

Rodrigo Otávio Silveira Silva

**DETECÇÃO DAS TOXINAS A/B e AVALIAÇÃO DOS TIPOS TOXIGÊNICOS
DE *Clostridium difficile* A PARTIR DE FEZES DE LEITÕES E CÃES**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2011

S586d Silva, Rodrigo Otávio Silveira, 1985-

Detecção das toxinas A/B e avaliação dos toxigênicos de *Clostridium difficile* a partir de fezes de leitões e cães / Rodrigo Otávio Silveira Silva. -2011.

40 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Dissertação (mestrado) _ Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Cão – Doenças – Teses. 3. *Clostridium difficile* – Teses. 4. Fezes – Exame – Teses. 5. Toxinas bacterianas – Teses.
I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96

Dissertação defendida e aprovada em 02 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Orientador



Dr. Ronnie Antunes de Assis



Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela oportunidade.

Aos meus pais, pelos ensinamentos indiscutíveis.

Á Ana Flávia, pelo apoio, compreensão e confiança que só uma irmã poderia dar.

Ao Prof. Francisco, pelo exemplo profissional e, antes de tudo, pelo exemplo de ética e humanidade.

Á Juliana, pelo carinho e amor.

Ao Prof. Roberto Guedes, por dividir seu entusiasmo com todos a sua volta.

Ao Dr. Ronnie Antunes de Assis, por ter me apresentado à pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica Renata Lara, Marina Carvalho, Lucas Queiroz e tantos outros que me apoiaram durante a execução deste trabalho.

Aos parceiros de laboratório Felipe Masiero e Prhiscylla Sadanã, pelo apoio empático e duradouro.

Ao Prof. Marcos Bryan, pelo auxílio na padronização da técnica de PCR.

A todos os animais que contribuem com suas vidas para o desenvolvimento da ciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. LITERATURA CONSULTADA	11
2.1. Histórico.....	11
2.2. Patogênese.....	12
2.3. A doença em Humanos.....	14
2.3. A doença em animais Domésticos.....	15
2.3.1. Suínos.....	15
2.3.2. Cães.....	16
2.3.4. Outras espécies domésticas.....	17
2.4. <i>Clostridium difficile</i> como agente zoonótico.....	17
2.5. Diagnóstico.....	17
2.5.1. Isolamento.....	18
2.5.2. Detecção das toxinas.....	18
2.5.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	20
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Local de realização do experimento.....	21
4.2. Meios de Cultura.....	21
4.3. Amostras de referência.....	21
4.3.1. Cultivo e identificação das amostras.....	21
4.4. Técnica da Reação em cadeia da Polimerase.....	21
4.4.1. Controles.....	21
4.4.2. Extração térmica do DNA.....	21
4.4.3. Iniciadores.....	21
4.4.4. PCR Convencional.....	22
4.4.5. Padronização da PCR Multiplex.....	23
4.4.6. Análise dos Produtos da PCR.....	23
4.4.7. Avaliação da PCR.....	23
4.4.7.1 Sensibilidade da PCR.....	23
4.4.7.2 Especificidade da PCR.....	23
4.5. Amostragem.....	23
4.5.1. Amostras de cães.....	23
4.5.2. Amostras de leitões.....	24
4.6. Isolamento, cultivo e identificação das amostras.....	24
4.7. Pesquisa das toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>	24
4.8. Análise Estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Padronização da PCR Multiplex.....	24
5.2. Isolamento e Aplicação da PCR Multiplex.....	27
5.2.1. Isolamento de <i>Clostridium difficile</i> a partir das amostras de cães.....	28
5.2.2. Isolamento de <i>Clostridium difficile</i> a partir das amostras de leitões.....	29
5.3. Pesquisa das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i> a partir das amostras de cães.....	32
5.4. Pesquisa das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i> a partir das amostras de leitões.....	32
5.5. Comparação dos dados de pesquisa das toxinas A/B e isolamento de <i>Clostridium difficile</i> a partir das amostras de cães e leitões.....	33
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores específicos usados na PCR Multiplex, para amplificação dos genes <i>tpi</i> e das toxinas A (<i>tcdA</i>), toxina B (<i>tcdB</i>) e toxina binária (<i>cdtB</i>) de <i>Clostridium difficile</i>	22
Tabela 2: Concentrações dos reagentes utilizados na reação monoplex para os genes <i>tpi</i> , <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> e <i>cdtB</i> de <i>Clostridium difficile</i>	22
Tabela 3: Ciclos utilizados na PCR Monoplex para os genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>tpi</i> e <i>cdtB</i> de <i>Clostridium difficile</i>	23
Tabela 4: Concentração dos reagentes utilizados na PCR multiplex para <i>Clostridium difficile</i> . 26	
Tabela 5: Frequência de filhotes e adultos na amostragem de fezes de cães para isolamento de <i>Clostridium difficile</i>	27
Tabela 6: Resultados da detecção dos genes <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> das amostras de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de cães diarreicos.....	28
Tabela 7: Resultados da detecção dos genes <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> das amostras de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de leitões diarreicos.....	29
Tabela 8: Presença dos genes responsáveis pela produção da toxina binária (CDT) nas amostras isoladas de <i>Clostridium difficile</i> isoladas de leitões.	31
Tabela 9: Frequência da detecção das toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i> por ELISA nas amostras de fezes de cães.	32
Tabela 10: Frequência da detecção das toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i> por ELISA nas amostras de fezes de leitões.....	33
Tabela 11: Comparação dos dados de detecção das toxinas A e B e de isolamento de <i>Clostridium difficile</i> em cães.....	34
Tabela 12: Comparação dos dados de detecção das toxinas A e B e de isolamento de <i>Clostridium difficile</i> em leitões.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do locus de patogenicidade (Paloc) e do locus de produção da toxina binária (Cdtloc) de <i>Clostridium difficile</i>	13
Figura 2: Mecanismo de ação das toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i> no intestino humano. 13	
Figura 3: Fotodocumentação de gel de agarose da PCR convencional de material genético de estirpes de <i>Clostridium difficile</i>	25
Figura 4: Fotodocumentação de gel de agarose da PCR convencional e multiplex para uma estirpe de campo A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	26
Figura 5: Placas de agar Cicloserina-Cefoxitina-Frutose (CCFA) mostrando morfologia colonial característica de <i>Clostridium difficile</i>	27
Figura 6: Fotodocumentação de gel de agarose da PCR multiplex de material genético de estirpes de <i>Clostridium difficile</i> isoladas a partir de fezes de leitões.....	30

RESUMO

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio obrigatório responsável por casos de colite pseudomembranosa em humanos. Em medicina veterinária, este microrganismo tem sido incriminado como o principal agente causador de colite em leitões, enquanto que em cães acredita-se que este agente seja um causador de diarreia crônica e infecção hospitalar. O diagnóstico das desordens entéricas causadas por esse microrganismo é baseado na detecção das toxinas A e B, enquanto que o isolamento seguido da tipagem de *C. difficile* tem se mostrado essencial para estudo da epidemiologia da doença, sendo que existem evidências que a tipificação permite uma predição do potencial de virulência das estirpes de *C. difficile*. Apesar da crescente importância deste agente em medicina veterinária, inexistem trabalhos sobre esse agente com suínos e cães no Brasil. Com isso, o objetivo deste estudo foi detectar as toxinas A e B e avaliar os tipos toxigênicos de *C. difficile* a partir de fezes de leitões e cães. Foram obtidas 60 amostras de fezes de leitões, sendo 30 de animais aparentemente saudáveis e 30 de animais diarreicos, e 57 amostras de fezes de cães, sendo 35 de animais aparentemente saudáveis e 22 de animais diarreicos. Para detecção das toxinas A e B, utilizou-se um kit comercial de ELISA e as amostras foram processadas de acordo com o recomendado pelo fabricante. Para isolamento de *C. difficile*, as amostras de fezes sofreram choque com álcool absoluto e foram plaquedadas em agar CCFA. Colônias sugestivas foram submetidas à extração térmica do DNA e o sobrenadante resultante foi utilizado como molde para PCR. Foi possível detectar as toxinas A e B de *C. difficile* em 21 (36,8%) das amostras de cães, sendo 16 (28,1 %) de animais diarreicos e cinco (8,8%) de animais não-diarreicos. Já em suínos, as toxinas foram encontradas em dez amostras (16,7%), sendo sete (11,7%) de animais diarreicos e três (5%) de animais aparentemente saudáveis. *C. difficile* foi isolado de 12 das 60 (20%) amostras de suínos coletadas. Três estirpes eram não-toxigênicas (A⁻B⁻) e nove toxigênicas, sendo que dessas, quatro eram A⁺B⁺ e cinco eram estirpes A⁻B⁺. Dos 12 isolados de suínos, seis (50%) eram positivos para toxina binária (CDT⁺). Em cães, foi possível isolar o agente a partir de 12 amostras, sendo que dez eram A⁺B⁺ e duas eram não-toxigênicas. Nenhuma estirpe variante foi isolada a partir de fezes de cão. O gene responsável pela codificação da toxina binária foi encontrado em apenas uma estirpe isolada desta espécie. Todas as estirpes não-toxigênicas obtidas a partir de cães e leitões foram isoladas de animais aparentemente saudáveis. A PCR multiplex demonstrou ser adequada para confirmação da identidade e avaliação dos tipos toxigênicos de *C. difficile* a partir de colônias isoladas. No presente estudo, a grande proporção de estirpes CDT⁺ reforça a necessidade de mais estudos para avaliar a importância da toxina binária na diarreia causada por *C. difficile* e leitões. Em ambas as espécies, muitos animais aparentemente saudáveis apresentaram-se positivos para a presença das toxinas, chamando atenção para a possibilidade da ocorrência da doença na forma subclínica.

Palavras-chave: diarreia neonatal, *C. difficile*, leitões, cães.

ABSTRACT

Clostridium difficile is a Gram-positive anaerobe responsible for cases of pseudomembranous colitis in humans. In veterinary medicine, this organism has been incriminated as the main agent of neonatal colitis in piglets, while recent reports suggest it as responsible for chronic diarrhea and nosocomial infection in dogs. The diagnosis of infections caused by this microorganism is based on the detection of toxins A and B, while the isolation followed by genotyping of *C. difficile* can provide information about the epidemiology of this disease and can also predict the potential virulence of the isolated strains. Despite the increasing importance of this agent in veterinary medicine, there are no studies about evaluated this agent in pigs and dogs in Brazil. The objective of this study was to detect toxins A and B and isolate and genotype *C. difficile* from stool samples of pigs and dogs. Sixty stool samples of piglets, 30 from apparently healthy and 30 from diarrheic animals, and 57 fecal samples from dogs, 35 from apparently healthy animals and 22 from diarrheic dogs. For detection of toxins A and B, a commercial ELISA kit were used according to manufacturer recommendations. For isolation of *C. difficile*, stool samples were plaqued on CCFA agar after alcohol-shock. Suggestive colonies were subjected to thermal extraction of DNA and the supernatant was used for PCR template. Toxins A and B of *C. difficile* in were found in 21 (36.8%) samples from dogs, 16 (28,1%) from diarrheic and five (8.8%) from non-diarrhoeic animals. In piglets, the toxins were found in ten (16.7%) samples, seven (11.7%) from diarrheic and three (5%) from apparently healthy piglets. *C. difficile* was isolated from 12 of 60 (20%) from pigs. Three strains were non-toxigenic (A⁻B⁻) and nine were toxigenic and, of these, four were A⁺B⁺ and five strains were A⁻B⁺. Six strains (50%) isolated from pigs were positive for binary toxin (CDT⁺). In dogs, the agent was isolated from 12 (21%) samples, which ten strains were A⁺B⁺ and two were non-toxigenic. No variant strain was isolated from dogs. The gene responsible for encoding the binary toxin was found in only one strain isolated from this specie. It came from a non-diarrheic animal and was classified as A⁺B⁺. All non-toxigenic strains obtained in this study were isolated from apparently healthy animals. The multiplex PCR was useful for confirming the identity and to provide genotyping of *C. difficile* strains. In this study, a large proportion of CDT⁺ strains reinforce the need for more studies to evaluate the importance of binary toxin in infections caused by *C. difficile* in piglets. In both species, many apparently healthy animals were positive for the presence of toxins, calling attention to the possibility of the occurrence of subclinical disease.

Keywords: neonatal diarrhea, *Clostridium difficile*, piglets, dogs.

1. INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio obrigatório comumente encontrado no intestino de mamíferos. Este microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1935, mas somente na década de 70 foi reconhecido como um patógeno. Hoje, *C. difficile* é o principal causador de colite pseudomembranosa em humanos, e como os esporos desse microrganismo podem permanecer viáveis por grandes períodos e resistir à maioria dos desinfetantes, este agente tornou-se também um grande contaminante hospitalar.

Em suínos, a infecção por *C. difficile* é hoje a principal causa não-controlada de diarreia neonatal, trazendo grandes prejuízos para a suinocultura. Já em cães, a importância deste agente ainda não é bem determinada, mas existem relatos de diagnóstico de diarreia crônica e até de surtos em hospitais veterinários. Estudos recentes realizaram o isolamento de cepas de *C. difficile* em alimentos de origem animal, levantando a suspeita de transmissão do agente entre animais e homem,

Os dois principais fatores de virulência de *C. difficile* são duas exotoxinas: a toxina A, uma enterotoxina, e a toxina B, uma potente citotoxina. Algumas estirpes apresentam também uma terceira toxina, conhecida como toxina binária, cujo real significado, tanto em humanos quanto animais, ainda é obscuro.

A detecção das toxinas A e B diretamente nas fezes é considerada o “padrão-ouro” para o diagnóstico laboratorial de infecções por *C. difficile*. Essa detecção comumente é realizada por kits comerciais de ELISA ou por soroneutralização celular. Por outro lado, o isolamento seguido da tipagem de *C. difficile*, comumente realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR), tem se mostrado essencial para estudo da epidemiologia da doença. Além disso, existem evidências que a avaliação dos tipos toxigênicos permite uma predição do

potencial de virulência das estirpes de *C. difficile*.

Apesar da crescente importância do agente em medicina veterinária, inexistem trabalhos no Brasil avaliando a presença das toxinas A e B e determinando os tipos toxigênicos de *C. difficile* em suínos e cães.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 Histórico

Clostridium difficile foi isolado pela primeira vez a partir de fezes e mecônio de recém-nascidos por Hall e O'Tolle em 1935. Pela dificuldade encontrada no isolamento e pela morfologia do microrganismo, os autores o chamaram inicialmente de *Bacillus difficilis*. Esses mesmos pesquisadores relataram que se tratava de uma bactéria toxigênica, uma vez que o filtrado de culturas causava morte de coelhos e cobaias. Como aquele microorganismo ainda não era reconhecido como um patógeno, poucos estudos foram publicados até a década de 70. A partir desse período, a clindamicina passou a ser extremamente utilizada no combate a infecções por microorganismos anaeróbicos e relatos de diarreia em pacientes começaram a surgir concomitantemente (Gurwith et al., 1977). A lincomicina, antibiótico em que foi baseada a criação da clindamicina, tinha como um dos principais efeitos colaterais a ocorrência de diarreia. Porém, pacientes tratados com clindamicina comumente progrediam de diarreia para colite pseudomembranosa (CPM), uma inflamação severa da mucosa do colón, com desenvolvimento de pseudomembranas compostas de fibrina, muco, células epiteliais necróticas e leucócitos (Lyerly et al., 1988). A CPM possuía uma alta letalidade e logo estudos relataram uma ocorrência de cerca de 10% de CPM em pacientes tratados com clindamicina (Tedesco et al., 1974).

Com o crescimento dos casos de CPM, iniciou-se uma intensa busca pelo agente causador. Inicialmente, percebeu-se que fezes de pacientes com CPM possuíam um

efeito citotóxico bastante forte. Vários laboratórios demonstraram então que esse efeito era neutralizado pela antitoxina de *Clostridium sordellii*, o que levou pesquisadores a acreditarem que este era o microrganismo causador da doença. Porém, logo foi demonstrado que *C. difficile* estava presente em grande quantidade nas fezes de pacientes com CPM e que este microrganismo produzia citotoxinas que eram neutralizadas pela antitoxina de *C. sordellii* (Bartlett et al, 1978a; George et al., 1978). Com a confirmação de *C. difficile* como causador da CPM, várias pesquisas foram iniciadas com o objetivo de esclarecer principalmente a patogênese e a epidemiologia das infecções causadas por esta bactéria anaeróbia.

2.2 Patogênese

No final da década de 70 foi observado que hamsters (*Mesocricetus auratus*), assim como humanos, desenvolviam colite causada por *C. difficile* após tratamento prolongado com uma grande variedade de antibióticos (Bartlett et al., 1978b). A doença também já foi reproduzida com sucesso em outras espécies como camundongos (*Mus musculus*), cobaias (*Cavia porcellus*) e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (Keel e Songer, 2006). Porém, hamsters são até hoje espécie mais utilizada devido sua alta sensibilidade às toxinas A e B, facilitando a indução experimental. Outro ponto que torna os hamsters um modelo experimental interessante é que filhotes desta espécie, assim como crianças, comumente apresentam grande quantidade de *C. difficile* e das toxinas A e B nas fezes, continuando, porém, assintomáticos (Lylerly

et al., 1988). Com tais observações, este animal passou a ser largamente utilizado como modelo para estudo da CPM causada por *C. difficile* em humanos, o que permitiu várias pesquisas que elucidaram pontos importantes com relação à patogênese das infecções por *C. difficile*, principalmente com relação à forma de ação das toxinas A e B.

Os genes responsáveis pela produção das toxinas A e B encontram-se em um locus de patogenicidade chamado de *PaLoc* (Figura 1). Este é constituído basicamente de cinco genes: *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* e *tcdE*. Os genes *tcdA* e *tcdB* são responsáveis pela codificação das toxinas A e B, respectivamente. Acredita-se que os outros três genes são responsáveis pela regulação da produção das toxinas. O *tcdR* atua como um regulador positivo, sendo inclusive muito semelhante aos genes *TetR* e *BotR*, que possuem esta mesma ação na produção das toxinas tetânica e botulínica, respectivamente. Já *tcdC* é altamente expresso durante a fase exponencial de crescimento da bactéria, diminuindo porém ao passo que o crescimento aproxima-se da fase estacionária. Esse declínio da expressão do *tcdC* é acompanhado de um incremento na produção das toxinas A e B, o que sugere que este gene atue como um regulador negativo. Por último, especula-se que o *tcdE* facilite a liberação das toxinas A e B através da permeabilização da parede celular. Com isso, pesquisadores acreditam que a expressão das toxinas de *C. difficile* é regulada positivamente pela expressão do *tcdR*, dependente da queda na expressão do *tcdC* e a liberação das toxinas é mediada pela expressão do *tcdE* (Voth e Ballard, 2005).

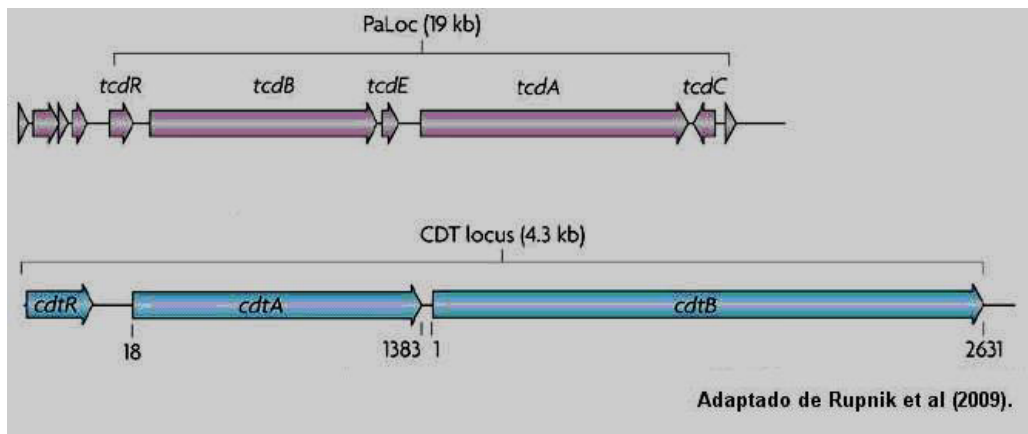


Figura 1: Representação do locus de patogenicidade (PaLoc) e do locus de produção da toxina binária (Cdtloc) de *Clostridium difficile*. Fonte: Adaptado de Rupnik et al (2009).

A toxina A é uma enterotoxina, enquanto a toxina B é uma potente citotoxina. Com isso, a lesão no intestino parece se iniciar pela toxina A, que possui receptores na lâmina basal das células epiteliais. Ocorre quebra das junções celulares, permitindo a ação da toxina B, cujos receptores, acredita-se, encontram-se na região baso-lateral do epitélio, amplificando a lesão (Figura 2). Ambas, depois de internalizadas por endocitose, causam condensação da actina, culminando com a desorganização do

citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose (Lyerly et al., 1988). Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, agindo também em outros órgãos. Ainda como consequência da destruição das junções celulares, há uma intensa migração leucocitária intestinal que resulta na formação da pseudomembrana característica da doença em humanos (Hookman et al., 2009).

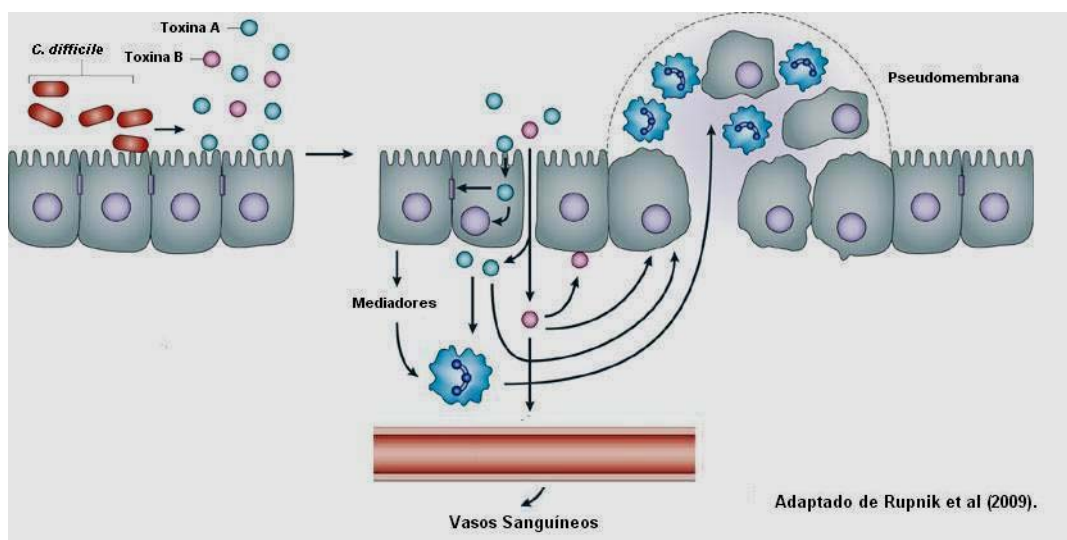


Figura 2: Mecanismo de ação das toxinas A e B no intestino humano. Fonte: Adaptado de Rupnik et al. (2009).

Uma terceira toxina, a toxina binária (CDT), recentemente vem chamando a atenção dos pesquisadores e clínicos. A toxina binária secretada por *C. difficile* é muito semelhante às outras toxinas binárias produzidas por bactérias do gênero *Clostridium*, como a toxina iota, produzida pelo *C. perfringens* tipo E, e a toxina C2, produzida pelo *C. botulinum* tipo C (Samie et al., 2008). É formada por dois componentes separados: um componente de ligação e um componente enzimático, sendo o primeiro responsável pela ligação e transporte do componente enzimático para o citosol, com conseqüente ação deste último na célula alvo. Separados, os dois componentes não causam nenhum efeito tóxico para as células (Schwan et al., 2009). A CDT é codificada em uma região separada do cromossomo, conhecido como *Cdtloc* (Figura 1), que compreende três genes: *cdtA* e *cdtB*, responsáveis pela codificação do componente de ligação e componente enzimático, respectivamente, e *cdtR*, que possui uma função de regulação gênica (Rupnik et al., 2009).

Muito tem sido discutido com relação à importância clínica da toxina binária, mas o real significado da CDT ainda é desconhecido. Em humanos, estudos reportam uma maior severidade da doença em pacientes que possuem estirpes CDT⁺ (Rupnik et al., 2009). Já em medicina veterinária, são raros os estudos avaliando a presença dos genes relativos à produção desse fator de virulência em estirpes isoladas de animais. De acordo com Gonçalves et al (2004), a CDT pode agir sinergicamente com as toxinas A e B, aumentando a despolimerização do citoesqueleto por um mecanismo complementar, agravando o quadro clínico e exacerbando os sintomas. Além da desorganização celular, a CDT parece formar também protusões nas células alvos com conseqüente extravasamento de material do citosol, formando uma malha densa na superfície celular que facilitaria a adesão e multiplicação de *C. difficile* no intestino (Schwan et al., 2009).

São raros estudos avaliando a imunidade de animais ao *C. difficile* e suas toxinas.

Estudos com camundongos e hamsters demonstraram que anticorpos contra a toxina A, induzidos por imunização, são capazes de prevenir a doença. Sabe-se pouco também com relação ao papel de anticorpos contra a toxina B, mas trabalhos também sugerem que a presença destes tenha grande influência no quadro clínico (Corthier et al., 1991; Ward, 1999), sendo que a proteção de animais imunizados tanto com a toxina A quanto a toxina B é superior quando comparada com a resposta de animais imunizados apenas com a toxina A (Lyerly et al., 1988).

2.3 A Doença em Humanos

A microbiota do colón de adultos saudáveis normalmente resiste à colonização por *C. difficile*, o que faz com que distúrbios causados por esse clostrídio em humanos sejam normalmente ligados a situações onde ocorreram alterações da microbiota intestinal, comumente a utilização de antibióticos (Beaugerie et al., 2003). Drogas imunossupressoras, principalmente quimioterápicos, também parecem aumentar o risco de desenvolvimento da doença (Macleod-Glover e Sadowski, 2010). Por outro lado, eventos recentes nos Estados Unidos, Canadá e Europa indicam mudanças na epidemiologia das infecções causadas por *C. difficile*, com ocorrência da doença em indivíduos saudáveis e sem prévia exposição a ambiente hospitalar (Samie et al., 2008).

Uma observação interessante nas infecções por *C. difficile* em humanos é que crianças comumente eliminam grande quantidade do agente e das toxinas A e B nas fezes, mas continuam assintomáticas (Ferreira et al., 2003). Sendo assim, relatos de diarreia por *C. difficile* em crianças são raros (Pinto et al., 2003).

De acordo com Gellad et al (2007), ocorrem cerca de três milhões de casos anualmente nos Estados Unidos, implicando em um custo de 1,1 bilhão de dólares no tratamento. Como fator agravante desse processo, temos a ocorrência de recidivas após tratamento, ocorrendo em 15-20% dos pacientes. Essas recidivas têm sido

associadas principalmente à persistência do agente em forma de esporos no paciente, mas a re-contaminação, especialmente quando no ambiente hospitalar, também deve ser considerada (Johnson et al., 1989).

Estudos comprovam que a forma vegetativa de *C. difficile* resiste pouco tempo em condições aeróbicas no ambiente. Os esporos, porém, podem permanecer viáveis por grandes períodos e resistir à maioria dos desinfetantes. Essas características tornam *C. difficile* um grande contaminante ambiental, especialmente em hospitais (Buggy et al., 1983). De acordo com Macleod-Glover e Sadowski (2010), produtos contendo cloro ativo e a higienização das mãos são as duas estratégias mais eficientes para eliminação de *C. difficile* do ambiente hospitalar e diminuição da transmissão de esporos, respectivamente. Os autores chamam atenção ainda para a ineficiência da aplicação de álcool gel nas mãos para eliminação dos esporos desse microrganismo.

2.4 A Doença em animais domésticos

2.4.1 Suínos

O isolamento de *C. difficile* em suínos foi relatado pela primeira vez em 1983 por Jones e Hunter. Nesta espécie, as infecções por *C. difficile* ocorrem quase que exclusivamente em leitões com até sete dias de idade. Ao contrário de humanos e alguns animais domésticos, como eqüinos, o desenvolvimento da doença em leitões não esta necessariamente correlacionada com a utilização de antibióticos (Songer e Uzal, 2005). De acordo com Songer (2004), em granjas acometidas, cerca de 30% dos animais apresentam-se positivos, porém essa prevalência pode chegar a 100% em alguns casos. Além disso, o ganho de peso dos leitões acometidos apresenta-se aproximadamente 10% abaixo do normal. Nos Estados Unidos, o exame de 1000 leitões com enterite revelou a presença das toxinas A e B em 34,1% deles, sem o envolvimento de outro patógeno. Em outros 24,3%, foi possível identificar as toxinas A e B em associação a detecção de outro

patógeno como rotavírus, *C. perfringens* e *E. coli* (Songer e Anderson, 2006). Com isso, de acordo com Songer e Anderson (2006), a infecção por *C. difficile* é hoje a principal causa não-controlada de diarreia neonatal.

O histórico inclui principalmente baixo desenvolvimento corporal, edema de mesocólon e um conteúdo amarelado de consistência de pastosa a aquosa no colón. Raramente podem ser observados outros sinais, como hidrotórax, seguido de dificuldade respiratória, edema escrotal e facial, além de morte súbita em alguns casos (Songer e Uzal, 2005). De acordo com Yaeger et al (2002), colite e edema de mesocólon, principalmente quando este último é severo, são as alterações macroscópicas que melhor se correlacionam com a ocorrência de infecções por *C. difficile* em leitões.

Diversos estudos mostram que a prevalência de *C. difficile* em leitões diarreicos e não-diarreicos é estatisticamente igual, o que sugere uma alta proporção de animais colonizados sem sinais clínicos (Alvarez-Perez et al., 2009; Avbersek et al., 2009). Com relação à detecção das toxinas, em granjas afetadas, aproximadamente um terço dos leitões apresentam resultados positivos para detecção das toxinas, mas nem todos apresentam os sinais entéricos característicos (Yaeger et al., 2002), dificultando o diagnóstico e a percepção da ocorrência da doença na granja. De acordo com Songer e Uzal (2005), a ausência comum de alterações macroscópicas marcantes muitas vezes dificulta a sugestão de infecção por *C. difficile*. Assim, as ausências de diarreia ou de alterações macroscópicas *post-mortem* marcantes não podem excluir a possibilidade de ocorrência da doença (Yaeger et al., 2007). Outro ponto importante, também levantado por Yaeger et al (2007), é a possibilidade das infecções por *C. difficile* como doença subclínica, uma vez que vários leitões aparentemente saudáveis são positivos para detecção das toxinas A e B, mas apresentam lesões intestinais apenas

quando submetidos a uma avaliação histopatológica.

Estudos com relação à sensibilidade antimicrobiana das estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos sugerem que tiamulina, virginiamicina e tilosina, incluídos na alimentação dos animais podem ser úteis como profilaxia ou terapia (Songer e Anderson, 2006).

2.4.2 Cães

A importância de *C. difficile* em cães diarreicos ainda não é bem determinada. Existem relatos de diagnóstico de diarreia crônica causada por *C. difficile* (Berry e Levett, 1986) e até mesmo um surto de infecção por *C. difficile* em cães em um hospital veterinário já foi descrito (Weese e Armstrong, 2003). Porém, ainda não foi possível induzir a doença experimentalmente nesta espécie doméstica, mantendo os questionamentos com relação ao papel e a importância de *C. difficile* em cães.

Vários estudos indicam que não há diferença significativa no isolamento do agente em cães diarreicos e não-diarreicos, o que confirma que *C. difficile* pode fazer parte normal da microbiota (Weese et al 2001a; Marks et al 2002; Chouicha e Marks, 2006). Por outro lado, trabalhos relatam uma grande variação na taxa de isolamento entre cães saudáveis, variando de 0 a 10% (Perrin et al., 1993; Struble et al., 1994; Al Saif e Brazier et al; 1996), cães internados em hospitais veterinários, entre 18 e 40% (Riley et al., 1991; Struble et al., 1994) e cães que visitam humanos em hospitais (58%) (Lefebvre et al., 2006). Tanto Struble et al (1994) quanto Chouicha e Marks (2006) encontraram uma maior frequência de estirpes toxigênicas em cães diarreicos do que em cães saudáveis. Estirpes variantes (A⁻B⁺) foram encontradas apenas em cães que haviam visitado hospitais humanos (Lefebvre et al., 2006) e, até o momento, nenhum estudo avaliou a frequência dos genes responsáveis pela produção da toxina binária em estirpes isoladas dessa espécie. Outra questão que permanece sem resposta é a relação do

isolamento de *C. difficile* e a idade dos cães. Weese et al (2001a) não encontraram associação significativa entre a frequência de isolamento e a idade dos cães, enquanto Struble et al (1994) relataram um aumento do risco de colonização por *C. difficile* com o aumento da idade.

Trabalhos relatam uma associação significativa entre a presença das toxinas A e B e diarreia (Weese et al, 2001a; Marks et al 2002; Chouicha e Marks, 2006). Porém, dois dos três trabalhos publicados utilizaram kits de ELISA para detecção das toxinas A e B de *C. difficile* em fezes de cães. Couicha e Marks (2006) avaliaram cinco kits comerciais ELISA em comparação com a detecção do efeito citopático em linhagens celulares e concluíram que os testes avaliados, que foram padronizados para detecção das toxinas em humanos, não eram adequados para utilização em cães devido a baixa sensibilidade, o que levaria a resultados falso-negativos.

Pouco se sabe também sobre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença nessa espécie doméstica. Struble et al (1994) demonstraram que o risco de colonização por *C. difficile* cresce significativamente com a hospitalização e, de acordo com Clooten et al (2008), a aquisição de estirpes toxigênicas de *C. difficile* durante a internação estava correlacionada com o desenvolvimento de diarreia. Estes autores observaram ainda que a administração de antibióticos e imunossupressivos favoreceram a colonização por *C. difficile* dos cães internados, sugerindo que a utilização desses medicamentos associado a internação são fatores de risco para desenvolvimento de diarreia associada a *C. difficile* em cães. Este achado é extremamente semelhante ao observado em humanos, onde entre os principais fatores de risco para desenvolvimento da doença esta a hospitalização e a administração de antibióticos ou quimioterápicos (Vaishnavi, 2009). Clooten et al (2008) observaram ainda que nenhum dos cães que apresentavam-se previamente colonizados por *C. difficile* e com fezes normais no momento da internação

desenvolveram diarreia. Isto sugere que, semelhante ao relatado em humanos (Shim et al., 1998), a colonização prévia por estirpes de *C. difficile* pode diminuir o risco de desenvolvimento de diarreia causada por este agente durante a hospitalização.

2.4.3 Outras espécies

C. difficile é também um importante agente causador de diarreia em potros e equinos adultos (Baverud et al., 1998). Mesmo não sendo considerado um constituinte normal da microbiota de equinos, esta bactéria pode ser isolada a partir das fezes de uma pequena proporção de animais sadios (0-4%) (Jones et al., 1987; Baverud et al., 1998). A doença clínica em adultos e potros pode variar de diarreia leve a severa com enterocolite necrotizante. Assim como em humanos, nesta espécie doméstica a ocorrência de diarreia associada a *C. difficile* parece ocorrer após desequilíbrio da microbiota gastrointestinal, principalmente pela utilização de antibiótico (Weese et al., 2000b).

De forma semelhante à disseminação comumente observada em hospitais humanos, Weese et al (2000a) relataram o isolamento de esporos de *C. difficile* em vários pontos de um hospital veterinário, tanto nas dependências relativas a grandes animais quanto nas relativas a pequenos animais. Neste estudo, os pesquisadores chamam a atenção ainda para a dificuldade de higienização e descontaminação eficientes contra esporos de *C. difficile*.

Existem relatos de infecções por *C. difficile* em várias outras espécies domésticas como coelhos, gatos, e até em bovinos (Weese et al., 2001b; Martins et al., 2001; Bano et al., 2008). Porém, nestas espécies a ocorrência de distúrbios gastrointestinais relacionadas a este clostrídio são incomuns.

2.5 *Clostridium difficile* como agente zoonótico

A hipótese de animais como reservatórios e transmissores de *C. difficile* para humanos foi levantada pela primeira vez por Borriello

et al., (1983) em um estudo no qual realizou o isolamento deste agente de cães e gatos. Desde então, essa hipótese permaneceu pouco lembrada. Porém, estudos recentes relataram isolamento de estirpes de *C. difficile* em produtos cárneos semelhantes a aquelas causadoras de PMC em humanos, sugerindo uma possível transmissão do agente por alimentos de origem animal (Rodriguez-Palacios et al., 2007; Songer et al., 2009).

A partir desses resultados, alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a similaridade entre estirpes isoladas de humanos e de animais domésticos. Foi observado que muitas estirpes isoladas de bezerros e suínos são similares às estirpes isoladas de humanos com CPM (>80% similares) (Jhung et al., 2008). Outro ponto que tem chamado a atenção é o grande aumento do isolamento de um ribotipo específico, conhecido como 078, em humanos nos Estados Unidos e na Inglaterra. Essa estirpe é comumente isolada de bezerros e corresponde a 83% dos isolados de suínos no EUA (Keel et al., 2007). Além disso, é importante salientar ainda que o ribotipo toxigênico mais comumente isolado de cães, que responde por aproximadamente 90% dos isolados toxigênicos dessa espécie doméstica, é um dos tipos causadores de infecção em humanos (Arroyo et al., 2005).

Esses resultados reforçaram a hipótese de transmissão de *C. difficile* entre animais e homens. Porém, mais estudos são necessários para confirmar. De acordo com Songer (2010), se confirmada essa hipótese, a prevenção da doença e até mesmo da colonização de animais domésticos passará a ser uma prioridade.

2.6 Diagnóstico

A detecção das toxinas A e B diretamente nas fezes é considerado o “padrão-ouro” para o diagnóstico laboratorial de infecções por *C. difficile* (Lyerly et al., 1988). Porém, em muitos casos, vários testes laboratoriais devem ser combinados, como por exemplo, isolamento, detecção das toxinas em amostras fecais, avaliação da produção de

toxinas *in vitro* pelo isolado e detecção dos genes responsáveis pela codificação das toxinas por PCR (Delmeé, 2001).

2.6.1 Isolamento

Após o estabelecimento do papel do *C. difficile* como principal causador de CPM, George et al (1979) relataram a utilização de um agar específico para isolamento: Agar CCFA (Cefoxitina-Cicloserina-Frutose-Agar). Desde então, este é o meio mais utilizado para isolamento de *C. difficile* a partir de fezes (Delmeé, 2001). Várias modificações do agar CCFA foram propostas ao longo dos anos. A maioria desses trabalhos objetivou aumentar a recuperação de esporos em estudos epidemiológicos e de isolamento do microrganismo a partir do ambiente, principalmente hospitalar (Delmeé, 2001). Entre essas modificações, a adição de taurocolate, que permite uma melhor germinação dos esporos, passou a ser utilizados principalmente em casos onde a detecção das toxinas foi positiva, mas o isolamento, utilizando CCFA, foi negativo. Ainda assim, de acordo com Songer e Uzal (2005), algumas estirpes podem não crescer devido à sensibilidade a um ou a ambos antibióticos utilizados no meio seletivo. Outra estratégia comumente utilizada para melhorar o isolamento de *C. difficile* é o choque com etanol, onde volumes iguais de álcool e fezes são misturados por aproximadamente uma hora antes do plaqueamento. O choque com álcool parece aumentar a sensibilidade do isolamento ao eliminar outras bactérias presentes nas fezes, permanecendo os esporos de *C. difficile* (Borriello e Honour, 1981).

Colônias de *C. difficile* são facilmente reconhecíveis por sua morfologia típica, aspecto conhecido como “vidro moído”: colônias rizóides, irregulares de coloração cinzenta e odor característico, semelhante ao de fezes de eqüinos (Delmeé, 2001). Além disso, as colônias podem apresentar um brilho verde-amarelado quando iluminado por luz ultravioleta. Na coloração de Gram é possível observar bastonetes Gram-positivos com esporos subterminais

(Vaishnavi, 2009). Para confirmação da identidade, pesquisadores comumente avaliam a produção de uma enzima, chamada proline-aminopeptidase, por meio de discos comercialmente disponíveis. Este teste é rápido e, quando associado à utilização do CCFA, permite a identificação com aproximadamente 99% de certeza (Fedorko e Williams, 1997). Infelizmente este produto ainda não está comercialmente disponível no Brasil. Além deste teste, alguns autores utilizam a fermentação de açúcares (principalmente manose, sacarose, glicose, maltose e lactose) para confirmação da identidade do microrganismo (Ferreira et al., 2003).

De acordo Delmeé (2001), o isolamento é um método de baixa especificidade e relativamente demorado. Além disso, *C. difficile* pode ser um habitante normal da microbiota intestinal, o que faz com que apenas o isolamento não seja indicativo da doença tanto em humanos quanto em animais domésticos (Yaeger et al., 2007; Ferreira et al., 2003; Clooten et al., 2008; Arroyo et al., 2007). De acordo com Fekey e Shah (1993), uma opção para diferenciação de indivíduos que possuem *C. difficile* normalmente na microbiota de indivíduos clinicamente afetados seria o isolamento quantitativo, uma vez que estes pacientes apresentam eliminação significativamente maior de esporos nas fezes. Ainda assim, este método é pouco utilizado, sendo o diagnóstico baseado na detecção das toxinas (Delmeé, 2001). Com isso, o isolamento é utilizado principalmente na condução de investigações epidemiológicas e avaliação da sensibilidade do microrganismo a antibióticos.

2.6.2 Detecção das toxinas

A detecção da presença das toxinas A e B pela visualização do efeito citopático em cultura celular é considerado como o “método-ouro” para diagnóstico de infecções causadas por *C. difficile*. Este método consiste na inoculação do filtrado de fezes em linhagens contínuas de células e a observação do efeito citopático, causado principalmente pela toxina B, que é 1000 vezes mais citotóxica que a toxina A (Ciesla

et al., 1998). De acordo com Voth e Ballard (2005), o efeito citopático é um parâmetro mais relevante do que a morte celular ao considerarmos o diagnóstico. Células expostas a tais toxinas podem exibir alterações consideráveis no citoesqueleto sem que ocorra morte celular, porém tais alterações impedem que elas exerçam suas funções normais no organismo do hospedeiro.

Várias linhagens celulares podem ser utilizadas para detecção das citotoxinas. A linhagem mais comumente utilizada é a CHO (Chinese Hamster Ovary) e a considerada mais sensível é a VERO (African Green Monkey Kidney). Além dessas, outras como Hela, fibroblast e Hep2 também são utilizadas (Delmeé, 2001). Resumidamente, uma suspensão da amostra fecal é preparada em solução salina tamponada e, após centrifugação, o sobrenadante é submetido a um filtro de 0,2 µm e o produto obtido é utilizado na avaliação do efeito citopático. A leitura é realizada em 24 a 48 horas sendo que, em casos severos, o arredondamento típico pode ser observado em 4 a 6 horas (Doern et al., 1992). A confirmação é dada pela soroneutralização do efeito citopático por anticorpos específicos contra as toxinas A e B de *C. difficile* ou de *C. sordellii* (Delmeé, 2001).

A detecção do efeito citopático tem como principal vantagem a alta sensibilidade e especificidade, sendo por isso considerado o “padrão-ouro” (Doern et al., 1992). Por outro lado, o resultado é demorado e permite processar apenas poucas amostras por vez, quando comparado com ELISA. Além disso, em aproximadamente 2% dos casos de CPM, um efeito citopático não-específico (não neutralizável pelas antitoxinas específicas) pode ocorrer, impossibilitando a conclusão do diagnóstico. Outro ponto desfavorável é a necessidade de manutenção de linhagens celulares, o que consome tempo, tem um custo relativamente elevado e necessita de pessoal treinado (Delmeé, 2001; Post et al., 2002).

Vários kits de ELISA para detecção das toxinas de *C. difficile* são oferecidos no mercado mundial. Porém no Brasil, até o ano de 2010, apenas dois kits eram comercialmente disponíveis, sendo que um deles é padronizado apenas para a detecção da toxina A. A detecção de ambas as toxinas tornou-se importante uma vez que em vários casos de infecção por *C. difficile*, incluindo grandes surtos em humanos, foram causados por estirpes variantes, produtoras apenas da toxina B (Alfa et al., 2000; Kuijper et al., 2001).

Existem várias publicações avaliando a sensibilidade e especificidade de diferentes kits de ELISA para detecção das toxinas de *C. difficile*, porém a maioria destes estudos limita-se a espécimes clínicos de humanos (Doern et al., 1992; De Girolami et al., 1992; Lyerly et al., 1998). Quando comparados com a detecção de efeito citopático em linhagens celulares, os kits apresentam em geral uma sensibilidade ligeiramente menor (Barbut et al., 1993; Bentley et al., 1998; Vanpoucke et al., 2001). Em um estudo com cães, avaliando cinco kits de ELISA em comparação a detecção em linhagem contínua de célula, o autor concluiu que estes não eram adequados para utilização em cães devido à baixa sensibilidade (variando de 7 a 33%). Já a especificidade, que ficou entre 65 e 100%, foi considerada adequada (Chouicha e Marks, 2006). Post et al (2002), trabalhando com fezes e conteúdo intestinal de suínos, relataram a avaliação de apenas um teste de ELISA, comercialmente disponível nos Estados Unidos, para detecção das toxinas A e B. Os autores encontraram uma alta correlação (88%) dos resultados obtidos com o kit em comparação com a detecção de efeito citopático em linhagens contínua de células, observando uma sensibilidade e especificidade de 91 e 86% respectivamente. Em outro estudo com fezes de suínos, Anderson e Songer (2008) testaram dois kits ELISA, incluindo o mesmo kit testado por Post et al (2002), e observaram resultados idênticos para sensibilidade e especificidade. Já para o segundo kit testado, a sensibilidade encontrada foi considerada baixa, de 36%, enquanto a especificidade foi de 100%.

2.6.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O isolamento seguido da tipagem de *C. difficile* tem se mostrado essencial para estudo da epidemiologia da doença (Lemeé et al., 2004; Arroyo et al., 2007). Além disso, existem evidências que a tipificação permite uma predição do potencial de virulência das estirpes de *C. difficile* (Stubbs et al., 2000).

Inicialmente a tipagem de amostras isoladas de *C. difficile* era baseada no fenótipo das estirpes, sendo que a diferenciação ocorria principalmente por classificação em sorotipos. Com o avançar do tempo, técnicas de genotipagem, baseadas principalmente na PCR, passaram a predominar por, entre outras vantagens, permitirem uma maior diferenciação entre os isolados e possuírem uma execução menos laboriosa. Com isso, vários esquemas de genotipagem foram desenvolvidos, sendo a ribotipagem e a avaliação dos tipos toxigênicos os dois métodos mais utilizados atualmente (Stubbs et al., 2000).

A avaliação dos ribotipos de amostras de *C. difficile* foi inicialmente proposta por Gurtler et al (1993). A técnica baseia-se na presença, no cromossomo bacteriano, de vários alelos do operon do rRNA que diferem no comprimento da região espaçadora intergênica, localizado entre os genes 16S e 23S rRNA. Com isso, em uma PCR utilizando um primer para a região do gene 16S rRNA e outro primer para a região 23S rRNA, são obtidos vários fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, de acordo com os alelos presentes no operon do rRNA do cromossoma bacteriano (Bidet et al., 1999). De acordo com os perfis obtidos com diversas amostras isoladas de animais, humanos e do ambiente, foi estabelecida uma lista de 116 padrões comuns (Stubbs et al., 1999). Este processo facilitou a análise de estirpes isoladas em todo mundo e, conseqüentemente, tem ajudado elucidar pontos com relação à epidemiologia e disseminação das estirpes de *C. difficile* no ambiente e em casos de infecções no homem e nos animais domésticos (Stubbs et al., 2000).

Já a avaliação dos tipos toxigênicos baseia-se na detecção dos genes relativos à produção das duas toxinas principais de *C. difficile*, toxina A e B, e eventualmente a detecção de outros fatores de virulência adicionais, como a toxina binária (Rupnik, 2001). A detecção de estirpes A⁻B⁺ pela PCR pode auxiliar o diagnóstico, uma vez que alguns kits de ELISA detectam apenas a toxina A, o que poderia levar a resultados falso-negativos no caso infecção por estirpes A⁻B⁺, também conhecidas como estirpes variantes (Arroyo et al., 2007). A importância das estirpes variantes tem aumentando, uma vez que estas têm sido incriminadas como causadoras de grandes surtos em humanos (Alfa et al., 2000; Kuijper et al., 2001). Além disso, estudos recentes sugerem uma alta correlação entre alguns tipos toxigênicos de *C. difficile* e uma maior severidade da doença em humanos (Voth e Ballard, 2005). Em animais, um estudo semelhante avaliou amostras isoladas de equinos adultos e potros com infecção por *C. difficile* e encontrou 17% de estirpes variantes, sendo que o grupo em que essas estirpes foram isoladas apresentou uma mortalidade maior que os outros animais (Arroyo et al., 2007), sugerindo que, também em animais, a tipificação permite uma predição do potencial de virulência das estirpes de *C. difficile*.

3. OBJETIVOS

- Padronizar uma PCR multiplex para detecção simultânea dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB* e *tpi* de amostras de *Clostridium difficile*.
- Avaliar os tipos toxigênicos isolados a partir de fezes de cães e leitões diarréicos e saudáveis.
- Detectar as toxinas A e B de *Clostridium difficile* em amostras de fezes de cães e leitões diarréicos e saudáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Realização do Experimento

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

4.2 Meios de Cultura

Para o isolamento e avaliação da pureza das amostras, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Caldo Brain Heart Infusion-BHI (Difco Laboratories, Detroit, EUA), Agar Mulluer-Hinton (AS) suplementado com 5% de sangue de equino (Difco Laboratories, Detroit, EUA), Agar Cicloserina-Cefoxitina-Frutose suplementado com 5% de sangue de equino (CCFA, Himedia, Mumbai, Índia).

4.3 Amostras de Referência

Para padronização da PCR Multiplex, utilizou-se a estirpe de referência de *Clostridium difficile* originária do American Type Culture Collection (ATCC 9689), gentilmente cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Para realização dos testes de especificidade da técnica, foram utilizadas amostras ATCC dos seguintes microrganismos: *Clostridium sordellii* (ATCC 9714), *Clostridium tetani* (ATCC 9441), *Clostridium septicum* (ATCC 11424), *Clostridium novyi* (ATCC 9690), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27707), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25319), *Escherichia coli* (ATCC 21986), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Salmonella typhi* (ATCC 9992V).

4.3.1 Cultivo e identificação das amostras de referência

As estirpes liofilizadas foram reconstituídas pela adição de 1ml de caldo BHI. Em ambiente estéril, uma alíquota de 150µL de amostra foi semeada em 15mL de caldo

BHI, contido em um tubo de rosca, e em duas placas de AS. O tubo de caldo BHI e uma das placas de AS foram incubados a 37°C durante 48 horas em atmosfera de anaerobiose (CO₂:10%; H₂:10%; N₂:80%). A outra placa de AS foi incubada em aerobiose a 37°C por 24 horas. O cultivo foi posteriormente avaliado morfológicamente e quanto à pureza por meio de coloração de Gram (Sebald e Petit, 1997).

4.4 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.4.1 Controles

Como controle positivo, utilizou-se a amostra de referência de *Clostridium difficile* (ATCC 9689). Sua identidade foi previamente confirmada por meio de uma PCR convencional (Monoplex) conforme metodologia descrita por Sambol et al. (2000). Como controle negativo, utilizou-se água estéril somente com os reagentes da técnica, sem a presença do DNA bacteriano.

4.4.2 Extração do DNA

O material genético da estirpe de referência e dos isolados foram obtidos a partir dos cultivos em CCFA, utilizando-se a extração sem purificação do DNA através do método térmico descrito por Baums et al (2004). Três a cinco colônias características foram raspadas com ponteiros estéreis e transferidas para *Eppendorfs* com 200 µL de água ultrapura estéril (Milli-q Plus QPack 1E, Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). Os microtubos foram hermeticamente fechados e colocados em aparelho termociclador a 98°C durante 20 minutos. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 x g por cinco minutos e o sobrenadante utilizado como molde de DNA (Lemeé et al., 2004).

4.4.3 Iniciadores

Foram utilizados oito iniciadores para a padronização da reação (Tabela 1).

Tabela 1 – Iniciadores específicos usados na PCR multiplex, para amplificação dos genes *tpi* e das toxinas A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) e toxina binária (*cdtB*) de *Clostridium difficile*.

Genes	Primer	Seqüência	Melting Temperature	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>tcdA</i>	tcdA_F	5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3'	48,1°C	365	Sambol et al (2000)
	tcdA_R	5'-GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3'	49,1°C		
<i>tcdB</i>	tcdB_F	5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3'	47,1°C	160	
	tcdB_R	5'-ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT-3'	49,3°C		
<i>tpi</i>	tpi_F	5'-AA AGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'	51,6°C	210	
	tpi_R	5'-CATAATATTGGGTCTATTCTAC-3'	48,1°C		
<i>cdtB</i>	cdtB_F	5'-TTGACCCAAAGTTGATGCTGATTG-3'	55,7°C	262	Persson et al (2008)
	cdtB_R	5'-CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG-3'	55,0°C		

4.4.4 PCR Convencional (monoplex)

Foram realizados ensaios de PCR convencional para verificação da especificidade dos primers utilizados e para comparação dos resultados após a padronização da PCR Multiplex. Para os dois pares relativos à detecção dos genes codificadores das toxinas A e B, genes *tcdA* e *tcdB* respectivamente, a PCR monoplex foi realizada de acordo com a metodologia

descrita por Sambol et al. (2000). Para o gene *tpi*, a reação foi realizada de acordo com Dhalluin et al. (2003), para o *cdtB*, as reações foram realizadas de acordo com Persson et al (2008). A Tabela 2 mostra as concentrações dos reagentes utilizados em cada uma das reações monoplex. Em todas as reações foi utilizada água ultrapura para completar o volume final da reação, que foi de 25 µl.

Tabela 2 – Concentrações dos reagentes utilizados na reação monoplex para os genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB* e *cdtB* de *C. difficile*.

Reagentes/Genes	<i>cdtB</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdA</i>	<i>tpi</i>
Tampão de Corrida	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	1,5mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM
dNTP	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
<i>taq</i> DNA Polimerase	1,0 U	1,0 U	1,0 U	0,5 U
Primers	0,2 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,2 mM

As reações foram realizadas em termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electro Corporation, Milford, EUA). Na

tabela 3, pode-se visualizar os ciclos utilizados na reação Monoplex para cada um dos genes.

Tabela 3 – Ciclos utilizados na reação de monoplex para os genes *tcdA*, *tcdB*, *tpi* e *cdtB* de *Clostridium difficile*.

Gene	Ciclo				
	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
<i>tcdA</i>	94°C por 2 min	94°C por 30 s	49°C por 30 s	72°C por 30s	72°C por 2 min
<i>tcdB</i>			50°C por 30 s		
<i>tpi</i>			54°C por 30 s		
<i>cdtB</i>			49°C por 30 s		

Passos repetidos 35 vezes

4.4.5 Padronização da PCR Multiplex

A padronização da técnica de PCR Multiplex para detecção dos genes codificadores das toxinas A, B, toxina binária e do gene *tpi* foi realizada utilizando-se a amostra de referência de *Clostridium difficile* (ATCC 9689) e um controle negativo. Durante a padronização do teste, variações foram realizadas na concentração de MgCl₂ (de 1,0 a 2,5mM), na concentração de TAQ DNA Polimerase (de 0,5 a 5U), na concentração de tampão da reação (de 1X a 2X) e na temperatura de anelamento (de 40 a 65°C), visando fornecer a PCR uma maior sensibilidade e especificidade.

4.4.6 Análise dos produtos da PCR

Dez microlitros dos produtos amplificados foram aplicados em géis de agarose a 2% (v/v), adicionados de dois µl de brometo de etídio (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) e submetidos a eletroforese a 120 V, 2 mA, por 60 minutos em tampão TAE 1X (10mM EDTA pH 8,0, 20,3 mM KH₂PO₄, 10,4 Tris acetato). As bandas foram visualizadas por meio de luz ultravioleta e analisadas por comparação a um marcador de tamanho molecular (100 bp ou 1kb DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, Brasil).

4.4.7 Avaliação da PCR

4.4.7.1 Sensibilidade Analítica da PCR

Para avaliação da sensibilidade da PCR, a dosagem do DNA da amostra de referência foi estimado em um NanoDrop ND1000

Spectrophotometer (NanoDrop Techonologies, Wilmington, EUA). Após a dosagem, a amostra de DNA foi submetida a diluições seriada na base 10, variando de 10⁻¹ a 10⁻⁵. As diluições foram utilizadas na PCR monoplex para o gene *tcdA*, *tcdB*, *tpi* e *cdtB* e á PCR Multiplex nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.4.7.2 Especificidade da PCR

Para avaliar a especificidade dos primers para detecção do agente, amostras ATCC de várias espécies do gênero *Clostridium* e de outros microorganismos comuns no trato gastrointestinal dos animais domésticos (descritos no item 4.3) foram processadas e submetidas à PCR Monoplex e Multiplex.

4.5 Amostragem

4.5.1 Amostras de cães

Foram coletadas 57 amostras de fezes de cães. Dessas, 22 de cães diarreicos, oriundos do Hospital Veterinário da UFMG, e 35 de cães não-diarreicos (aparentemente saudáveis), obtidas a partir de cães de alunos da Escola de Veterinária da UFMG ou coletadas em duas praças da cidade de Belo Horizonte. As amostras obtidas de cães diarreicos foram coletadas no momento da chegada ao hospital, previamente ao internamento. Todas as amostras foram acondicionadas em tubos coletores de material clínico e mantidas a 4° C por, no máximo, 72 horas até o processamento para isolamento e pesquisa das toxinas A/B.

4.5.2 Amostras de leitões

Foram coletadas amostras de fezes de leitões, com até sete dias de idade, de 15 granjas comerciais, localizadas na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (Minas Gerais, Brasil), e que apresentavam histórico de diarreia na fase de maternidade. Em cada granja, foram coletadas fezes de dois animais com diarreia e de dois sem diarreia, totalizando 60 amostras. Todas as amostras foram acondicionadas em tubos coletores de material clínico e mantidas a 4°C por, no máximo, 72 horas até o processamento para isolamento e pesquisa das toxinas A/B.

4.6 Isolamento, Cultivo e Identificação das amostras.

Para o isolamento, as amostras de fezes foram misturadas com igual quantidade de álcool absoluto (96%) e, após incubação por 30 minutos a 37°C, 50µl foram plaqueados em CCFA (Avbersek et al., 2009). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas em atmosfera de anaerobiose.

4.7 Pesquisa das toxinas A e B de *Clostridium difficile*.

A detecção das toxinas A e B de *C. difficile* foi realizada utilizando um kit comercial de ELISA (Ridascreen® *Clostridium difficile* toxins A/B, R-biopharm, Darmstadt, Alemanha). O processamento foi realizado conforme orientação do fabricante e as

leituras foram realizadas em um leitor de ELISA (Biotek Instruments, EUA). Todas as amostras foram processadas até 48 horas após a coleta.

4.8 Análise Estatística

Os dados de pesquisa das toxinas A/B foram avaliados estatisticamente pelo Teste Qui-Quadrado (Sampaio, 2007), considerando-se como valor significativo a probabilidade menor ou igual a 1% ($p > 0.01$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização da PCR Multiplex

Na avaliação da pureza, a amostra referência de *C. difficile* (ATCC 9689) encontrava-se pura e com coloração de Gram apresentando bastonetes curtos, Gram-positivos com esporos subterminais. Procedeu-se a extração de DNA das colônias para utilização na PCR. Na realização da PCR convencional (monoplex) da amostra de referência de *C. difficile*, foi possível observar uma banda de aproximadamente 365 pares de base, para o gene *tcdA*, 210 pares de base, para o gene *tpi*, 160 pares de base, para o gene *tcdB* e 262 pares de base, para o gene *cdtB* (Figura 3). A reação monoplex não gerou amplificação com os controles negativos testados.

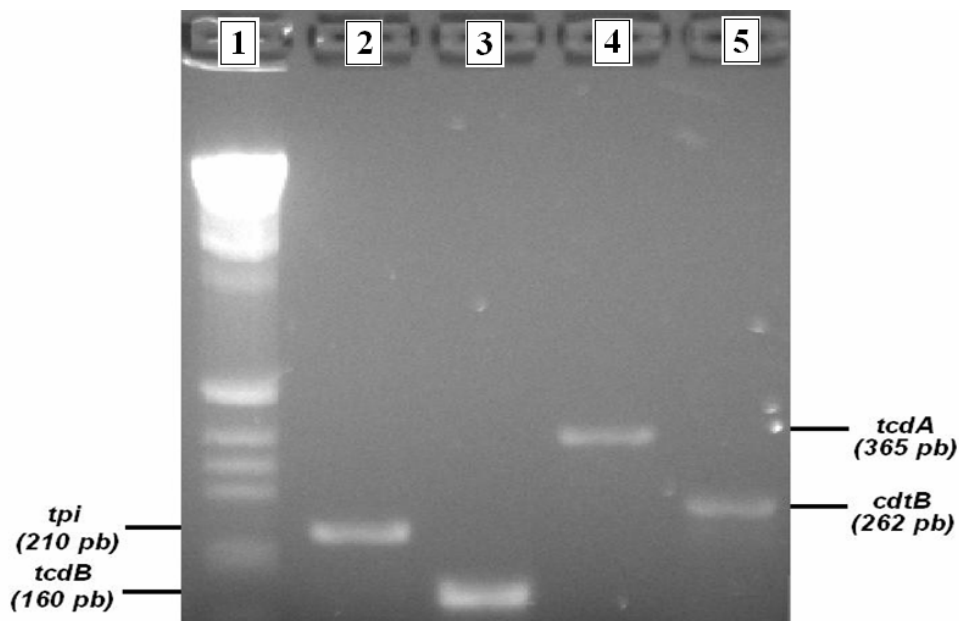


Figura 3 – Fotodocumentação de gel de agarose da PCR convencional de material genético de estirpes de *Clostridium difficile*. Legenda: Canaleta 1 – Marcador do peso molecular 1kb; Canaleta 2 – Banda de 210 pb, referente a reação monoplex para o gene *tpi*; Canaleta 3 – Banda de 160 pb, referente a reação monoplex para o gene *tcdB*; Canaleta 4 - Banda de 365 pb, referente a PCR monoplex para o gene *tcdA*; Canaleta 5 - Banda de 262 pb, referente a PCR monoplex para o gene *cdtB*.

A principal dificuldade na padronização da PCR multiplex foi o estabelecimento da concentração dos primers utilizados. Os primers utilizados para detecção do gene *tcdA* não permitiam uma diminuição na concentração ou falhavam na amplificação com o aumento da temperatura de anelamento. Os primers para os genes *cdtB* e *tpi* exibiam grande quantidade de reações inespecíficas mesmo em concentrações relativamente baixas e a altas temperaturas de anelamento. A solução encontrada foi a diminuição gradual de ambos pares de primers e realização concomitante de

gradientes de temperatura de anelamento. Com isso definiu-se a temperatura de anelamento a 52°C. A PCR multiplex foi padronizada empregando-se um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por um minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por um minuto para desnaturação, 52°C por um minuto para anelamento e 72°C por um minuto para extensão. Foi também incluído um ciclo final de extensão a 72°C por 2 minutos. Após a realização de variações na concentração do MgCl₂, *taq* DNA polimerase e de tampão, a reação foi padronizada com as concentrações descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Concentração dos reagentes utilizados na PCR multiplex para amplificação dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB* e *tpi* de *Clostridium difficile*.

Reagente		Concentração
Tampão de Corrida		1x
MgCl ₂		1,5 mM
<i>taq</i> DNA Polimerase		3,0 U
dNTP		0,2 mM
Primers	tcdA-F e tcdA_R	1,0 µM ou 25 pmol/µL
	tcdB-F e tcdB_R	0,5 µM ou 12,5 pmol/µL
	cdtB-F e cdtB_R	0,3 µM ou 7,5 pmol/µL
	tpi-F e tpi_R	0,3 µM ou 7,5 pmol/µL

Com a técnica padronizada, nenhuma das amostras bacterianas utilizadas para avaliação da especificidade gerou bandas, comprovando a especificidade da técnica. Na dosagem de DNA, a estirpe de referência de *C. difficile* apresentou concentração de 12 ng/µl. Na avaliação da sensibilidade, tanto nas reações monoplex quanto na multiplex, foi possível observar bandas específicas até na diluição 10⁻³, o que nos leva a uma detecção de aproximadamente 0,001 ng/µl, resultado

que confirma a alta sensibilidade da técnica. Resultados idênticos foram descritos por Gomes (2007) e Vieira (2006) em uma padronização de uma PCR multiplex para genotipagem de *C. perfringens*.

Os resultados obtidos com a PCR multiplex foram iguais aos obtidos com as reações monoplex para os genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB* e *tpi*, confirmando a padronização da técnica (Figura 4).

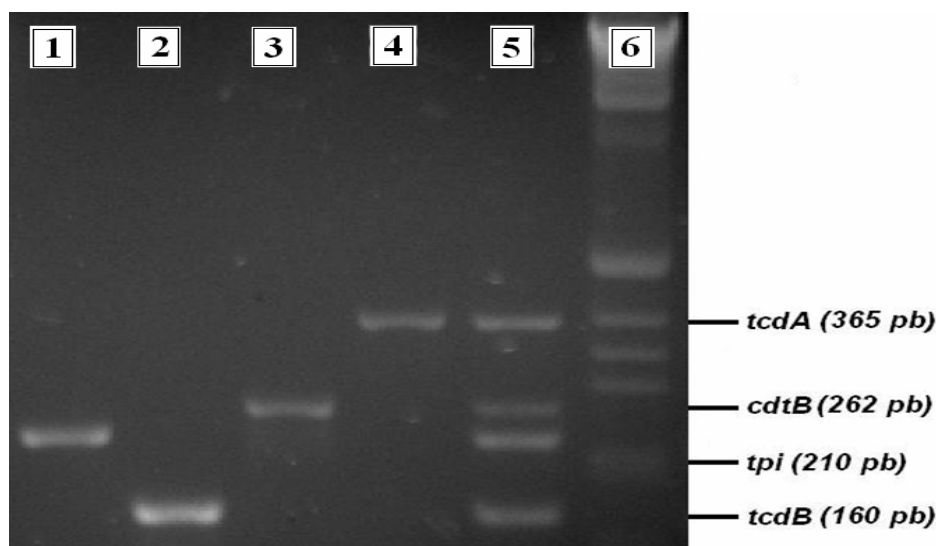


Figura 4 – Fotodocumentação de gel de agarose da PCR convencional e multiplex para uma A⁺B⁺CDT⁺ de *Clostridium difficile*. Legenda: Gel de agarose corado com brometo de etídio. Canaletas 1 a 4: reação monoplex mostrando a amplificação do gene *tpi*, *tcdB*, *cdtB* e *tcdA*, respectivamente; Canaleta 5: reação multiplex, mostrando a amplificação simultânea dos *tcdB*, *tpi*, *cdtB* e *tcdA*; Canaleta 6: marcador de peso molecular 1kb.

5.2 Isolamento e Aplicação da PCR Multiplex

Das 57 amostras obtidas de cães, 19 (33,3%) foram de filhotes e 38 (66,7%) de animais adultos (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência de filhotes e adultos na amostragem de fezes de cães colhidos para isolamento e detecção das toxinas A e B de *Clostridium difficile*.

Cães	Diarréicos	Não-diarréicos	Total
Filhotes (≤ 1 ano)	14 (24,5%)	5 (8,8%)	19 (33,3%)
Adultos (> 1 ano)	8 (14%)	30 (52,6%)	38 (66,7%)
Total	22 (38,6%)	35 (61,4%)	57 (100%)

Chama atenção o grande número de filhotes no grupo de cães diarréicos, correspondendo a aproximadamente 63,6% das amostras desse grupo, enquanto que no grupo de animais não-diarréicos as amostras oriundas de filhotes correspondem apenas a 14,3%. Este fato pode ser explicado por uma maior susceptibilidade dos cães nessa faixa etária, especialmente até seis meses de idade. Neste período, há queda da imunidade passiva e estabelecimento da imunidade ativa, sendo que a exposição aos agentes e a vacinação tem grande influência nessa etapa (Ettinger e Feldman, 2000).

Quanto ao isolamento do agente, das 117 amostras de fezes obtidas (60 de leitões e 57 de cães), em 24 (20,5%), quando cultivadas em CCFA, apresentaram colônias variando de branco a cinza claro, com aspecto de “vidro moído”, bordas irregulares e com odor característico (semelhante ao de fezes de equino), sendo assim consideradas sugestivas de *C. difficile* (Figura 5). Pela coloração de Gram, foi possível observar bastonetes Gram-positivos, longos e, em alguns casos, com esporos subterminais.

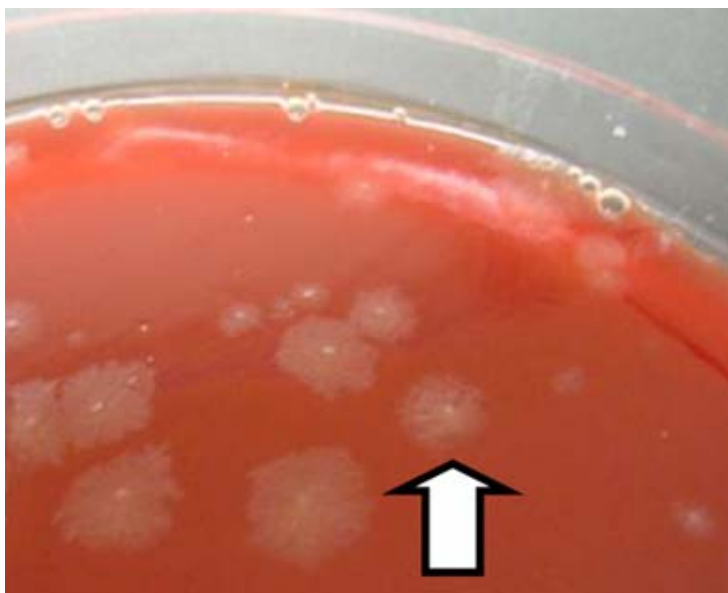


Figura 5 - Placa de Agar Cicloserina-Cefoxitina-Frutose (CCFA) mostrando morfologia colonial característica de *Clostridium difficile*: colônias com bordas irregulares (seta), com aspecto de “vidro moído” e de coloração variando de branco a cinza claro.

Todas as 24 amostras consideradas suspeitas tiveram sua identidade confirmada pela PCR multiplex. Este resultado corrobora com o descrito por Lemeé et al (2004), que relataram que colônias de *C. difficile* são facilmente identificadas de forma presumptiva por meio de características marcantes como odor e morfologia colonial.

5.2.1 Isolamento de *Clostridium difficile* a partir das amostras de cães

Das 57 amostras de fezes de cães, foi possível identificar 12 (21%) estirpes de *C. difficile*, sendo dez estirpes de animais aparentemente saudáveis e duas de animais diarreicos (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da detecção dos genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB* das amostras de *Clostridium difficile* isoladas de cães diarreicos e aparentemente saudáveis.

Cães	Estirpes de <i>Clostridium difficile</i>		
	A ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁻	Total
Diarreicos	2 (16,7%)	(0%)	2 (16,7%)
Não diarreicos	8 (66,6%)	2 (16,7%)	10 (83,3%)
Total	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12 (100%)

Existe uma grande variação na taxa de isolamento em cães, sendo relatado taxas que variam de 0 a 10% em cães saudáveis (Perrin et al., 1993; Al Saif and Brazier et al; 1996) e entre 18 e 40% em cães internados (Riley et al., 1991; Struble et al., 1994). É importante lembrar ressaltar que as amostras de cães aparentemente saudáveis e diarreicos foram obtidas fora do hospital e no momento da admissão no hospital veterinário, logo antes do internamento, respectivamente. Estudos mostram que, quanto maior o tempo de internação do cão, maior a chance de colonização por *C. difficile* (Clooten et al., 2008). Esta diferença pode ser percebida mesmo quando comparamos a taxa de isolamento de animais que apenas consultaram no hospital com de animais internados. Segundo um estudo realizado por Weese et al (2003), onde foram avaliados três grupos distintos de cães, foi possível isolar *C. difficile* em 10,5% dos cães não-internados, 14,3% dos cães internados, mas sem diarreia, e em 16,1% dos cães internados e com diarreia, confirmando a forte tendência à positividade quanto maior o tempo de permanência do animal no hospital veterinário.

A alta proporção de amostras de filhotes (cães com até um ano de idade) também pode ter influenciado na taxa de isolamento obtida, uma vez que, de acordo com Struble et al (1994), o risco de colonização por *C.*

difficile aumenta proporcionalmente com a idade. Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com essa afirmação, uma vez que todas as estirpes obtidas a partir de fezes de cães foram oriundas de animais adultos, sendo de que o mais novo tinha aproximadamente dois anos de idade.

O número de estirpes obtidas foi superior ao encontrado por Weese et al (2001a), que isolaram apenas duas amostras em 142 animais trabalhados (1,4%). Já Struble et al (1994) e Marks et al (2002), que também trabalharam com cães diarreicos e saudáveis, isolaram *C. difficile* em 28 das 152 (18.4%) e 17 das 130 (13.1%) amostras de fezes. Dessas, 14 (50%) e 12 (70.6%) eram toxigênicas, respectivamente. No presente estudo, dez estirpes (83,3%) possuíam genes para produção tanto da toxina B quanto da toxina A (A⁺B⁺), enquanto que as outras duas amostras eram não-toxigênicas (A⁻B⁻). A ausência de estirpes variantes corrobora com trabalhos anteriores (Struble et al., 1994; Weese et al., 2001; Marks et al., 2002; Clooten et al., 2008). Até o presente momento (em 2011), essas estirpes foram isoladas apenas de cães que haviam visitado hospitais humanos (Lefebvre et al., 2006).

5.2.2 Isolamento de *Clostridium difficile* a partir das amostras de leitões

Das 60 amostras de fezes de leitões, foi possível isolar 12 (20%) estirpes de *C.*

difficile, sendo cinco oriundas de animais diarreicos e sete de animais não-diarreicos (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da detecção dos genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB* das amostras de *Clostridium difficile* isoladas de leitões diarreicos e não-diarreicos.

Leitões	Estirpes de <i>Clostridium difficile</i>			
	A ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁺	A ⁻ B ⁻	Total
Diarreicos	3 (25%)	2 (16,7%)	0 (0%)	5 (41,7%)
Não-diarreicos	1 (8,3%)	3 (25%)	3 (25%)	7 (58,3%)
Total	4 (33,3%)	5 (41,7%)	3 (25%)	12(100%)

A taxa de isolamento obtida a partir das fezes de leitões (20%) foi ligeiramente menor que a encontrada por Alvarez-Perez et al. (2009). Estes relataram o isolamento de *C. difficile* em 25,9% dos leitões, também com idade entre um e sete dias, de granjas na Espanha. Comparações entre os dois estudos devem ser feitas com cautela devido a diferenças na metodologia. No presente estudo, amostras foram obtidas em 15 granjas diferentes, mas fezes de apenas quatro animais foram amostradas em cada uma delas. Todas as granjas visitadas relataram problemas de diarreia na maternidade. Já Alvarez-Perez et al. (2009) trabalharam com 13 granjas, incluindo três que não possuíam histórico de diarreia

neonatal, e amostraram fezes de vários animais em cada granja (em média 23 animais por granja).

Com relação aos tipos toxigênicos, três estirpes (25%) eram não-toxigênicas (A⁻B⁻) e nove (75%) toxigênicas. Dessas nove, quatro (33.3%) possuíam genes para produção tanto da toxina B quanto da toxina A (A⁺B⁺) e cinco (41.7%) foram estirpes variantes (A⁻B⁺). Avaliando apenas a granjas trabalhadas, foi possível isolar *C. difficile* de oito das 15 (53,3%) das granjas trabalhadas. A Figura 6 mostra o resultado da PCR multiplex para algumas das estirpes isoladas a partir das fezes de leitões.

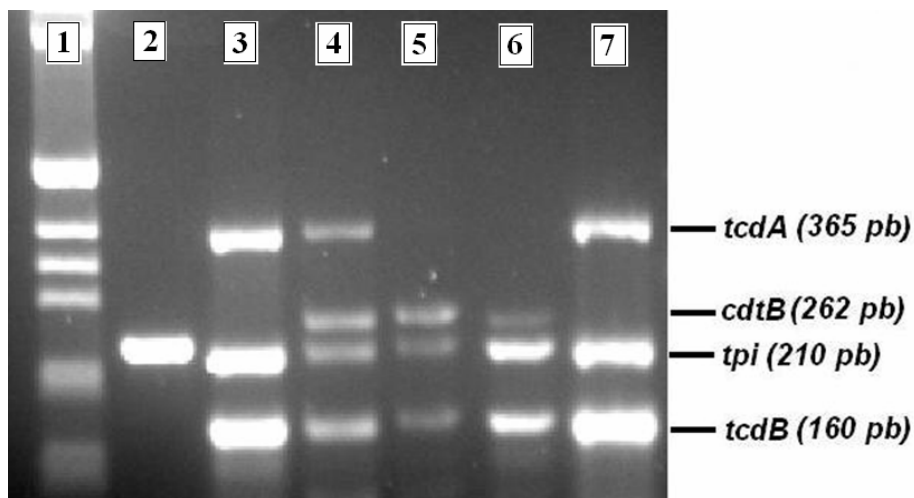


Figura 6 - Fotodocumentação de gel de agarose da PCR multiplex de material genético de estirpes de *Clostridium difficile* isoladas a partir de fezes de leitões. Legenda: Gel de agarose corado com brometo de etídio. Amostras de *C. difficile* isoladas de suínos. Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb; Canaleta 2: amostra não toxigênica de *C. difficile* (A⁻B⁻CDT⁻); Canaleta 3 e 7: duas amostra A⁺B⁺CDT⁻; Canaleta 4: amostra A⁺B⁺CDT⁺; Canaleta 5 e 6: duas amostras A⁺B⁺CDT⁺.

No presente estudo, foram obtidas três (25%) estirpes não-toxigênicas e cinco estirpes variantes (41.7%) isoladas de quatro granjas diferentes. Em contraste, Alvarez-Perez et al (2009) encontraram uma frequência bem menor de estirpes variantes e não-toxigênicas. Em 140 isolados, estes autores encontraram apenas sete (5%) estirpes não-toxigênicas e uma estirpe variante (0.7%), todas isoladas na mesma granja, concluindo que estirpes variantes são raras em granjas de suínos da Espanha.

Diferenças na taxa de isolamento e na frequência dos tipos toxigênicos podem estar relacionadas com o manejo (Arroyo et al., 2007) e também com a distribuição geográfica. Avbersek et al (2009) encontraram diferentes tipos toxigênicos de *C. difficile* em granjas geograficamente distantes e sem ligações entre elas. Além disso, esses mesmos autores observaram que um tipo toxigênico pode persistir em uma granja e, com o tempo, se diferenciar em subtipos. O mesmo já foi observado também em estirpes isoladas de humanos em hospitais (Fawley et al., 2008). Ainda, o

estado de portador de *C. difficile* em indivíduos assintomáticos parece variar entre espécies e mesmo dentro de espécies, dependendo de idade e outras características da população, influenciando, portanto, as taxas de isolamento (Keel e Songer, 2006).

De acordo com Arroyo et al. (2007), a alta prevalência de estirpes variantes pode complicar o diagnóstico de diarreia por *C. difficile*, uma vez que existem kits comerciais de ELISA padronizados para detecção apenas da toxina A, podendo gerar diagnósticos falso-negativos. É interessante observar ainda que estirpes variantes têm sido incriminadas como causadoras de grandes surtos de diarreia nosocomial em humanos (Alfa et al., 2000; Kuijper et al., 2001).

No presente estudo, tanto em suínos como em cães, todas as estirpes não-toxigênicas foram isoladas de animais não-diarreicos, corroborando os resultados encontrados por Alvarez-Perez et al (2009). De acordo com Songer et al (2007), a inoculação de leitões no nascimento com estirpes não-toxigênicas

de *C. difficile* teve efeito positivo significativo sobre a performance dos animais. De forma semelhante ao encontrado em suínos, estudos sugerem que em humanos e em cães a colonização prévia por estirpes não-toxigênicas *C. difficile* reduz o risco de desenvolvimento de diarreia por este agente (Kyne et al 2000; Clooten et al., 2008) Como resultado dessas observações, uma estirpe não-toxigênica de *C. difficile* para administração oral esta em avaliação, objetivando a exclusão competitiva em pacientes com alto risco (Songer, 2010).

Nenhuma associação entre o isolamento e a ocorrência de diarreia foi observada tanto em cães quanto em leitões, resultado que

corroborar com estudos anteriores nestas espécies (Marks et al., 2002; Alvarez-Perez et al., 2009; Avbersek et al., 2009) e também em outras espécies como humanos e equinos (Ferreira et al., 2003; Ossiprandi et al., 2010).

Em cães, a toxina binária foi encontrada em apenas uma estirpe, classificada como A⁺B⁺ e oriunda de um animal aparentemente saudável. Este consiste no primeiro relato na literatura de uma estirpe CDT⁺ em cães. Já em suínos, o gene responsável pela produção da toxina binária foi identificado em seis das 12 (50%) estirpes (Tabela 8). Das seis estirpes CDT⁺, cinco (83,3%) foram classificadas como A⁺B⁺.

Tabela 8 - Presença dos genes responsável pela produção da toxina binária (CDT) nas amostras isoladas de *Clostridium difficile* isoladas de leitões.

Estirpes de <i>C. difficile</i> isoladas de leitões	Toxina Binária		Total
	CDT ⁻	CDT ⁺	
A ⁺ B ⁺	3 (25%)	1 (8,3%)	4 (33,3%)
A ⁻ B ⁺	0 (0%)	5 (41,7%)	5 (41,7%)
A ⁻ B ⁻	3 (25%)	0 (0%)	3 (25%)
Total	6 (50%)	6 (50%)	12 (100%)

A presença da toxina binária (CDT) observada nas amostras de leitões no presente estudo (50%) foi muito superior à observada em trabalhos anteriores em diversas espécies. Chama atenção ainda para o fato de a maioria das amostras CDT⁺ isoladas de leitões serem variantes (A⁺B⁺). Persson et al (2008), trabalhando com isolados de humanos, encontraram 26% de estirpes CDT⁺, sendo que 97.3% delas eram A⁺B⁺. Arroyo et al (2007) encontrou apenas 4% de estirpes CDT⁺ em um estudo com equinos diarreicos, sendo todas elas A⁺B⁺. Avbersek et al (2009) também relataram a presença do gene responsável pela produção da toxina binária em estirpes de *C. difficile* isoladas de leitões, porém a frequência encontrada não foi relatada, impedindo comparações.

A ausência de amostras não-toxigênicas e CDT⁺ corrobora estudos anteriores (Stubbs

et al., 2000; Arroyo et al., 2007; Persson et al., 2008). De acordo com Stubbs et al (2000), a toxina binária é comumente observada apenas em estirpes que possuem parte do locus de patogenicidade (Paloc) contendo os genes para as toxinas A e B. Com isso, estirpes CDT⁺ em geral produzem também toxinas A e B ou pelo menos uma delas.

Pouco se sabe com relação à relevância clínica e o papel da CDT nas diarreias causadas por *C. difficile*, sendo ainda que a maioria dos estudos limita-se a pacientes humanos. Como a CDT é uma potente citotoxina, Gonçalves et al (2004) sugeriram que esta poderia preparar a atuação das toxinas A e B. Por outro lado, a toxina binária pode também agir sinergicamente com outras toxinas, despolimerizando o citoesqueleto celular por um mecanismo complementar. De qualquer forma, a

elevada frequência de estirpes de *C. difficile* CDT⁺ encontradas no presente estudo demonstra a necessidade de novas pesquisas com o objetivo de esclarecer o papel da toxina binária nas diarreias por *C. difficile* principalmente em leitões.

5.3 Pesquisa das toxinas A/B de *Clostridium difficile* a partir das amostras de cães

A frequência da detecção das toxinas A/B de *Clostridium difficile* em fezes de cães é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Frequência da detecção das toxinas A e B de *Clostridium difficile* por ELISA nas amostras de fezes de cães.

Cães	Resultado ELISA	
	Positivos	Negativos
Diarréicos	16 (28,1%) ^a	6 (10,5%)
Não-Diarréicos	5 (8,8%) ^b	30 (52,6%)
Total	21 (36,9%)	36 (63,1%)

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p > 0,01$).

Nas amostras de fezes de cão, 21 (36,8%) foram positivas para a detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, sendo 16 (28,1%) animais diarréicos e cinco (8,8%) animais não-diarréicos (Tabela 9). Avaliando estatisticamente, observa-se que há uma tendência a positividade no ELISA dos animais diarréicos ($p > 0,01$). O kit utilizado no presente experimento foi padronizado a partir de fezes humanas, não existindo na literatura nenhum trabalho avaliando sua utilização para fezes de cão, não se conhecendo, portanto, a sensibilidade e a especificidade do teste para esta espécie. Couicha e Marks (2006) avaliaram outros cinco kits comerciais de ELISA disponíveis no mercado dos Estados Unidos da América (EUA) e concluíram que esses kits apresentavam baixa sensibilidade para detecção das toxinas A e B em fezes de cães, o que levaria a resultados falso-negativos, ocorrendo principalmente com os kits padronizados para detecção apenas da toxina A, o que não aconteceu no presente experimento. Entretanto, os kits comumente apresentam especificidade alta, o que permite certa segurança para os resultados positivos encontrados (Couicha e Marks, 2006).

Os resultados obtidos corroboram com trabalhos anteriores que relatam uma associação entre a presença das toxinas A/B e diarreia em cães (Weese et al, 2001a; Marks et al 2002, Chouicha e Marks, 2006). A proporção de animais positivos foi muito maior que a encontrada em alguns estudos. Marks et al (2002) encontraram apenas cinco amostras de fezes positivas de 132 trabalhadas (3,8%), sendo que quatro desses animais eram do grupo dos cães diarréicos. Deve ser enfatizado, porém, que a utilização de um kit de ELISA que detecta apenas a toxina A pode ter influenciado significativamente nessa baixa proporção de positivos encontrada pelos autores. Em outro estudo, Weese et al (2001a) encontraram 22 positivos de 142 amostras trabalhadas (15,5%), chegando a uma proporção maior que a relatada por Marks et al (2002), mas ainda inferior a encontrada no presente estudo.

5.4 Pesquisa das toxinas A/B de *Clostridium difficile* a partir das amostras de leitões

Os resultados da detecção das toxinas A/B de *C. difficile* em fezes de leitões são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Frequência da detecção das toxinas A e B de *Clostridium difficile* por ELISA nas amostras de fezes de leitões.

Leitões	Resultado ELISA	
	Positivos	Negativos
Diarréicos	7 (11,7%) ^a	23 (38,3%)
Não-Diarréicos	3 (5%) ^a	27 (45%)
Total	10 (16,7%)	50 (83,3%)

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p > 0,01$).

Na detecção das toxinas A e B de *C. difficile* nas amostras de fezes de leitões, 10 (16,7%) animais foram positivos, sendo sete (11,7%) diarréicos e três (5%) animais não-diarréicos (Tabela 10). Avaliando estatisticamente, não observa-se tendência a positividade no ELISA dos leitões diarréicos ($p > 0,01$), contrastando com o observado em cães. A proporção de animais positivos encontrada é inferior ao relatado por Yaeger et al (2007), que observaram 62 leitões positivos em 129 amostras testadas (50%). Porém, das 129 amostras avaliadas pelos autores, 100 (77,5%) eram de animais com suspeita de infecção por *C. difficile*, o que provavelmente influenciou significativamente na grande proporção de positivos encontrada. Em outro estudo semelhante, o exame de 1000 leitões com enterite revelou a presença das toxinas A e B em 58,4% deles (Songer e Anderson, 2006).

Da mesma forma que ocorre em cães, não existem trabalhos comparando o kit utilizado no presente experimento com a soroneutralização celular, considerado o “método ouro” de detecção das toxinas A e B. São poucos os trabalhos de avaliação de kits de ELISA com fezes suínas e, de forma semelhante ao que acontece em cães e em comparação a soroneutralização celular. Estes kits apresentam uma boa especificidade, mas uma sensibilidade variada (entre 30 e 80%) quando utilizados

com fezes de suínos, podendo levar a resultados falso-negativos (Post et al, 2002; Anderson e Songer, 2008).

Observou-se a presença de animais não-diarréicos, porém positivos na detecção das toxinas A e B tanto em cães quanto em leitões. De acordo com Yaeger et al (2007), é comum leitões infectados por *C. difficile* não apresentarem diarreia ou qualquer outro sinal clínico. Entretanto, alguns leitões positivos para detecção das toxinas apresentam lesões intestinais quando submetidos a uma avaliação histopatológica, podendo inferir que nesta espécie parte dos animais acometidos são subclínicos, o que pode dificultar a percepção da doença em uma granja. Já em cães não existem estudos avaliando histologicamente o intestino de animais não-diarréicos e positivos para as toxinas A e B, mantendo assim a dúvida com relação à importância desse achado nesta espécie doméstica.

5.5 Comparação dos dados de pesquisa das toxinas A/B e isolamento de *Clostridium difficile* a partir das amostras de cães e leitões.

Avaliando simultaneamente o isolamento e a detecção das toxinas nas duas espécies domésticas avaliadas, podemos perceber uma baixa porcentagem de animais positivos para ambos os testes (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Comparação dos dados de detecção das toxinas A e B e de isolamento de *Clostridium difficile* em cães.

Cães	ELISA		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	4 (7%)	8 (14,1%)	12 (21,1%)
Isolamento Negativos	17 (29,8%)	28 (49,1%)	45 (78,9%)
Total	21 (36,8%)	36 (63,2%)	57 (100%)

Tabela 12 - Comparação dos dados de detecção das toxinas A e B e de isolamento de *Clostridium difficile* em leitões.

Leitões	ELISA		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	3 (5%)	9 (15%)	12 (20%)
Isolamento Negativos	7 (11,7%)	41 (68,3%)	48 (80%)
Total	10 (16,7%)	50 (83,3%)	60 (100%)

Esse resultado corrobora com o encontrado em outros trabalhos com suínos e cães (Struble et al., 1994, Yaeger et al., 2007) e tem relação com a dificuldade de isolamento do microrganismo, fazendo com que em muitos casos as toxinas A e B sejam encontradas no conteúdo fecal, mas o isolamento não ocorra. A forma vegetativa de *C. difficile* resiste pouco tempo em condições aeróbicas, sendo dependente da esporulação para que possa permanecer viável nas fezes (Buggy et al., 1983). Além disso, algumas cepas podem não crescer devido à sensibilidade a um ou a ambos antibióticos utilizados no meio seletivo (Songer e Uzal, 2005). Estes resultados reforçam a necessidade de estudos avaliando a adição de taurocolate ao CCFA para isolamento de *C. difficile* a partir de fezes de animais domésticos. Em humanos, estudos comprovaram que a inclusão deste elemento no agar seletivo aumenta a germinação do *C. difficile*, influenciando consequentemente as taxas de isolamento do agente (Wilson, 1982). Porém, o mecanismo pelo qual a adição de taurocolate influencia nas taxas de isolamento de *C. difficile* é ainda obscuro.

Recentemente, *C. difficile* foi isolado de alimentos prontos para o consumo, como saladas e alguns tipos de carnes. A grande maioria dos isolados pertenciam aos mesmos ribotipos comumente encontrados em casos de diarreia por *C. difficile* em humanos e animais domésticos (Rodriguez-Palacios et al., 2007; Bakre et al., 2009; Songer et al., 2009). É importante observar que os dois ribotipos mais comuns em cães e suínos, que correspondem a respectivamente por 90 e 80% dos isolados destas espécies, são ribotipos reconhecidos como causadores de infecções em humanos (Arroyo et al., 2007). Esses trabalhos levantam, portanto, a hipótese das infecções por *C. difficile* como uma doença zoonótica. Deve-se ressaltar, porém, que mais estudos são necessários para esclarecer a epidemiologia e a transmissão desse agente entre humanos e animais.

Mais estudos são necessários para avaliar a distribuição e o papel dos diferentes tipos toxigênicos de *C. difficile* em leitões. Uma futura avaliação da concentração inibitória mínima das estirpes isoladas no presente estudo poderia ser de grande valia, esclarecendo assim a sensibilidade das

amostras de *C. difficile* aos principais antimicrobianos e promotores de crescimento utilizados na suinocultura nacional e na clínica de pequenos animais.

6. CONCLUSÕES

A PCR multiplex demonstrou ser adequada para confirmação da identidade e avaliação dos tipos toxigênicos de *Clostridium difficile* a partir de colônias isoladas.

Por meio do ELISA, foi possível detectar as toxinas A e B de *Clostridium difficile* nas fezes de suínos e cães.

Em ambas as espécies, muitos animais aparentemente saudáveis apresentaram-se positivos para a presença das toxinas, chamando atenção para a possibilidade da ocorrência da doença na forma subclínica e também para necessidade de avaliação da sensibilidade e especificidade dos kits de ELISA disponíveis no mercado brasileiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL SAIF, N.; BRAZIER, J.S. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol.* v.45, n.2, p.133-137, 1996.

ALFA, M.J.; KABANI, A.; LYERLY, D. et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, v.38, n.7, p.2706-2714, 2000.

ALVAREZ-PEREZ, S.; BLANCO, J.L.; BOUZA, E. et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet Microbiol*, v.137, n.4, p.302-305, 2009.

ANDERSON, M.A.; SONGER, J.G. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Vet Microbiol*, v.128, p.204-206, 2008.

ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Med Microbiol.* v.54, p.163-166, 2005.

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

AVBERSEK, J.; JANEZIC, S.; PATE, M. et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, v.15, n.6, p.252-255, 2009.

BANO, L.; BASUNI, L.; COCCHI, M. et al. Prevalence and Molecular Characterization of *Clostridium difficile* isolated from rabbits and detection of its main toxins. In: World Rabbit Congress. 9. 2008.

BARBUT, F.; KAJZER, C.; PLANAS, N. et al. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol.* v.31, n.4, p.963-967, 1993.

BARTLETT J.G.; CHANG T.W. et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, v.298, n.10, p.531-4, 1978a.

BARTLETT, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*, v.15, n.4, p.573-581, 1992.

BARTLETT, J.G.; CHANG, T.W.; MOON, N. et al. Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing Clostridia. *Am J Vet Res*, v.39, n.9, p.1525-1530, 1978b.

BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G. et al. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotype of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol*, v.100, p.11-16, 2004.

- BAVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q*, v.24, n.4, p.203-219, 2002.
- BÄVERUD, V.; FRANKLIN, A.; GUNNARSSON, A. et al. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J*. v.30, n.6, p.482-488, 1998.
- BEAUGERIE L.; FLAHAULT, A.; BARBUT, F. et al. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther*. v.17, n.7, p.905-912, 2003.
- BENTLEY, A.H.; PATEL, N.B.; SIDORCZUK, M. et al. Multicentre evaluation of a commercial test for the rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-mediated antibiotic-associated diarrhoea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v.17, n.11, p.788-790, 1998.
- BERRY, A.P.; LEVETT, P.N. Chronic diarrhoea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *Vet Rec*. v.118, n.4, p.102-103, 1986.
- BIDET, P.; BARBUT, F.; LALANDE, V. et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett*. v.175, n.2, p.261-266, 1999.
- BORRIELLO, S.P.; HONOUR, P. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *J Clin Pathol*. v.34, n.10, p.1124-1127, 1981.
- BORRIELLO, S.P.; HONOUR, P.; TURNER, T. et al. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *J Clin Pathol*. v.36, n.1, p.84-87, 1983.
- BUGGY, B.P.; WILSON, K.H.; FEKETY, R. Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. *J Clin Microbiol*. v.18, n.2, p.348-352, 1983.
- CHOUICHA, N.; MARKS, S.L. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *J Vet Diagn Invest*, v.18, n.2, p.182-188, 2006.
- CIESLA, W.P.; BOBAK, D.A. *Clostridium difficile* toxins A and B are cation-dependent UDP-glucose hydrolases with differing catalytic activities. *J Biol Chem*. v.273, n.26, p.16021-16026, 1998.
- CLOOTEN, J.; KRUTH, S.; ARROYO, L. et al. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet Microbiol*, v.129, n.2, p.209-214, 2008.
- CORTHIER, G.; MULLER, M.C.; WILKINS, T.D. et al. Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun*, v.59, n.3, p.1192-1195, 1991.
- DE GIROLAMI, P.C.; HANFF, P.A.; EICHELBERGER, K. et al. Multicenter evaluation of a new enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* enterotoxin A. *J Clin Microbiol*. v.30, n.5, p.1085-1088, 1992.
- DELMEÉ, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.
- DHALLUIN, A.; LEMÉE, L.; PESTEL-CARON, M. et al. Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (*tpi*) gene. *Syst Appl Microbiol*, v.26, n.1, p.90-96, 2003.
- DOERN, G.V.; COUGHLIN, R.T.; WU, L. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays. *J Clin Microbiol*. v.30, n.8, p.2042-2046, 1992.

- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato*. 4. ed. São Paulo: Manole, 2000. 540p.
- FAWLEY, W.N.; FREEMAN, J.; SMITH, C. et al. Use of highly discriminatory fingerprinting to analyze clusters of *Clostridium difficile* infection cases due to epidemic ribotype 027 strains. *J Clin Microbiol*, v.46, n.3, p.954-960, 2008.
- FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, v.35, n.5, p.1258-1259, 1997.
- FEKETY, R.; SHAH, A.B. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA*. v.269, n.1, p.71-75, 1993.
- FERREIRA, C.E.; NAKANO, V.; DURIGON, E.L. et al. Prevalence of *Clostridium spp.* and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.4, p.451-455, 2003.
- GELLAD, Z.F.; JOHNSON, J.L.; MUIR, A.J. Severity of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in solid organ transplant patients. *Transplant Infectious Disease*, v.9, n.4, p.276-280, 2007.
- GEORGE, R.H.; SYMONDS, J.M.; DIMOCK, F. et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J*, v.18, n.1, p.695, 1978.
- GEORGE, W.L.; SUTTER, V.L.; CITRON, D. et al. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. v.9, n.2, p.214-219, 1979.
- GOMES, A.M. *Isolamento e tipificação genotípica de Clostridium perfringens em frangos de corte*. 2007. 38f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária da UFMG.
- GONÇALVES, C.; DECRÉ, D.; BARBUT, F. et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, v.42, n.5, p.1933-1939, 2004.
- GÜRTLER, V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J Gen Microbiol*. v.139, n.12, p.3089-3097, 1993.
- GURWITH, M.J.; RABIN, H.R.; LOVE, K. Diarrhea associated with clindamycin and ampicillin therapy: preliminary results of a cooperative study. *J Infect Dis*, v.135, 104-110, 1977.
- HALL, I.C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants. *Am J Dis Child*, v.49, p.390-402, 1935.
- HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol* v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.
- JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis*, v.14, n.7, p.1039-45, 2008.
- JOHNSON, S.; ADELMANN, A.; CLABOTS, C.R. et al. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. *J Infect Dis*, v.159, n.2, p.340-343, 1989.
- JONES, M.A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *The Veterinary Record*, v.112, n.11, p.253, 1983.
- JONES, R.L.; ADNEY, W.S.; SHIDELER, R.K. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. *J Clin Microbiol*. v.25, n.7, p.1225-1227, 1987.

- KEEL, K.; BRAZIER, J.S.; POST, K.W. et al. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol*, v.45, n.6, p.1963-1964, 2007.
- KEEL, M.K.; SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet Pathol*, v.43, n.3, p.225-240, 2006.
- KUIJPER, E.J.; DE WEERDT, J.; KATO, H. et al. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.20, n.8, p.528-534, 2001.
- KYNE, L.; WARNY, M.; QAMAR, A. et al. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*, v.342, n.6, p.390-397, 2000.
- LEFEBVRE, S.L.; ARROYO, L.G.; WEESE, J.S. Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. *Emerg Infect Dis*, v.12, n.6, p.1036-1037, 2006.
- LEMÉE, L.; DHALLUIN, A.; TESTELIN, S. et al. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, v.42, n.12, p.5710-5714, 2004.
- LYERLY, D.M.; KRIVAN, H.C.; WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev*, v.1, n.1, p.1-18, 1988.
- LYERLY, D.M.; NEVILLE, L.M.; EVANS, D.T. et al. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* tox A/B test. *J Clin Microbiol*, v.36, n.1, p.184-190, 1998.
- MACLEOD-GLOVER, N.; SADOWSKI, C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Canadian Family Physician*, v. 56, n.5, p.417-23, 2010.
- MARKS, S.L.; KATHER, E.J.; KASS, P.H. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med*, v.15, n.5, p.533-540, 2002.
- MARTINS, A.M.C.R.P.F.; LEME, M.C.M.; HIPOLITO, M. et al. Descrição de um caso de enterocolite pseudomembranosa em bovino. *Arq. Inst. Biol.*; São Paulo, v.68, n.1, p.119-121, 2001.
- OSSIPRANDI, M.C.; BUTTRINI, M.; BOTTARELLI, E. et al. Preliminary molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates from healthy horses in northern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, Ahead of Print, 2010.
- PERRIN, J.; BUOGO, C.; GALLUSSER, A. et al. Intestinal carriage of *Clostridium difficile* in neonate dogs. *Zentralbl Veterinarmed B*, v.40, n.3, p.222-226, 1993.
- PERSSON, S.; TORPDAHL, M.; OLSEN, K.E.P. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect*, v.14, p.1057-1064, 2008.
- PINTO, L.J.; ALCIDES, A.P.; FERREIRA, E.O. et al. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol*, v.52, p.1095-1099, 2003.
- POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest*, v.14, n.3, p.258-259, 2002.
- RILEY, T.V.; ADAMS, J.E.; O'NEILL, G.L. et al. Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiol Infect*, v.107, n.3, p.659-665, 1991.

- RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STAEMPFLI, H.R.; DUFFIELD, T. et al. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis*, v.13, n.3, p.485-487, 2007.
- RUPNIK, M.; BRAZIER, J.S.; DUERDEN, B.I. et al. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology*. v.147, p.439-447, 2001.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; DALE, N. Gerding. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* v.7, p.526-536, 2009.
- SAMBOL, S.P.; MERRIGAN, M.M.; LYERLY, D. et al. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infect Immun*, v.68, n.10, p.5480-5487, 2000
- SAMIE, A.; OBI, C.L.; FRANASIAK, J. et al. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (tpi), toxin A (tcdA), toxin B (tcdB), binary toxin (cdtA, cdtB), and tcdC genes in Vhembe District, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*. v.78, n.4, p.577-585, 2008.
- SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog*, v.5, n.10, e1000626, 2009.
- SEBALD, M.; PETIT, J.C. *Identification des Clostridium species. Méthodes de laboratoire bactéries anaérobies et leur identification*. 2.ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. p.262-263.
- SHIM, J.K.; JOHNSON, S.; SAMORE, M.H. et al. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet*. v.351, n.9103, p.633-636, 1998.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, v.140, p.399-404, 2010.
- SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev*, v.5, n.2, p.321-326, 2004.
- SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1-4, 2006
- SONGER, J.G.; JONES, R.; ANDERSON, M.A. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Vet Microbiol*, v.124, n.4, p.358-361, 2007.
- SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; KILLGORE, G.E. et al. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, v.15, n.5, p.819-821, 2009.
- SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest*, v.17, n.6, p.528-536, 2005.
- STRUBLE, A.L.; TANG, Y.J.; KASS, P.H. et al. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*, v.6, n.3, 342-347, 1994.
- STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M. et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Letters*, v.186, p.307-312, 2000.
- STUBBS, S.L.; BRAZIER, J.S.; O'NEILL, G.L. et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol*. v.37, n.2, p.461-463, 1999.

- SWARTZBERG, J.E.; MARESCA, R.M.; REMINGTON, J.S. Clinical study of gastrointestinal complications associated with clindamycin therapy. *J Infect Dis*, v.135, S.99-103, 1977.
- TEDESCO F.J.; BARTON, R.W.; ALPERS, D.H. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med*, v.81, n.4, p.429-33, 1974.
- VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Microbiol*. v.27, n.4, p.289-300, 2009.
- VAN DEN BERG, R.J.; CLAAS, E.C.; OYIB, D.H. et al. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *J Clin Microbiol*. v.42, n.3, p.1035-1041, 2004.
- VANPOUCKE, H.; DE BAERE, T.; CLAEYS, G. et al. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect*. v.7, n.2, p.55-64, 2001.
- VIEIRA, A.A.S. *Padronização e aplicação da técnica de PCR de amplificação múltipla (PCR Multiplex) na tipificação de Clostridium perfringens isolados de suínos*. 2006. 43f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária da UFMG.
- VOTH D.E.; BALLARD J.D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, v.18, n.2, p.247-263, 2005.
- WARD, S.J.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. et al. Local and systemic neutralizing antibody responses induced by intranasal immunization with the nontoxic binding domain of toxin A from *Clostridium difficile*. *Infect Immun*, v.67, n.10, p.5124-5132, 1999.
- WEESE, J.S.; ARMSTRONG, J. Outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a small animal veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med*. v.17, n.6, p.813-816, 2003.
- WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*, v.12, n.5, p.449-452, 2000a.
- WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest*. v.12, v.4, p.332-336, 2000b.
- WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. et al. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med*, v.15, n.4, p.374-378, 2001a.
- WEESE, J.S.; WEESE, H.E.; BOURDEAU, T.L. et al. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *J Am Vet Med Assoc*. v.18, n.9, p.1436-1439, 2001b.
- WILSON, K.H.; KENNEDY, M.J.; FEKETY, F.R. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. v.15, n.3, p.443-446, 1982.
- YAEGER, M.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*. v.14, n.4, p.281-287, 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. *J Vet Diagn Invest*, v.19, v.1, p.52-59, 2007.