO 492 nm) de IgG anti-TcdA (5.a) e anti-TcdB recombinantes (5.b) do grupo controle, composto por matrizes suínas imunizadas com a vacina sem toxoides A e B de *C. difficile*, avaliados por ELISA indireto. T0: Tempo de coleta anterior à 1ª dose de vacina; T1: Tempo de coleta anterior à 2ª dose de vacina; T2: Tempo de coleta 24 horas após o parto. ns: sem diferença significativa pelo teste ANOVA ($p \leq 0,01$).

Em relação à resposta apresentada pelos diferentes grupos após a segunda dose, foi observada elevada produção de IgG frente aos antígenos A (figura 6.a) e B (figura 6.b) no grupo vacinado, estatisticamente superior à resposta observada no grupo controle.

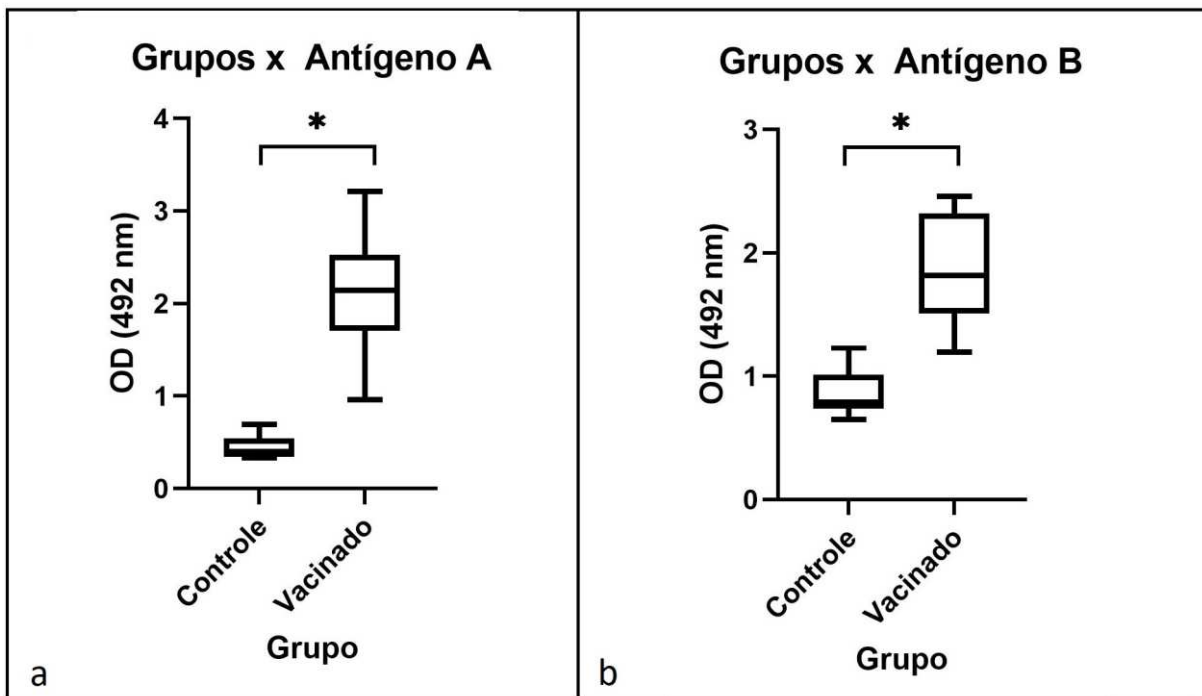


Figura 6: Comparação de absorvâncias (DO 492 nm) de IgG anti-TcdA (6.a) e anti-TcdB recombinantes (6.b) do grupo de matrizes suínas imunizadas com a vacina contendo os toxoides A e B de *C. difficile* e do grupo controle no T2, avaliados por ELISA indireto. *: Diferenças significativas entre diferentes grupos pelo teste T não pareado ($p \leq 0,01$).

Entre os leitões, similar ao observado nos grupos de matrizes, aqueles passivamente imunizados via colostro apresentaram níveis superiores de IgG frente aos antígenos A (média de $2,89 \pm 0,69$) e B ($2,62 \pm 0,6$), quando comparados com leitões amamentados por matrizes do grupo controle (média de $0,88 \pm 0,55$ para TcdA e $1,95 \pm 0,54$ para TcdB).

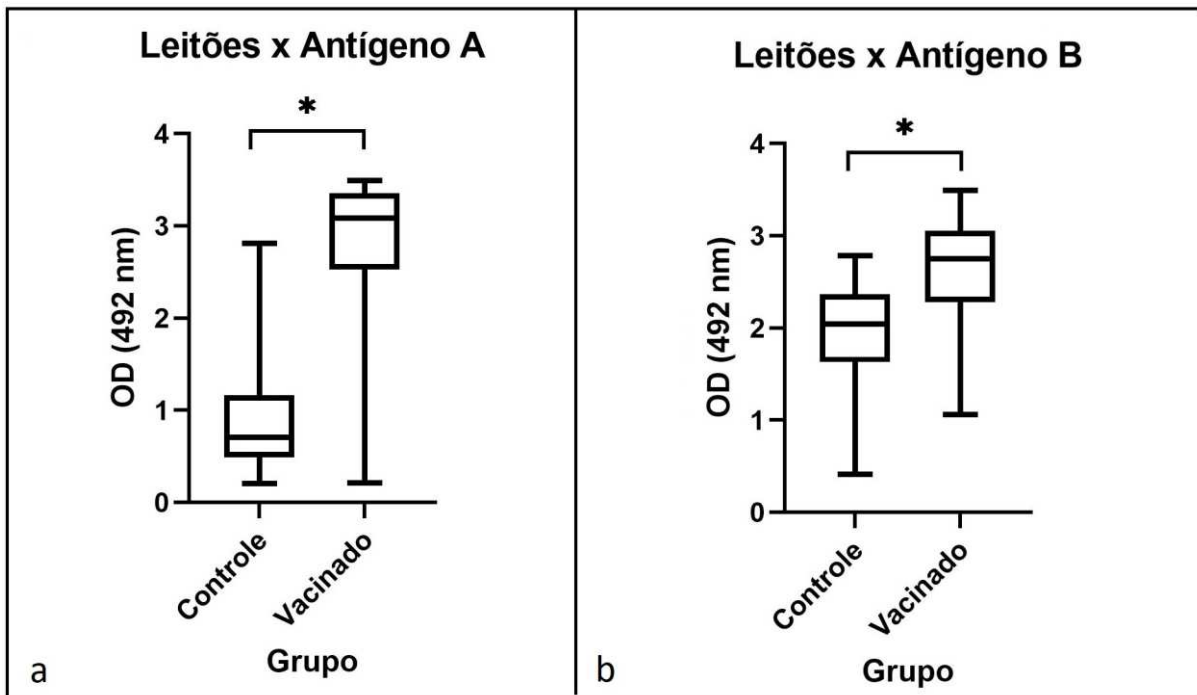


Figura 7: Comparação de absorvâncias (DO 492 nm) de IgG anti-TcdA (7.a) e anti-TcdB recombinantes (7.b) entre os grupos de leitões, avaliados por ELISA indireto. *: Diferenças significativas entre diferentes grupos pelo teste de Mann Whitney (figura 7.a). ou teste T não pareado (figura 7.b) ($p \leq 0,01$).

6 DISCUSSÃO

A ICD é uma das principais causas de diarreia neonatal em suínos, levando a perdas econômicas relacionadas ao baixo desenvolvimento corporal, que diminui a produtividade no lote acometido (DIAB; UZAL; SONGER, 2016; OLIVEIRA JÚNIOR, 2019). A presença desse agente em suínos é, ainda, uma questão de saúde pública, uma vez que a transmissão de *C. difficile* entre seres humanos e animais já foi relatada, além de possibilitar a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos entre as diferentes espécies (DEBAST et al., 2009; KEESSEN et al., 2013; KNETSCH et al., 2014; REDDING et al., 2021). A prevalência de *C. difficile* em suínos varia entre 3,4% a 92% em países da Ásia, Europa e América, evidenciando a alta disseminação do agente entre criações de suínos e sua importância na saúde pública (MONTEAGUDO et al., 2022; NORÉN; JOHANSSON; UNEMO, 2014; PUTSATHIT et al., 2019; SCHNEEBERG et al., 2013; SPIGAGLIA et al., 2023; UZAL et al., 2023; WEESE et al., 2011).

De modo geral, suínos não são tratados contra a ICD devido à quantidade de animais que pode ser acometida, elevando os custos com medicação e manejo (KEESSEN; GAASTRA; LIPMAN, 2011). As medidas de controle do agente são dificultadas pela formação de esporos; assim, o desenvolvimento de uma vacina pode auxiliar na prevenção à ocorrência da doença (CZEPIEL et al., 2019; LOBATO, 2013; SONGER; UZAL, 2005). Nesse contexto, vários estudos foram desenvolvidos nos últimos anos, a fim de produzir um imunizante eficaz para usos nas medicinas humana e veterinária. A resposta humoral tem papel importante no curso da doença, onde indivíduos com elevada produção de anticorpos IgG tendem a ser assintomáticos ou apresentar quadros mais brandos, além de terem menor taxa de recorrência (CZEPIEL et al., 2019; KELLY; KYNE, 2011; KYNE et al., 2001; LEAV et al., 2010). Em seres humanos, a prevenção da ICD ainda é um desafio, já que a maioria dos estudos de vacinas até o momento foi encerrado durante as fases de análise clínica.

O desenvolvimento de vacinas contra *C. difficile* é desafiador e envolve testes em animais (AMINZADEH et al., 2020; ANOSOVA et al., 2013). Nesse contexto, hamsters (*Mesocricetus auratus*) são a espécie mais utilizada em testes iniciais de possíveis imunógenos (BEST; FREEMAN; WILCOX, 2012; WANG et al., 2015). Entretanto, a infecção nesses animais é potencialmente fatal quando a imunidade vacinal é insuficiente para impedir a ocorrência da doença ou quando os animais se encontram em grupos não-vacinados (BEST; FREEMAN; WILCOX, 2012; DONALD et al., 2013; GIANNASCA et al., 1999; SIDDIQUI et al., 2012). Devido à alta suscetibilidade dessa espécie à infecção por *C. difficile*, o quadro clínico apresentado por esses animais envolve sinais hiperagudos como diarreia grave e morte

em poucos dias, o que limita a comparação com o quadro apresentado por seres humanos (STEELE et al., 2010).

Em suínos, o quadro clínico apresentado é semelhante àquele observado em seres humanos, o que levou à utilização de leitões como um modelo animal possível para o estudo de ICD aguda ou crônica (NYBLADE et al., 2022; STEELE et al., 2010). Assim, esses animais podem ser utilizados no desenvolvimento de vacinas, oferecendo respostas importantes relacionadas a sinais clínicos, lesões patológicas, resposta imune e colonização bacteriana (STEELE et al., 2010, 2013a). Em leitões, a proteção contra ICD se demonstrou eficaz com a utilização de anticorpos monoclonais humanos e colostro bovino hiperimune contra as toxinas de *C. difficile* (COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013a, 2013b). Nessa espécie, a proteção é necessária durante a primeira semana de vida, quando a microbiota está em formação, sendo incapaz de inibir a colonização por *C. difficile* (LOBATO, 2013; PROCTOR et al., 2021; WEESE, 2020). Estudos desenvolvidos nessa espécie, avaliando a proteção contra ICD, indicam que a imunização passiva tem efeito na proteção contra a doença, levando à prevenção da doença ou a manifestações clínicas mais brandas (COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013a, 2013b).

No presente trabalho, realizou-se a detecção de IgG, em animais ativamente e passivamente imunizados, por ELISA. Apesar de não fornecer informações acerca da capacidade neutralizantes dos anticorpos, essa técnica permite avaliar a imunogenicidade da vacina, especificamente a produção de IgG no teste padronizado (ABBAS et al., 2015). O ELISA permite ainda a avaliação de um grande número de amostras em um período curto de tempo (CROWTHER, 2001).

No presente estudo, os animais do grupo controle não apresentaram diferenças na produção de anticorpos ao longo do tempo, confirmando a ausência de estímulo para produção de IgG anti-TcdA e TcdB. A presença de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB anteriores à primeira vacinação pode indicar o contato prévio dos animais com *C. difficile*. Sabe-se que esse agente encontra disseminado no ambiente na forma de esporos, o que possibilita a colonização de animais adultos, que não apresentam quadro clínico de ICD, mas podem apresentar resposta humoral contra o patógeno (LOBATO, 2013; PROCTOR et al., 2021; SQUIRE; RILEY, 2012a; UZAL et al., 2023). Esses anticorpos podem ser transmitidos aos leitões através do colostro, o que justificaria a presença de imunoglobulinas nos leitões do grupo controle, ainda que estatisticamente inferiores aos níveis de IgG apresentados pelo grupo vacinado (ABBAS et al., 2015; RICHARD et al., 2019b). Há ainda a possibilidade de ocorrerem reações inespecíficas

durante a execução do ELISA indireto, o que pode superestimar a quantificação de IgG nas amostras (GÜVEN et al., 2014; MORITZ et al., 2019; TERATO et al., 2016).

Já no grupo vacinado, após a primeira dose, foi observada resposta humoral contra as toxinas de *C. difficile*. A resposta humoral primária, produzida a partir da ativação de células B frente ao antígeno proteico vacinal, é importante para potencializar a resposta secundária, observada após a aplicação da segunda dose da vacina (ABBAS et al., 2015). Nesse contexto, é importante lembrar que a resposta de células B é fundamental no prognóstico dos pacientes com quadro de ICD, já que a presença de anticorpos séricos é associada a quadros mais leves e menores taxas de recorrência (KYNE et al., 2001; NAZ; PETRI, 2023; SHAH et al., 2020). Já em suínos, estudos demonstraram que a presença de anticorpos contra as toxinas TcdA e TcdB protege os animais contra ICD; entretanto, esses resultados foram obtidos utilizando anticorpos monoclonais humanos e colostro bovino hiperimune (COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013a, 2013b).

O esquema de vacinação influencia os níveis de anticorpos circulantes no sangue e no colostro das fêmeas, tendo impacto direto na proteção dos leitões (MATISHECK; MCGINLEY, 1986; RICHARD et al., 2019b). No caso da ICD, que atinge leitões na primeira semana de vida, a transferência passiva de anticorpos é um caminho possível para a proteção dos neonatos, já que a transferência de anticorpos maternos é a melhor forma de prevenir infecções nessa fase inicial (DE ARRIBA et al., 2002; PARK et al., 2018; SONGER, 2010). No presente estudo, os títulos de anticorpos foram mantidos após a segunda dose da vacina, garantindo a presença de IgG circulante nas matrizes gestantes no período periparto. Esse resultado é altamente desejável, pois a elevada concentração de anticorpos circulantes nas fêmeas nesse período aumenta a chance de mobilização desses para o colostro, potencializando a transferência para os leitões. Ainda, sabe-se que a aplicação de dose de reforço em um protocolo de imunização baseado em toxoides é essencial para aumentar o nível de anticorpos presentes no colostro e proporcionar melhor proteção materna à prole (MOXLEY; OLSON, 1989; ODENDAAL et al., 1988; YANG et al., 2021).

A proximidade entre os níveis de IgG circulantes nos leitões (média de $2,89 \pm 0,69$ frente ao antígeno A e $2,62 \pm 0,6$ frente ao antígeno B) e nas porcas (médias para TcdA e TcdB de $2,11 \pm 0,65$ e $1,85 \pm 0,44$, respectivamente) indica que houve relevante mobilização desses anticorpos e transferência via colostro aos neonatos. Estudos anteriores já demonstraram que os níveis de anticorpos em matrizes e neonatos estão fortemente associados (CABRERA et al., 2012; MACHADO-NETO; GRAVES; CURTIS, 1987; MACIAG et al., 2022; TIZARD, 2017).

A ingestão e absorção dessas imunoglobulinas nas primeiras horas de vida conferem proteção no lúmen intestinal e sistêmica, evitando ou reduzindo a ocorrência de doenças (ABBAS et al., 2015).

Foi observada uma menor resposta humoral frente ao antígeno B ($1,84 \pm 0,44$), quando comparado ao antígeno A ($2,11 \pm 0,49$), após a aplicação das duas doses da vacina, similar a trabalhos anteriores que sugerem que TcdA é mais imunogênica que TcdB (GHOSE et al., 2013; LUO et al., 2019; TIAN et al., 2012). A presença de anticorpos IgG na coleta anterior à aplicação da primeira dose da vacina (T0) sugere ainda o contato prévio dos animais com o agente, tendo em vista que *C. difficile* encontra-se disseminado na forma de esporos. Outra hipótese é a presença de antígenos de *E. coli* nas proteínas recombinantes produzidas nessa espécie, o que levaria a um ruído no ELISA (captação de anticorpos inespecíficos). Devemos salientar, porém, que após o estímulo vacinal, o grupo controle se manteve com resposta humoral estatisticamente inferior àquela apresentada pelos animais vacinados com os toxoides de *C. difficile*, indicando a imunogenicidade da vacina

Dessa forma, é possível sugerir que a vacina comercial testada é capaz de induzir resposta imune humoral contra os fragmentos recombinantes de TcdA e TcdB de *C. difficile* em fêmeas suínas imunizadas às seis e três semanas anteriores ao parto. O protocolo de aplicação de duas doses de vacina em fêmeas gestantes já é conhecido e garante um aumento significativo nos níveis de anticorpos circulantes contra toxinas bacterianas (HOGH, 1976; LEWIS, 2011; RICHARD et al., 2019a). Além disso, os anticorpos contra essas toxinas no soro desses animais são transmitidos passivamente para leitões neonatos, através do colostro, e absorvidos pelo epitélio intestinal (ABBAS et al., 2015; TIZARD, 2017).

Muitos estudos foram desenvolvidos com a administração de toxoides e outros fragmentos de antígenos de *C. difficile*, além de proteínas recombinantes. Apesar da reconhecida importância dos anticorpos na prevenção da doença e sucesso do tratamento em seres humanos, nenhuma vacina para essa espécie foi aprovada, até o momento. Algumas pesquisas em andamento buscam o desenvolvimento de imunizantes contendo antígenos flagelares recombinantes e proteínas que afetariam a capacidade de colonização e germinação de *C. difficile* (COSTANZO; ROVIELLO, 2023; GONZALES-LUNA; CARLSON; GAREY, 2023; STEVENSON; MINTON; KUEHNE, 2015; TAN et al., 2022). Se bem sucedidos, esses imunizantes podem reduzir o impacto que a ICD tem na saúde dos seres humanos e nos altos custos dispensados para o tratamento da doença.

O uso de cepas não-toxigênicas parece reduzir as taxas de ICD em leitões, através da colonização e exclusão competitiva das cepas toxigênicas (SONGER et al., 2007; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019). Entretanto, sua administração deve ser feita logo após o nascimento dos leitões, por via oral, antes desses animais terem contato com os esporos, comumente presentes no ambiente. Esse cuidado implica no aumento dos custos com a mão-de-obra necessária para uma proteção eficaz (OLIVEIRA JÚNIOR, 2019).

O desenvolvimento de uma vacina que induz resposta humoral contra *C. difficile* significa um grande avanço na prevenção dessa doença. A sua utilização em suínos pode favorecer o aumento na produtividade dos lotes, evitando perdas relacionadas ao baixo desenvolvimento dos animais acometidos. Devido ao caráter zoonótico do agente, esse imunizante também pode auxiliar na redução da transmissão do agente entre seres humanos, já que os animais são apontados como reservatórios, possivelmente associados a casos comunitários, onde os fatores de risco clássicos – hospitalização, idade avançada e uso de medicamentos – não estão presentes. Além disso, uma vacina eficaz para a espécie suína pode colaborar para o desenvolvimento de um imunizante destinado a outras espécies suscetíveis à ICD, como equinos e seres humanos.

Entre as limitações desse estudo, a avaliação do soro dos animais através de ELISA não permite a verificação da capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos. Apesar de fornecer informações importantes acerca da imunogenicidade da vacina, é necessário verificar a atividade neutralizante dessas imunoglobulinas frente às toxinas nativas produzidas por *C. difficile*.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a primeira vacina comercial contra *C. difficile* é capaz de induzir resposta imune humoral em porcas gestantes vacinadas, possibilitando a transferência passiva de anticorpos aos leitões neonatos após a ingestão do colostro. Essa descoberta revela a possibilidade de proteção contra a ICD em leitões, o que levaria a aumento na produtividade dos lotes e redução das perdas econômicas inerentes à doença.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Perspectivas futuras envolvem a realização de ensaio de neutralização em célula, utilizando os soros dos animais imunizados ativamente e passivamente, a fim de verificar a capacidade de neutralização dos anticorpos detectados no ensaio imunoenzimático. Para isso, também deve ser estabelecido um protocolo de produção de toxina nativa de *C. difficile*, que será usada na soroneutralização. A eficácia da vacina também poderá ser avaliada em propriedades sabidamente positivas para *C. difficile*, com a vacinação de um grupo de animais e observação da ocorrência de ICD, através de sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas associadas. Deve-se acompanhar os níveis séricos de anticorpos em fêmeas imunizadas, a fim de se estabelecer um protocolo de imunização nas gestações subsequentes. Há, ainda, a possibilidade de testar a vacina em potros, animais suscetíveis à ocorrência de ICD quando tratados com antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Cellular and molecular immunology: study smart**. 8. ed., internat. ed ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders, 2015.
- ALVES, J. D. F. et al. Metronidazole for Treatment of *Clostridioides difficile* Infections in Brazil: A Single-Center Experience and Risk Factors for Mortality. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1162, 28 ago. 2022.
- AMINZADEH, A. et al. Detoxification of toxin A and toxin B by copper ion-catalyzed oxidation in production of a toxoid-based vaccine against *Clostridioides difficile*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 160, p. 433–446, nov. 2020.
- ANOSOVA, N. G. et al. Systemic antibody responses induced by a two-component *Clostridium difficile* toxoid vaccine protect against *C. difficile*-associated disease in hamsters. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1394–1404, 1 set. 2013.
- ARIMOTO, J. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29754, 15 jul. 2016.
- ARRUDA, P. H. E. et al. Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. **The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 57, n. 2, p. 183–188, fev. 2016.
- BACCI, S. et al. Binary Toxin and Death after *Clostridium difficile* Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 976–982, jun. 2011.
- BARBOSA, M. L. L. et al. Role of probiotics in preventing *Clostridioides difficile* infection in older adults: an integrative review. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1219225, 10 ago. 2023.
- BARBUT, F. How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 4, p. 287–295, abr. 2015.
- BARTLETT, J. G. *Clostridium difficile*: Clinical Considerations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 12, n. Supplement_2, p. S243–S251, 1 jan. 1990.
- BAUER, M. P. et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 63–73, jan. 2011.
- BEST, E. L.; FREEMAN, J.; WILCOX, M. H. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 145–167, mar. 2012.
- BÉZAY, N. et al. Safety, immunogenicity and dose response of VLA84, a new vaccine candidate against *Clostridium difficile*, in healthy volunteers. **Vaccine**, v. 34, n. 23, p. 2585–2592, maio 2016.
- BORRIELLO, S. P.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. suppl 3, p. 67–69, 1 maio 1998.

- BOUZA, E. et al. An outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Spain: risk factors for recurrence and a novel treatment strategy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1777–1786, out. 2017.
- BRAGA, D. S. et al. Incidence of healthcare-associated *Clostridioides difficile* infection in a quaternary referral university hospital in Brazil. **Anaerobe**, v. 79, p. 102672, fev. 2023.
- BRUXELLE, J.-F.; PÉCHINÉ, S.; COLLIGNON, A. Immunization Strategies Against *Clostridium difficile*. Em: MASTRANTONIO, P.; RUPNIK, M. (Eds.). **Updates on Clostridium difficile in Europe**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 1050p. 197–225.
- BUDDLE, J. E.; FAGAN, R. P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. **Virulence**, v. 14, n. 1, p. 2150452, 31 dez. 2023.
- CABRERA, R. A. et al. Influence of birth order, birth weight, colostrum and serum immunoglobulin G on neonatal piglet survival. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 42, dez. 2012.
- CANÇADO, G. G. et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, v. 54, p. 65–71, dez. 2018a.
- CANÇADO, G. G. L. et al. Impact of simultaneous glutamate dehydrogenase and toxin A/B rapid immunoassay on *Clostridium difficile* diagnosis and treatment in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 393–396, fev. 2018b.
- CARROLL, K. C.; MIZUSAWA, M. Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile*. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 33, n. 02, p. 073–081, mar. 2020.
- CARVALHO, G. M. et al. Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. **Anaerobe**, v. 75, p. 102574, jun. 2022.
- CASTRO-CÓRDOVA, P. et al. Entry of spores into intestinal epithelial cells contributes to recurrence of *Clostridioides difficile* infection. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1140, 18 fev. 2021.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 54, n. 47, p. 1201–1205, 2 dez. 2005.
- CHAI, J.; LEE, C. H. Management of Primary and Recurrent *Clostridium difficile* Infection: An Update. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 3, p. 54, 30 jun. 2018.
- CHANDRA, H. et al. Host Immune Responses to Surface S-Layer Proteins (SLPs) of *Clostridioides difficile*. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 380, 2 fev. 2023.

- CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303–306, dez. 2013.
- CHITNIS, A. S. et al. Epidemiology of Community-Associated *Clostridium difficile* Infection, 2009 Through 2011. **JAMA Internal Medicine**, v. 173, n. 14, p. 1359, 22 jul. 2013.
- 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. 2, p. 182–188, mar. 2006.
- COHEN, O. R. et al. Systemically Administered IgG Anti-Toxin Antibodies Protect the Colonic Mucosa during Infection with *Clostridium difficile* in the Piglet Model. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111075, 27 out. 2014.
- COSTANZO, V.; ROVIELLO, G. N. The Potential Role of Vaccines in Preventing Antimicrobial Resistance (AMR): An Update and Future Perspectives. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 333, 1 fev. 2023.
- COWARDIN, C. A. et al. The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 16108, 11 jul. 2016.
- CROBACH, M. J. T. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. S63–S81, ago. 2016.
- CROWTHER, J. R. **The ELISA guidebook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2001.
- CRUZ JUNIOR, E. C. et al. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 963–969, ago. 2013.
- CZEPIEL, J. et al. *Clostridium difficile* infection: review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 7, p. 1211–1221, jul. 2019.
- DANZ, H. R. et al. The Impact of Actotoxumab Treatment of Gnotobiotic Piglets Infected With Different *Clostridium difficile* Isogenic Mutants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 2, p. 276–284, 2 jan. 2020.
- DAWSON, L. F. et al. Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50527, 7 dez. 2012.
- DE ARRIBA, M. L. et al. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, n. 1–2, p. 85–97, fev. 2002.

- DE BRUYN, G. et al. Defining the optimal formulation and schedule of a candidate toxoid vaccine against *Clostridium difficile* infection: A randomized Phase 2 clinical trial. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2170–2178, abr. 2016.
- DE BRUYN, G. et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a *Clostridioides difficile* toxoid vaccine candidate: a phase 3 multicentre, observer-blind, randomised, controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 252–262, fev. 2021.
- DEBAST, S. B. et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 505–511, fev. 2009.
- DELLIT, T. H. et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 2, p. 159–177, 15 jan. 2007.
- DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 8, p. 411–416, ago. 2001.
- DIAB, S. S.; UZAL, F. A.; SONGER, J. G. Diseases produced by *Clostridium difficile*. Em: **Clostridial Diseases of Animals**. 1. ed. Sons: John Wiley & amp, 2016.
- DINIZ, A. N. et al. Fecal microbiota transplantation via colonoscopy in a dog with *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, p. e20200783, 2021.
- DINIZ, A. N. et al. Characterization of the virulence of three novel clade 2 *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains and a two-year screening in animals and humans in Brazil. **PLOS ONE**, v. 17, n. 8, p. e0273013, 26 ago. 2022.
- DINLEYICI, M.; VANDENPLAS, Y. *Clostridium difficile* Colitis Prevention and Treatment. Em: GUANDALINI, S.; INDRIO, F. (Eds.). **Probiotics and Child Gastrointestinal Health**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 1125p. 139–146.
- DONALD, R. G. K. et al. A novel approach to generate a recombinant toxoid vaccine against *Clostridium difficile*. **Microbiology**, v. 159, n. Pt_7, p. 1254–1266, 1 jul. 2013.
- DUBIN, K. A. et al. Diversification and Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* during Intestinal Domination. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 7, p. e00102–19, jul. 2019.
- DUMYATI, G. et al. Community-associated *Clostridium difficile* Infections, Monroe County, New York, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 392–400, fev. 2012.
- EASTWOOD, K. 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 Cytotoxic Culture Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3211–3217, out. 2009.

- EL FEGHALY, R. E. et al. Markers of Intestinal Inflammation, Not Bacterial Burden, Correlate With Clinical Outcomes in *Clostridium difficile* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1713–1721, 15 jun. 2013.
- ETIFA, P. et al. Non-Toxigenic *Clostridioides difficile* Strain E4 (NTCD-E4) Prevents Establishment of Primary *C. difficile* Infection by Epidemic PCR Ribotype 027 in an In Vitro Human Gut Model. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 435, 22 fev. 2023.
- FAGAN, R. P.; FAIRWEATHER, N. F. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 211–222, mar. 2014.
- FARZAN, A. et al. An investigation into the association between cpb2-encoding *Clostridium perfringens* type A and diarrhea in neonatal piglets. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire**, v. 77, n. 1, p. 45–53, jan. 2013.
- FRANCIS, M. B. et al. Bile Acid Recognition by the *Clostridium difficile* Germinant Receptor, CspC, Is Important for Establishing Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 5, p. e1003356, 9 maio 2013.
- FRASCA, D.; BLOMBERG, B. B. Aging Affects Human B Cell Responses. **Journal of Clinical Immunology**, v. 31, n. 3, p. 430–435, jun. 2011.
- FREEMAN, J. et al. Effect of metronidazole on growth and toxin production by epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotypes 001 and 027 in a human gut model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 83–91, 1 jul. 2007.
- FREEMAN, J. et al. The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 529–549, jul. 2010.
- FROST, L. R.; CHENG, J. K. J.; UNNIKRISHNAN, M. *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 3, p. e1009348, 11 mar. 2021.
- FULGIONE, V. [*Clostridium difficile* infections. Current aspects]. **Recenti Progressi in Medicina**, v. 89, n. 7–8, p. 385–394, 1998.
- GAREY, K. W. et al. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 4, p. 298–304, dez. 2008.
- GATEAU, C. et al. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 5, p. 463–468, maio 2018.
- GERDING, D. N. et al. Administration of Spores of Nontoxigenic *Clostridium difficile* Strain M3 for Prevention of Recurrent *C. difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 313, n. 17, p. 1719, 5 maio 2015.
- GERDING, D. N.; SAMBOL, S. P.; JOHNSON, S. Non-toxigenic *Clostridioides* (Formerly *Clostridium*) *difficile* for Prevention of *C. difficile* Infection: From Bench to Bedside Back to Bench and Back to Bedside. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1700, 26 jul. 2018.

- GHOSE, C. et al. Toll-Like Receptor 5-Dependent Immunogenicity and Protective Efficacy of a Recombinant Fusion Protein Vaccine Containing the Nontoxic Domains of *Clostridium difficile* Toxins A and B and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Flagellin in a Mouse Model of *Clostridium difficile* Disease. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 6, p. 2190–2196, jun. 2013.
- GIANNASCA, P. J. et al. Serum Antitoxin Antibodies Mediate Systemic and Mucosal Protection from *Clostridium difficile* Disease in Hamsters. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 527–538, fev. 1999.
- GONZALES-LUNA, A. J.; CARLSON, T. J.; GAREY, K. W. Emerging Options for the Prevention and Management of *Clostridioides difficile* Infection. **Drugs**, v. 83, n. 2, p. 105–116, fev. 2023.
- GOORHUIS, A. et al. Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1162–1170, nov. 2008.
- GÜVEN, E. et al. Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. **Journal of Immunological Methods**, v. 403, n. 1–2, p. 26–36, jan. 2014.
- HALL, I. C.; O'TOOLE, E. INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS: WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, *Bacillus difficilis*. **American Journal of Diseases of Children**, v. 49, n. 2, p. 390, 1 fev. 1935.
- HEIMANN, S. M. et al. Economic burden of *Clostridium difficile* associated diarrhoea: a cost-of-illness study from a German tertiary care hospital. **Infection**, v. 43, n. 6, p. 707–714, dez. 2015.
- HEIMANN, S. M. et al. Economic burden and cost-effective management of *Clostridium difficile* infections. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 1, p. 23–29, fev. 2018.
- HENSGENS, M. P. M. et al. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012.
- HOGH, P. Experimental studies on serum treatment and vaccination against *C. perfringens* type C infection in piglets. **Developments in Biological Standardization**, v. 32, p. 69–76, 1976.
- HOPMAN, N. E. M. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1–2, p. 186–192, abr. 2011.
- KEEL, 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, jun. 2007.
- KEEL, M. K.; SONGER, J. G. The Comparative Pathology of *Clostridium difficile* - associated Disease. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 3, p. 225–240, maio 2006.

- 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, maio 2011.
- KEESSEN, E. C. et al. *Clostridium difficile* Infection Associated with Pig Farms. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 1032–1034, jun. 2013.
- KEESSEN, E. C.; GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A. *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 3–4, p. 205–217, dez. 2011.
- KELLY, C. P.; KYNE, L. The host immune response to *Clostridium difficile*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1070–1079, 1 ago. 2011.
- KELLY, C. R. et al. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. **American Journal of Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1124–1147, jun. 2021.
- KHANNA, S.; PARDI, D. S. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 4, n. 4, p. 409–416, ago. 2010.
- KNETSCH, C. W. et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 45, 13 nov. 2014.
- KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Genomic Delineation of Zoonotic Origins of *Clostridium difficile*. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 164, 20 jun. 2019.
- KOENE, M. G. J. et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 8, p. 778–784, ago. 2012.
- KUIJPER, E. J.; COIGNARD, B.; TÜLL, P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 2–18, 2006.
- KYNE, L. et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. **The Lancet**, v. 357, n. 9251, p. 189–193, jan. 2001.
- LACHOWICZ, D. et al. Surveillance of antimicrobial susceptibilities reveals high proportions of multidrug resistance in toxigenic *Clostridium difficile* strains in different areas of Poland. **Anaerobe**, v. 62, p. 102167, abr. 2020.
- LAWSON, P. A. et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95–99, ago. 2016.
- LEAV, B. A. et al. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). **Vaccine**, v. 28, n. 4, p. 965–969, jan. 2010.

- LEE, Y.-R. et al. Prevalence, genetic characteristics, and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* isolates from horses in Korea. **Anaerobe**, v. 80, p. 102700, abr. 2023.
- LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 16, p. 1539–1548, 16 abr. 2015.
- LEWIS, C. J. Control of Important Clostridial Diseases of Sheep. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 121–126, mar. 2011.
- LICCIARDI, C. et al. Prevalence, Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridioides difficile* Isolated from Pig Carcasses and Pork Products in Central Italy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 21, p. 11368, 29 out. 2021.
- LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* and One Health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 857–863, jul. 2020.
- LOBATO, F. C. F. Clostridioses dos animais de produção. **Veterinaria e zootecnia**, v. 20, p. 29–48, 2013.
- LOO, V. G. et al. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile* –Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 23, p. 2442–2449, 8 dez. 2005.
- LOUIE, T. J. et al. Effect of Age on Treatment Outcomes in *Clostridium difficile* Infection. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 61, n. 2, p. 222–230, fev. 2013.
- LUO, D. et al. Immunogenicity and Protection from Receptor-Binding Domains of Toxins as Potential Vaccine Candidates for *Clostridium difficile*. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 180, 8 nov. 2019.
- MACHADO-NETO, R.; GRAVES, C. N.; CURTIS, S. E. Immunoglobulins in Piglets from Sows Heat-Stressed Prepartum. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 2, p. 445–455, 1 ago. 1987.
- MACIAG, S. S. et al. On the influence of the source of porcine colostrum in the development of early immune ontogeny in piglets. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15630, 17 set. 2022.
- MAESTRI, A. C. et al. Multicenter study of the epidemiology of *Clostridioides difficile* infection and recurrence in southern Brazil. **Anaerobe**, v. 64, p. 102238, ago. 2020.
- MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 4, p. 206–216, abr. 2016.
- MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. et al. An Update on *Clostridioides difficile* Binary Toxin. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 305, 27 abr. 2022.

- MATISHECK, P. H.; MCGINLEY, M. Colostral transfer of *Clostridium perfringens* type C beta antitoxin in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 5, p. 1132–1133, maio 1986.
- MCDONALD, L. C. et al. Recommendations for Surveillance of *Clostridium difficile* – Associated Disease. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 2, p. 140–145, fev. 2007.
- MCDONALD, L. C. et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 7, p. e1–e48, 19 mar. 2018.
- MCGLAUCHLEN, K. S.; VOGEL, L. A. Ineffective humoral immunity in the elderly. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1279–1284, nov. 2003.
- 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: *C. difficile* ELISA for Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 628–632, 6 abr. 2010.
- MERRIGAN, M. M. et al. Prevention of Fatal *Clostridium difficile* –Associated Disease during Continuous Administration of Clindamycin in Hamsters. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 12, p. 1922–1927, 15 dez. 2003.
- METCALF, D. et al. *Clostridium difficile* in seafood and fish. **Anaerobe**, v. 17, n. 2, p. 85–86, abr. 2011.
- MONOT, M. et al. *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15023, 8 out. 2015.
- MONTEAGUDO, L. V. et al. Occurrence of Rotavirus A Genotypes and Other Enteric Pathogens in Diarrheic Suckling Piglets from Spanish Swine Farms. **Animals**, v. 12, n. 3, p. 251, 20 jan. 2022.
- MORITZ, C. P. et al. Reducing the risk of misdiagnosis of indirect ELISA by normalizing serum-specific background noise: The example of detecting anti-FGFR3 autoantibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 466, p. 52–56, mar. 2019.
- MOURA, I. et al. Analysis of metronidazole susceptibility in different *Clostridium difficile* PCR ribotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 362–365, 1 fev. 2013.
- MOXLEY, R. A.; OLSON, L. R. Lesions of transmissible gastroenteritis virus infection in experimentally inoculated pigs suckling immunized sows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 5, p. 708–716, maio 1989.
- 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, n. 11, p. 5266–5270, nov. 2013.

- NAZ, F.; PETRI, W. A. Host Immunity and Immunization Strategies for *Clostridioides difficile* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. e00157-22, 21 jun. 2023.
- NORÉN, T.; JOHANSSON, K.; UNEMO, M. *Clostridium difficile* PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. O2–O6, jan. 2014.
- NYBLADE, C. et al. Establishment of a gnotobiotic pig model of *Clostridioides difficile* infection and disease. **Gut Pathogens**, v. 14, n. 1, p. 22, dez. 2022.
- ODENDAAL, M. W. et al. The passive protection of lambs against *Clostridium perfringens* type D with semi-purified hyperimmune serum. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 1, p. 47–50, mar. 1988.
- OFORI, E. et al. Community-acquired *Clostridium difficile*: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 4, p. 436–442, ago. 2018.
- O’GRADY, K.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 12, p. 2459–2478, dez. 2021.
- OLAITAN, A. O. et al. Decoding a cryptic mechanism of metronidazole resistance among globally disseminated fluoroquinolone-resistant *Clostridioides difficile*. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 4130, 12 jul. 2023.
- OLEASTRO, M. et al. Outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 - the recent experience of a regional hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 209, dez. 2014.
- OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. **Avaliação de uma estirpe não toxigênica para revenção de diarreia neonatal em leitões por *Clostridioides (Clostridium) difficile***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. et al. Non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 1–6, abr. 2019.
- OTTEN, A. M. et al. Disease transmission model for community-associated *Clostridium difficile* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 6, p. 907–914, jun. 2010.
- PARK, J.-E. et al. Porcine epidemic diarrhea vaccine evaluation using a newly isolated strain from Korea. **Veterinary Microbiology**, v. 221, p. 19–26, jul. 2018.
- PATTERSON, L. et al. Morbidity and mortality associated with *Clostridium difficile* ribotype 078: a case–case study. **Journal of Hospital Infection**, v. 82, n. 2, p. 125–128, out. 2012.
- PLANCHE, T.; WILCOX, M. Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2011.

- PROCTOR, A. et al. Neonatal Piglets Are Protected from *Clostridioides difficile* Infection by Age-Dependent Increase in Intestinal Microbial Diversity. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e01243-21, 31 out. 2021.
- PUTSATHIT, P. et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 237, p. 108408, out. 2019.
- QUEMENEUR, L. et al. *Clostridium difficile* Toxoid Vaccine Candidate Confers Broad Protection against a Range of Prevalent Circulating Strains in a Nonclinical Setting. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 6, p. e00742-17, jun. 2018.
- RAMOS, C. P. et al. Evaluation of glutamate dehydrogenase (GDH) and toxin A/B rapid tests for *Clostridioides* (prev. *Clostridium*) *difficile* diagnosis in a university hospital in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1139–1143, set. 2020.
- RAMOS, C. P. **DESENVOLVIMENTO DE VACINAS RECOMBINANTES PARA A PREVENÇÃO DA INFECCÃO POR *Clostridioides difficile* EM LEITÕES**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2023.
- RAO, K. et al. Poor Functional Status as a Risk Factor for Severe *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Older Adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 61, n. 10, p. 1738–1742, out. 2013.
- RAO, K.; MALANI, P. N. Diagnosis and Treatment of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* Infection in Adults in 2020. **JAMA**, v. 323, n. 14, p. 1403, 14 abr. 2020.
- REBMANN, T.; CARRICO, R. M. Preventing *Clostridium difficile* infections: An executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology's elimination guide. **American Journal of Infection Control**, v. 39, n. 3, p. 239–242, abr. 2011.
- REDDING, L. et al. *Clostridioides difficile* on dairy farms and potential risk to dairy farm workers. **Anaerobe**, v. 69, p. 102353, jun. 2021.
- REMICH, S. et al. A Phase 2 Extension Study Evaluating the Immunogenicity, Safety, and Tolerability of 3 or 4 Doses of a *Clostridioides difficile* Vaccine in Healthy US Adults Aged 65 to 85 Years. **The Journal of Infectious Diseases**, p. jiad307, 2 ago. 2023.
- RICHARD, O. K. et al. Application of an Endothelial Cell Culture Assay for the Detection of Neutralizing Anti-*Clostridium perfringens* Beta-Toxin Antibodies in a Porcine Vaccination Trial. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 225, 15 abr. 2019a.
- RICHARD, O. K. et al. Vaccination against *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs: a field study using an adapted vaccination scheme. **Porcine Health Management**, v. 5, n. 1, p. 20, dez. 2019b.
- RIDDLE, D. J.; DUBBERKE, E. R. *Clostridium difficile* Infection in the Intensive Care Unit. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 727–743, set. 2009.

- ROBERTS, A. et al. Development and Evaluation of an Ovine Antibody-Based Platform for Treatment of *Clostridium difficile* Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 875–882, fev. 2012.
- RODRIGUEZ, C. et al. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. **Anaerobe**, v. 18, n. 6, p. 621–625, dez. 2012.
- RODRÍGUEZ-PALLARES, S. et al. Transmission of toxigenic *Clostridioides difficile* between a pet dog with diarrhea and a 10-month-old infant. **Anaerobe**, v. 74, p. 102519, abr. 2022.
- RYAN, A. et al. A Role for TLR4 in *Clostridium difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 6, p. e1002076, 30 jun. 2011.
- SAHA, S. et al. Increasing antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and meta-analysis. **Anaerobe**, v. 58, p. 35–46, ago. 2019.
- SALVARANI, F. M. et al. Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. **Vaccine**, v. 31, n. 38, p. 4152–4155, ago. 2013.
- SAMPAIO, I. B. M. **M. Estatística aplicada à experimentação animal**. 4. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2015.
- SCHNEEBERG, A. et al. *Clostridium difficile* Genotypes in Piglet Populations in Germany. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3796–3803, nov. 2013.
- SHAH, H. B. et al. Human *C. difficile* toxin-specific memory B cell repertoires encode poorly neutralizing antibodies. **JCI Insight**, v. 5, n. 16, p. e138137, 20 ago. 2020.
- SHANE, A. L. et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 12, p. e45–e80, 29 nov. 2017.
- SHIM, J. K. et al. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. **The Lancet**, v. 351, n. 9103, p. 633–636, fev. 1998.
- SHIN, J. H.; HIGH, K. P.; WARREN, C. A. Older Is Not Wiser, Immunologically Speaking: Effect of Aging on Host Response to *Clostridium difficile* Infections. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 7, p. 916–922, jul. 2016.
- SHIN, J. H.; PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A. Teaching old mice new tricks: the utility of aged mouse models of *C. difficile* infection to study pathogenesis and rejuvenate immune response. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1966255, 1 jan. 2021.
- SHIRVAN, A. N.; AITKEN, R. Isolation of recombinant antibodies directed against surface proteins of *Clostridium difficile*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 394–402, abr. 2016.
- SIDDIQUI, F. 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 1, p. 128–133, 1 jan. 2012.
- SILVA, R. O. S. et al. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. **Anaerobe**, v. 28, p. 207–211, ago. 2014a.
- SILVA, R. O. S. et al. Evaluation of Three Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Foals. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 8, p. 1032–1035, ago. 2014b.
- SILVA, R. O. S. et al. 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 447–450, ago. 2014c.
- SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. D. 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, 22 nov. 2012.
- SIMOR, A. E. Diagnosis, Management, and Prevention of *Clostridium difficile* Infection in Long-Term Care Facilities: A Review: *Clostridium difficile* INFECTION. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 58, n. 8, p. 1556–1564, ago. 2010.
- SLIMINGS, C.; RILEY, T. V. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 881–891, abr. 2014.
- SONGER, J. G. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 3–4, p. 358–361, out. 2007.
- SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 399–404, jan. 2010.
- SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. **Anaerobe**, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006.
- SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial Enteric Infections in Pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 528–536, nov. 2005.
- SPIGAGLIA, P. et al. *Clostridioides difficile* in Pigs and Dairy Cattle in Northern Italy: Prevalence, Characterization and Comparison between Animal and Human Strains. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1738, 2 jul. 2023.
- SPONSELLER, J. K. et al. Hyperimmune Bovine Colostrum as a Novel Therapy to Combat *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Infectious Diseases**, p. jiu605, 7 nov. 2014.
- SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* Infection in Humans and Piglets: A ‘One Health’ Opportunity. Em: MACKENZIE, J. S. et al. (Eds.). **One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012a. v. 365p. 299–314.

- SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* infection: the next big thing! **Microbiology Australia**, v. 33, n. 4, p. 163–164, 1 nov. 2012b.
- STABLER, R. A. et al. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. **Genome Biology**, v. 10, n. 9, p. R102, 2009.
- STEELE, J. et al. Piglet Models of Acute or Chronic *Clostridium difficile* Illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 3, p. 428–434, fev. 2010.
- STEELE, J. et al. Antibody Against TcdB, but Not TcdA, Prevents Development of Gastrointestinal and Systemic *Clostridium difficile* Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 2, p. 323–330, 15 jan. 2013a.
- STEELE, J. et al. Hyperimmune bovine colostrum for treatment of GI infections: A review and update on *Clostridium difficile*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1565–1568, 13 jul. 2013b.
- STEVENSON, E.; MINTON, N. P.; KUEHNE, S. A. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 275–282, maio 2015.
- STEWART, D. B.; BERG, A.; HEGARTY, J. Predicting Recurrence of *C. difficile* Colitis Using Bacterial Virulence Factors: Binary Toxin Is the Key. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 17, n. 1, p. 118–125, jan. 2013.
- STEWART, D. B.; BERG, A. S.; HEGARTY, J. P. Single Nucleotide Polymorphisms of the *tcdC* Gene and Presence of the Binary Toxin Gene Predict Recurrent Episodes of *Clostridium difficile* Infection. **Annals of Surgery**, v. 260, n. 2, p. 299–304, ago. 2014.
- TAN, C. et al. Immunoinformatics Approach Toward the Introduction of a Novel Multi-Epitope Vaccine Against *Clostridium difficile*. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 887061, 26 maio 2022.
- TERATO, K. et al. Preventing further misuse of the ELISA technique and misinterpretation of serological antibody assay data. **Vaccine**, v. 34, n. 39, p. 4643–4644, set. 2016.
- THANISSERY, R.; WINSTON, J. A.; THERIOT, C. M. Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. **Anaerobe**, v. 45, p. 86–100, jun. 2017.
- TIAN, J.-H. et al. A novel fusion protein containing the receptor binding domains of *C. difficile* toxin A and toxin B elicits protective immunity against lethal toxin and spore challenge in preclinical efficacy models. **Vaccine**, v. 30, n. 28, p. 4249–4258, jun. 2012.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. [s.l.] Elsevier, 2017.
- TRINDADE, C. N. R.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, E. O. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. **Anaerobe**, v. 58, p. 13–21, ago. 2019.
- UZAL, F. A. et al. Clostridial diarrheas in piglets: A review. **Veterinary Microbiology**, v. 280, p. 109691, maio 2023.

- VAN BEURDEN, Y. H. et al. An Outbreak of *Clostridium difficile* Ribotype 027 Associated with Length of Stay in the Intensive Care Unit and Use of Selective Decontamination of the Digestive Tract: A Case Control Study. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160778, 17 ago. 2016.
- VEHRESCHILD, M. J. G. T. et al. *Clostridium Difficile* Infection in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and in Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation: Epidemiology and Risk Factor Analysis. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 823–828, jun. 2014.
- VERNAYA, M.; MCADAM, J.; HAMPTON, M. D. Effectiveness of probiotics in reducing the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in elderly patients: a systematic review. **JBIM Database of Systematic Reviews and Implementation Reports**, v. 15, n. 1, p. 140–164, jan. 2017.
- VONBERG, R.-P. et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 2–20, maio 2008.
- WANG, S. et al. Recombinant Fusion Protein Vaccine Containing *Clostridioides difficile* FliC and FliD Protects Mice against *C. difficile* Infection. **Infection and Immunity**, v. 91, n. 4, p. e00169-22, 18 abr. 2023.
- WANG, Y.-K. et al. A chimeric protein comprising the glucosyltransferase and cysteine proteinase domains of toxin B and the receptor binding domain of toxin A induces protective immunity against *Clostridium difficile* infection in mice and hamsters. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 9, p. 2215–2222, 2 set. 2015.
- WARNY, M. et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **The Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1079–1084, set. 2005.
- WEESE, J. S. et al. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. **Anaerobe**, v. 16, n. 5, p. 501–504, out. 2010.
- WEESE, J. S. et al. *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter-age pigs. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 41, 2011.
- WEESE, J. S. *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 213–221, mar. 2020.
- WHITTIER, S. et al. Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2861–2865, nov. 1993.
- WILCOX, M. H. et al. Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, n. 2, p. 109–114, jun. 2003.
- WILKINS, T. D.; LYERLY, D. M. *Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 531–534, fev. 2003.

- WRIGHT, A. et al. Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 750–756, 1 jun. 2008.
- 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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 4, p. 281–287, jul. 2002.
- 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, jan. 2007.
- YANG, F. et al. Evaluation of Antibody Response in Sows after Vaccination with Senecavirus A Vaccine and the Effect of Maternal Antibody Transfer on Antibody Dynamics in Offspring. **Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1066, 24 set. 2021.
- ZAR, F. A. et al. A Comparison of Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea, Stratified by Disease Severity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 302–307, 1 ago. 2007.

ANEXOS

Aprovação do projeto pela CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 184/2022

Título do projeto: Avaliação da potência de uma vacina comercial para a prevenção da infecção por Clostridioides (Clostridium) difficile em suínos.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Rodrigo Otavio Silveira Silva

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado com Recomendação na reunião ordinária on-line do dia 07/11/2022. Validade: 07/11/2022 à 06/11/2027. Recomendação: A CEUA recomenda que a granja experimental onde a pesquisa será realizada seja devidamente cadastrada no CIUCA/CONCEÁ.

Belo Horizonte, 07/11/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br