

Felipe Masiero Salvarani

**CLOSTRÍDIOS ENTÉRICOS DE LEITÕES NEONATOS,
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA EXPERIMENTAL**

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Co-Orientadores: Prof. Israel José da Silva

Prof. Roberto Maurício de Carvalho Guedes

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2011

SI82c Salvarani, Felipe Masiero, 1982-
Clostrídios entéricos de leitões neonatos, desenvolvimento e avaliação de
uma vacina experimental / Felipe Masiero Salvarani. -2011.
62 p. : il.

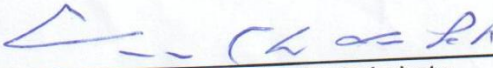
Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Co-orientadores: Israel José da Silva, Roberto Maurício de Carvalho
Guedes

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária
Inclui bibliografia

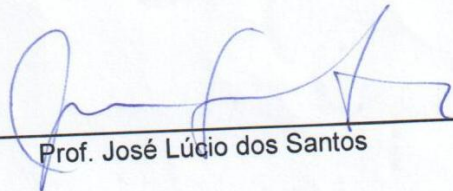
1. Leitão (Suíno) - Doenças - Teses. 2. Diarreia em animais - Teses.
3. Clostridium - Teses. 4. Vacina veterinária - Teses. I. Lobato, Francisco
Carlos Faria. II. Silva, Israel José da. III. Guedes, Roberto Maurício de
Carvalho. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
V. Título.

CDD - 636.408 96

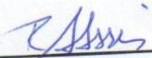
Tese defendida e aprovada em 25 de novembro de 2011 pela Comissão Examinadora constituída por:



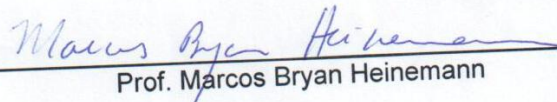
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente



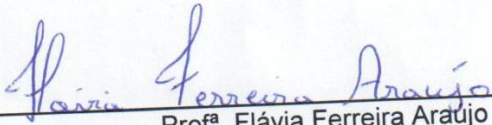
Prof. José Lúcio dos Santos



Prof. Ronnie Antunes de Assis



Prof. Marcos Bryan Heinemann



Prof.ª Flávia Ferreira Araújo

DEDICATÓRIA

Dedico mais esta conquista aos meus Pais, Maria José Masiero Salvarani e Luiz Fábio Salvarani, pelo exemplo, amor e por renunciarem aos seus sonhos para tornar os meus realidade.

Ao meu irmão, que meus passos o inspirem a lutar pelos seus ideais.

As todos os meus familiares, em especial minha avó Nair, por todo amor a mim dedicado e por sempre acreditarem que eu seria capaz!

Aos animais, minha grande paixão e constante fonte de inspiração.

E a DEUS por nunca permitir que eu desistisse do meu grande sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Francisco Lobato, por ser além de meu orientador e exemplo profissional, um segundo pai guiando meus passos na vida acadêmica, científica e pessoal.

Aos professores Israel da Silva e Roberto Guedes pela valiosa co-orientação, ensinamentos e por me mostrarem que na vida nada sem esforço e dedicação tem valor.

Aos professores Flávia Ferreira, José Lúcio e Marcos Bryan pelas contribuições e valorização do meu trabalho.

Ao Dr. Ronnie Antunes de Assis pela amizade, presteza, incentivo e valorização pessoal.

À professora Zélia Lobato pelo carinho e reconhecimento.

Ao professor Marcos Xavier pela amizade e ajuda na análise estatística e interpretação dos resultados.

Aos professores Rômulo Cerqueira, Romário Cerqueira e Marília Martins pela amizade, incentivo e reconhecimento da minha capacidade.

Aos amigos Eduardo Coulaud, Rodrigo Otávio, Luis Fonte Boa e Isabella Albefaro por todo apoio na realização do experimento e, principalmente, por terem acreditado nesse projeto.

Aos alunos de mestrado do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa Prhiscylla Sadanã, Ana Teixeira e Guilherme Guerra e aos alunos de Iniciação Científica Lucas Queiroz, Marina Carvalho, Carlos Augusto, Amanda Diniz e Laura Bernardes, pela ajuda, incentivo, paciência, respeito e amizade.

Às "meninas" dos Laboratórios de Vírus, em especial, Fábica Campos, Tércia Ludolfo, Priscilla Gerber, Amanda Soriano, Izabelle Rehfeld, Ana Carolina Diniz, Maria Izabel Guedes, Gissandra Braz, Daniela Rajão e Fernanda Morcati pelo excelente convívio, amizade e risadas.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Grazielle Cossenoso, Eduardo Nogueira, Graciela Kunrath, Anita Luciano, Nádia Maria da Silva, Renata Canhestro e Mirli Roza pela dedicação ao trabalho, ajuda e amizade.

Aos funcionários do Colegiado de Pós Graduação em Ciência Animal, em especial Deborah Monteiro e Luzete Ornelas, pela dedicação ao trabalho, paciência e amizade.

Ao amigo Antônio Augusto Fonseca Júnior, representando aqui todos os funcionários do LANAGRO/MG.

Aos grandes amigos Juliana Lobato, Kenia Fonseca, Julia Angélica, Luciana Aramuni, Monique Neves, Luana Campos, Mariana Martins, Eduardo Palmieri, Eduardo Lara, Luciana Salles e Lucas Paim por acreditarem e me incentivarem nessa empreitada.

A minha família de Palma por todo carinho, apoio e por sempre acreditarem que eu seria capaz!

Ao CNPq pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

E a todos que não citei o nome, mas que foram essenciais para realização de mais este sonho.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. LITERATURA CONSULTADA	15
2.1 <i>Clostridium difficile</i>	15
2.1.1 Agente.....	15
2.1.2 Toxinas.....	15
2.1.3 Doença.....	16
2.1.4 Diagnóstico	17
2.1.5 Tratamento.....	18
2.2 <i>Clostridium perfringens</i>	18
2.2.1 Agente.....	18
2.2.2 Toxinas.....	18
2.2.3 <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.....	19
2.2.4 <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	21
2.3 Antibióticos na suinocultura	22
2.4 Diarreia.....	24
2.5 Imunidade em leitões	26
3. OBJETIVO GERAL	28
3.1. Objetivos específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Local de realização do experimento	28
4.2 Animais	29
4.2.1 Leitões utilizados para coleta das amostras.....	29
4.2.2 Coelho, porcas e leitões utilizados para avaliação da vacina experimental.....	29
4.2.3 Camundongos.....	29
4.3 Isolamento e identificação de <i>Clostridium difficile</i>	29
4.4 Isolamento e identificação de <i>Clostridium perfringens</i>	30
4.5 PCR Multiplex para genotipificação de <i>Clostridium difficile</i>	30
4.6 PCR Multiplex para tipificação de <i>Clostridium perfringens</i>	31
4.7 Sequenciamento do gene <i>cpb2</i>	32
4.8 Detecção qualitativa das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	32
4.9 Concentração inibitória mínima das amostras de <i>Clostridium perfringens</i> isoladas	33
4.9.1 Antimicrobianos.....	33
4.9.2 Plaqueamento das amostras em ágar sangue	33
4.9.3 Leitura e interpretação do teste	33
4.10 Estudo histopatológico.....	33
4.11 Produção da vacina experimental polivalente	33

4.11.1 Toxóide alfa de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A	33
4.11.2 Toxóide beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	34
4.11.3 Toxóide A/B de <i>Clostridium difficile</i>	34
4.11.3.1 Produção das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	34
4.11.3.2 Cultivo da amostra	34
4.11.3.3 Produção e concentração das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	34
4.11.3.4 Tipificação das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	34
4.11.3.5 Titulação <i>in vitro</i> das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	35
4.11.3.6 Dosagem protéica	35
4.11.3.7 Inativação das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	35
4.11.4 Adição do hidróxido de alumínio.....	35
4.11.5 Teste de esterilidade.....	35
4.11.6 Teste de inocuidade.....	35
4.11.7 Vacinação dos animais	36
4.11.8 Sangria dos animais e obtenção dos soros	36
4.11.9 Titulação dos soros	36
4.11.9.1 Padronização da soroneutralização das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i> em Célula	36
4.11.9.1.1 Linhagem celular.....	36
4.11.9.1.2 Meios, soluções e reagentes do cultivo celular	36
4.11.9.1.3 Padronização <i>in vitro</i> das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	36
4.11.9.1.4 Titulação de antitoxina A/B de <i>Clostridium difficile</i> de soros de coelhos, porcas e leitões por meio da técnica de soroneutralização <i>in vitro</i>	37
4.11.9.2 Titulação de antitoxina alfa de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A de soros de coelhos, porcas e leitões por meio da técnica de soroproteção em camundongos	37
4.11.9.3 Titulação de antitoxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C de soros de coelhos, porcas e leitões por meio da técnica de soroneutralização em camundongos	38
4.12 Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSÃO	38
5.1 Isolamento, identificação e genotipificação de <i>Clostridium difficile</i> , detecção das toxinas A/B, macroscopia e histopatologia	38
5.2 Isolamento, quantificação, identificação e tipificação de <i>Clostridium perfringens</i> , histopatologia e sequenciamento do gene <i>cpb2</i>	44
5.3 Concentração inibitória mínima das amostras de <i>Clostridium perfringens</i>	48
5.4 Produção e avaliação da vacina experimental polivalente	51
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos diferentes tipos de <i>Clostridium perfringens</i>	18
Tabela 2: Iniciadores utilizados na PCR Multiplex para genotipificação de <i>Clostridium difficile</i>	30
Tabela 3: Iniciadores utilizados na PCR Multiplex para tipificação de <i>Clostridium perfringens</i>	31
Tabela 4: Iniciadores utilizados no sequenciamento do gene <i>cpb2</i> de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A	32

Tabela 5: Número de colônias de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A em UFC por grama de fezes, isoladas de leitões de zero a sete dias, com e sem diarreia	47
Tabela 6: Distribuição da concentração inibitória mínima em micrograma por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos 15 antimicrobianos frente as 50 amostras de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A isoladas de leitões de até sete dias de vida, com e sem diarreia	48
Tabela 7: Distribuição da concentração inibitória mínima 50 (CIM_{50}) e concentração inibitória mínima 90 (CIM_{90}) em micrograma por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos 15 antimicrobianos frente às 23 amostras de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A isoladas de leitões com diarreia, e às 27 amostras de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A isoladas de leitões sem diarreia.	49
Tabela 8: Distribuição da concentração inibitória mínima 50 (CIM_{50}) e concentração inibitória mínima 90 (CIM_{90}) em micrograma por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos 15 antimicrobianos frente às 31 amostras de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, <i>cpb2</i> positivas, e às 19 amostras de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, <i>cpb2</i> negativas, isoladas de leitões com e sem diarreia.	50
Tabela 9: Nível de anticorpos neutralizantes em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de antitoxina alfa, antitoxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> e antitoxina A/B de <i>Clostridium difficile</i> em soros de porcas imunizadas.	52
Tabela 10: Nível de anticorpos neutralizantes em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de antitoxina alfa, antitoxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> e antitoxina A/B <i>Clostridium difficile</i> de em pool de soro de leitegadas das porcas imunizadas.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 2% da PCR Multiplex de <i>Clostridium difficile</i> . .	40
Figura 2: Leitão apresentando edema de mesocólon (setas).	41
Figura 3: Cólon de leitão.	43
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR Multiplex de <i>Clostridium perfringens</i>	45
Figura 5: Alinhamento dos aminoácidos codificados pelos gene <i>cpb2</i> isolados dos leitões com e sem diarreia.	46
Figura 6: SDS-PAGE 12% da purificação mediante cromatografia de afinidade das toxinas alfa e beta de <i>Clostridium perfringens</i> produzidas em <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 7: SDS-PAGE 7,5% das toxinas A/B de <i>Clostridium difficile</i>	51

ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH)₃ = Hidróxido de alumínio
AMPc = Monofostato de adenosina cíclico
ATCC = American Type Culture Collection
ATP = Triofosfato de adenosina
BHI = Caldo cérebro coração
Ca⁺² = Íon cálcio
CCFA = Ágar cicloserina cefoxitina frutose
CDT = Toxina binária
CDTec = Centro de Desenvolvimento Tecnológico
CETEA = Comitê de ética em experimentação animal
CFTR = Regulador transmembrana da fibrose cística
CHO = Chinese Hamster Ovary
CIM = Concentração inibitória mínima
CIM₅₀ = Concentração inibitória mínima 50%
CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima 90%
Cl⁻ = Íon cloro
CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute
CO₂ = Dióxido de carbono
DB = Danbred
DNA = Ácido desoxirribonucléico
DO = Densidade ótica
ECP = Efeito citopático
ETEC = *Escherichia coli* enterotoxigênica
EV/UFMG = Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
g = grama
GMPc = Guanosina monofostato cíclico
H⁺ = Íon hidrogênio
H₂ = Hidrogênio
H₂O = Água
HCO₃⁻ = Íon bicarbonato
IgA = Imunoglobulina A
IgG = Imunoglobulina G
IgM = Imunoglobulina M
IL-8 = Interleucina 8
IM = Intramuscular
kDa = Quilodalton
kg = quilograma
KHPO₄ = Fosfato de potássio
LANAGRO/MG = Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM = Meio essencial mínimo
mg = Miligrama
mL = Mililitro
N₂ = Nitrogênio
Na⁺ = Íon sódio
Na₂HPO₄H₂O = Fosfato de sódio uma água
NaCl = Cloreto de sódio
NHE = Canais de trocas dos íons sódio e hidrogênio
NIBSC = National Institute for Biological Standards and Control
nm = Nanômetro
°C = Graus Celsius
ORFs = Open reading frame

PABA = Ácido para-aminobenzóico
PBS = Tampão salina fostato
PCR = Reação em cadeia da polimerase
PGE2 = Prostaglandina E2
PKA = Proteína quinase
SDS = Sódium deodecyl sulfato
SFB = Soro fetal bovino
SINDAN = Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SNE = Sistema nervoso entérico
SPS = Ágar específico para *Clostridium perfringens*
STV = Solução de tripsina versene
TE = Tris EDTA
TNF α = Fator de necrose tumoral alfa
UI/mL = Unidades internacionais por mililitro
VERO = African Green Kidney Monkey
VIP = Peptídeo intestinal vasoativo
 $\mu\text{g/mL}$ = Micrograma por mililitro
 μL = Microlitro

RESUMO

O envolvimento dos clostrídios como agentes causadores de diarreia em leitões neonatos tem crescido no mundo todo. No Brasil, são escassos os relatos da ocorrência de *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* tipos A e C como causadores de diarreia em leitões, devido à ausência de diagnóstico laboratorial destes agentes. Diante deste quadro, os objetivos desse estudo foram determinar a frequência dos clostrídios entéricos que acometem leitões neonatos com até sete dias de vida, em granjas comerciais acima de 500 matrizes, localizadas na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, no estado de Minas Gerais, Brasil; e desenvolver e avaliar uma vacina polivalente, contendo os toxóides alfa de *C. perfringens* tipo A, beta de *C. perfringens* tipo C e A/B de *C. difficile*. Dos 60 animais utilizados neste trabalho, em 12 (20%) foi possível isolar e genotipificar *C. difficile* a partir das fezes, sendo cinco (41,7%) do grupo diarreico e sete (58,3%) do grupo não diarreico. Na interpretação dos dados da detecção qualitativa das toxinas A/B de *C. difficile* pelo ELISA, observou-se que dos 60 animais analisados em 10 (16,7%) foi possível a identificação das toxinas. Destes 10 leitões, sete (70%) eram do grupo diarreico e os outros três (30%) do grupo não diarreico. Na necropsia, 13 leitões (21,67%) apresentaram edema de mesocólon, principal alteração macroscópica associada com a infecção por *C. difficile*. Dos 13 animais que apresentavam edema de mesocólon, oito (61,54%) eram do grupo diarreico e os outros cinco (38,46%) do grupo não diarreico. À microscopia, 16 animais apresentaram lesões histopatológicas, caracterizadas por lesões inflamatórias. Destes 16 leitões, sete (43,75%) apresentavam o quadro clínico de diarreia e outros nove (56,25%) eram não diarreicos. Dos 60 animais utilizados neste trabalho, em 50 (83,3%) foi possível isolar colônias características de *C. perfringens* a partir das fezes. Com a tipificação destas amostras, observou-se que todas eram *C. perfringens* tipo A. Destas 50 amostras de *C. perfringens* tipo A, 23 (46%) foram isoladas de animais com diarreia e 27 (54%) isoladas de animais aparentemente saudáveis. Em 37 (74%) amostras de *C. perfringens* tipo A isoladas, foi detectada a presença do gene *cpb2*, codificador da toxina beta-2. O resultado do seqüenciamento do gene *cpb2* revelou que apenas 10 amostras, oito do grupo não diarreico e duas do grupo diarreico, apresentavam uma mutação no gene *cpb2*+ que gerava uma proteína truncada sem ação efetiva. As outras 21 amostras, 12 do grupo diarreico e nove do grupo não diarreico, não apresentavam a mutação, permitindo assim a tradução normal da toxina beta-2. Não foi isolada nenhuma amostra de *C. perfringens* tipo C. A concentração inibitória mínima (CIM) estabelecida frente às amostras de *C. perfringens* tipo A demonstrou que amoxicilina, ceftiofur e a narasina, foram os antimicrobianos que apresentaram a melhor atividade inibitória. A vacina experimental polivalente contendo os toxóides alfa recombinante, beta recombinante e A/B nativo foi eficiente em estimular títulos de anticorpos neutralizantes nos animais estudados, demonstrando poder ser uma importante ferramenta para o controle das diarreias causadas por clostrídios na maternidade.

Palavras chave: *Clostridium difficile*; *Clostridium perfringens* tipo A; ELISA; concentração inibitória mínima; vacina; diarreia; leitão

ABSTRACT

The involvement of clostridia as agents causing diarrhea in neonatal piglets has grown worldwide. In Brazil there are few reports of the occurrence of *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* types A and C causing diarrhea in piglets due to the lack of laboratory diagnosis of these agents. Given this situation, the aims of this study were to determine the frequency of enteric clostridia affecting newborn piglets with up to seven days, on commercial farms over 500 sows, located in the Triangulo Mineiro and Alto Paranaíba, state of Minas Gerais, Brazil; and develop and evaluate a polyvalent vaccine containing the alpha toxoid of *C. perfringens* type A, beta toxoid of *C. perfringens* type C and A/B toxoid of *C. difficile*. Of the 60 animals used in this work, it was possible to isolate *C. difficile* from the feces of 12 (20%), five (41.7%) of the diarrheal group and seven (58.3%) of the group without diarrhea. When interpreting the data from the qualitative detection of toxins A/B of *C. difficile* by ELISA, it showed that of the 60 animals analyzed, 10 (16.7%) allowed the identification of toxins. Of these 10 piglets, seven (70%) were from the diarrheal group and the other three (30%) from the group without diarrhea. At necropsy, 13 piglets (21.67%) had mesocolon edema, the main macroscopic change associated with infection of *C. difficile*. Of the 13 animals that had mesocolon edema, eight (61.54%) were from the diarrheal group and the other five (38.46%) without diarrhea. Microscopically, 16 animals showed histopathological lesions characterized by inflammatory lesions. Of these 16 piglets, seven (43.75%) had clinical cases of diarrhea and other nine (56.25%) were non-diarrheal. Of the 60 animals used in this study, it was possible to isolate characteristic colonies of *C. perfringens* from the feces of 50 (83.3%). With the characterization of these samples, we found that all were *C. perfringens* type A. Of these 50 strains of *C. perfringens* type A, 23 (46%) were isolated from animals with diarrhea and 27 (54%) isolated from apparently healthy animals. In 31 (62%) strains of *C. perfringens* type A isolated, we detected the presence of *cpb2* gene, encoding the beta-2 toxin. The result of the sequencing of the *cpb2* gene revealed that only 10 samples, eight from the diarrheic group and two from the non-diarrheic group, have a mutation in the gene *cpb2* that generated a truncated protein without effective action. The other 21 samples, 12 from the diarrheal group and nine from the group without diarrhea, didn't have the mutation, thereby allowing normal translation of beta-2 toxin. There was not a single sample of *C. perfringens* type C. The minimal inhibitory concentration (MIC) of *C. perfringens* type A strains has shown that amoxicillin, ceftiofur and narasin were the antimicrobials which had the best inhibitory activity. The polyvalent vaccine containing recombinant toxoids recombinant alpha, beta and native A/B was effective in stimulating neutralizing antibodies in animal studies. Therefore this vaccine proved to be an important tool for controlling diarrhea caused by clostridia.

Keywords: *Clostridium difficile*; *Clostridium perfringens* tipo A; ELISA; minimum inhibitory concentration; vaccine; diarrhea; piglet.

1. INTRODUÇÃO

As atividades relacionadas à suinocultura ocupam lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio brasileiro, destacando-se como uma atividade de importância no âmbito econômico e social. Segundo estimativas, mais de 730 mil pessoas dependem diretamente da suinocultura, sendo essa atividade responsável pela renda de mais de 2,7 milhões de pessoas. Em termos econômicos, a suinocultura não contribui apenas por meio de sua dinâmica econômica interna, mas também por meio da geração de divisas via mercado externo.

Entre as atividades adotadas para maximizar a produção suinícola nas últimas décadas, sobressai uma substituição progressiva das criações extensivas por intensivas, com uma maior densidade animal. Neste novo contexto, as diarreias, principalmente na primeira semana de vida do leitão, ganharam grande importância, por causarem aumento significativo da mortalidade, piora na conversão alimentar e ganho de peso diário, além de gastos excessivos com medicamentos. Com relação à morbidade, em um estudo realizado com 712 granjas nos Estados Unidos, observou-se que a diarreia foi a principal causa de doença em leitões na maternidade, sendo que 65% de todos os casos ocorreram na primeira semana de vida e, desses, 42% ocorreram nos primeiros três dias de vida do leitão.

Os principais agentes causadores de diarreia neonatal suína podem ser divididos em: virais (rotavírus e coronavírus), bacterianos (*Escherichia coli*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* tipos A e C) e parasitários (*Isospora suis*, *Eimeria sp.* e *Cryptosporidium sp.*). Na última década nos Estados Unidos, vem sendo observada uma mudança no perfil dos principais agentes causadores de diarreia neonatal. Há alguns anos, rotavírus, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *I. suis* eram diagnosticados como os agentes mais frequentes envolvidos nessa diarreias. Entretanto, nos dias atuais, esses micro-

organismos apresentam baixa importância, dando lugar aos organismos emergentes como é o caso do *C. difficile* e *C. perfringens* tipos A e C.

O envolvimento dos clostrídios como agentes causadores de diarreia em leitões neonatos tem crescido no mundo todo, e alguns trabalhos demonstram que esses micro-organismos anaeróbios são responsáveis por até 30% das enterites neonatais e por 50% das diarreias neonatais em suínos. No Brasil, são escassos os relatos da ocorrência de *C. difficile* e *C. perfringens* tipos A e C como causadores de diarreia em leitões, devido à ausência de diagnóstico laboratorial destes agentes. Isto demonstra a necessidade do desenvolvimento e padronização de técnicas para que seja determinada a real prevalência e importância desses micro-organismos na suinocultura nacional.

A prevenção e o controle das diarreias causadas por clostrídios na maternidade são baseados principalmente em medidas sistemáticas de manejo, higiene e desinfecção, associadas com a vacinação das porcas no pré-parto a fim de transferir imunidade aos leitões via colostro. No Brasil, existem apenas duas vacinas registradas junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo a composição das mesmas restrita ao toxóide beta de *C. perfringens* tipo C. A ausência de imunobiológicos específicos no mercado nacional dificulta o controle das infecções causadas por esses agentes, e determinam prejuízos aos suinocultores, pelo aumento das taxas de morbidade, mortalidade e animais refugos.

Diante da crescente ocorrência no Brasil de diarreia em leitões na fase de maternidade sem diagnóstico conclusivo e com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, suspeita-se fortemente do envolvimento destes agentes anaeróbios. Diante deste quadro, os objetivos deste estudo foram isolar os clostrídios entéricos que acometem leitões neonatos com até sete dias de vida, em 15 granjas comerciais acima de 500 matrizes, localizadas na região do Triângulo Mineiro e

Alto Paranaíba, no estado de Minas Gerais, Brasil; e desenvolver e avaliar uma vacina polivalente, contendo os toxóides alfa de *C. perfringens* tipo A, beta de *C. perfringens* tipo C e A/B de *C. difficile*.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 *Clostridium difficile*

2.1.1 Agente

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio obrigatório que pode esporular em condições adversas. Habitante comum do solo, água e do intestino de mamíferos, aves e répteis, tem sido responsabilizado por desordens entéricas em diversas espécies como homem, suínos, cães, gatos, roedores de laboratório e equinos (Poxton et al., 2001; Post et al., 2002).

O primeiro isolamento em suínos foi realizado em dois leitões com oito semanas de vida (Jones e Hunter, 1983), porém é na primeira semana de vida que *C. difficile* é diagnosticado e considerado como um dos principais agentes de enterites neonatais em leitões. A partir deste relato, diversos autores têm descrito surtos com diferentes taxas de mortalidade e morbidade em leitões (Songer et al., 2000; Yaeger et al., 2002; Nagy e Bilkei, 2003; Songer et al., 2004; Songer e Anderson, 2006; Yaeger et al., 2007; Alvarez-Perez, et al., 2009; Baker et al., 2010). Nos Estados Unidos, a infecção por *C. difficile* é considerada na última década como a principal causa de diarreia não controlada em leitões com até sete dias de vida (Songer e Anderson, 2006).

2.1.2 Toxinas

Os genes responsáveis pela produção das toxinas A e B encontram-se em um locus de patogenicidade chamado de *PaLoc*. 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* tem alta expressão durante a fase exponencial de crescimento da bactéria, diminuindo próximo ao início 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. Especula-se que o gene *tcdE* facilite a liberação das toxinas A e B. Por isso, pesquisadores acreditam que a expressão das toxinas de *C. difficile* seja 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; Rupnik et al., 2009).

As células susceptíveis do epitélio intestinal parecem apresentar, nas microvilosidades, receptores para a exotoxina A. Ao contrário da toxina A, ainda não são conhecidos os receptores da exotoxina B e a idéia mais aceita é de que se situem na membrana basal do epitélio intestinal. Isto justificaria a necessidade da toxina A causar lesão prévia à mucosa intestinal, para que ocorra a ação da toxina B (Keel e Songer, 2006).

A toxina A é uma potente enterotoxina cuja massa molecular é 308 kDa, enquanto que a B é uma potente citotoxina com massa molecular de 270 kDa (Poxton et al., 2001). Elas são estruturalmente semelhantes e atuam sinergicamente, sendo que a toxina A se destaca por causar lesão inicial à mucosa intestinal. Assim, após perder sua completa integridade, os enterócitos se tornam susceptíveis à ação da toxina B. A toxina A, por meio de seus efeitos enterotóxicos, provoca efusão, aumento da permeabilidade intestinal e uma potente reação inflamatória aguda na mucosa, resultando em necrose tecidual, edema hemorrágico e ulceração do epitélio. A toxina B tem efeito citotóxico mais potente que a anterior e causa profundas alterações eletrofisiológicas e morfológicas na mucosa

do cólon. As duas toxinas são capazes de estimular a liberação de potentes mediadores inflamatórios, resultando num dano tecidual adicional (Kell e Songer, 2006; Kell e Songer, 2007).

Uma terceira toxina, denominada toxina binária (CDT), recentemente vem chamando atenção dos pesquisadores e clínicos. 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). A CDT é codificada em uma região separada do cromossomo, conhecido como *Cdtloc*, que compreende três genes: *cdtA* e *cdtB*, responsáveis pela codificação do componente de ligação e componente enzimático, respectivamente, e *cdtR*, que possui 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 indefinido. Em humanos, estudos relatam uma maior severidade da doença em pacientes que possuem amostras 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 amostras isoladas de animais. 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 sinais (Gonçalves et al., 2004). Além da desorganização celular, a CDT parece formar protusões nas células alvos com consequente extravasamento de material do citosol, formando uma malha densa na superfície celular que facilitaria a adesão e multiplicação de *C. difficile* no intestino (Schwan et al., 2009).

2.1.3 Doença

A diarreia causada por *C. difficile* em suínos pode estar relacionada à contaminação do leitão com os esporos do agente presente nas fezes das porcas e no ambiente da granja (Weese et al., 2010; Hopman et al.,

2011); colonização do trato alimentar; e utilização precoce de antimicrobianos de forma curativa ou preventiva. Estes fatores predisponentes causam um desequilíbrio na microbiota entérica, e *C. difficile*, como agente oportunista, coloniza, multiplica-se e produz suas toxinas, determinando o aparecimento do quadro patológico (Songer e Uzal, 2005). Estudos conduzidos por Alvarez-Perez et al. (2009) e Avbersek et al. (2009) demonstraram que o isolamento de *C. difficile* em leitões com e sem o quadro clínico de diarreia é estatisticamente igual, sugerindo assim uma alta taxa de animais com a presença do agente mas sem manifestação de diarreia.

Em geral, *C. difficile* afeta leitões entre um a sete dias de vida, e o histórico inclui diarreia pastosa a líquida, de coloração amarelada, começando logo após o nascimento; leitegada com baixo peso ao desmame; crescimento retardado e morte súbita (Songer et al., 2004). Outros sinais clínicos como aumento do volume abdominal, edema escrotal e dispnéia podem estar presentes (Waters et al., 1998).

Entre as lesões descritas, temos ascite, hidrotórax, precipitação de uratos no rim, edema no mesocólon ascendente e inflamação do ceco e cólon (Songer et al., 2000). À microscopia, é visto infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico na lâmina própria, diminuição de células caliciformes com aumento da taxa mitótica das criptas e múltiplas erosões da mucosa do cólon. Essas últimas são comumente chamadas de erosões em vulcão, decorrente da forma que assumem (Yaeger et al., 2002; Kell e Songer, 2007). Portanto, a ausência de lesões macroscópicas características da infecção por *C. difficile* é comum, assim como a não ocorrência do quadro clínico de diarreia. Entretanto, a ausência de alterações macroscópicas ou de diarreia não pode excluir a possibilidade de ocorrência futura da doença por *C. difficile* (Yaeger et al., 2007).

De acordo com os dados obtidos por Songer et al. (2004), a mortalidade gira em torno de 20% e a morbidade em torno de 50%. No Brasil, não há relatos na literatura

da associação do agente com diarreia em leitões com até sete dias de vida. Nos Estados Unidos, foi realizado o exame de 1000 leitões que apresentavam o quadro de enterite. Este trabalho demonstrou a presença das toxinas A e B de *C. difficile* em 34,1% dos leitões com até sete dias de vida, não havendo associação com nenhum outro patógeno entérico. Em 24,3% dos animais, identificaram-se as toxinas A e B em associação com a detecção de outro agente como rotavírus, *C. perfringens* tipo A e C, e *E. coli*, sendo, portanto, a infecção por *C. difficile* considerada como a principal causa de diarreia neonatal (Songer e Anderson, 2006). Ainda segundo Yaeger et al. (2007), existe a possibilidade de infecções por *C. difficile* produzirem uma forma subclínica, pois vários leitões aparentemente saudáveis são positivos para a detecção das toxinas A e B, mas apresentam lesões entéricas características nas avaliações histopatológicas.

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da diarreia causada por *C. difficile* deve ser realizado pela associação do histórico clínico, observação das lesões macroscópicas, com o diagnóstico laboratorial baseado no isolamento do agente, histopatologia para observação das lesões microscópicas, reação em cadeia da polimerase (PCR) e teste de citotoxicidade em cultivo celular ou detecção qualitativa das toxinas A e B por meio do teste de ensaio imuno-enzimático (ELISA) (Delmeé, 2001).

No isolamento em Agar Cicloserina-Cefoxitina-Frutose⁽¹⁾(CCFA), as colônias de *C. difficile* apresentam morfologia com aspecto conhecido como “vidro moído”, com colônias rizóides e irregulares, de coloração acinzentada e odor característico, semelhante ao de fezes de equinos (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). Entretanto, o isolamento

é um método de baixa especificidade e relativamente demorado, porém a adição de taurocolato ao meio seletivo permite uma melhor germinação dos esporos, aumentando a viabilidade do isolamento (Delmeé, 2001). Além disso, *C. difficile* pode ser um habitante normal da microbiota intestinal, logo só o isolamento não é indicativo da doença (Yaeger et al., 2002; Ferreira et al., 2003; Arroyo et al., 2007; Yaeger et al., 2007; Clooten et al., 2008). 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 amostras de *C. difficile* (Stubbs et al., 2000).

A detecção da presença das toxinas A e B pela visualização do efeito citopático em cultura celular é considerado como o “padrão-ouro” para diagnóstico de infecções causadas por *C. difficile* (Lyerly et al., 1998). Várias linhagens celulares podem ser utilizadas para detecção das citotoxinas, como a CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e a VERO, considerada a mais sensível (*African Green Monkey Kidney*) (Delmeé, 2001). As principais vantagens desta técnica são a alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, o resultado é demorado e são processadas poucas amostras por vez, quando comparado com ELISA, além da necessidade da manutenção de linhagens celulares.

São várias as publicações avaliando a sensibilidade e especificidade de diferentes kits de ELISA para detecção das toxinas de *C. difficile*, porém a maioria destes estudos limitam-se a espécimes clínicos de humanos (Doern et al., 1992; Girolami et al., 1992; Lyerly et al., 1998). Quando comparados com a detecção do efeito citopático em linhagens celulares, os kits apresentam, em geral, uma sensibilidade ligeiramente menor (Bentley et al., 1998; Vanpoucke et al., 2001; Barbut et al., 2005). Post et al. (2002), ao trabalharem 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.

⁽¹⁾ HiMedia Laboratories, India.

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.

A ausência de alterações macroscópicas marcantes muitas vezes dificulta o diagnóstico de infecção por *C. difficile*. Porém, a ausência de diarreia ou de alterações macroscópicas *post-mortem* marcantes não podem excluir a possibilidade de ocorrência da doença (Yaeger et al., 2002; Songer e Uzal, 2005). A associação da histopatologia com a detecção das toxinas do *C. difficile* foi avaliada por Yaeger et al. (2002) que encontraram valores preditivos positivos entre 63% e 76%, demonstrando a importância da associação destas duas técnicas para o diagnóstico definitivo.

2.1.5 Tratamento

Segundo Post e Songer (2004) e Songer e Anderson (2006), antibióticos como a

tetraciclina, tilosina, tiamulina e virginamicina são eficientes no controle de *C. difficile* quando adicionadas à ração. Uma forma de controle inclui a aplicação de vacinas autógenas (bacterinas e toxóides), sendo que não há até o momento vacinas comerciais disponíveis no mercado brasileiro.

2.2 *Clostridium perfringens*

2.2.1 Agente

É uma bactéria Gram positiva, em forma de bacilo, imóvel, formadora de esporos e saprófita do trato gastrointestinal de animais sadios e do homem. É classificada de A a E (Tabela 1), de acordo com a produção de quatro toxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota. Duas outras toxinas foram descobertas, beta-2 e enterotoxina, estando a beta-2 relacionada com os tipos de *C. perfringens* causadores de diarreia em leitões (Lobato et al., 2007).

Tabela 1: Classificação dos diferentes tipos de *Clostridium perfringens*.

Tipo	Alfa	Beta	Beta-2	Épsilon	Iota	Enterotoxina
A	+		+			+
B	+	+		+		+
C	+	+	+			+
D	+			+		+
E	+				+	+

Fonte: Uzal e McClane (2011).

2.2.2 Toxinas

A toxina alfa é codificada pelo gene *plc*, de origem cromossomal, com peso molecular de 43kDa e ponto isoelétrico de 5,4. É uma fosfolipase C que hidrolisa a fosfatidilcolina e, em menor proporção, a esfingomielina, na dependência de íons cálcio. A ação da toxina alfa caracteriza-se por hemólise intravascular, danos capilares, processos inflamatórios, agregação plaquetária e alterações do metabolismo, culminando com a morte celular (Popoff e Bouvet, 2009).

A toxina beta, produzida pelos *C. perfringens* tipo B e C, é codificada pelo gene *cpb*, de origem plasmidial, com peso molecular de 40kDa e ponto isoelétrico de 5,6. Sua ação caracteriza-se pelo efeito citotóxico por meio da formação de poros, atuando nos canais seletivos de sódio e potássio, causando despolarização das membranas celulares excitáveis e alterações na permeabilidade vascular do sistema nervoso (Uzal e McClane, 2011).

A toxina beta-2 é codificada pelo gene *cpb2*, de origem plasmidial, com peso molecular de 28kDa (Bueschel et al., 2003). Investigações epidemiológicas demonstraram a maior ocorrência do gene *cpb2* entre os animais doentes, sugerindo que a toxina codificada por este gene tenha função relevante no processo patogênico, como possível fator de virulência (Van Asten et al., 2010). Seu mecanismo de ação não está completamente esclarecido, mas envolve a lise celular por meio da formação de poros na membrana (Petit et al., 1999).

A toxina épsilon, produzida pelos *C. perfringens* tipo B e D, é codificada pelo gene *etx*, de origem plasmidial, secretada na forma de protoxina, com peso molecular de 32,7kDa. Pela ação de enzimas proteolíticas, é convertida na forma ativa, com peso molecular de 31,2kDa. Seu mecanismo de ação envolve a ligação específica a receptores na superfície das células endoteliais, promovendo a desestabilização da membrana com alteração da permeabilidade vascular e resultando no escape de líquidos e destruição celular (Bokori-Brown et al., 2011).

A toxina iota é formada por duas subunidades protéicas imunologicamente distintas denominadas iota A, codificada pelo gene *iap*, de origem plasmidial, com peso molecular de 47,5kDa e ponto isoelétrico de 5,2; e iota B, codificada pelo gene *ibp*, de origem plasmidial, com peso molecular de 105kDa e ponto isoelétrico de 4,2. A toxina iota é produzida na forma de protoxina, sendo ativada por enzimas proteolíticas. Seu mecanismo de ação envolve desorganização do citoesqueleto das células com consequente morte celular (Marvaud et al., 2002).

A enterotoxina é codificada pelo gene *cpe*, de origem cromossomal e/ou plasmidial, com peso molecular de 35kDa e ponto isoelétrico de 4,3. Seu mecanismo de ação envolve a ligação com receptores específicos na superfície das células epiteliais do intestino dos animais, levando a inibição da síntese de macromoléculas, a formação de poros e desintegração do

citoesqueleto, com desequilíbrio osmótico da célula e consequente lise celular (Li e McClane, 2006).

As toxinas secundárias são representadas, principalmente, pelas toxinas: theta, codificada pelo gene *PfoA*, de origem cromossomal, com peso molecular de 51kDa e mecanismo de ação envolvendo atividades hemolíticas e necrosantes; delta, peso molecular de 42kDa e mecanismo de ação envolvendo atividade hemolítica; kappa, codificada pelo gene *colA*, de origem cromossomal, peso molecular de 80kDa e mecanismo de ação envolvendo hidrólise de colágeno e necrose celular; lambda, codificada pelo gene *lam*, de origem plasmidial, peso molecular não determinado e mecanismo de ação envolvendo atividades proteolíticas; neuramidase, codificada pelo gene *nanH*, de origem cromossomal, peso molecular de 64kDa e mecanismo de ação envolvendo aglutinação de eritrócitos, resultando em aumento da viscosidade sanguínea e formação de trombos (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999).

2.2.3 *Clostridium perfringens* tipo A

Clostridium perfringens tipo A vem sendo isolado do intestino dos leitões nos últimos anos e é considerado componente da microbiota normal destes animais. Evidências sugerem seu envolvimento nas doenças entéricas em leitões lactentes, principalmente com um a quatro dias de vida (Yaeger, 2007). A contaminação dos leitões se dá logo após o nascimento e a principal fonte de infecção são os esporos presentes no ambiente e nas fezes das porcas (Taylor e Bergeland, 1992; Holmgren et al., 2006).

Estudos da prevalência em leitões são escassos na literatura. Em um estudo retrospectivo realizado no laboratório de diagnóstico veterinário da Universidade de Iowa, nos Estados Unidos, nos anos de 2005 e 2006, *C. perfringens* tipo A foi identificado como o principal agente causador de diarreia neonatal, compreendendo 48% das 273 amostras (Yaeger, 2007). No Brasil, existem apenas

duas publicações relatando o envolvimento deste agente como causador de diarreia em leitões. Uma delas em 2003, por Moreno et al., que isolaram *C. perfringens* tipo A, beta-2 positivo, de leitões de um a cinco dias de idade, de quatro surtos de diarreia neonatal de granjas da região Sul do país. Neste mesmo estudo também foi realizado o diagnóstico diferencial para os demais enteropatógenos. Entretanto, todos foram negativos, sendo assim possível afirmar ser *C. perfringens* tipo A o agente responsável pela doença. A outra publicação é datada de 2004, por Costa et al., que isolaram o agente em três rebanhos de granjas comerciais dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Essas granjas tinham histórico de elevada incidência de diarreia em leitões lactentes, acometendo animais de um a 21 dias de idade. Na tentativa de isolamento de clostrídios, foram sacrificados 15 animais diarreicos, cinco de cada granja. Como diagnóstico diferencial foi realizado apenas o exame parasitológico para *I. suis*, sendo isolado somente *C. perfringens* tipo A, não havendo menção da presença ou ausência do gene *cpb2*.

A patogenia da infecção envolve a participação da toxina alfa. Porém, segundo Songer e Glock (1998), esta não é a verdadeira responsável por lesões e acúmulo de líquidos no trato intestinal. Estes autores defendem a hipótese de que a toxina beta-2, codificada pelo gene *cpb2*, seja a principal responsável por diarreia em leitões por *C. perfringens* tipo A, como relatado em diversos estudos (Bueschel et al., 2003; Schotte, et al., 2004; Hammer et al., 2008). Já a participação na doença da enterotoxina, produzida durante a esporulação, foi descartada, pois estudos demonstraram que essa toxina é raramente detectada nos casos de enterite causada por *C. perfringens* tipo A (Bueschel et al., 2003; Guedes et al., 2006; Van Asten et al., 2010). Apesar de ainda permanecerem muitas dúvidas acerca da patogênese da infecção por *C. perfringens* tipo A, especula-se que a ocorrência de diarreia em leitões por este agente esteja associada com amostras produtoras de toxina beta 2 (Bueschel et al., 2003). Klaasen et al. (1999), pesquisando a associação da toxina

beta 2 em leitões lactentes diarreicos, encontraram valores entre 70 e 90% de presença do gene *cpb2* na Suíça e Holanda, respectivamente.

Os sinais clínicos da infecção pelo *C. perfringens* tipo A consistem em diarreia mucóide e pastosa, de coloração amarelada e não hemorrágica, apatia, desidratação e baixa taxa de crescimento (Songer e Uzal, 2005). À necropsia, pode ser encontrada hiperemia discreta a moderada da mucosa intestinal e dilatação de alças devido à produção aumentada de gases e excesso de conteúdo líquido (Costa et al., 2004). As lesões afetam primariamente o jejuno e o íleo. Na histopatologia, pode ser vista uma enterocolite necrotizante discreta a moderada, com edema de vilosidades e com mínimos danos ao epitélio e aos vasos sanguíneos (Songer e Glock, 1998). Em geral, as lesões não são muito graves, sejam elas macro ou microscópicas. Ainda há na literatura uma corrente que defende que a diarreia causada por *C. perfringens* tipo A seja do tipo secretória e não inflamatória, (Yaeger, 2007). Sendo assim, trata-se de uma patologia entérica de elevada morbidade e baixa mortalidade (Collins et al., 1989).

Por ser um comensal do trato gastrointestinal, o diagnóstico de enterite por *C. perfringens* tipo A torna-se um desafio (Collins et al., 1989; Songer e Glock, 1998). O diagnóstico deve envolver o isolamento, quantificação do agente nas fezes, seguido de tipificação e observação do gene da toxina beta 2. Além disso, incluí-se a avaliação histológica para uma possível evidência de lesões e exclusão de outros enteropatógenos (Yaeger, 2007). A não detecção da toxina no conteúdo intestinal não é um parâmetro confiável, uma vez que a mesma é muito lábil, sendo rapidamente degradada por outras bactérias ou enzimas intestinais (Sanz et al., 2007).

As medidas de controle visam o manejo correto de higiene, desinfecção do ambiente e vacinação das fêmeas, no intuito de transferir imunidade passiva à progênie. Entretanto, a inexistência destas vacinas

obriga a utilização cada vez mais precoce de antibióticos nos animais (Taylor, 1999).

2.2.4 *Clostridium perfringens* tipo C

É considerado um agente primário de enterites necróticas hemorrágicas, classicamente associadas ao tipo C e acometendo leitões com até três dias de vida, podendo ocorrer de forma precoce, afetando animais com menos de 12 horas de vida (Songer e Uzal, 2005). Ao contrário do *C. perfringens* tipo A, o tipo C é encontrado em menor frequência e quantidade no intestino de animais saudáveis (Springer e Selbitz, 1999).

Este micro-organismo pode ser transmitido na forma vegetativa de leitões para leitões e contaminar o ambiente da maternidade ou ser adquirido a partir das fezes das mães, podendo persistir no ambiente na forma de esporos e infectar leitões susceptíveis por longos períodos de tempo. A compra de matrizes portadoras é a mais provável fonte de origem da doença nas granjas, mas o agente pode também ser introduzido por contaminações fecais em botas ou vestimentas. A infecção é oral e leitões recém-nascidos se infectam minutos ou horas após o nascimento (Taylor, 1999).

A morbidade apresenta grande variação, alcançando 85%, e a letalidade em torno de 50%, podendo chegar a 100% dos animais acometidos. Em estudos de prevalência, Morin et al. (1983) constataram que 0,4% das diarreias presentes em 749 animais de um a 15 dias tinha como causa o *C. perfringens* tipo C. Já Yaeger et al. (2002) diagnosticaram em 100 leitões que apresentavam diarreia com até 10 dias de vida, 2% de *C. perfringens* tipo C como único agente. No Brasil, não há trabalhos acerca da prevalência deste agente.

A toxina beta letal e necrosante é o principal fator patogênico da doença. Seu mecanismo de ação envolve a ligação com receptores nos enterócitos, provocando alterações na bomba de sódio e potássio, levando ao desequilíbrio osmótico e formação de poros na membrana da célula com conseqüente lise e necrose celular

(Songer, 1996). Explicações para que a infecção por *C. perfringens* tipo C ocorra tão precocemente em leitões relacionam-se com a deficiência da enzima pancreática proteolítica tripsina neste período, uma vez que a toxina beta produzida por *C. perfringens* tipo C é sensível à essa protease. A presença de fatores inibidores de proteases no colostro e a ausência de microbiota bem estabelecida no intestino do neonato também são justificativas da precocidade dessa infecção (Tveten, 2001).

Alguns autores classificam os casos de enterite necrótica em hiperagudos, agudos, subagudos e crônicos segundo os sinais clínicos, sendo as formas superaguda e aguda as mais frequentes (Songer e Uzal, 2005). Na forma superaguda, os sinais clínicos aparecem entre 12 a 24 horas após o nascimento do leitão, e a morte em até 24 horas. São observadas diarreia hemorrágica com consistência aquosa e severa desidratação. Nos casos agudos, pode-se observar diarreia hemorrágica, com presenças de restos necróticos, sinais de dor abdominal, desidratação, apatia e a morte podendo ocorrer por obstrução intestinal ou toxemia. A forma crônica é bem menos freqüente, as fezes apresentam coloração amarelada a esbranquiçada, sendo facilmente confundida com outros enteropatógenos (Rood, 1998).

À necropsia, as lesões estão comumente restritas ao intestino delgado e podem ser vistos variados graus de hiperemia do mesentério, enterite fibrinonecrotica ou pseudomembranosa e conteúdo intestinal sanguinolento (Songer et al., 2009). Microscopicamente, as lesões são de necrose profunda da mucosa do intestino delgado, podendo se estender até o ceco; e porções do cólon com hemorragia na lâmina própria, submucosa e camadas musculares (Miclard et al., 2009). Além disso, também é comum encontrar trombos, bacilos e/ou esporos e intenso infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e fibrina.

Os sinais clínicos e achados de necropsia são suficientes para um diagnóstico presuntivo de *C. perfringens* tipo C nos

quadros de enterite necrótica. Diarreias hemorrágicas em leitões, o padrão de mortalidade, a presença de hemorragias e as lesões necróticas no intestino delgado, são os mais importantes achados de base desse diagnóstico. O diagnóstico laboratorial é baseado no isolamento e tipificação por biologia molecular (Vieira et al., 2008), bem como na detecção da toxina beta no conteúdo intestinal por soroneutralização. Estas técnicas são ferramentas importantes para identificação de *C. perfringens* tipo C como agente causador de enterite hemorrágica em leitões (Straw et al., 1999).

A infecção pelo *C. perfringens* tipo C pode ser prevenida por meio da vacinação das fêmeas com o toxóide beta, que geralmente é associado à *E. coli* nas vacinas comerciais rotineiramente utilizadas nas granjas de suínos no Brasil. Este manejo vem sendo realizado desde a década de 90 e pode ser uma das explicações para a baixa importância do agente no nosso meio como causador de diarreia neonatal em suínos.

2.3 Antibióticos na suinocultura

As mudanças na produção de suínos no Brasil, principalmente a adoção de sistemas de criação intensivos, aumentaram a pressão de infecção e o nível de estresse a que os animais são submetidos. Estes geraram condições para que agentes, que antes se mantinham em equilíbrio com o hospedeiro, viessem a exercer um efeito patogênico. Diante desta nova realidade, o uso de antimicrobianos tornou-se uma ferramenta essencial à produção, na forma terapêutica, profilática e, subterapêutica como promotores de crescimento (Barcellos et al., 2009).

O uso de promotores de crescimento da classe dos antibióticos via ração tem sido questionado em muitos países, e em alguns, como nos integrantes da Comunidade Européia, seu uso foi proibido no final de 2005, sendo estas drogas indicadas apenas para tratamentos veterinários (Burch, 2005). A proibição se fundamenta no risco da indução de resistência na microbiota dos animais

alimentados com a ração medicada, e na possibilidade da infecção cruzada de seres humanos com as bactérias resistentes. Estas não somente podem tornar-se predominantes em uma população de bactérias, como podem transferir material genético para bactérias susceptíveis, que então adquirem resistência. Outra alegação para fundamentar a proibição foi a da possibilidade da presença de resíduos nos produtos cárneos para consumo humano. (Mathew, 2003).

Embora a resistência a antibióticos em humanos seja elevada, não existem evidências que comprovem sua relação com o uso subterapêutico dessas drogas em animais. De qualquer forma, tem sido sugerido que os antimicrobianos sejam utilizados somente para fins terapêuticos. Todavia, se recomenda como promotores de crescimento somente os antibióticos não utilizados na medicina humana, ou outras alternativas, como, por exemplo, o uso de probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos, extratos vegetais e homeopatia (Bellaver, 2000).

A medicina de suínos é essencialmente coletiva e, por isso, medicações maciças via água ou ração têm sido as mais adotadas. A terapia individual fica restrita a lotes de animais doentes, ao tratamento de animais com infecção aguda ou superaguda, e em casos esporádicos de doença em poucos animais. A medicação na ração é menos onerosa e geralmente seu uso requer menor mão de obra. Entretanto, na maioria dos casos, animais doentes apresentam anorexia, o que pode interferir com a ingestão da dose do medicamento necessária para combater o quadro infeccioso. A redução da ingestão de água nos animais doentes é menos significativa do que a queda do consumo de ração, mas também ocorre (Barcellos et al., 2009).

O ponto inicial para a escolha de um antimicrobiano consiste na obtenção de um diagnóstico preciso sobre o agente da doença que se pretende tratar ou prevenir. Em condições ideais, o tratamento ou o uso profilático só deveria ser iniciado depois de conhecidos os resultados dos exames

laboratoriais. Porém, os dados de um antibiograma representam uma estimativa *in vitro* da sensibilidade ou resistência de determinados agentes a uma droga. Geralmente este resultado apresenta boa correlação com o resultado do tratamento nos animais, entretanto, não existe a garantia da eficiência do tratamento *in vivo*, onde muitos outros fatores interagem (Burkgen, 2007).

As sulfonamidas constituem uma classe de antimicrobianos de origem sintética, que foram os primeiros agentes realmente efetivos a serem utilizados contra infecções bacterianas sistêmicas. Seu mecanismo de ação envolve a inibição competitiva ou antagonismo metabólico da diidropteroato-sintetase, enzima bacteriana responsável pela incorporação do ácido para-aminobenzoico (PABA) ao ácido diidropteróico. As sulfonamidas são bacteriostáticos de amplo espectro, sendo mais eficientes no tratamento das infecções agudas, podendo atuar sobre Gram positivos e negativos. Podem ser classificadas em sulfonamidas sistêmicas de ação curta, intermediária e prolongada; sulfonamidas de uso entérico; e sulfonamidas de uso tópico (Jukes e Crawford, 1984). Na prática, têm sido primariamente indicadas para o tratamento de infecções cutâneas, gastrointestinais e urinárias. A resistência bacteriana às sulfonamidas é um fato comum e crescente, causado pelo seu uso indiscriminado.

As quinolonas são bactericidas por inibição da síntese do DNA. São classificadas em dois grupos, as chamadas de Primeira Geração, que são drogas de espectro reduzido, atuando apenas contra Gram negativos, principalmente enterobactérias; e as de Segunda Geração, também denominadas de fluoroquinolonas, drogas que podem ser utilizadas contra Gram negativos e positivos. Como um grupo, as quinolonas de primeira geração são indicadas para infecções urinárias e como aditivos de rações de suínos e aves. Já as fluorquinolonas constituem uma das primeiras escolhas para infecções urinárias e gastrointestinais, onde predominem Gram negativos, além de poderem ser usadas

como boa alternativa para algumas infecções cutâneas, ósseas, articulares e de tecidos moles, dependendo do agente envolvido (Paiva Neto, 1989).

As penicilinas, do grupo dos beta-lactâmicos, são os mais antigos antibióticos e ainda muito utilizados devido à sua grande eficiência para o tratamento de diversas infecções, principalmente respiratórias. São drogas bactericidas que agem inibindo a síntese de mucopeptídeos da parede bacteriana. A resistência bacteriana às penicilinas se dá principalmente pela produção de beta-lactamases, enzimas que destroem o anel beta-lactâmico da droga, inativando-a. Visando reduzir este processo de resistência, as penicilinas têm sido associadas ao clavulanato de potássio, que inativam as beta-lactamases (Sarsur Neto, 1983).

Cefalosporinas, também pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, são antibióticos seguros, com bons resultados clínicos, pouco atingidos pelas beta-lactamases, porém têm elevado custo. Seu mecanismo de ação é idêntico ao das penicilinas, pela inibição da síntese da parede bacteriana, e são classificadas em gerações. Assim, as de primeira geração têm espectro reduzido, atuando basicamente contra Gram positivos. Já as cefalosporinas de segunda e terceira gerações têm amplo espectro, diferindo entre si pela distribuição ampla e melhor atuação sobre Gram negativos. Recentemente, surgiram as de quarta geração que são as mais resistentes à ação das beta-lactamases. As cefalosporinas podem ser usadas em diferentes situações, com destaque às infecções cutâneas, ósseas e de tecidos moles, mamites e otites (Andrade, 2008).

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas de espectro reduzido, que agem inibindo a síntese protéica no nível da unidade 30S dos ribossomos. A eficiência destas drogas é dose-dependente e as mesmas possuem atividade residual mesmo após os níveis sanguíneos terem caído abaixo da concentração inibitória mínima, permitindo assim a administração com grandes intervalos entre doses. De maneira

geral, constituem a primeira escolha para o tratamento de infecções por Gram negativos, em especial coliformes. Os aminoglicosídeos apresentam sinergismo com os antibióticos beta-lactâmicos, embora as cefalosporinas possam aumentar sua nefrotoxicidade. A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos se dá principalmente por inativação do fármaco por a ação de enzimas bacterianas. Esta resistência aparece rapidamente quando certos esquemas posológicos são utilizados, tais como doses baixas e intervalos entre administrações muito longos. Além disso, neomicina não deve ser utilizada por via parenteral devido a sua grande toxicidade (Andrade, 2008).

Macrolídeos e lincosamidas são drogas de ação bactericida ou bacteriostática, dependendo da sua dose. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da síntese protéica no nível da subunidade 50S dos ribossomos. O espectro antibacteriano dos macrolídeos é limitado, sendo a tilosina a principal representante, muito utilizada na terapêutica massal de aves e suínos contra Gram positivos anaeróbios. As lincosamidas, como a lincomicina, não apresentam grande vantagem, em eficiência, em relação aos macrolídeos, que embora mais caros são menos tóxicas. As lincosamidas possuem uma propriedade única, alcançando níveis elevados no leite, às vezes maiores que no plasma. O uso repetido destas drogas determina o rápido aparecimento de resistência bacteriana, que é cruzada de maneira total dentro de cada grupo e parcial entre macrolídeos e lincosamidas (Paiva Neto, 1989).

Tetraciclina são drogas de amplo espectro, obtidas de fungos do gênero *Streptomyces*, que podem se comportar como bacteriostáticas ou bactericidas, dependendo da dose empregada. Atuam sobre os micro-organismos inibindo a síntese protéica e alterando a permeabilidade da membrana. São muito utilizadas em terapêutica massal e com frequência adicionadas às rações como promotores de crescimento. A resistência bacteriana às tetraciclina normalmente é cruzada entre todas elas. Como produto

químico, as tetraciclina são muito sensíveis à luz e umidade, tornando-se, inclusive, muito tóxicas quando vencidas ou deterioradas (Andrade, 2008).

Cloranfenicol ou florfenicol é um antibiótico que pode ser bacteriostático ou bactericida, dependendo da dose. Tem amplo espectro e atua por inibição da síntese protéica no nível da unidade 50S. Devido a sua alta toxicidade, tem seu uso limitado, além de permanecer por vários dias na carne, leite e ovos, tornando seu uso proibido em animais de consumo, e liberado apenas para equídeos e animais de companhia (Andrade, 2008).

Ionóforos são um tipo de antibiótico representado pela narasina e avilamicina, amplamente utilizados na suinocultura brasileira como promotores de crescimento. Não se conhecem ao certo os mecanismos bioquímicos que medeiam os efeitos dos ionóforos sobre as bactérias. Sugere-se que os ionóforos desorganizem o transporte de cátions na membrana das bactérias Gram-positivas, interferindo na absorção de soluto pela célula e promovendo maior gasto energético para a manutenção do balanço osmótico (Pressman, 1976).

2.4 Diarreia

A diarreia é a principal manifestação clínica das infecções entéricas. O desequilíbrio entre os processos de absorção e secreção intestinal decorrentes de alterações no transporte de água e eletrólitos são determinantes na patogênese dos processos diarreicos. Os mecanismos fisiopatológicos estão associados às características particulares de cada patógeno. Dessa forma, a interação específica entre os patógenos entéricos e o epitélio intestinal resulta em diferentes tipos de diarreias. Na produção de suínos, o conhecimento da fisiopatologia das infecções entéricas é fundamental para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e, em um futuro próximo, na elaboração de estratégias de prevenção e controle dessas infecções (Vannucci e Guedes, 2009).

As principais células envolvidas no transporte de íons e nutrientes por meio da mucosa intestinal são os enterócitos maduros e as células das criptas intestinais (criptas de Lieberkühn). Os enterócitos maduros, presentes no ápice das vilosidades, são responsáveis pela absorção de nutrientes. As dissacaridases e peptidases são continuamente expressas na membrana apical dessas células e, a hidrólise de carboidratos e proteínas da dieta, monossacarídeos, aminoácidos e peptídeos são absorvidos (Holt e Yeh, 1992). A atividade secretora dessas células é mínima, entretanto pode ser estimulada por toxinas e neurotransmissores (Jones e Blikslager, 2002). As células das criptas representam o compartimento proliferativo, que originará enterócitos, além de possuírem predominantemente funções secretórias por meio de canais iônicos (Welsh et al., 1982).

O íon sódio (Na^+) é o principal eletrólito envolvido nos processos de absorção intestinal. Baixas concentrações de Na^+ intracelular permitem o transporte por meio da membrana apical de carboidratos, aminoácidos, peptídeos e vitaminas hidrossolúveis. Os mecanismos de absorção desses nutrientes envolvem a ativação de transportadores acoplados ao Na^+ (Wright, 1993). O mecanismo mais importante na absorção intestinal de Na^+ ocorre por meio de trocas iônicas com íons hidrogênio (H^+) realizadas por transportadores NHE. Os transportadores NHE são regulados negativamente pela concentração intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e pela ativação da proteína quinase A (PKA). Nesse sentido, toxinas bacterianas e processos inflamatórios que elevam a concentração intracelular de AMPc e, conseqüentemente, ativam a PKA, inibem a função dos NHE, estimulando os processos diarreicos (Forte et al., 1992).

Os processos secretórios do epitélio intestinal ocorrem predominantemente nas criptas de Lieberkühn. Os eletrólitos envolvidos são cloro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) (Welsh et al., 1982). A secreção de íons Cl^- na membrana apical ocorre pela

abertura de canais iônicos, sendo que o principal canal de Cl^- é o regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR). Mensageiros intracelulares (AMPc e GMPc) regulam o funcionamento do CFTR por meio da ativação de proteínas quinases. Dessa forma, processos patológicos que resultam no aumento da concentração intracelular de AMPc promovem a ativação da PKA, abertura dos canais iônicos CFTR, com conseqüente secreção de Cl^- . A concentração de íons cálcio (Ca^{+2}) presentes no citoplasma dos enterócitos é capaz de regular a abertura dos canais de Cl^- dependentes de Ca^{+2} . Pode ocorrer ainda sinergismo entre os mensageiros intracelulares, potencializando o estímulo secretório de Cl^- (Keely e Barrett, 2000).

O sistema nervoso entérico (SNE) é constituído por dois grandes plexos, submucoso e mioentérico, os quais são responsáveis pela regulação de estímulos motores e sensoriais. Esse sistema é capaz de coordenar o funcionamento do trato gastrointestinal e regular os mecanismos secretórios e absorptivos pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (Benarroch, 2007). A liberação de noradrenalina aciona mecanismos pró-absorptivos pela ativação de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos nos enterócitos (Chang et al., 1982). Contrariamente, a acetilcolina e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) são os principais neurotransmissores envolvidos na estimulação dos processos secretórios. O SNE pode ser ativado por agentes tóxicos, estímulos endócrinos e mediadores inflamatórios, resultando no aumento da secreção intestinal (Spiller, 2002).

Ao longo dos anos, as diarreias nos animais domésticos vêm sendo classificadas em quatro categorias: diarreia secretória, mal-absorptiva, efusiva (inflamatória) e por hipermotilidade (Moon, 1978; Argenzio, 1992; Field, 2003; Moeser e Blikslager, 2007). Na prática, as alterações patológicas envolvidas na diarreia secretória ou por má absorção também podem comprometer a integridade da mucosa e, por conseqüência, promover efusão de conteúdo protéico para o lúmen intestinal. Da mesma forma,

processos inflamatórios entéricos caracterizados por intensas lesões tissulares podem ter um componente secretório envolvido na sua patogênese (Giannella et al., 1975; Grondahl et al., 1998). Independentemente dos mecanismos fisiopatológicos, o aumento da motilidade intestinal ocorre secundariamente ao acúmulo de líquido no lúmen intestinal. Logo, a hipermotilidade certamente não possui função primária no desenvolvimento das diarreias infecciosas nos animais domésticos (Moon, 1978; Greenwood e Davison, 1987).

Na diarreia secretória o principal íon envolvido na patogênese é o Cl^- (Forte et al., 1992). A diarreia secretória mais frequente entre os animais domésticos está associada à infecção por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), em leitões após o desmame. Já na diarreia por má absorção, como acontece nos casos de infecção por rotavírus, a ação direta de patógenos entéricos sob o epitélio intestinal induz a lise celular. Nestes casos, a intensidade da infecção e a morte celular superam a capacidade de renovação epitelial, levando à atrofia de vilosidades e, conseqüentemente, à redução na absorção intestinal (Moon, 1978). As alterações nos mecanismos de absorção são decorrentes da perda e fusão de vilosidades, com redução na produção de enzimas digestivas e inibição da atividade biológica dos transportadores de membrana (Argenzio, 1992). As alterações morfológicas observadas na mucosa intestinal são caracterizadas pela substituição de células colunares maduras por células cubóides em processo de diferenciação (Reynolds et al., 1985).

A diarreia efusiva ou inflamatória, como a que ocorre nos casos de infecções por clostrídios, caracteriza-se pelo acúmulo de líquido no lúmen intestinal devido ao aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, secundário ao processo inflamatório (Vannucci e Guedes, 2009). Nas infecções por *C. difficile*, a resposta inflamatória é mediada pela liberação das toxinas A e B, cujas ações no epitélio intestinal induzem a morte celular e intensa

resposta inflamatória com liberação de citocinas (IL-8 , $\text{TNF}\alpha$ e PGE_2) pelas células do hospedeiro, e posterior recrutamento de neutrófilos. A diarreia ocorre pela ativação de mecanismos inflamatórios, levando ao aumento da permeabilidade da barreira intestinal e, conseqüentemente, à perda de água, eletrólitos e proteínas (Castagliuolo et al., 1994; Savidge et al., 2003). Já as infecções pelo *C. perfringens* tipo C, produtor das toxinas alfa e beta, são mais graves que as pelo tipo A (Songer e Uzal, 2005). As lesões causadas pelo tipo C ocorrem por ação direta sobre os enterócitos na região do jejuno e, por conseqüente, descamação, invasão e proliferação bacteriana a partir da membrana basal. Microscopicamente, podem ser observadas extensas áreas de necrose, envolvendo células das criptas, lâmina própria, submucosa e até camadas musculares (Arbuckle, 1972). Desse modo, mecanismos efusivos, caracterizados pela intensa perda de eletrólitos, proteínas e sangue para a luz intestinal, são determinantes na patogênese da diarreia. Já as infecções por *C. perfringens* tipo A geralmente não são caracterizadas por lesões macro ou microscópicas. Eventualmente, pode-se observar presença de colônias bacterianas associadas à superfície apical dos enterócitos. Nesses casos, é possível que a diarreia esteja associada à ativação de mecanismos secretórios no epitélio intestinal mediado pelas toxinas alfa e beta-2 (Songer e Uzal, 2005).

2.5 Imunidade em leitões

A resposta imune dos animais é um dos mais importantes mecanismos adaptativos, pois permite a sobrevivência em ambientes potencialmente lesivos, principalmente naqueles constituídos por bactérias, como as do gênero *Clostridium*. Nos sistemas de criação de suínos, com alta densidade de animais por metro quadrado, há uma grande concentração de agentes patogênicos no ambiente que aumenta o risco dos animais contraírem infecções. A defesa contra a infecção se processa em duas frentes: a imunidade humoral, mediada por anticorpos,

e a imunidade celular, mediada por células (Haesebrouck et al., 2004)

A sobrevivência e o desempenho dos leitões é muito influenciado pela recepção da imunidade passiva, colostro, e pela sua capacidade de desenvolver a imunidade ativa - reação do organismo dos leitões aos antígenos. O manejo, desde o nascimento do leitão até a utilização de vacinas injetáveis, determinará o sucesso da formação dos anticorpos necessários para o equilíbrio sanitário e desempenho (Haesebrouck et al., 2004).

A imunidade passiva confere uma proteção imediata porém transitória. Nos suínos, a placenta é do tipo epitélio corial, formando uma barreira que impede contato do sangue materno e sangue fetal durante a gestação, não havendo a transferência de imunoglobulinas para o feto. Portanto, os anticorpos maternos não são transmitidos aos leitões via placenta, fazendo com que nasçam praticamente sem defesas. Os anticorpos são transmitidos aos leitões pela porca por meio do colostro. Desta forma, os leitões são dependentes da ingestão correta do colostro para aumentar suas chances de sobrevivência (Haesebrouck et al., 2004).

Outro fator fundamental é a capacidade de absorção do colostro. A eficiência da absorção das imunoglobulinas pelo intestino delgado dos leitões decresce rapidamente, com uma meia vida média de três horas após o nascimento. Portanto, garantir que todos os leitões mamem a maior quantidade possível de colostro nas primeiras horas de vida é fundamental. Estudos imunológicos pós absorção colostrada de leitões demonstraram três classes de imunoglobulinas importantes: IgG, IgA e IgM. A IgG representa 80% do total dessas imunoglobulinas absorvidas pelos leitões (Wannemuehler e Galvin, 1994).

O período de proteção colostrada é variável conforme o agente envolvido e a capacidade induzida ou natural da fêmea em produzir os anticorpos, podendo chegar até seis meses de idade, como, por exemplo, no caso da parvovirose. A imunidade ativa determina a proteção

baseada na memória imunológica. Pode ser adquirida por meio da infecção natural ou artificialmente com a utilização de vacinas. As vacinas são aplicadas durante a lactação, ou no período de creche, visando à proteção dos animais contra possíveis infecções (Haesebrouck et al., 2004).

O objetivo da utilização de vacinas em suinocultura é melhorar as condições de defesa dos animais contra agentes patogênicos aos quais estão expostos continuamente no ambiente em que são criados. Para os leitões, as vacinas devem evitar o desencadeamento da doença após a infecção inicial; prevenir ou reduzir a replicação do agente infeccioso no local de entrada ou em outros tecidos; promover a eliminação do agente do animal doente; prevenir ou reduzir a persistência e a possível reativação da infecção; prevenir o desenvolvimento ou reduzir a severidade da doença após a infecção; prevenir a difusão do agente para animais não vacinados por meio do contato e finalmente prevenir ou reduzir as perdas econômicas. Já para as porcas, as vacinas devem proteger os leitões contra as infecções, por meio do colostro contendo anticorpos protetores. O que preocupa é o período em que são aplicadas as vacinas. A orientação que chega nas granjas é aplicar a vacina durante os manejos como castração e desmame. Justamente nos períodos mais críticos da vida do leitão, em situações de máximo estresse, onde a capacidade de reação aos antígenos da vacina está limitada, o que provoca uma diminuição da produção de anticorpos e reduz a eficácia da vacina. As vacinas podem ser aplicadas durante o curso de uma infecção ou, como no caso das diarreias causadas por clostrídios, durante o período gestacional da porca. As imunizações são realizadas em duas etapas, aos 80 e 100 dias de gestação ou aos 70 e 90 dias, com o intuito de conferir aos leitões uma proteção contra infecção potencial (Carvalho, 2005).

Atualmente no Brasil, segundo dados do Compêndio de produtos veterinários do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) e do MAPA, existem apenas duas vacinas comerciais,

com o toxóide beta, para o controle da diarreia neonatal causada por clostrídios em suínos. Não há nenhuma menção a imunobiológicos que contenham em sua composição os toxóides alfa de *C. perfringens* e nem os toxóides A e B de *C. difficile* (SINDAN, 2010).

Na literatura mundial, são escassos os trabalhos que avaliam a eficiência das vacinas contendo toxóides clostridiais na imunização de porcas e a transferência de imunidade destas para sua prole. Mastischeck e McGinley (1986) avaliaram a transferência de imunidade de porcas vacinadas aos 70 e 100 dias de gestação com toxóide beta, por meio da soroneutralização em camundongos, utilizando soro das porcas e *pool* de soro dos leitões. O sangue das porcas foi coletado no dia do parto, já o dos leitões foi coletado 36 a 48 horas após o nascimento. Como resultados, o colostro apresentou título médio de 42,3UI/mL, porém a variação individual foi muito elevada, com animais apresentando títulos de 4,5 a 123UI/mL. Já na titulação dos soros das porcas, a média dos títulos foi de 5,3UI/mL, com variação individual de 1,8 a 18UI/mL. No caso dos leitões filhos destas porcas, utilizando o *pool* de soros oriundos da leitegada, o título médio foi de 23UI/mL, com variação entre leitegadas de 0,5 a 75,5UI/mL. Hammer et al. (2008) fizeram uma avaliação sorológica de porcas vacinadas com um toxóide alfa comercial em uma granja americana, na qual havia histórico de diarreia causada por *C. perfringens* tipo A. As porcas foram vacinadas com duas doses, aos 70 e 90 dias de gestação, e a titulação dos soros das porcas e dos leitões também foi realizada por soroneutralização em camundongos. Os resultados obtidos foram de um título médio nas porcas de 24UI/mL e de 23,1UI/mL nos leitões.

3. OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* tipos A e C das fezes de leitões com e sem diarreia, com até sete dias de vida, bem como desenvolver e avaliar uma vacina experimental polivalente para o controle das

diarreias neonatais causadas por esses agentes na maternidade.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar *Clostridium difficile* das fezes dos leitões com até sete dias de vida;
- Aplicar a técnica da PCR multiplex para genotipificação de *Clostridium difficile*;
- Detectar as toxinas A/B de *Clostridium difficile* utilizando um “kit” comercial de ELISA;
- Isolar e quantificar *Clostridium perfringens* das fezes dos leitões com até sete dias de vida;
- Aplicar a técnica da PCR multiplex para tipificação de *Clostridium perfringens*;
- Sequenciar o gene *cpb2*;
- Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *Clostridium perfringens* isoladas frente a 15 antimicrobianos;
- Realizar um estudo histopatológico das possíveis lesões causadas por *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo C no trato intestinal dos leitões;
- Desenvolver e avaliar uma vacina experimental polivalente contendo os toxóide A/B de *Clostridium difficile*, toxóide alfa de *Clostridium perfringens* tipo A e toxóide beta de *Clostridium perfringens* tipo C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, Laboratório de Cultivo Celular, Laboratório de Patologia Animal, na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, todos pertencentes à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), e nas 15 granjas

comerciais, acima de 500 matrizes, localizadas na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Dessas granjas, sete eram unidades produtoras de leitão (UPL) e oito eram granjas de ciclo completo, com uma taxa média de mortalidade na maternidade de 9,54%.

4.2 Animais (utilização aprovada pelo CETEA UFMG sob protocolo nº 102/10)

4.2.1 Leitões utilizados para coleta das amostras

O trabalho foi realizado com 30 leitões diarreicos e 30 aparentemente saudáveis, oriundos de 15 granjas comerciais, acima de 500 matrizes, localizadas na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Essas granjas apresentavam um histórico de diarreia na maternidade, mas não estavam passando por um surto no momento das coletas, as quais foram realizadas durante os meses de maio a julho de 2009. De cada granja visitada eram escolhidos e eutanaziados quatro animais com até sete dias de vida, sendo dois aparentemente saudáveis e os outros dois com quadro clínico de diarreia. Cada leitão foi retirado de uma leitegada diferente. Os animais foram sacrificados por eletrocussão e sangria, após serem previamente sedados com xilazina⁽²⁾ (0,3 a 5mg/Kg IM).

De cada animal necropsiado foram coletadas amostras para a realização dos exames histológicos, bacteriológicos e moleculares. Amostras de fezes foram coletadas em coletores universais estéreis, diretamente da ampola retal e/ou da porção final do intestino grosso de cada leitão, e armazenados a uma temperatura de 2 a 8°C por, no máximo, 48 horas. Fragmentos de jejuno, íleo, ceco e cólon foram obtidos de cada leitão e fixados em formalina tamponada 10% (v/v).

4.2.2 Coelho, porcas e leitões utilizados para avaliação da vacina experimental

Na avaliação da potência da vacina experimental foram utilizados oito coelhos machos, da raça Nova Zelândia, pesando entre 1,5 a 2,5Kg, adquiridos junto à Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária – UFMG. Foram também utilizadas sete porcas, da genética DB, com média de quatro partos no teste de eficiência da vacina e duas marrãs no teste de inocuidade, cedidas pela granja de suínos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (EV-UFMG), a qual não utiliza vacinação das porcas contra diarreia causada por *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo C. Os leitões filhos dessas sete porcas, oriundos do cruzamento com um macho da genética DB, também foram utilizados na avaliação da eficiência da vacina experimental.

4.2.3 Camundongos

Para realização dos testes de soroneutralização *in vivo* foram utilizados 200 camundongos do sexo feminino, da raça Swiss, linhagem Webster, com peso variando entre 18 a 22g, cedidos pelo Biotério do Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em Pedro Leopoldo, Minas Gerais (LANAGRO/MG).

4.3 Isolamento e identificação do *Clostridium difficile*

Aproximadamente 1mL ou 1g de fezes foi diluído em 9mL de tampão salina fosfato (0,01M PO₄⁻ e 0,15M NaCl, pH 7,2) a 1% (v/v). Realizada a homogeneização, 100µL da mistura foi adicionado com o mesmo volume de álcool absoluto (96%) e incubada por 30 minutos a 37°C, para a eliminação de formas vegetativas. Após este período aproximadamente 50µL foram estriados em uma placa de Agar cicloserina cefoxitina frutose (CCFA)⁽³⁾ e em Brain Heart Infusion (caldo BHI)⁽³⁾, e incubadas em jarras de anaerobiose com mistura gasosa (CO₂- 9,8%; H₂- 10,4%; N₂- 79,8%) a 37°C por 48 horas, como descrito por Avbersek et al.

⁽²⁾ Vibrac do Brasil, Brasil.

⁽³⁾ Difco Laboratories, EUA

(2009). Após este período, colônias foram avaliadas pela morfologia e sua pureza confirmada pela técnica da coloração de Gram.

4.4 Isolamento e identificação do *Clostridium perfringens*

Aproximadamente 1mL ou 1g de fezes foi diluído em 9mL de tampão salina fosfato (0,01M PO₄⁻ e 0,15M NaCl, pH 7,2) a 1% (v/v). Após homogeneização foram realizadas diluições seriadas na base 10, obtendo-se as concentrações de 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶. Dessas diluições 10µL foram estriadas em uma placa de agar seletivo para *C. perfringens* (SPS agar)⁽⁴⁾ e em caldo BHI⁽⁴⁾, e incubadas em jarras de anaerobiose com mistura gasosa, a 37 °C por 24 horas. Após avaliação macroscópica e pela coloração de Gram, as colônias características foram contadas para a quantificação bacteriana por mL ou g de fezes (Manteca et al., 2001).

4.5 PCR Multiplex para genotipificação de *Clostridium difficile*

Após crescimento em CCFA, três a cinco colônias características foram transferidas para um tubo eppendorf⁽⁵⁾, contendo 100µL de tampão TE, e levadas ao termociclador⁽⁶⁾ a 98°C por 20 minutos para rompimento da membrana bacteriana e posterior liberação do material genético sem purificação do DNA (Baums et al.,2004). As reações de PCR foram realizadas de acordo com Silva et al. (2011), utilizando os iniciadores da tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores utilizados na PCR Multiplex para genotipificação de *Clostridium difficile*

Genes	Seqüência	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Referências
Toxina A (<i>tcdA</i>)	S 5' AGATTCCTATATTTACATGACAATAT 3' AS 5' GTATCAGGCATAAAGTAATACTTT 3'	48,1°C 49,1°C	365 bp	Sambol et al. (2000)
Toxina B (<i>tcdB</i>)	S 5' GGAAAAGAGAAATGGTTTTATTAA 3' AS 5' ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT 3'	47,1°C 49,3°C	160 bp	
<i>tpi</i>	S 5' AA AGAAGCTACTAAGGGTACAAA 3' AS 5' CATAATATTGGGTCTATTCCTAC 3'	51,6°C 48,1°C	210 bp	Dhalluin et al. (2003)
Toxina Binária (<i>cdtB</i>)	S 5' TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG 3' AS 5' CGGATCTCTTGCTTCAGCTTTATAG 3'	55,7°C 55,0°C	262 bp	Persson et al. (2008)

*S = senso. AS = anti senso

⁽⁴⁾ Difco Laboratories, EUA

⁽⁵⁾ Eppendorf, GE

⁽⁶⁾ Thermo Fisher Scientific, EUA

Para análise, 20µL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 2% (v/v), adicionados de brometo de etídeo⁽⁷⁾ e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por comparação ao marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder*⁽⁸⁾ e à amostra de referência. Como controle positivo foi utilizada a amostra de referência do *American Type Culture Collection*⁽⁹⁾ *C. difficile* (ATCC 9689).

4.6 PCR Multiplex para tipificação de *Clostridium perfringens*

Após crescimento em agar seletivo para *C. perfringens*, três a cinco colônias características foram transferidas para um tubo eppendorf⁽¹⁰⁾, contendo 100µL de tampão TE, e foram levadas ao termociclador⁽¹¹⁾ a 98°C por 20 minutos para rompimento da membrana bacteriana e posterior liberação do material genético sem purificação do DNA (Baums et al., 2004). As reações de PCR foram realizadas de acordo com Vieira et al. (2008), utilizando os iniciadores da tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores utilizados na PCR Multiplex para tipificação de *Clostridium perfringens*

Toxina (Genes)	Seqüência	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Referências
Alfa (<i>plc</i>)	S 5' GCTAATGTTACTGCCGTTGA 3'	52,9°C	324 bp	Meer et al., 1997
	AS 5' CCTCTGATACATCGTGAAG 3'	49,7°C		
Beta (<i>cpb</i>)	S 5' GCGAATATGCTGAATCATCTA 3'	50,1°C	196 bp	Meer et al., 1997
	AS 5' GCAGGAACATTAGTATATCTTC 3'	48,3°C		
Epsilon (<i>etx</i>)	S 5' GCGGTGATATCCATCTATTC 3'	50,1°C	655 bp	Meer et al., 1997
	AS 5' CCACTTACTTGTCTACTAAC 3'	49,8°C		
Iota (<i>iA</i>)	S 5' TTTTAACTAGTTCATTTCTAGTTA 3'	50,6°C	298 bp	Perelle et al., 1993
	AS 5' TTTTGTATTCTTTTCTCTAGATT 3'	45,0°C		
Enterotoxina (<i>cpe</i>)	S 5' GGAGATGGTTGGATATTAGG 3'	49,5°C	233 bp	Meer et al., 1997
	AS 5' GGACCAGCAGTTGTAGATA 3'	51,1°C		
Beta 2 (<i>cpb2</i>)	S 5' GAAAGGTAATGGAGAA 3'	50,1°C	573 bp	Herholz et al., 1999
	AS 5' GCAGAATCAGGATTTT 3'	49,8°C		

*S = senso. AS = anti senso.

⁽⁷⁾ Sigma-Aldrich, GE

⁽⁸⁾ Invitrogen, BR

⁽⁹⁾ Rockville, EUA

⁽¹⁰⁾ Eppendorf, GE

⁽¹¹⁾ Thermo Fisher Scientific, EUA

Para análise, 20µL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1% (v/v), adicionados de brometo de etídeo⁽⁵⁾ e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por comparação ao marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder*⁽⁶⁾ e as amostras de referência. Como controles positivos foram utilizadas as seguintes amostras de referência do ATCC⁽¹²⁾: *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624), *C. perfringens* tipo B (ATCC 3626), *C. perfringens* tipo C (ATCC 3628), *C. perfringens* tipo D (ATCC 3629) e *C. perfringens* tipo E (ATCC 27324).

4.7 Sequenciamento do gene *cpb2*

O gene *cpb2* completo das amostras de *C. perfringens* tipo A foi sequenciado no sequenciador ABI 3130⁽¹³⁾ com o kit de sequenciamento Big Dye⁽¹²⁾. Os iniciadores foram desenhados no programa Primer3 Plus (Untergasser et al., 2007) utilizando como molde a sequência de número de acesso AP003515.1 disponível no Genbank. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 4.

Os sequenciamentos foram editados e analisados no programa BioEdit (Hall, 1999) para análises das sequências e identificação das mutações.

4.8 Detecção qualitativa das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

Aproximadamente 1mL ou 1g de cada amostra de fezes foi diluída na proporção de 1:2 em tampão salina fosfato (0,01M PO₄⁻, 0,15M NaCl, pH 7,2) e, após homogeneização foi centrifugada a 8.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45µm⁽¹⁴⁾ e utilizado para pesquisa das toxinas A e B. A detecção das toxinas A/B de *C. difficile* foi realizada utilizando um kit ELISA comercial (Ridascreen® *Clostridium difficile* toxins A/B)⁽¹⁵⁾. O processamento foi realizado conforme orientação do fabricante e as leituras foram realizadas em leitor de ELISA⁽¹⁶⁾.

Tabela 4: Iniciadores utilizados no seqüenciamento do gene *cpb2* de *Clostridium perfringens* tipo A

Codificação	Seqüência
Cp1 - <i>C.perfringens</i> -B2T_81_F	5' CCACGGGGACATCTTTTTG 3'
Cp2 - <i>C.perfringens</i> -B2T_337_F	5' GAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATG 3'
Cp3 - <i>C.perfringens</i> -B2T_839_F	5' TCATTGGTTATGGGGAGATGA 3'
Cp4 - <i>C.perfringens</i> -B2T_719_R	5' CTCCCCCAATTGATTGTGAT 3'
Cp5 - <i>C.perfringens</i> -B2T_1158_R	5' GCCTTTTATTTTATTTCCCATACTTT 3'
Cp6 - <i>C.perfringens</i> -B2T_1316_R	5' TGGTAATTTTTCTTTTATCGATGATG 3'

⁽¹²⁾ Rockville, EUA

⁽¹³⁾ Applied Biodytems, EUA

⁽¹⁴⁾ Millipore Corporation, EUA

⁽¹⁵⁾ R-biopharm, GE

⁽¹⁶⁾ Biotek Instruments, EUA

4.9 Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras de *Clostridium perfringens* isoladas

4.9.1 Antimicrobianos

Foram avaliados 15 antimicrobianos comumente empregados na suinocultura brasileira: Amoxicilina, Avilamicina, Cefotiofur, Estreptomicina, Florfenicol, Josamicina, Leucomicina, Lincomicina, Narazina, Neomicina, Norfloxacin, Sulfa, Tetraciclina, Tilosina e Trimetropin. As soluções foram preparadas e diluídas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009).

4.9.2 Plaqueamento das amostras em agar sangue

Foram utilizadas todas as amostras de *Clostridium perfringens* tipo A isoladas a partir das fezes dos leitões de zero a sete dias, com e sem diarreia. Para o controle do teste, foi utilizada uma amostra de referência de *Bacterioides fragillis* (ATCC 25285). A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de diluição em agar, recomendado pelo CLSI (2009). Todas as drogas foram diluídas em salina 0,85%, para conter concentrações finais de 0,25µg/mL, 0,5µg/mL; 1,0µg/mL, 2,0µg/mL; 4,0µg/mL; 8,0µg/mL; 16,0µg/mL; 32,0µg/mL; 64,0µg/mL; 128,0µg/mL; 256µg/mL. Cada concentração do antimicrobiano foi adicionada em ágar Brucella⁽¹⁷⁾ suplementado com 5% de sangue de carneiro, hemina e vitamina K, e distribuído em duas placas de petri descartáveis (90x15) e incubado a 37° por 24h para realização de teste de esterilidade. Após este período, o inóculo bacteriano foi ajustado para a turbidez n° 0,5 da escala MacFarland e foi utilizado o replicador de Steers, padronizando o inóculo de cada amostra em 0,1µl, para a aplicação das amostras nas placas. As placas foram incubadas em jarras anaeróbicas com mistura gasosa, a 37 °C por 24 horas, de acordo com o CLSI (2009).

⁽¹⁷⁾ Difco Laboratories, EUA.

4.9.3 Leitura e interpretação do teste

O aparecimento de somente uma colônia ou de um crescimento muito leve, de difícil visualização a olho nu, foi considerado como inibição CLSI (2009). Para cada antibiótico testado, foi calculado o CIM₅₀ e CIM₉₀, ou seja, a concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% e 90% das amostras respectivamente, como descrito por Post e Songer (2004).

4.10 Estudo Histopatológico

Os fragmentos de jejuno, íleo, ceco e cólon obtidos de cada leitão e fixados em formalina tamponada 10% foram processados pela técnica rotineira de desidratação, diafanização, inclusão em parafina, secção de cinco micras de cada espécime clínico. Foi realizada a coloração por hematoxilina e eosina e avaliação histológica em microscópio de luz clara (Luna, 1968).

4.11 Produção da vacina experimental polivalente

4.11.1 Toxóide alfa de *Clostridium perfringens* tipo A

Foi cedida pelo Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas, a toxina alfa recombinante, purificada e dosada para utilização na vacina experimental.

toxina alfa foi observada por meio do gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e, para a coloração do gel foi utilizada solução de Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

A dosagem protéica foi realizada no equipamento NanoVue⁽¹⁸⁾, com leitura a 280nm, utilizando-se o volume de 5µL da toxina.

⁽¹⁸⁾ General Electric Company, EUA

4.11.2 Toxóide beta de *Clostridium perfringens* tipo C

Foi cedida pelo Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas, a toxina beta recombinante, purificada e dosada para utilização na vacina experimental.

A toxina beta foi observada por meio do gel de poliacrilamida 12% contendo SDS. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e, para a coloração do gel foi utilizada solução de Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

A dosagem protéica foi realizada no equipamento NanoVue⁽¹⁹⁾, com leitura a 280nm, utilizando-se o volume de 5µL da toxina.

4.11.3 Toxóide A/B de *Clostridium difficile*

4.11.3.1 Produção das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

4.11.3.2 Cultivo da amostra

Foi utilizada a amostra toxigênica de *C. difficile* ATCC 9689. O liofilizado foi reconstituído pela adição de 1mL de caldo BHI⁽²⁰⁾ e semeado em dois tubos de ensaio (16 X 160 mm), com tampa rosca, contendo 10 mL desse mesmo meio. Cada tubo recebeu 0,5mL do inóculo e ambos foram incubados em jarra de anaerobiose com mistura gasosa, a 37 °C por 48 horas. Após a reconstituição, as culturas foram avaliadas quanto a pureza pela coloração de Gram.

4.11.3.3 Produção e concentração das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

Para a produção das toxinas A/B foi utilizado um biorreator de bancada (BioFlo 110)⁽²¹⁾ com volume da dorna de 5,0L. O biorreator é provido de uma turbina do tipo *pitched-blade*, dispondo de controle de

velocidade de agitação e fornecimento de gás nitrogênio nos primeiros 30 minutos que permitem manter um ambiente sem oxigênio no início do ensaio. O aparelho possui um sistema automático de controle de temperatura e pH, além de permitir a colheita de alíquotas para a dosagem da concentração celular, a qual foi quantificada por meio da medida de densidade ótica (DO) em espectrofotômetro⁽²²⁾ lida a 600nm.

O meio utilizado na produção das toxinas foi o caldo BHI⁽²³⁾ suplementado com 0,05% de cisteína, que foi reconstituído de acordo com a recomendação do fabricante e a cisteína foi adicionada imediatamente antes da autoclavação a 121°C, por 20 minutos dentro da dorna do aparelho. O pré-inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) para o meio BHI suplementado no biorreator. Com fluxo de nitrogênio, pH e temperatura controlados, a fermentação bacteriana foi realizada por aproximadamente 72 horas (Popoff, 1987). Após crescimento os 5L da cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 40 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, e o sobrenadante concentrado 10 vezes por ultrafiltração em sistema Pellicon⁽²⁴⁾, com membrana de retenção de 100 KDa⁽²⁴⁾, até obter um volume final de 50mL. A expressão das proteínas foi analisada em SDS-PAGE (sódio dodecil sulfato – eletroforese em gel de poliacrilamida) 7,5%, corado pelo azul de Coomassie.

4.11.3.4 Tipificação das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

Para tipificação das toxinas A/B foi empregada a metodologia descrita por Lobato (1989) com modificações que consistem na mistura de 1,0mL das toxinas em diferentes diluições com 1,0mL de antitoxina padrão⁽²⁵⁾ de *Clostridium sordellii* contendo 1,0UI/mL. As misturas foram mantidas em banho-maria, a 37°C por 30 minutos e em seguida 0,2mL foram

⁽¹⁹⁾ General Electric Company, EUA

⁽²⁰⁾ Difco Laboratories, EUA

⁽²¹⁾ New Brunswick Scientific C.O., UK

⁽²²⁾ CELM, BR

⁽²³⁾ Difco Laboratories, EUA

⁽²⁴⁾ Millipore Corporation, EUA

⁽²⁵⁾ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK

inoculadas por via endovenosa, em dois camundongos por diluição e os animais observados por um período de 72 horas. Como controle positivo foi inoculada somente a toxina. Como controle negativo foi inoculada solução salina 0,85% estéril e como controle do soro foi inoculado antitoxina padrão, todos no mesmo volume e via de inoculação.

4.11.3.5 Titulação das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

A titulação foi realizada em quadruplicata, sendo 100µL da toxina adicionados nos quatro primeiros poços da placa de 96 poços⁽²⁶⁾, e nos demais foram adicionados 50µL de MEM⁽²⁷⁾ (meio essencial mínimo) suplementado. Procedeu-se a diluição da toxina na base dois, e adicionou-se mais 50µL de MEM e 50µL da linhagem celular VERO contendo $2,5 \times 10^4$ células, com um volume final em cada poço de 150µL. Os poços do controle positivo e negativo continham, respectivamente, 100µL da toxina e 50µL de células, e 100µL de MEM e 50µL de células. A placa foi incubada a 37°C em estufa úmida⁽²⁸⁾ com atmosfera controlada (5% CO₂ e 95% O₂) por 48 horas. Após este período o sobrenadante foi descartado e lavou-se duas vezes com 100µL de PBS e corou-se com 100µL de uma solução de cristal violeta (0,1%) para observação do efeito citopático (ECP) (Souza Júnior et al., 2010). Para a leitura visual dos poços foi considerado 80% de efeito citopático (ECP) quando era observada a destruição de 80% da monocamada celular (Lima et al., 2011).

4.11.3.6 Dosagem protéica

A dosagem protéica foi realizada no equipamento NanoVue⁽²⁹⁾, com leitura a 280nm, utilizando-se o volume de 5µL da toxina.

A presença das toxinas A/B foi confirmada por meio do gel de poliacrilamida 7,5%

contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e, para a coloração do gel foi utilizada solução de Azul de Coomassie (Laemmli, 1970)

4.11.3.7 Inativação das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

As toxinas A/B foram submetidas à inativação por meio da adição de formol a 37% na concentração final de 0,5% (v/v), sob agitação, em temperatura ambiente. Alíquotas da mistura foram coletadas e inoculadas em cinco camundongos em intervalos de 24 horas, até total inativação.

4.11.4. Adição de Hidróxido de alumínio [Al(OH)₃]

Foi acrescentado aos toxóides alfa de *Clostridium perfringens* tipo A, beta de *Clostridium perfringens* tipo C e A/B de *Clostridium difficile*, gel de Al(OH)₃ na concentração final de 2,83% de óxido de alumínio livre, na proporção 1:2, sob agitação, em geladeira à 4°C, durante a noite (Fernelius et al., 1972).

4.11.5 Teste de esterilidade

A esterilidade foi verificada pela inoculação de 0,5mL da vacina polivalente em quatro tubos contendo 20mL de caldo tioglicolato⁽³⁰⁾ e em quatro tubos contendo 20mL de caldo sabouraud⁽²⁹⁾. Metade dos tubos de cada um dos inóculos em caldo tioglicolato foi incubada em anaerobiose. Os demais tubos com caldo sabouraud e caldo tioglicolato foram incubados em aerobiose. Todos os tubos inoculados foram mantidos a 37°C, por 21 dias, com leituras diárias (Brasil, 1997).

4.11.6 Teste de inocuidade

Duas marrãs foram inoculadas com a vacina produzida, com o dobro do volume e concentração antigênica da dose teste, por via subcutânea. Os animais foram observados por sete dias, quanto à

⁽²⁶⁾ Sarstedt, EUA

⁽²⁷⁾ Gibco Laboratories, EUA

⁽²⁸⁾ Sheldon Manufacturing Inc, EUA

⁽²⁹⁾ General Electric Company, EUA

⁽³⁰⁾ Difco Laboratories, EUA

produção de reações locais e sistêmicas significativas (European Pharmacopoeia, 1998).

4.11.7 Vacinação dos animais

Cada um dos oito coelhos foram inoculados com 200µg dos toxóides alfa e beta e com 1000µg do toxóide A/B, numa mesma dose, contendo um volume final de 2mL, e após 21 dias foi administrada uma segunda dose (Souza et al., 2010). Cada uma das sete porcas do grupo experimental foram imunizadas com duas doses contendo as mesmas concentrações dos antígenos, porém com um volume final por dose de 5mL, aos 80 e 100 dias de gestação. Uma porca do grupo controle negativo recebeu duas doses contendo 5mL de salina estéril. A administração da vacina foi realizada por via subcutânea em ambas as espécies.

4.11.8 Sangria dos animais e obtenção dos soros

A sangria dos coelhos foi realizada 14 dias após a segunda inoculação e preparado um *pool* de soros. A coleta de sangue das porcas foi feita no dia do parto, por punção da veia jugular. Nos leitões o sangue foi coletado 24 horas após o nascimento, por punção da veia cefálica. Os soros obtidos de cada animal foram devidamente acondicionados, identificados e armazenados em freezer a -20°C até a realização dos testes.

4.11.9 Titulação dos soros

As amostras dos soros das porcas, *pool* de soros de leitões e o *pool* de soros dos coelhos foram titulados pelos métodos de soroneutralização em camundongos (European Pharmacopoeia, 1998) para titulação da antitoxina beta, soroneutralização em célula para a titulação de antitoxinas A/B, e teste de neutralização em camundongo (USDA, 2002) para titulação de antitoxina alfa. O título de neutralização de cada soro foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938) e expresso em unidades internacionais por mililitro (UI/mL).

4.11.9.1 Padronização da soroneutralização das toxinas A/B de *Clostridium difficile* em linhagem celular

4.11.9.1.1 Linhagem celular

Foi utilizada a linhagem celular VERO (ATCC CCL-81), cedida pelo Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

4.11.9.1.2 Meios, soluções e reagentes do cultivo celular

A célula foi cultivada no meio essencial mínimo⁽³¹⁾ (MEM), suplementado com soro fetal bovino⁽³⁰⁾ (SFB) 5% (v/v), penicilina e estreptomicina nas concentrações de 40.000UI/mL e 20.000UI/mL, respectivamente. Foram utilizadas a solução (0,01M PO₄⁻, 0,15M NaCl, pH 7,2) e a solução de tripsina/versene⁽³²⁾ (STV) de acordo com Andrade (2000).

A linhagem celular foi cultivada em frascos de 150cm³, até a confluência mínima de 90%, em estufa úmida⁽³³⁾, com atmosfera controlada de 5% CO₂ a 37°C. As células foram contadas em câmara de Neubauer, após os procedimentos de lavagem da monocamada com PBS-1X e tripsinização com STV-1X. Os ensaios foram padronizados em placas de 96 poços⁽³⁴⁾ de fundo plano.

4.10.9.1.3 Padronização *in vitro* das toxinas A/B de *Clostridium difficile*

As toxinas A/B foram padronizadas na linhagem VERO empregando-se o nível de teste L+/50 (menor quantidade de toxina que, misturada a 0,02 UI de antitoxina padrão de *C. sordellii* causa 80% de ECP em 48 horas). Diluições seriadas na base dois da toxina foram distribuídas em placas de 96 poços⁽³³⁾, com quatro repetições para cada diluição da toxina e com volume de 50µL por poço. Foram adicionados em cada

⁽³¹⁾ Gibco Laboratories, EUA

⁽³²⁾ Difco Laboratories, EUA

⁽³³⁾ Sheldon Manufacturing Inc, EUA

⁽³⁴⁾ Sarstedt, EUA

poço, 50µL de antitoxina padrão de *C. sordellii*⁽³⁵⁾, contendo 0,02UI. A placa foi homogeneizada manualmente por 30 segundos e incubada a 37°C por uma hora em estufa úmida⁽³²⁾ com 5% de CO₂. Após este período foram adicionados 50µL de uma suspensão celular contendo 2,5 x 10⁴ células e as placas reincubadas nas mesmas condições anteriores por mais 48 horas. Os poços referentes ao controle positivo (80% de destruição celular) continham 50µL de toxina, 50µL de MEM e 50µL de células. Os poços referentes ao controle negativo (100% de células viáveis) continham 100µL de MEM e 50µL de células. Os poços referentes ao controle do soro, realizado para a verificação da toxicidade do soro padrão, continham 50µL de soro padrão, 50µL de MEM e 50µL de células. O volume final em cada poço foi de 150µL. Após as 48 horas de incubação o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 100µL de PBS-1X corados com 100µL de uma solução de cristal violeta (0,1%) para observação do ECP (Souza Júnior et al., 2010). Para a leitura visual dos poços considerou-se 80% de ECP (Lima et al, 2011). Para a validação do teste foi realizado a retrotitulação da toxina padronizada utilizando-se a antitoxina padrão de *C. sordellii* (Salvarani et al. 2010).

4.10.9.1.4 Titulação de antitoxina A/B de *Clostridium difficile* de soros de coelhos, porcas e leitões por meio da técnica de soroneutralização *in vitro*

O soro teste foi mantido em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Após este período 100µL do soro foram adicionados nos quatro primeiros poços da placa de 96 poços⁽³⁶⁾, e nos demais poços foi adicionado 50µL de MEM suplementado. Procedeu-se a diluição do soro teste na base dois, e foi adicionada mais 50µL das toxinas A/B padronizadas no nível de teste L+/50. A placa foi homogeneizada manualmente por 30 segundos e incubada a 37°C por uma hora em estufa úmida com 5% de CO₂.

Após este período, foram adicionados 50 µL de uma suspensão celular contendo 2,5 x 10⁴ células VERO e as placas reincubadas nas mesmas condições anteriores por mais 48 horas. Os poços referentes ao controle positivo (100% de destruição celular) continham 50µL de toxina padronizada, 50µL de MEM e 50µL de células. Os poços referentes ao controle negativo (100% de células viáveis) continham 100µL de MEM e 50µL de células. Os poços referentes ao controle do soro, realizado para a verificação da toxicidade dos soros teste, continham 50µL de soro teste, 50µL de MEM e 50µL de células. O volume final em cada poço foi de 150µL. Após as 48 horas de incubação o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 100µL de PBS-1X e corados com 100µL de uma solução de cristal violeta (0,1%) para observação do ECP (Souza Júnior et al., 2010). Para a leitura visual dos poços foi considerado 80% de ECP (Lima et al, 2011). Para a validação do teste foi realizado a retrotitulação da toxina padronizada utilizando-se a antitoxina padrão de *C. sordellii* (Salvarani et al., 2010).

4.11.9.2 Titulação de antitoxina alfa de *Clostridium perfringens* tipo A de soros de coelhos, porcas e leitões por meio da técnica de soroproteção em camundongos

Foi empregada a metodologia preconizada pelo *United States Department of Agriculture* (USDA), 2002, que consiste no desafio do soro teste frente a toxina alfa padronizada para conter 10DL₅₀. O soro teste puro foi misturado a toxina alfa, por 30 minutos à temperatura de 37°C, e após este período 10 camundongos foram inoculados com 0,2mL cada, via endovenosa, e observados por 72 horas. O toxóide alfa será considerado satisfatório se o soro antitoxina alfa proteger no mínimo 80% do animais inoculados, o que corresponde a um título de 4UI/mL.

⁽³⁵⁾ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK

⁽³⁶⁾ Sarstedt, EUA

4.11.9.3 Titulação de antitoxina beta de *Clostridium perfringens* tipo C de soros de coelhos, porcas e leitões por meio da técnica de soroneutralização em camundongos

Os soros testes foram incubados por 30 minutos em banho-maria a 56°C. Após este período, 1,0mL de diluições seriadas, na base dois, dos soros em salina peptonada 1% foram homogeneizadas com o mesmo volume da toxina beta padronizada ao nível de teste L+ em camundongo (menor quantidade de toxina que, misturada com 1UI de antitoxina padrão homóloga e inoculada em camundongos por via endovenosa, é capaz de matar 80% dos animais inoculados em 72 horas), gentilmente cedida pelo Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG). A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos. Para cada diluição, 0,2mL foram inoculados em cinco camundongos por via endovenosa. No controle negativo foi inoculado apenas 0,2mL do soro teste e no controle positivo foi inoculada apenas a toxina padronizada 0,2mL. Os animais foram observados por 72 horas (European Pharmacopoeia, 1998). Para a validação do teste foi realizado a retrotitulação da toxina padronizada utilizando-se a antitoxina padrão homóloga⁽³⁷⁾ (Salvarani et al., 2010).

4.12 Análise estatística

Para análise dos resultados foram empregados o teste exato de Fisher e o teste de Chi-Quadrado (Sampaio, 1998).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento, identificação e genotipificação de *Clostridium difficile*; detecção das toxinas A/B; macroscopia e histopatologia

Dos 60 animais utilizados nesse trabalho em 12 (20%) foi possível isolar e genotipificar *Clostridium difficile* a partir das fezes, resultado inferior ao encontrado por Alvarez-Perez et al. (2009) de 25,9% de isolados em granjas espanholas. Essa

diferença pode ser resultado do número amostral, uma vez que nesse estudo foram coletadas fezes de apenas quatro animais, por granja, contra 23 animais, por granja, em média por Alvarez-Perez et al. (2009). Destes 12 animais, cinco (41,7%) eram do grupo diarreico e sete (58,3%) do grupo não diarreico. Este resultado pode ser justificado pelo fato de ser mais comum que leitões com infecção por *C. difficile* não apresentem diarreia ou qualquer outro sinal clínico, como também observado por Yaeger et al., (2007). Ao analisarmos a taxa de isolamento com relação às granjas estudadas, observa-se que das 15 granjas, em sete (46,7%) foi possível isolar o agente, resultado inferior ao observado Baker et al. (2010) que isolaram o agente em 62,5% das granjas americanas pesquisadas. O menor número de granjas positivas no isolamento de *C. difficile*, nesse trabalho, quando comparado ao estudo conduzido por Baker et al. (2010) pode ser explicado pela não utilização do taurocolate no meio seletivo de isolamento, que permite uma melhor germinação dos esporos, aumentando a viabilidade do isolamento, e pelo perfil de granjas estudadas, que nesse estudo não estavam passando por um surto de diarreia neonatal.

A construção de uma tabela de contingência 2X2 para comparação da taxa de isolamento de *C. difficile* com as idades dos leitões coletados, agrupados em animais de 0-3 e 4-7 dias de idade, demonstrou pelo teste exato de Fisher, haver diferença estatística ($p < 0,0007$), permitindo afirmar que o maior sucesso na taxa de isolamento do agente está em se coletar amostras de animais de zero a três dias de idade, independente do animal apresentar ou não o quadro clínico de diarreia. Este fato, pode ser explicado por ser nessa idade em que a microbiota do animal está sendo estabelecida.

Das 12 amostras de *C. difficile* isoladas e tipicadas pela PCR Multiplex, três (25%) eram não toxigênicas (A⁻B⁻) e nove (75%) possuíam os genes *tcdA* ou *tcdB* codificadores das toxinas A e B. Destas nove amostras, quatro (44,5%) eram positivas para a presença dos genes *tcdA* e

tcdB (A⁺B⁺), enquanto que as outras cinco (55,5%) eram amostras variantes (A⁻B⁺). Em contraste, trabalhando com 140 isolados, Alvarez-Perez et al. (2009) encontraram apenas sete (5%) amostras de *C. difficile* não toxigênicas e uma amostra variante (0,7%), todas isoladas numa mesma granja. No presente estudo, todas as amostras não toxigênicas foram isoladas de animais não diarreicos, corroborando os resultados encontrados por Alvarez-Perez et al. (2009). Outros estudos envolvendo *C. difficile* isolados de diferentes espécies domésticas (Marks et al., 2002; Arroyo et al., 2007; Avbersek et al., 2009; Ossiprandi et al., 2009), obtiveram uma frequência de amostras não toxigênicas e variantes menores do que a obtida neste experimento com leitões. Diferenças na taxa de isolamento e na frequência dos tipos toxigênicos podem resultar de diferenças no manejo (Arroyo et al., 2007) e também de diferenças na distribuição geográfica. De acordo com Arroyo et al. (2007), a alta prevalência de amostras variantes pode complicar o diagnóstico de diarreia por *C. difficile*, uma vez que alguns kits comerciais de ELISA são padronizados apenas para detecção da toxina A, podendo gerar diagnósticos falso-negativos. Também foi identificada a presença do gene *cdtB* da toxina binária (CDT) em seis amostras de *C. difficile* isoladas (figura 1).

A presença do gene *cdtb* que codifica a toxina binária (CDT) observada em seis

(50%) amostras de *C. difficile* isoladas de leitões foi significativamente superior à observada por Arroyo et al. (2007) que encontraram apenas 4% de amostras CDT em um estudo com eqüinos diarreicos, sendo todas elas A⁺B⁺. Avbersek et al. (2009) também relataram a presença do gene responsável pela produção da toxina binária em amostras de *C. difficile* isoladas de leitões, porém a frequência encontrada não foi relatada, impedindo comparações. A ausência de amostras não toxigênicas corrobora com estudos anteriores (Stubbs et al., 2000; Arroyo et al., 2007; Persson et al., 2008). De acordo com Stubbs et al. (2000), o gene da toxina binária é comumente observado apenas em amostras que possuem parte do locus de patogenicidade (Paloc) contendo os genes para as toxinas A e B. Com isso, amostras CDT em geral produzem as 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. Gonçalves et al. (2004) atribuem à toxina binária o caráter potencializador, por agir sinergicamente com as toxinas A e B. De qualquer forma, a grande frequência de amostras de *C. difficile* CDT encontradas no presente estudo mostra a necessidade de mais estudos com o objetivo de esclarecer o papel da toxina binária nas diarreias por *C. difficile* em leitões.

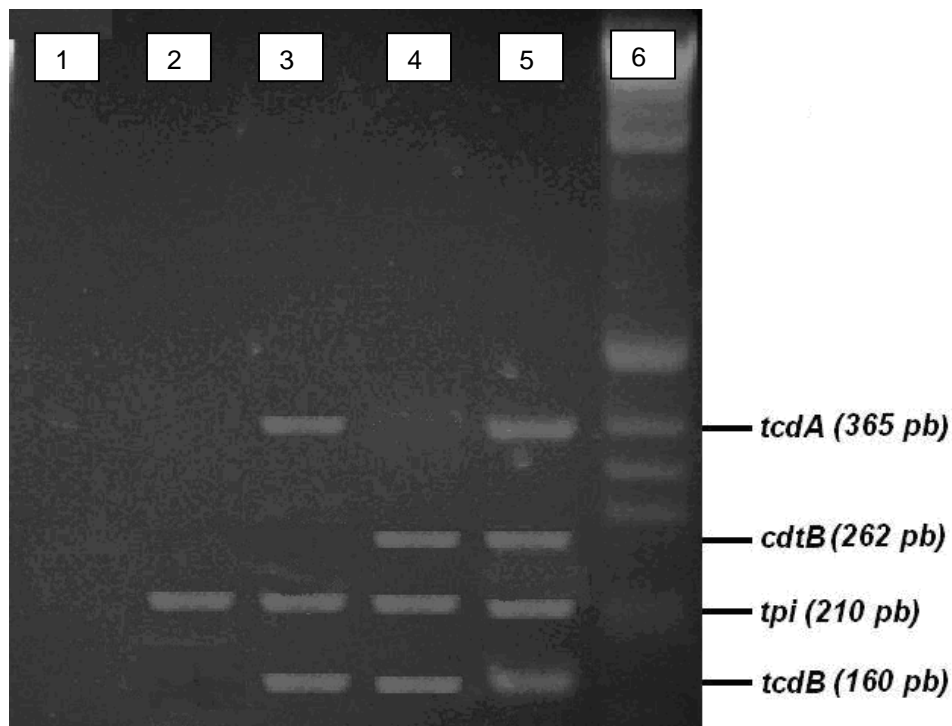


Figura1: Eletroforese em gel de agarose a 2% da PCR Multiplex de *Clostridium difficile*. Canaleta 1: controle negativo. Canaleta 2: amplificação do produto de 210 pares de base do gene *tpi* (amostra não toxigênica A-B- CDT-). Canaleta 3: amplificação dos produtos de 365, 210 e 160 pares de bases dos genes *tcdA*, *tpi* e *tcdB* (amostra A+B+ CDT-). Canaleta 4: amplificação do produto de 262, 210 e 160 pares de base do gene *cdtB*, *tpi* e *tcdB* (amostra A-B+ CDT+). Canaleta 5: amplificação dos produtos de 365, 262, 210 e 160 pares de bases dos genes *tcdA*, *cdtB*, *tpi* e *tcdB* (amostra A+B+ CDT+). Canaleta 6: padrão de tamanho molecular (1kb plus DNA Ladder - Invitrogen).

Na interpretação dos dados da detecção qualitativa das toxinas A/B de *C. difficile* pelo ELISA, observou-se que em 10 (16,7%) dos 60 animais amostrados foi possível a identificação das toxinas. Destes 10 leitões, sete (70%) eram do grupo diarreico e os outros três (30%) do grupo não diarreico. Ao analisarmos a taxa de detecção das toxinas A e B com relação às granjas estudadas, em seis delas foi possível identificar as toxinas, sendo que em uma das granjas, três dos quatros animais utilizados foram positivos. A detecção das toxinas A/B, considerado o padrão ouro no diagnóstico da infecção por *C. difficile*, demonstra que a infecção por este agente está presente na suinocultura mineira e a importância do seu estudo, diagnóstico e controle. 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).

Avaliando somente o isolamento e a detecção das toxinas pelo ELISA, observa-se apenas 5% (3/60) animais positivos para ambos os testes. Este resultado também foi verificado por 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, sem o isolamento. Segundo Buggy et al. (1983) a forma vegetativa de *C. difficile* resiste pouco tempo em condições aeróbicas, sendo dependente da esporulação para que possa permanecer viável nas fezes. Além disso, algumas amostras podem não crescer devido à sensibilidade a um ou a ambos antibióticos utilizados no meio seletivo (Songer e Uzal, 2005). Podemos inferir também que a não utilização do taurocolate como suplemento ao meio seletivo para isolamento de *C. difficile* nesse trabalho pode ter influenciado a baixa taxa de isolamento, associado com o perfil das granjas analisadas de não estarem passando por surtos de diarreia neonatal.

À necropsia, 13 leitões (21,6%) apresentaram edema de mesocólon, alteração macroscópica sugestiva da infecção por *C. difficile* (Figura 2). Dos 13

animais que apresentavam edema de mesocólon, oito (61,5%) eram do grupo diarreico e os outros cinco (38,46%) do grupo não diarreico. Ao analisarmos a ocorrência de edema de mesocólon e as granjas estudadas, em seis delas foram encontrados animais com a lesão, sendo que em uma das granjas, todos os quatro animais apresentavam a patologia. Segundo 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, permitindo portanto inferir novamente que a infecção por *C. difficile* em leitões até o sete dias de vida está presente em Minas Gerais e que seu estudo, diagnóstico e controle serão fundamentais para a suinocultura mineira e possivelmente para a suinocultura nacional, sendo de suma importância estudos nessa área no Brasil.

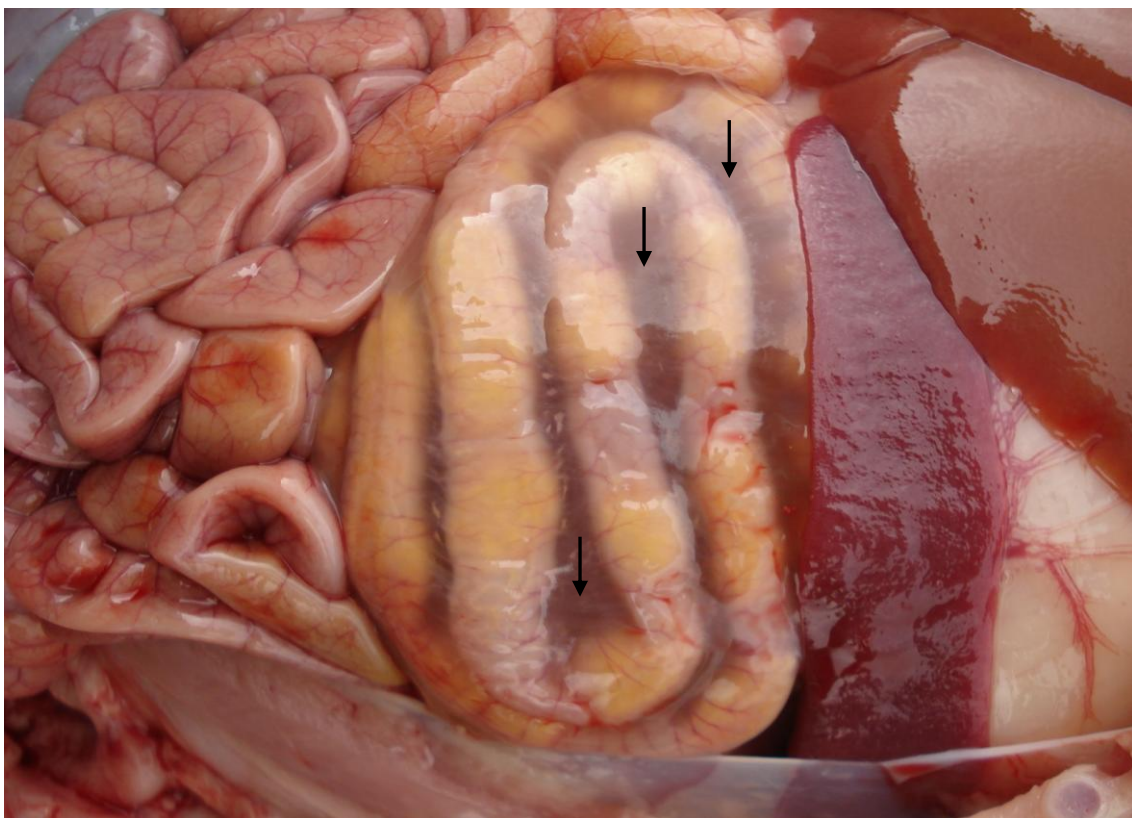


Figura 2: Leitão apresentando edema de mesocólon (setas).

Considerando os 13 leitões que apresentaram edema de mesocólon, em seis (46,1%) deles foi possível identificar qualitativamente as toxinas A e B de *C. difficile*. A construção de uma tabela de contingência 2X2 para comparação da presença de alterações macroscópicas e a detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, demonstrou pelo teste exato de Fisher, haver diferença estatística ($p < 0,004$), e um valor preditivo positivo de 80%, permitindo afirmar que a ocorrência de edema de mesocólon está diretamente associada a detecção das toxinas, confirmando a ocorrência de infecção por *C. difficile*, independente dos animais apresentarem ou não o quadro clínico de diarreia. Dessa forma, a presença de edema de mesocólon é um parâmetro importante para avaliações a campo.

À microscopia, 16 animais apresentaram lesões histopatológicas, caracterizadas por lesões inflamatórias a citar: tiflíte neutrofílica necrotizante, colite neutrofílica necrotizante e infiltrado neutrofílico, partindo da lâmina própria em direção ao lúmen intestinal, conhecido como “erosões em vulcão” (Figura 3 B e D), muito característica das infecções por *C. difficile* em leitões. Destes 16 leitões, sete (43,7%) apresentavam o quadro clínico de diarreia e outros nove (56,3%) não diarreicos. Além dessas alterações inflamatórias, que representam as alterações histológicas mais comumente relatadas, Yaeger et al., (2007) observaram que uma alteração comumente encontrada

é a perda de células calciformes e aumento de atividade mitótica nas criptas. Nesse estudo também foi observada uma acentuada diminuição de células calciformes (Figura 3 B) no ceco e cólon de leitões que apresentavam alterações inflamatórias. Ao analisarmos a ocorrência das lesões histopatológicas com relação às granjas estudadas, em oito delas foram encontrados animais com alguma lesão microscópica, sendo que em uma das granjas, todos os quatro animais apresentavam as patologias. Em relação aos oito leitões negativos ao ELISA, mas que apresentavam lesões histológicas, pode estar relacionado a baixa sensibilidade do ELISA utilizado, o qual foi padronizado para detecção das toxinas em seres humanos e não em animais (Wesse et al., 2001).

A construção de uma tabela de contingência 2X2 para comparação da presença de alterações microscópicas e a detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, demonstrou pelo teste exato de Fisher, haver diferença estatística ($p < 0,0001$), e um valor preditivo positivo de 80%, permitindo afirmar que a ocorrência de lesões inflamatórias microscópicas está diretamente associada a detecção das toxinas, confirmando a ocorrência de infecção por *C. difficile*, independente dos animais apresentarem ou não o quadro clínico de diarreia. Portanto, na impossibilidade de se utilizar, ou mesmo em se adquirir o Kit ELISA, a histopatologia pode ser utilizada como ferramenta no diagnóstico da infecção por *C. difficile*.

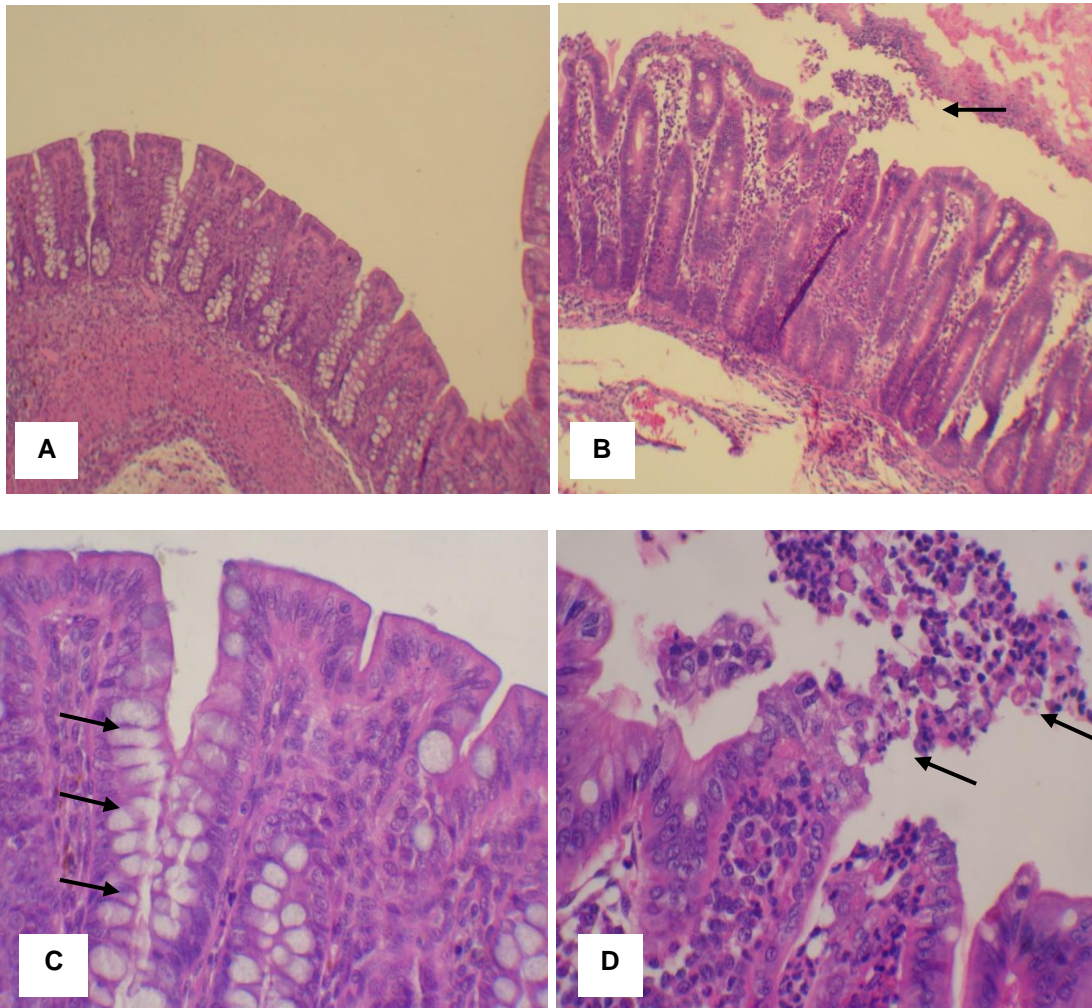


Figura 3: Cólon de leitão: A e C). Cólon normal com presença marcante de células caliciformes, vide setas (40X e 400X); B e D). Colite neutrofílica necrotisante grave, há intensa infiltração de neutrófilos partindo da lâmina própria em direção ao lúmen intestinal, lesão conhecida como “erosões em vulcão”, setas (aumento de 40X e 400X).

Estes resultados de macroscopia, microscopia e detecção das toxinas A e B encontrados no presente estudo e suas associações, confirmam as suspeitas de que a infecção por *C. difficile* em leitões neonatos com até sete dias de vida está presente na suinocultura mineira, e que leitões com infecção por este agente podem não apresentarem diarreia ou qualquer outro sinal clínico. Por outro lado, esses animais são positivos para detecção das toxinas e apresentam lesões intestinais quando submetidos a uma avaliação macroscópica e histopatológica, demonstrando a importância da associação de diferentes ferramentas investigativas no diagnóstico da infecção causada por esse agente em leitões neonatos na fase da maternidade.

5.2 Isolamento, quantificação, identificação e tipificação de *Clostridium perfringens*; histopatologia; seqüenciamento do gene *cpb2*

Dos 60 animais utilizados neste trabalho, em 50 (83,3%) foi possível isolar colônias características de *Clostridium perfringens* a partir das fezes. Na tipificação destas amostras por meio da técnica da PCR Multiplex (figura 4), observou-se que todas eram *C. perfringens* tipo A, resultado este que corrobora com o encontrado por Baker et al. (2010) de 89,8% (299/333). Destas 50 amostras de *C. perfringens* tipo A, 46% (23/30) foram isoladas de animais com

diarreia e 54% (27/30) isoladas de animais aparentemente saudáveis. Esta taxa de isolamento de *C. perfringens* tipo A em animais diarreicos de 46%, foi superior aos 21% (21/100) encontrado por Yaeger (2007). Foi possível isolar o agente em todas as granjas estudadas, resultado que corrobora o encontrado por Baker et al. (2010) em granjas americanas, demonstrando a alta frequência deste tipo de *C. perfringens*, comensal do trato intestinal de suínos saudáveis.

Em 37 (74%) amostras de *C. perfringens* tipo A isoladas, foi detectada a presença do gene *cpb2*, codificador da toxina beta-2, resultado similar ao observado por Sting (2009) na Alemanha, de 75,3% (593/787). Das 37 amostras em que se detectou a presença do gene *cpb2*, 19 (51,5%) eram de leitões com diarreia, resultado inferior aos observados por Gibert et al. (1997) encontrando 88,9% (24/27), por Klassen et al. (1999) 70% (21/30) na Holanda e 90,3% (28/31) na Suíça, por Garmory et al. (2000) 69,7% (23/33), e 91,8% (235/256) encontrado por Bueschel et al., 2003. Os dados acima sugerem uma correlação entre a ocorrência de diarreia em suínos e o isolamento de amostras de *C. perfringens* tipo A *cpb2* em animais afetados. Porém, para fundamentar este ponto de vista, é necessário uma investigação da presença da toxina beta-2 no intestino do leitão e seus efeitos locais e sistêmicos.

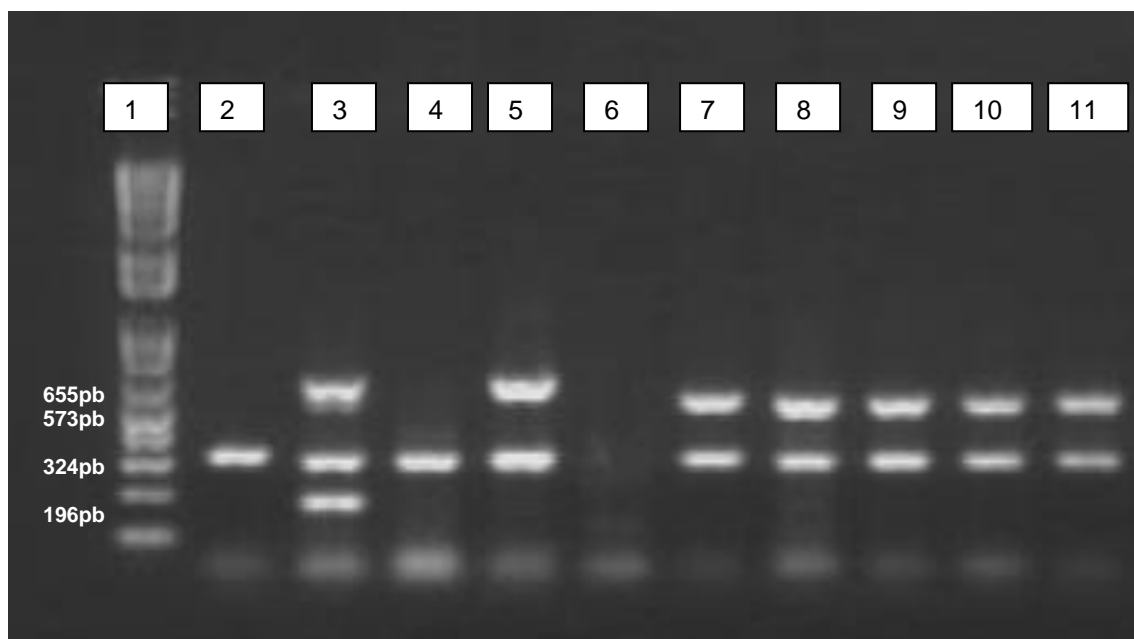


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR Multiplex de *Clostridium perfringens*. Canaleta 1: padrão de peso molecular (1 kb plus DNA Ladder - Invitrogen); Canaleta 2: amplificação do produto de 324 pares de bases do gene *plc* (*C.perfringens* A - ATCC 3624); Canaleta 3: amplificação dos produtos de 196, 324 e 655 pares de base dos genes *cpb*, *plc* e *etx* (*C. perfringens* B - ATCC 3626); Canaleta 5: amplificação dos produtos de 324 e 655 pares de bases dos genes *plc* e *etx* (*C. perfringens* D - ATCC 3629); Canaleta 6: controle negativo; Canaleta 4: amplificação do produto de 324 pares de bases do gene *plc* (*C. perfringens* tipo A isolada no experimento); Canaletas 7 a 11: amplificação dos produtos de 324 e 573 pares de bases dos gene *plc* e *cpb2* (*C. perfringens* tipo A *cpb2* positivas isoladas no experimento).

A alta frequência de *C. perfringens* tipo A *cpb2* encontrada no grupo de animais não diarreicos (48,7%) foi um resultado inesperado, uma vez que amostras positivas para o gene *cpb2* comumente estão relacionadas com a ocorrência de enterites ou diarreias (Van Asten et al., 2010). Diante desse resultado, 31 amostras de *C. perfringens* tipo A *cpb2* tiveram seu DNA extraído e o gene *cpb2* sequenciado para análise da ocorrência de mutações, que pudessem levar a síntese de uma proteína truncada, que não seria expressa, e por isso não causaria lesões e nem o quadro clínico de diarreia, justificando assim o maior número de amostras *cpb2* no grupo de animais não diarreicos.

Porém o resultado do sequenciamento revelou que apenas 10 amostras, oito do grupo não diarreico e duas do grupo diarreico, apresentavam uma mutação no gene *cpb2* que gerava uma proteína truncada sem ação efetiva. As outras 21 amostras, 12 do grupo diarreico e nove do grupo não diarreico, não apresentavam a mutação, permitindo assim a tradução normal da toxina beta-2 (figura 5). Este sequenciamento nos permite inferir que a presença do gene *cpb2* possa não ser o marcador de patogenicidade como defendido por muitos pesquisadores, sendo portanto necessário a detecção da toxina beta 2 no sistema *in vivo* e avaliação de seus efeitos tóxicos no organismo animal e não apenas a detecção do gene *cpb2* nas amostras de *C. perfringens* isoladas.



Figura 5: Alinhamento dos aminoácidos codificados pelos gene *cpb2* isolados dos leitões com e sem diarreia. Ponto significa homologia dos aminoácidos e consequente tradução da proteína normal. Asterisco significa que no local foi gerado um *stop* códon, dando origem a proteína truncada que não pode ser expressa. Finais 1 e 2 representam animais com diarreia, 3 e 4 representam animais sem diarreia. As letras codificam as granjas estudadas.

Os valores da enumeração das amostras isoladas, em número de colônias por grama de fezes, é apresentado na tabela 5. O ponto de corte de 10^7 UFC/g foi escolhido

baseado no trabalho de Manteca et al. (2001), por ser considerada a contagem indicativa da presença de infecção por *C. perfringens*.

Tabela 5: Número de colônias de *Clostridium perfringens* tipo A em unidade formadora de colônia (UFC) por grama de fezes, isoladas de leitões de zero a sete dias, com e sem diarreia

Contagem UFC/g	Leitão diarreico	Leitão não diarreico	Amostras cpb2 +	Amostras cpb2 -
$\geq 10^7$ UFC/g	9	22	20	11
$< 10^7$ UFC/g	14	5	11	8
<i>Total</i>	23	27	31	19

Ao compararmos os dados do número de amostras isoladas de animais com e sem diarreia, com os valores encontrados na enumeração, pelo teste de Qui-quadrado, observa-se haver diferença estatística ($p < 0,0002$), permitindo afirmar que as maiores contagens de *C. perfringens* tipo A, que seriam indicativas de infecção por este agente, foram encontradas nos animais que não apresentavam o quadro clínico de diarreia. Com relação às amostras cpb2 positivas e negativas, não houve diferença estatística ($p = 0,405$) quando comparado com os valores de quantificação. Estes resultados corroboram os encontrados por Baker (2006), que não observou nenhuma associação entre a contagem de *C. perfringens* tipo A nas fezes de animais com a manifestação clínica de diarreia. Estes dados indicam que a quantificação de colônias nas fezes de leitões, não é um parâmetro a ser utilizado como ferramenta de diagnóstico, como também já observado por Songer e Glock (1998).

Na avaliação histopatológica, não foram verificadas quaisquer alterações, como presença de bastonetes Gram positivos, de neutrófilos e atrofia de vilosidade, que pudessem ser associadas a este agente. Apesar de muitos trabalhos não considerarem a presença de alterações histopatológicas associadas a infecções por *C. perfringens* tipo A cpb2, alguns autores tem associado a presença de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e necrose discreta a moderada de enterócitos a esta infecção (Songer e Glock, 1998; Hammer et al., 2008). Entretanto, não foi encontrada qualquer lesão histológica que pudesse ser

atribuída a este agente. Sendo, portanto, coerente pensar que a diarreia causada por *C. perfringens* tipo A seja de caráter secretória, e não inflamatória como se suspeita.

Segundo Schultz (2006) o diagnóstico de diarreia causada por *C. perfringens* tipo A deve ser determinado pela presença dos sinais clínicos típicos, presença de grandes quantidades de bastonetes Gram positivos, a ausência de lesões graves macroscópicas e microscópicas, associados sempre a exclusão de outros potenciais enteropatógenos, porém é preciso bastante cautela na interpretação destes resultados, uma vez que este agente é normal à microbiota entérica de animais sadios, sendo importante a detecção das toxina(s) envolvida(s) via soroneutralização com antitoxina padrão homóloga.

Não foi isolada nenhuma amostra de *C. perfringens* tipo C, resultado esse que corrobora com os encontrados na maioria dos estudos envolvendo isolamento e identificação de *C. perfringens* em leitões diarreicos (Yaeger, 2007; Sting., 2009; Baker et al., 2010). À histopatologia também não houve qualquer alteração sugestiva de infecção por *C. perfringens* tipo C. Uma provável explicação seria a eficiência das medidas terapêuticas adotadas nas granjas como a utilização preventiva de antimicrobianos e a vacinação das porcas com toxóide beta presente em algumas vacinas comerciais disponíveis no mercado.

5.3 Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *Clostridium perfringens*

antimicrobianos testados estão compilados na tabela 6.

A CIM das 50 amostras de *C. perfringens* tipo A isoladas de leitões frente aos 15

Tabela 6: Distribuição da concentração inibitória mínima em micrograma por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) dos 15 antimicrobianos frente as 50 amostras de *Clostridium perfringens* tipo A isoladas de leitões de até sete dias de vida, com e sem diarreia

Antibiótico	Diluição do antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)												CIM ₅₀	CIM ₉₀
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256		
Amoxicilina	5	31	9	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0,5	1
Avilamicina	0	0	15	2	16	9	0	0	2	1	0	5	4	128
Ceftiofur	21	9	2	4	6	5	0	0	0	0	3	0	0,5	8
Estreptomina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	42	>256	>256
Florfenicol	0	1	2	24	9	2	2	2	0	7	1	0	2	128
Josamicina	0	0	0	1	3	17	6	0	2	0	5	16	16	>256
Leucomicina	0	0	7	14	13	0	2	0	0	0	7	7	4	>256
Lincomicina	0	0	0	6	8	8	1	1	0	0	7	19	16	256
Narasina	0	2	1	41	0	2	0	0	0	0	0	4	2	8
Neomicina	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4	44	>256	>256
Norfloxacina	0	0	3	0	0	2	1	3	9	23	9	0	128	256
Sulfa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	>256	>256
Tetraciclina	0	0	0	4	0	4	21	2	0	5	14	0	16	256
Tilosina	13	23	5	2	1	0	3	3	0	0	0	0	0,5	16
Trimetopim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	>256	>256

Conforme demonstrando na tabela acima, os antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina e ceftiofur), ionóforos (narasina e avilamicina), macrolídeos (tilosina) e o florfenicol foram às bases farmacológicas mais eficientes na inibição do crescimento de *C. perfringens* tipo A. Em contrapartida, os antibióticos das classes das quinolonas (norfloxacina), aminoglicosídeos (estreptomina e neomicina), sulfonamidas (trimetopim e sulfa) e a tetraciclina foram às bases farmacológicas menos eficientes, com um perfil elevado de amostras resistentes.

Todas as amostras testadas foram inibidas pela amoxicilina em concentrações abaixo de $4\mu\text{g/mL}$, limite de sensibilidade determinado pelo CLSI (2009). Já o limite de sensibilidade estipulado para o ceftiofur é de $16\mu\text{g/mL}$ e nesse trabalho esta droga inibiu o crescimento de 94% isolados até esta concentração. A CIM₉₀ de $128\mu\text{g/mL}$ determinada para o florfenicol foi oito vezes maior que a encontrada por Tansuphasiri et al. (2009) frente a isolados de suínos com quadros de enterite na Tailândia.

Considerando o limite de sensibilidade de $8\mu\text{g/mL}$ para o florfenicol, este antibiótico inibiu o crescimento de 76% das amostras de *C. perfringens* tipo A. Para a tilosina, o limite de sensibilidade é de $8\mu\text{g/mL}$ e nesse trabalho, 88% dos isolados tiveram seu crescimento inibido até esta concentração. A tetraciclina e lincomicina apresentaram 84 e 72% das amostras inibidas nas concentrações acima de 16 e $8\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo estes os limites de resistência determinados pelo CLSI (2009). Genes responsáveis pela resistência a tetraciclina e lincomicina já foram descritos em amostras de *C. perfringens* isoladas de humanos e animais (Chopra e Roberts, 2001; Sasaki et al., 2001; Marks e Kather, 2003; Johansson et al., 2004; Chalmers et al., 2008; Gholamiandehkordi, et al., 2009; Silva et al., 2009), fato que pode explicar o alto índice de resistência encontrado no presente estudo para estas duas drogas. Os demais antimicrobianos foram menos ativos, necessitando de altas concentrações para inibirem o crescimento de *C. perfringens* tipo A, porém estes resultados devem ser

interpretados como menor sensibilidade inerente a essas drogas, e não como resistência mediada por genes adquiridos ou mutações.

Os resultados CIM₅₀ e CIM₉₀ de isolados de animais com e sem diarreia são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Distribuição da concentração inibitória mínima 50 (CIM₅₀) e concentração inibitória mínima 90 (CIM₉₀) em micrograma por mililitro (µg/mL) dos 15 antimicrobianos frente as 23 amostras de *Clostridium perfringens* tipo A isoladas de leitões com diarreia, e as 27 amostras de *Clostridium perfringens* tipo A isoladas de leitões sem diarreia.

Antibiótico	Diarreico		Sem diarreia	
	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
Amoxicilina	0,5	2	0,5	1
Avilamicina	4	>256	4	8
Ceftiofur	0,5	8	0,5	4
Estreptomicina	>256	>256	>256	>256
Florfenicol	2	128	2	128
Josamicina	16	>256	16	>256
Leucomicina	4	>256	4	>256
Lincomicina	256	>256	256	>256
Narasina	2	>256	2	2
Neomicina	>256	>256	>256	>256
Norfloxacina	128	256	64	256
Sulfa	>256	>256	>256	>256
Tetraciclina	16	256	16	256
Tilosina	0,5	16	0,5	1
Trimetropin	>256	>256	>256	>256

Ao comparar o perfil de inibição das amostras isoladas de leitões com quadro clínico de diarreia, com as isoladas de leitões não diarreicos, observa-se uma mudança na sensibilidade à avilamicina, narasina e tilosina. As CIM₉₀ destas três drogas ocorreram em concentrações mais elevadas nos isolados de animais diarreicos. Em relação à narasina e avilamicina, esta mudança no perfil foi mais significativo passando de 2 e 8µg/mL, respectivamente, nas amostras dos leitões não diarreicos para >256µg/mL nas amostras dos leitões diarreicos, concentração 128 vezes superior para narasina e 32 vezes superior para avilamicina. Nas demais drogas testadas

não foram percebidas mudanças no perfil de inibição, quando se comparou a CIM₉₀ dos isolados de animais com e sem diarreia. Estes resultados sugerem que alguns antibióticos, principalmente os ionóforos, não devam ser utilizados para o tratamento terapêutico de diarreias causadas por *C. perfringens* tipo A, devendo, portanto, seu uso ser restrito a forma de promotor de crescimento.

Na tabela 8 são apresentados os resultados CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados dos leitões com e sem diarreia e que apresentavam ou não a presença do gene *cpb2*.

Tabela 8: Distribuição da concentração inibitória mínima 50 (CIM₅₀) e concentração inibitória mínima 90 (CIM₉₀) em micrograma por mililitro (µg/mL) dos 15 antimicrobianos frente as 31 amostras de *Clostridium perfringens* tipo A, *cpb2* positivas, e as 19 amostras de *Clostridium perfringens* tipo A, *cpb2* negativas, isoladas de leitões com e sem diarreia.

Antibiótico	Cpb2 positivo		Cpb2 negativo	
	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
Amoxicilina	0,5	1	0,5	4
Avilamicina	4	128	4	256
Ceftiofur	1	8	0,25	2
Estreptomina	>256	>256	>256	>256
Florfenicol	4	128	2	128
Josamicina	256	>256	8	>256
Leucomicina	4	>256	2	4
Lincomicina	256	>256	8	>256
Narasina	2	2	2	16
Neomicina	>256	>256	>256	>256
Norfloxacina	128	256	128	128
Sulfa	>256	>256	>256	>256
Tetraciclina	32	256	16	256
Tilosina	0,5	32	0,5	0,5
Trimetropin	>256	>256	>256	>256

Quando se compara os resultados dos antimicrobianos que apresentaram menores CIM₉₀ (Tab. 6), com os isolados que possuíam o gene *cpb2* à estas mesmas drogas (Tab. 8), observa-se uma variação no perfil de sensibilidade, principalmente, com relação a tilosina, cuja CIM₉₀ passou de 16µg/mL para 32µg/mL. Entretanto, quando correlacionado com o limite de sensibilidade estabelecido pelo CLSI (2009), apenas o valor referente à tilosina 32µg/mL, está quatro vezes maior ao limite de referência. A comparação apenas do perfil de inibição das amostras *cpb2* positivas e negativas demonstra que a CIM₉₀ obtida nos isolados *cpb2* positivos para amoxicilina, narasina e avilamicina, foram inferiores as CIM₉₀ encontradas para os isolados *cpb2* negativos, sugerindo que, principalmente, os ionóforos podem ser indicados, como promotores de crescimento, no controle das amostras portadoras do gene *cpb2*, as quais representaram 62% das amostras isoladas neste trabalho. Em contrapartida a CIM₉₀ da tilosina, ceftiofur e leucomicina frente aos isolados *cpb2* positivos foram superiores as CIM₉₀ encontradas para os isolados *cpb2* negativos, sugerindo também que o uso destas três bases de amplo acesso na

suinocultura nacional, não seja recomendado para o controle de diarreia causada por *C. perfringens* tipo A *cpb2* positivo.

A droga que apresentou o melhor perfil de inibição antimicrobiana frente a isolados de *C. perfringens* tipo A de leitões, com ou sem o quadro clínico de diarreia e a presença do gene *cpb2*, neste estudo foi a amoxicilina. Este é o primeiro trabalho a comparar o CIM para amostras de *C. perfringens* tipo A com o gene *cpb2*, em leitões neonatos com e sem diarreia.

Os dados de um antibiograma representam uma estimativa *in vitro* da sensibilidade ou resistência de determinados agentes a uma droga. Geralmente estes resultados apresentam boa correlação com os resultados dos tratamentos, entretanto, não existe a garantia da eficiência dos tratamentos *in vivo*, situação na qual outros fatores interagem. Desta forma, sugere-se que os antimicrobianos sejam utilizados somente para fins terapêuticos, e como promotores de crescimento somente os antibióticos não utilizados na medicina humana. Porém, o ideal é a intensificação

na adoção de medidas de controle visando o manejo correto de higiene e desinfecção do ambiente, associado à vacinação ou ao uso de estratégias alternativas, como o uso de probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos, extratos vegetais e homeopatia.

5.4 Produção e avaliação da vacina experimental polivalente

As toxinas recombinantes alfa de *Clostridium perfringens* tipo A e beta de *Clostridium perfringens* tipo C purificadas mediante cromatografia de afinidade estão representadas na figura 6.

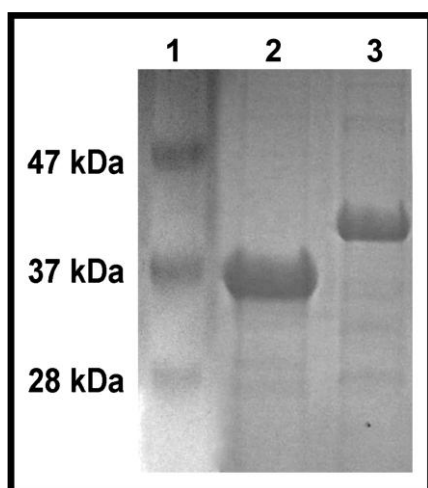


Figura 6: SDS-PAGE 12% da purificação mediante cromatografia de afinidade da toxina alfa e toxina beta recombinantes de *Clostridium perfringens* produzidas em *Escherichia coli*. (1) BioPioneer Low Range Pre-Stained Protein Marker. (2) Toxina beta recombinante (40kDa). (3) Toxina alfa recombinante (43kDa).

As toxinas A/B de *Clostridium difficile* ATCC 9689 produzidas no biorreator de bancada e concentradas em sistema de ultrafiltração estão representadas na figura 7.

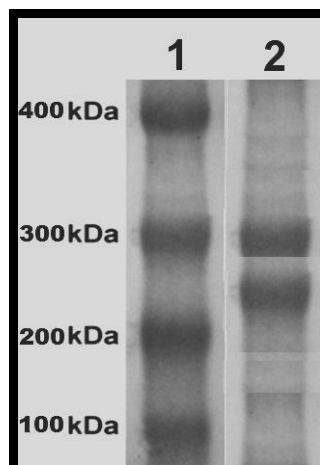


Figura 7: SDS-PAGE 7,5% das toxinas A/B de *Clostridium difficile*. (1) BioPioneer Low Range Pre-Stained Protein Marker. (2) Toxina A de *Clostridium difficile* (308kDa) e Toxina B de *Clostridium difficile* (270kDa).

Na titulação das toxinas A/B de *C. difficile* em linhagem celular VERO obteve-se um título de 20.480ECP/mL. A inativação das toxinas A/B com formol ocorreu em 24 horas, com a morte dos cinco camundongos inoculados apenas nas primeiras 24 horas, aproximadamente 13 horas após inoculação. Após este primeiro período todos os animais inoculados ficaram vivos comprovando a inativação das toxinas. As toxinas recombinantes alfa e beta eram atóxicas, não sendo necessário o processo de inativação com formol.

O teste de soroneutralização *in vitro* das toxinas A/B de *C. difficile* em linhagem VERO padronizado no nível de teste L+/50, demonstrou ser uma alternativa segura e precisa na mensuração de anticorpos neutralizantes, podendo ser utilizado nos testes de potência e eficiência de vacinas clostridias que contenham os toxóides A e B em sua composição, sendo, portanto, uma importante ferramenta dentro da medicina veterinária.

No teste de esterilidade realizado com a primeira partida da vacina experimental polivalente utilizada nos coelhos e com a segunda partida utilizada nas porcas gestantes, não houve crescimento nos tubos de caldo tioglicolato e caldo sabouraud incubados em aerobiose e anaerobiose durante os 21 dias de incubação. No teste de inocuidade realizado nas duas marrãs inoculadas com o dobro da dose teste, por via subcutânea, não foram observadas reações locais ou sistêmicas nos animais. Estes resultados comprovam que a vacina experimental produzida foi estéril e inócua.

Os coelhos foram vacinados com uma dose de 2mL, contendo 200µg do toxóide alfa recombinante, 200µg do toxóide beta recombinante e 1000µg do toxóide A/B. O título de antitoxina alfa encontrado no pool de soro dos coelhos foi de 9,6UI/mL, superior ao limite mínimo estabelecido pelo USDA de 4UI/mL (USDA, 2002). O título de antitoxina beta foi de 20,4UI/mL, também foi superior ao limite mínimo estabelecido pela

legislação brasileira de 10UI/mL (Brasil, 1997). Já para o título de antitoxina A/B de *C. difficile* não existe parâmetro estabelecido na literatura mundial, sendo este trabalho o primeiro a padronizar um teste de soroneutralização em célula para detecção de anticorpos neutralizantes. Portanto, especula-se que o título de 6,4UI/mL de antitoxina A/B seja satisfatório em induzir proteção aos animais vacinados. Estes resultados comprovam que no teste de potência realizado em coelhos, a vacina experimental polivalente foi eficiente em induzir títulos de anticorpos neutralizantes, permitindo a realização da segunda etapa de vacinação das porcas gestantes. Na literatura mundial não existem trabalhos que avaliem a potência de uma vacina com os mesmos antígenos de *C. difficile* utilizados neste trabalho, o que impossibilita comparações.

Os títulos de anticorpos neutralizantes antitoxina alfa, antitoxina beta e antitoxina A/B do soros das porcas estão representados na tabela 9.

Tabela 9: Nível de anticorpos neutralizantes em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de antitoxina alfa, antitoxina beta de *Clostridium perfringens* e antitoxina A/B de *Clostridium difficile* em soros de porcas imunizadas.

	Antitoxina alfa	Antitoxina beta	Antitoxina A/B
Porca 1	6,9 UI/ml	17,3 UI/ml	1,6 UI/ml
Porca 2	4,8 UI/ml	12 UI/ml	1,6 UI/ml
Porca 3	4,8 UI/ml	12 UI/ml	1,6 UI/ml
Porca 4	5,7 UI/ml	14,4 UI/ml	3,2 UI/ml
Porca 5	6,9 UI/ml	17,3 UI/ml	1,6 UI/ml
Porca 6	5,7 UI/ml	14,4 UI/ml	0,8 UI/ml
Porca 7	6,9 UI/ml	14,4 UI/ml	1,6 UI/ml
Porca 8	ND	ND	ND

*ND= não detectável.

Na titulação da antitoxina alfa no soro das porcas a média dos títulos foi de 5,9UI/mL, com uma pequena variação individual de 4,8 a 6,9UI/mL. Este valor médio do título de antitoxina alfa encontrado foi inferior ao obtido por Hammer et al. (2008) de 24UI/mL, entretanto no estudo conduzido por estes pesquisadores a vacina utilizada era monovalente, ou seja, só continha o toxóide alfa e não foi informado a

concentração deste antígeno o que dificulta o estabelecimento de comparações mais específicas. Na titulação da antitoxina beta no soro das porcas a média dos títulos foi de 14,5UI/mL, com uma pequena variação individual de 12 a 17,3UI/mL. O valor médio do título de antitoxina beta encontrado foi praticamente três vezes superior ao obtido por Mastisheck e McGinley (1986) de 5,3UI/mL. No estudo conduzido por estes

dois pesquisadores a variação individual foi bem superior ao observado neste trabalho, com títulos individuais indo de 1,8 a 18UI/mL. No trabalho de Mastisheck e McGinley (1986) também não é informado a concentração do toxóide beta na vacina utilizada, não permitindo maiores discussões. Já para o título de antitoxina A/B de *C. difficile* foi observado um título médio de 1,7UI/mL, com variações individuais de 1,6 a 3,2UI/mL. Este valor médio do títulos de anticorpos antitoxina A/B observado no soro das porcas foi aproximadamente seis vezes menor ao observado nos coelhos, o que nos permite pensar que a concentração desse antígeno possa ser mais elevada na produção da vacina para os suínos no intuito de se obter

melhores títulos de anticorpos, sendo necessários novos ensaios para a determinação desta tendência. Porém não existem na literatura estudos que estabeleçam os níveis mínimos dos títulos de anticorpos neutralizantes necessários para conferir proteção aos animais, podendo, o valor encontrado de 1,7UI/mL ser suficiente para proteger os animais contra a infecção por *C. difficile*.

Os títulos de anticorpos neutralizantes antitoxina alfa, antitoxina beta e antitoxina A/B no *pool* de soros das leitegadas das porcas imunizadas, coletados 24 horas após o nascimento, está representado na tabela 10.

Tabela 10: Nível de anticorpos neutralizantes em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de antitoxina alfa, antitoxina beta de *Clostridium perfringens* e antitoxina A/B de *Clostridium difficile* em *pool* de soro de leitegadas das porcas imunizadas.

	Antitoxina alfa	Antitoxina beta	Antitoxina A/B
Leitegada 1	4 UI/ml	12 UI/ml	0,4 UI/ml
Leitegada 2	4 UI/ml	10 UI/ml	0,4 UI/ml
Leitegada 3	4 UI/ml	10 UI/ml	0,4 UI/ml
Leitegada 4	4 UI/ml	12UI/ml	0,8 UI/ml
Leitegada 5	4,8 UI/ml	12UI/ml	0,4 UI/ml
Leitegada 6	4 UI/ml	10UI/ml	0,4 UI/ml
Leitegada 7	4,8 UI/ml	10UI/ml	0,4 UI/ml
Leitegada 8	ND	ND	ND

*ND = não detectável.

Na titulação da antitoxina alfa no *pool* de soro das leitegadas, a média dos títulos foi de 4,2UI/mL, com uma pequena variação individual de 4 a 4,8UI/mL. Este valor médio do título de antitoxina alfa encontrado foi inferior ao obtido por Hammer et al. (2008) de 23,1UI/mL, e como já discutido anteriormente a diferença dos imunógenos empregados dificulta o estabelecimento de comparações. Na titulação da antitoxina beta no *pool* de soro das leitegadas a média dos títulos foi de 10,8UI/mL, com uma pequena variação entre as leitegadas de 10 a 12UI/mL. O valor médio do título de antitoxina beta encontrado foi praticamente duas vezes menor ao obtido por Mastisheck e McGinley (1986) de 23UI/mL, diferente do

observado nas porcas. No estudo conduzido por estes dois pesquisadores a variação entre leitegadas foi muito superior ao observado neste trabalho, com títulos variando de 0,5 a 75,5UI/mL. A pequena variação nos títulos de anticorpos encontrados no *pool* de soro das leitegadas nesse trabalho, quando comparado ao trabalho de Mastisheck e McGinley (1986), demonstram a importância do parto assistido e do manejo de colostro dentro da rotina de granjas de suínos. A colostragem realizada de maneira correta e eficiente, reflete diretamente nos resultados dos títulos de anticorpos neutralizantes, como observado nesse estudo. Já para o título de antitoxina A/B de *C. difficile* foi observado

um título médio de 0,45UI/mL, com variações individuais de 0,4 a 0,8UI/mL.

A diarreia neonatal suína causada por *C. perfringens* tipo A, *C. perfringens* tipo C e *C. difficile* leva à perdas consideráveis no sistema de produção de suínos, uma vez que o tratamento na grande maioria dos casos é impraticável. Devido as características ecológicas desses agentes, que são ubiqüitários do trato digestivo dos animais e solo, e pela forma de resistência no ambiente da granja por meio de esporos, a erradicação da diarreia causada por estes agentes é praticamente impossível. Portanto, o controle e profilaxia devem basear-se em medidas adequadas de manejo, e vacinação das porcas gestantes, já que os leitões estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear a enfermidade. Os resultados encontrados nesse trabalho demonstraram que os clostrídios entéricos estão envolvidos nos casos de diarreia em leitões até sete dias de vida em Minas Gerais e que a vacina polivalente elaborada foi imunogênica, podendo vir a ser uma ferramenta estratégia no controle das diarreias neonatais na maternidade.

6. CONCLUSÕES

- A infecção por *Clostridium difficile* está presente na suinocultura mineira em leitões com até sete dias de vida.
- Não foram encontradas evidências diagnósticas, que confirmassem a diarreia neonatal causada por *Clostridium perfringens* tipo A .
- O sequenciamento do gene *cpb2* revelou que este parece não ser o melhor marcador de patogenicidade e virulência.
- A CIM demonstrou que amoxicilina, ceftiofur e a narasina foram os antimicrobianos que apresentaram a melhor atividade inibitória.
- A vacina experimental polivalente contendo os toxóides alfa recombinante de *Clostridium perfringens* tipos A, beta

recombinante de *Clostridium perfringens* tipo C, e A/B nativo de *Clostridium difficile* foi imunogênica, podendo vir a ser uma importante ferramenta no controle das diarreias neonatais causadas por clostrídios na maternidade de granjas suinícolas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C.M. *Meios e soluções comumente empregados em laboratórios*. Seropopéia, RJ: EDUR, 2000, 353 p.
- ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. 912 p.
- 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.
- ARBUCKLE, J.B.R. The attachment of *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. *J. Pathol.*, v.106, p.65-72, 1972.
- ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of diarrhea. In: ANDERSON, N.V. *Veterinary Gastroenterology*. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap.10, p.163-172. 1992.
- 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.
- BAKER, A.A.; DAVIS, E.; REHBERG, T. et al. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the Midwest. *Applied Envir. Microbiol.*, v.76, n.9, 2961-2967, 2010.

- BARCELLOS, D.E.S.N.; MARQUES, B.M.F.P.P.; MORES, T.J. et al. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. *Acta Scien. Vet.*, v.37, n.1, p.151-155, 2009.
- BARBUT, F.; DECRÉ, D.; LALANDE, V. et al. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP ribosyltransferase)-producing strains. *J. Med. Microbiol.*, v.54, p.181-185, 2005.
- BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.*, v.100, p.11-16, 2004.
- BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: CONGRESSO DE PRODUÇÃO PORCINA, 2000, BUENOS AIRES. ANAIS...Buenos Aires, 2000. p.56-78.
- BENARROCH, E.E. Enteric nervous system. *Neurology*, v.69, p.1953-1967, 2007.
- 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.
- BOKORI-BROWN, M.; SAVVA, C.G.; COSTA, S.P.F. et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.*, v.278, n.3, p.4589-4601, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49 de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas contra o carbúnculo sintomático, gangrena gasosa, enterotoxemia e tétano. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169.
- BUESCHEL, D.M.; JOST, B.H.; BILLINGTON, S.J. et al. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.*, v.94, p.121-129, 2003.
- 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.
- BURCH, D. Problems of antibiotics resistance in pig in the UK. In *Practice*, v.27, p.37-43, 2005.
- BURKGREN, T. Prudent use of antimicrobials: an American vision. In: PROCEEDINGS OF 38TH AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIAN, 2007, Orlando. Proceedings. Orlando: 2007. p.1-7.
- CARVALHO, L.F.O.S. Vacinas e vacinações em suinocultura intensiva. In: IV SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, 2008, FLORIANÓPOLIS. ANAIS...Florianópolis: 2005. p.14-27.
- CASTAGLIUOLO, I.; LAMONT, J.T.; LETOURNEAU, R. et al. Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholera* enterotoxin in rat ileum. *Gastroenterology*, v.107, p.657-665, 1994.
- CHALMERS, G.; MARTIN, S.W.; HUNTER, D.B. et al. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chicken at a commercial farm. *Vet. Microbiol.*, v.127, 116-127, 2008.
- CHANG, E.B.; FIELD, M.; MILLER, R.J. α 2-Adrenergic receptor regulation of ion transport in rabbit ileum. *A. J. Physiol.*, v.242, p. G237-G242, 1982.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.65, 232-260, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard – Seventh edition. M11-07. v.27, n.2, 2009.

CLOOTEN, J.; KRUTH, S.; ARROYO, L. 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.

COLLINS, J.E.; BERGELAND, M.E.; BOULEY, D. et al. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *J. Vet. Diag.c Invest.*, v.1, p. 351-353, 1989.

Compêndio de produtos veterinários, 2010. Disponível em: <<http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html>>. Acesso em: 01 de março de 2010.

Conditional Licenses for Products Containing *Clostridium perfringens* Type A. United States Department Of Agriculture. Center for Veterinary Biologics Notice N° 20-25/2002. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications. Acessado em 12 junho de 2011.

COSTA, G.M.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F. et al. Diarreia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.3, p.401-404, 2004.

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.

European Pharmacopoeia. 2 ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S. A. 1998.

FERNELIUS, A.L.; CLASSICK, L.G.; SMITH, R.L. Evolution of β -propiolactone-inactivated and chloroform-treated-virus vaccines against bovine viral diarrhea-mucosal disease. *Am. J. Vet. Res.*, v.33, n.7, p.1421-31, 1972.

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. Ins.t Oswaldo Cruz*, v.98, n.4, p.451-455, 2003.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest.*, v.111, p.931-943, 2003.

FORTE, L.R.; THORNE, P. K.; EBER, S. L. et al. . Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *A. J. Physiol.*, v.263, p.C607- C615, 1992.

GARMORY, H.S.; CHANTER, N.; FRENCH, N.P. et al. Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.*, v.124, p.61-67, 2000.

GIANNELLA, R.A.; GOTS, R.E.; CHARNEY, A.N. et al. Pathogenesis of Salmonella-mediated intestinal fluid secretion. Activation of adenylate cyclase and inhibition by indomethacin. *Gastroenterology*, v.69, n.6, p.1238-1245, 1975.

- GHOLAMIANDEHKORDI, A.; EECKHAUT, V.; LANCKRIET, A. et al. Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium. *Vet. Res. Commun.*, v.33, p.1031-1037, 2009.
- GIBERT, M.; JOLIVET-RENAUD, C.; POPOFF, M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, v.203, p.65-73, 1997.
- 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.
- 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.
- GREENWOOD, B.; DAVISON, J.S. The relationship between gastrointestinal motility and secretion. *A. J. Physiol.*, v.252, p.G1-G7, 1987.
- GRONDAHL, M.L.; JENSEN, G.M.; NIELSEN, C.G. et al. Secretory pathways in *Salmonella* Typhimurium-induced fluid accumulation in the porcine small intestine. *J. Med. Microbiol.*, v.47, n.2, p.151- 157, 1998.
- GUEDES, R.M.V.; VIEIRA, A.A.S.; ASSIS, R.A. et al. Multiplex PCR for typification of *Clostridium perfringens* in feces of diarrheic piglets in Brazil. In: 19th CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 19, 2006, Copenhagen. Proceedings...Copenhagen: 2006. p.332.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K. et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.*, v.100, p.255-268, 2004.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*; v.41, p.95-98, 1999.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- HAMMER, J.M.; FUHRMAN, M.; WALZ, M. Serological evaluation of a *Clostridium perfringens* type A toxóide in a commercial swine herd. *J. Swine Health Prod.*, v.16, n.1, p.37-40, 2008.
- HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J. et al. Prevalence of beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.358-361, 1999.
- HOLMGREN, N.; BAVERUD, V.; LINDEBERG, A. et al. *Clostridium perfringens* type A in neonatal piglets without clinical diarrhoea symptoms. In: 19TH CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 19, 2006, COPENHAGEN. Proceedings...Copenhagen: 2006. p. 321.
- HOLT, P.R.; YEH, K.Y. Effects of starvation and refeeding on jejunal disaccharidase activity. *Digest. Dis. Scien.*, v.37, p.827-832, 1992.
- HOPMAN, N.E.M.; KEESSEN, E.C.; HARMANUS, C. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet. Microb.*, v.149, n.1, p.186-192, 2011.
- JOHANSSON, A.; GREKO, C.; ENGSTRÖM, B.E. et al. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet. Microb.*, v.99, p.251-257, 2004.
- JONES, M.A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *Vet. Rec.*, n.112, p.253-254, 1983.
- JONES, S.L.; BLIKSLAGER, A.T. Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. *J. Vet. Int. Med.*, v.16, p.222-228, 2002.
- JUKES, T.H.; CRAWFORD, L.M. *Antibiotics, sulfonamides and public health*. Boca Raton: CRC, 1984. 397p.

- KELL, M.K.; SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet. Pathol.*, v.43, p.225-240, 2006.
- KELL, M.K.; SONGER, J.G. The distribution and density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs. *Vet. Pathol.*, v.44, n.6, p.814-22, 2007.
- KEELY, S.J.; BARRETT, K.E. Regulation of chloride secretion. Novel pathways and messengers. *Annual New York Acad. Scien.*, v.915, p.67-76, 2000.
- KLAASEN, H.L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; BAKKER, J. et al. Detection of the $\beta 2$ toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Imm. Med. Microbiol.*, v.24, p.325-332, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970.
- 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.
- LI, J.; MACCLANE, B.A. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and ph-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Applied Envir.Microbiol.*, v.72, p.7620-7625, 2006.
- LIMA, C.G.R.D.; LOBATO, Z.I.P.; PIRES, P.S. et al. Padronização de teste de potência *in vitro* para vacinas que contenham toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B. *Arq. Inst. Biol.*, v.78, n.4, p.507-512, 2011.
- LOBATO, F.C.F. *Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil*. 1989. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; ASSIS, R.A. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Rev. Port. Ciên. Vet.*, v.102, p.23-34, 2007.
- LUNA, L. G. *Manual of histologic staining methods of the armed forces of institute of pathology*. 3ed. New York: McGraw Hill. 1968. 258p.
- 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.
- MANTECA, C.; DAUBE, G.; PIRSON, V. et al. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Vet. Microbiol.*, v.81, p. 21-32, 2001.
- 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.
- MARKS, S.L.; KATHER, E.J. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet. Microb.*, v.94, p.39-45, 2003.
- MARVAUD, J.C.; STILES, B.G.; CHENAL, A. et al. *Clostridium perfringens* iota toxin: mapping of the Ia domain involved in docking with Ib and cellular internalization. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.43659-43666, 2002.

- MATISHECK, P.H.; MCGINLEY, M. Colostral transfer of *Clostridium perfringens* type C beta antitoxin in swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, n.5, p.1132-1333, 1986.
- MATHEW, A.G. Management of antibiotic resistance in swine production. In: 34TH AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS. 2003. ORLANDO. Proceedings...Orlando: 2003. p.419-425,
- MEER, R.R.; SONGER, J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, p.702-705, 1997.
- MICLARD, J.; JÄGGI, M.; SUTTER, E. et al. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet. Microb.*, v.137, p.320-325, 2009.
- MOESER, A.M.; BLIKSLAGER, A.T. Mechanisms of porcine diarrhea. *J. A. Vet. Med. Assoc.*, v.231, n.1, p.56-67, 2007.
- MOON, H.W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J. A. Vet. Med. Assoc.*, v.172, n.4, p.443-448, 1978.
- MORENO, A.M.; BACCARO, M.R.; FERREIRA, A.J.P. et al. Detection of $\beta 2$ toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, n. 2, p. 135-138, jun. 2003.
- MORIN, M.; TURGEON, D.; JOLETTE, J. et al. Neonatal Diarrhea of pigs in Quebec: Infectious causes of significant outbreaks. *Can. J. Comp.Med.*, v.47, n.1, p. 11-17, 1983.
- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.*, v.30, p.259- 284, 1999.
- NAGY, J.; BILKEI, G. Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit. *Vet. J.*, v.166, p.98-100, 2003.
- 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*, v.33, n.6, p.25-29, 2009.
- PAIVA NETTO, J.V. *Antibióticos e quimioterápicos em medicina veterinária*. São Paulo: Atheneu, 1989. 181p.
- PERELLE, S., GIBERT, M., BOQUET, P. et al. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Imm.*, v. 61, p.5147-5156, 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.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, v.7, p.104-110, 1999.
- POPOFF, M.R. Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Inf. Imm.*, v.55, n.1, p.35-43, 1987.
- POPOFF, M.R.; BOUVET, P. Clostridial toxins. *Future Microb.*, v.4, n.8, 1021-1064, 2009.
- POST, K.W.; SONGER, J.G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs. *Anaerobe*, v.10, p.47-50, 2004.
- 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. Diag. Invest.*, v.14, p. 258-259, 2002.
- POXTON, I.R.; MCCOUBREY, J.; BLAIR, G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.7, n.8, p.421-427, 2001.

- PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. *Ann. rev. Bioch.*, v.45, p. 501-530, 1976.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, n.3, p.493-497, 1938.
- REYNOLDS, D.J.; HALL, G.A.; DEBNEY, T.G. et al. Pathology of natural rotavirus infection in clinically normal calves. *Res. Vet. Scien.*, v.38, p.264-269, 1985.
- ROBERTS, S.A.; SHORE, K.P.; PAVIOUR, S.D. et al. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in New Zealand: 1999-2003. *J. Antimic. Chemot.*, v.57, p.992-998, 2006.
- ROOD, J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.52, p.333-360, 1998.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; DALE, N. G. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Rev. Microbiol.*, v.7, p.526-536, 2009.
- SALVARANI, F.M.; LOBATO, Z.I.P.; ASSIS, R.A. et al. *In vitro* evaluation of the alpha toxoid from *Clostridium septicum*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.4, p.778-783, 2010.
- SAMBOL, S.P.; MERRIGANAN, M.M.; LYERLY, D. et al. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infect Imm.*, v. 68, p.5480-5487, 2000.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANZ, M.G.; VENTURINI, L.; ASSIS, R.A. et al. Fibrinonecrotic enteritis of piglets in a commercial farm: a postmortem study of the prevalence and the role of lesion associated agents *Isospora suis* and *Clostridium perfringens*. *Braz. J. Vet. Res.*, v.27, n.7, p.297-300, 2007.
- SARSUR NETO, J.M. Penicilinas: farmacologia e terapêutica. *Ver. Farm. Bioq.*, v.5, n.2, p.169-182, 1983.
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, Y. et al. Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Vet. Microbiol.*, v.81, n.1, 61-69, 2001.
- SAVIDGE, T.C.; PAN, W.; NEWMAN, P. et al. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology*, v.125, p.413-420, 2003.
- SCHOTTE, U.; TRUYEN, U. NEUBAUER, H. Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors – a review. *J. Vet. Med.*, v.51, p.423-426, 2004.
- SCHULTS, R.; SONGER, J.G.; YAEGER, M.J. Development of an antemortem test for *Clostridium perfringens* type A in swine. In: 19TH CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 2006, COPENHAGEN. Proceedings...Copenhagen:2006. v.1, p. 330.
- 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.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; ASSIS, R.A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, p.261-263, 2009.
- SILVA, R.O.S.; CRUZ JÚNIOR, E.C.C.; SALVARANI, F.M. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* piglets in the state of Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v.41, n8, p.1430-1435, 2011.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, p. 216-234, 1996.

- SONGER, J.G.; GLOCK, R.D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. *J. Swine Health Prod.*, v.6, p.223-225, 1998.
- SONGER, J.G.; POST, K.W.; LARSON, D.J. et al. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *J. Swine Health Prod.*, v.8, n.4, p. 185-189, 2000.
- SONGER, J.G.; POST, K.W.; GLOCK, R.D.. Clostridial diarrhea diseases: neonatal infections that affect postweaning performance. IN: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 35, 2004, IOWA. Proceedings...Iowa: 2004. p. 491.
- SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.17, p.528-536, 2005.
- SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1-4, 2006.
- 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.
- SOUZA, A.M.; REIS, J.K.P.; ASSIS, R.A. et al. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genetics Mol. Res.*, v.9, n.1, p.266-276, 2010.
- SOUZA JÚNIOR, M.F.; LOBATO, Z.I.P.; PIRES, P.S. et al. Padronização da titulação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em linhagem contínua de células como alternativa ao bioensaio animal. *Ciência Rural*, v.40, n.3, p.600-603, 2010.
- SPILLER, R.C. Role of nerves in enteric infection. *Gut*, v.51, p.759-762, 2002.
- SPRINGER, S.; SELBITZ, H.J. The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Imm. Med. Microbiol.*, v.24, p.333-336, 1999.
- STING, R. Detection of beta2 and major toxins genes by PCR in *Clostridium perfringens* field isolates of domestic animals suffering from enteritis or enterotoxemia. *Berl. Mùch. Tieräztl. Wochenschr.*, v.122, p.341-247, 2009.
- STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. et al. *Diseases of Swines*. Iowa: Blakwell Science, 1999.
- 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.
- TANSUPHASIRI, U.T.; MATRA, W.; SANGSUK, L. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.36, n.4, p. 954-961, 2005.
- TAYLOR, D.J.; BERGELAND, M.E. *Diseases of swine*. Iowa State University Press. 1992. 12098p.
- TAYLOR, D.J. Clostridial infections In: Straw, B.; D'Allaire, S.; Mengeling, W.L. et al. *Diseases of Swine*, 8 ed. Ames: Iowa University Press. p. 395-412. 1999.
- TWETEN, R.K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet. Microbiol.*, v.82, p.1-9, 2001.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v.35, n.2, p.71-74, 2007.
- UZAL, F.A.; MCCLANE B.A. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet. Microb.*, v.153, n.1, p.37-43, 2011.

- VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J. Med. Microbiol.*, v.27, n.4, p.289-300, 2009.
- VAN ASTEN, A.J.A.M.; NIKOLAU, G.N.; GRÖNE, A. The occurrence of *cpb2*-toxicogenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the β 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet. J.*, v.183., n.2, p.135-140, 2010.
- 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.
- VANNUCCI, F.A.; GUEDES, R.M.C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. *Ciência Rural*, v.39, n.7, p.2233-2242, 2009.
- VIEIRA, A.A.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M. et al. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq.Inst. Biol.*, v.75, p.513-516, 2008.
- 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.
- WATERS, E.H.; ORR, J.P.; CLARK, G E. et al. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. *J. Vet. Diag. Invest.*, n. 10, p. 104-108, 1998.
- WANNEMUEHLER, M.J.; GALVIN, J.E. Bacterial immunogens and protective immunity in swine. *Vet. Imm. Immunop.*, v.43, p. 7-126, 1994.
- 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, 2001.
- WEESE, J.S.; WAKEFORD, T.; REID-SMITH, R. et al. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe*, v.16, n.5, p.501-504, 2010.
- WELSH, M.J.; SMITH, P.L.; FROMM, M. et al. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, v.218, p.1219, 1982.
- WRIGHT, E.M. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annual Rev. Physiol.*, v.55, p.575-589, 1993.
- 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, p.25281-287, 2002.
- YAEGER, M.Y. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. In: 38th ANNUAL MEETING AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIAN. 2007. ORLANDO. Proceedings...Orlando: p.101-103, 2007.
- 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. Diag. Invest.*, v.19, n.1, p.52-59, 2007.