

Carlos Augusto de Oliveira Júnior

**PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *Clostridium difficile* EM HAMSTERS  
UTILIZANDO UMA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

**Belo Horizonte**

**UFMG – Escola de Veterinária**

**2015**

O48p Oliveira Júnior, Carlos Augusto de, 1988-  
Prevenção da infecção por *Clostridium difficile* em hamsters utilizando uma estirpe não  
toxigênica / Carlos Augusto de Oliveira Júnior. – 2015.  
72 p. : il.

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

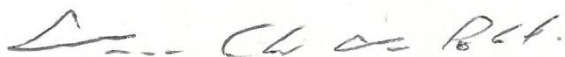
1. Hamster como animal de laboratório – Teses. 2. *Clostridium difficile* – Teses.  
3. Toxinas bacterianas – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade Federal  
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 69

**FOLHA DE APROVAÇÃO****CARLOS AUGUSTO DE OLIVEIRA JÚNIOR**

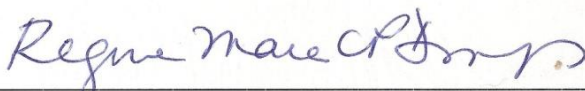
Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 03 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



---

Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Presidente - Orientador



---

Profª. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



---

Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva  
Escola de Veterinária - UFMG



## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, pela dedicação de toda uma vida.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação irretocável.

À Renata, por ter sido além de uma irmã, uma companheira e minha primeira professora.

Ao professor Francisco, por ter me acolhido nessa trajetória e me ajudado a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao Walter, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao Renan, ao Augusto e à Aline, meus irmãos escolhidos, que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Rodrigo, pela sincera amizade e auxílio em todos os passos dessa conquista.

À Amanda, pela divertida e leve amizade que fizeram meus dias laborais mais felizes.

Aos meus colegas de graduação Bárbara, Beatriz, Filipe, Hariany, Isabela, Joana, Juliana, Renata, Samuel e Vanessa que sempre ofereceram uma amizade grata e verdadeira.

À Prhiscylla, pelo auxílio essencial, à disposição em ajudar e os bons conselhos.

As alunas de iniciação Laura e Izabella pelo suporte inestimável e inenarrável vivacidade.

A Grazi, por se disponibilizar a ajudar sempre que necessário com alegria e prazer.

A todos que passaram pelo Laboratório de Anaeróbios nos últimos quatro anos, que tiveram participação nesta conquista.

À instituições de fomento de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, por viabilizar financeiramente a realização do experimento.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1. O microrganismo: breve histórico .....	14
3.2. Fatores de Virulência e Patogenia .....	15
3.2.1. Esporulação e Germinação .....	15
3.2.2. Adesinas e flagelo .....	17
3.2.3. Toxinas .....	18
3.3. Tipificação das amostras .....	21
3.4. A doença .....	22
3.4.1. Humanos .....	23
3.4.2. Equinos .....	24
3.4.3. Suínos .....	25
3.4.4. Outros animais .....	26
3.5. Diagnóstico: prós e contras .....	26
3.6. Prevenção e Controle .....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Local de realização do experimento .....	31
4.2. Amostras .....	31
4.2.1. Confirmação de toxigenicidade das estirpes NTCD por PCR .....	31
4.2.2. Avaliação da ausência de produção de toxinas das estirpes NTCD .....	32
4.2.3. Avaliação da produção de esporos <i>in vitro</i> das estirpes NTCD .....	32
4.2.4. Susceptibilidade antimicrobiana e avaliação de genes de resistência .....	33
4.2.5. Seleção da estirpe .....	33
4.3. Esporos .....	33
4.3.1. Produção de esporos .....	33
4.3.2. Avaliação da solução de esporo congelada e preparo do liofilizado .....	34
4.3.3. Contagem de esporos .....	34
4.4. Animais .....	35
4.4.1. Desenho experimental .....	35
4.4.2. Definição dos grupos experimentais .....	35
4.4.3. Depleção da microbiota e administração da estirpe NTCD .....	36
4.4.4. Desafio com estirpe toxigênica de <i>C. difficile</i> .....	36
4.4.5. Coleta de fezes .....	36
4.4.6. Necropsia .....	36
4.4.7. Análise dos dados .....	37
4.4.8. Aprovação do comitê de ética .....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	37

5.1.	Amostras.....	37
5.1.1.	Descrição das amostras .....	37
5.1.2.	Avaliação da toxigenicidade das estirpes NTCD de <i>C. difficile</i> .....	38
5.1.3.	Ribotipos das estirpes NTCD de <i>C. difficile</i> .....	38
5.1.4.	Avaliação da produção de esporos <i>in vitro</i> das estirpes NTCD de <i>C. difficile</i> .....	39
5.1.5.	Concentração Inibitória Mínima e genes de resistência a antimicrobianos das estirpes NTCD de <i>C. difficile</i> .....	40
5.1.6.	Seleção da estirpe .....	42
5.2.	Viabilidade dos esporos .....	43
5.2.1.	Avaliação dos esporos NTCD de <i>C. difficile</i> produzidos.....	43
5.2.2.	Contagem de esporos das estirpes NTCD de <i>C. difficile</i> .....	44
5.2.2.1.	Avaliação dos métodos de contagem de esporos de <i>C. difficile</i> .....	45
5.2.2.2.	Avaliação da temperatura na viabilidade dos esporos NTCD de <i>C. difficile</i> .....	48
5.2.2.3.	Tempo de viabilidade das alíquotas de esporos de <i>C. difficile</i> .....	49
5.3.	Desafio animal.....	50
5.3.1.	Adaptação do modelo experimental .....	50
5.3.2.	Avaliação da porcentagem de sobrevivência dos hamster .....	51
5.3.3.	Avaliação do conteúdo fecal de hamsters quanto à presença de estirpes NTCD, estirpes toxigênicas e toxinas A e B.....	53
5.3.4.	Avaliação das lesões macro e microscópicas após necropsia .....	54
5.3.5.	Comparação da utilização de NTCD com outras estratégias preventiva.....	56
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1.	Iniciadores específicos usados na PCR <i>multiplex</i> , para amplificação dos genes <i>tpi</i> , <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> e <i>cdtB</i> de <i>Clostridium difficile</i> .....	32
Tabela 2.	Esquema de inoculação de estirpes NTCD de <i>C. difficile</i> em hamsters para avaliação de proteção ao longo do tempo contra infecção por estirpes toxigênicas. ....	36
Tabela 3.	Caracterização das amostras não toxigênicas de <i>C. difficile</i> (NTCD) da bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios quanto à espécie da qual foi isolada, o ribotipo e o perfil toxigênico. ....	37
Tabela 4.	Média do log <sub>10</sub> das contagens de esporos de cada uma das estirpes NTCD.....	39
Tabela 5.	Susceptibilidade antimicrobiana por concentração inibitória mínima (CIM) das cinco amostras NTCD frente às oito drogas testadas.....	40
Tabela 6.	Classificação das estirpes NTCD quanto ao ribotipo, produção relativa de esporos <i>in vitro</i> , perfil relativo de resistência a antimicrobianos e espécie na qual foi isolada.....	42



Tabela 7. Valores de correlação (r) e seu respectivo P valor (P) entre os métodos de contagem em placas (CP), câmara de Neubauer (CN) e número mais provável (NMP) de acordo com cada uma das formas de armazenamento: temperatura ambiente e resfriada. .... 47

Tabela 8. Média do  $\log_{10}$  das contagens de microbiota intestinal de hamsters antes e após a administração de clindamicina por via intramuscular. .... 51

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Desenho esquemático de um esporo bacteriano representando o núcleo e suas diversas camadas envoltórias. .... 16

Figura 2. Esquema do gene de patogenicidade de *Clostridium difficile* (PaLoc) ilustrando os genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* e *tcdR*. .... 19

Figura 3. Colônias das estirpes não toxigênicas de *Clostridium difficile* (NTCD) em ágar sangue suplementado com taurocolate (AST) se apresentando grandes, branco-acinzentadas, aspecto rugoso e bordas irregulares. .... 43

Figura 4. Evolução da média do  $\log_{10}$  das contagens de esporos ao longo do tempo pelos métodos de contagem número mais provável (NMP), câmara de Neubauer (CN) e contagem em placas (CP) nas duas diferentes formas de armazenamento: temperatura ambiente (20°C) e resfriada (4°C). .... 45

Figura 5. Média de  $\log_{10}$  das contagens de *C. difficile* do mês três de acordo com o método de contagem e as temperaturas de armazenamento. .... 49

Figura 6. Análise de regressão linear dos métodos de contagem em placas (CP) e em câmara de Neubauer (CN) das alíquotas de esporos de *C. difficile* armazenadas em temperatura próxima a ambiente (20°C). .... 50

Figura 7. Diagrama de Kaplan-Meier indicando a porcentagem de sobrevivência dos animais dos grupos experimentais I a V ao longo dos 28 dias experimentais. .... 52

Figura 8. Fotografias referentes às necropsias de hamsters (*Mesocricetus auratus*).. .... 55

---

### LISTA DE ABREVIATURAS

---

AFLP: Polimorfismo de fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism*)

AST: Ágar Müller-Hinton suplementado com 5% de sangue equino e 0,1% de taurocolate

ATCC: American Type Culture Collection

CCFA: Ágar cicloserina cefoxitina frutose

CDT: Toxina binária de *Clostridium difficile*

CDTa: Componente enzimático da toxina CDT

CDTb: Componente de ligação e transporte da toxina CDT

CP: Contagem em placas ou recuperação de esporos em placas

CPM: Colite pseudomembranosa

CN: Contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer

CT: Cultura toxigênica

ELISA: Ensaio de Imunoadsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

GDH: Enzima glutamato desidrogenase

ICD: Infecção por *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile infection*)

MLST: Tipificação de sequências multilocus (*multilocus sequence typing*)

NTCD: *Clostridium difficile* não toxigênico (*non-toxigenic C. difficile*)

NMP: Número mais provável

NAP1: *North American Pulsed Field type 1*

PBS: Tampão fosfato salina

PCR: Reação da cadeia em polimerase (*polimerase chain reaction*)

PFGE: Gel de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*)

REA: Análise por enzimas de restrição (*restriction enzyme analysis*)

SNC: Soroneutralização celular

TcdA: Toxina A de *Clostridium difficile*

TcdB: Toxina B de *Clostridium difficile*

UFC: Unidades formadoras de colônia

## RESUMO

Os objetivos do trabalho foram caracterizar cinco estirpes não toxigênicas de *Clostridium difficile* (NTCD), avaliar a viabilidade temporal de esporos liofilizados e prevenir a infecção por *C. difficile* (ICD) em hamsters utilizando uma estirpe NTCD. Foram realizadas PCR e ELISA para confirmação do perfil toxigênico, testes de produção de esporos *in vitro* e avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos. Uma estirpe foi selecionada e liofilizada em várias alíquotas, as quais foram mantidas a 4 e 20°C e submetidas a três métodos de contagem de esporos mensalmente. Um total de  $10^7$  esporos da estirpe NTCD foi administrada em hamsters previamente tratados com clindamicina. O desafio com  $10^8$  esporos de uma estirpe toxigênica de *C. difficile* ocorreu 12 e 48 horas após a administração da estirpe NTCD e os animais foram observados por 28 dias. As estirpes foram confirmadas como não toxigênicas, apresentaram resistência a clindamicina e lincomicina, além de genes de resistência a bacitracinas e tetraciclina. A produção de esporos *in vitro* variou de  $6,17 \times 10^4$  a  $4,79 \times 10^6$  esporos/mL. As estirpes estocadas a 20°C mantiveram contagens ligeiramente mais elevadas ao longo do tempo, apresentando tempo de prateleira estimado de 23 meses. A estirpe NTCD foi capaz de prevenir ICD em todos os animais que a receberam, permanecendo no intestino até o último dia experimental.

**Palavras-chave:** diarreia, colite, liofilização.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize five strains of non-toxigenic *Clostridium difficile* (NTCD), to assess the temporal viability of freeze-dried spores and prevent *C. difficile* infection (CDI) in hamsters using one NTCD strain. The tests performed were PCR and ELISA to confirm the toxigenic profile, in vitro spore production and evaluation of antimicrobial resistance profile. One strain was selected and lyophilized in several aliquots, which were kept at 4 and 20°C and subjected to three spore count methods monthly. A total of  $10^7$  spores of NTCD strain was administered to hamsters previously treated with clindamycin. The challenge with  $10^8$  spores from a toxigenic strain of *C. difficile* was performed 12 and 48 hours after administration of NTCD strain and the animals were observed for 28 days. Strains were confirmed as non-toxigenic, were resistant to clindamycin and lincomycin and presented resistance genes to bacitracins and tetracyclines. The production of spores in vitro ranged from  $6.17 \times 10^4$  to  $4.79 \times 10^6$  spore/ml. Strains stored at 20°C maintained slightly higher counts over time, with estimated shelf life of 23 months. NTCD strain was able to prevent CDI in all animals that received it and remaining in the intestine until the last experiment day.

**Keys words:** diarrhea, colitis, lyophilization.

## 1. INTRODUÇÃO

*Clostridium difficile* é um bacilo, anaeróbio, Gram positivo, formador de esporos e de difícil isolamento. Após ser confirmado como um dos causadores de diarreia e colite pseudomembranosa em humanos no final da década de 1970, este microrganismo ganhou notoriedade como agente de afecções entéricas de animais domésticos, principalmente equinos e suínos, sendo hoje considerado a principal causa não controlada de diarreia em leitões na Europa e Estados Unidos (Songer & Anderson, 2006).

A infecção por *C. difficile* se inicia pela ingestão de esporos presentes no ambiente e, como o microrganismo é um mau competidor, é necessário um desequilíbrio da microbiota indígena para a infecção se estabelecer. Uma vez tendo colonizado o intestino, as estirpes toxigênicas de *C. difficile* produzem as toxinas A e B, que causam alterações na sinalização celular, desorganização do citoesqueleto, comprometimento das junções celulares e apoptose (Hookman & Barkin, 2009).

Em suínos, *C. difficile* acomete principalmente leitões com até sete dias de idade, ocorrendo colonização intestinal dos neonatos logo nas primeiras horas de vida por esporos eliminados pela mãe ou presentes no ambiente. Como não existem vacinas para a prevenção da doença, as medidas de controle existentes se baseiam em práticas gerais de manejo, como desinfecção sistemática das baias maternidade com compostos contendo cloro ativo, as quais são de cunho paliativo (Lobato et al., 2013).

Como as medidas de controle existentes não são eficientes para controlar ou prevenir a ocorrência da infecção por *C. difficile*, novas estratégias se fazem necessárias. Uma inovadora alternativa para o controle seria a utilização de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD), uma vez que elas não possuem os genes responsáveis pela produção das toxinas causadoras da doença, mas, aparentemente, mantém a mesma capacidade de colonização (Sambol et al., 2002). Entretanto, antes da utilização desta estratégia nas espécies alvos é necessária uma criteriosa análise da estirpe e das formas de armazenamento das mesmas. Além disso, testes em modelos experimentais constituem um passo inicial para futuros testes nas espécies domésticas de interesse.

## 2. OBJETIVOS

- Caracterizar estirpes NTCD quanto à produção de esporos *in vitro*, sensibilidade antimicrobiana e presença de genes de resistência a antimicrobianos.
- Avaliar três métodos de contagens de esporos liofilizados.
- Avaliar a viabilidade de esporos liofilizados em duas diferentes temperaturas de estocagem.
- Avaliar a proteção conferida por uma estirpe NTCD contra ICD utilizando hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental em dois diferentes tempos de desafio.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O microrganismo: breve histórico

Em 1935, Hall e O'Tolle (1935, citado por Bartlett, 2008) isolaram na Inglaterra, de forma inédita, um bastonete Gram-positivo, anaeróbio, esporulado e produtor de citotoxina proveniente de uma amostra fecal de neonato humano saudável. Naquela ocasião, nomearam tal microrganismo como *Bacillus difficilis* devido a sua morfologia e a grande dificuldade de isolamento e cultivo. Ainda na década de 30, estudos sugeriram que a bactéria em questão pertencia ao gênero *Clostridium* (Prevot, 1938, citado por Cato et al., 1982). No entanto, o nome *Clostridium difficile* foi oficializado apenas em 1980 pelo “Approved Lists of Bacterial Names” baseando-se em uma sistemática classificação publicada em um manual de microrganismos anaeróbios (Holdeman et al., 1977; Skerman et al., 1980).

Antes mesmo do primeiro isolamento, o médico John Finney já havia relatado o primeiro caso de colite pseudomembranosa (CPM) em uma paciente submetida a uma cirurgia entérica (Finney, 1893 citado por Worsley, 1998). Durante muito tempo *Staphylococcus aureus* foi considerado o principal responsável pela ocorrência dessa doença, a qual ganhou grande visibilidade nas décadas subsequentes ao primeiro relato, porém poucas descobertas foram feitas a respeito da participação de *C. difficile* como agente etiológico.

A incidência de diarreia seguida de CPM aumentou significativamente a partir da década de 1970, época na qual se disseminou a utilização de lincosamidas, em especial clindamicina, para tratamento de enfermidades causadas por microrganismos anaeróbios (Gurwith et al., 1977). O aumento dos casos e a considerável letalidade da enfermidade mobilizaram diversos pesquisadores a descobrirem mais a respeito da etiologia da doença.

O primeiro relato a sugerir *C. difficile* como agente etiológico da CPM é datado de 1978. O estudo conduzido por George et al. (1978) demonstrou que o conteúdo fecal de 8 pacientes diagnosticados com CPM possuía uma toxina citopática cujo efeito era neutralizado com antitoxina de *Clostridium sordelli*. Como não foi isolado *C. sordelli* do conteúdo fecal destes pacientes, o pesquisador cultivou todas as espécies do gênero *Clostridium* isoladas do conteúdo fecal em meio de cultura líquido e avaliou o efeito citopático do sobrenadante, constatando que apenas algumas estirpes de *C. difficile* produziam efeito citopático similar. Além disso, ele demonstrou que este efeito também era neutralizado pela antitoxina de *C. sordelli*, constatando a participação efetiva de *C. difficile* como causador da CPM. Apesar disso, a comunidade científica só se convenceu com o experimento de Larson et al. (1978), que consistiu no isolamento de quatro estirpes de *C. difficile* de pacientes com CPM e repetição do quadro ao inoculá-las em hamsters pré-tratados com vancomicina. A descoberta do agente etiológico ampliou o campo de pesquisa, principalmente relacionados à patogenia da doença.

### 3.2. Fatores de Virulência e Patogenia

Assim como os demais microrganismos do gênero *Clostridium*, as exotoxinas são os principais fatores de virulência de *C. difficile* e grandes responsáveis pelas alterações morfológicas e sinais clínicos da doença (Borriello, 1998). Apesar disso, outros fatores de virulência com possível participação na patogenia da doença têm sido estudados e serão brevemente discutidos nesta seção.

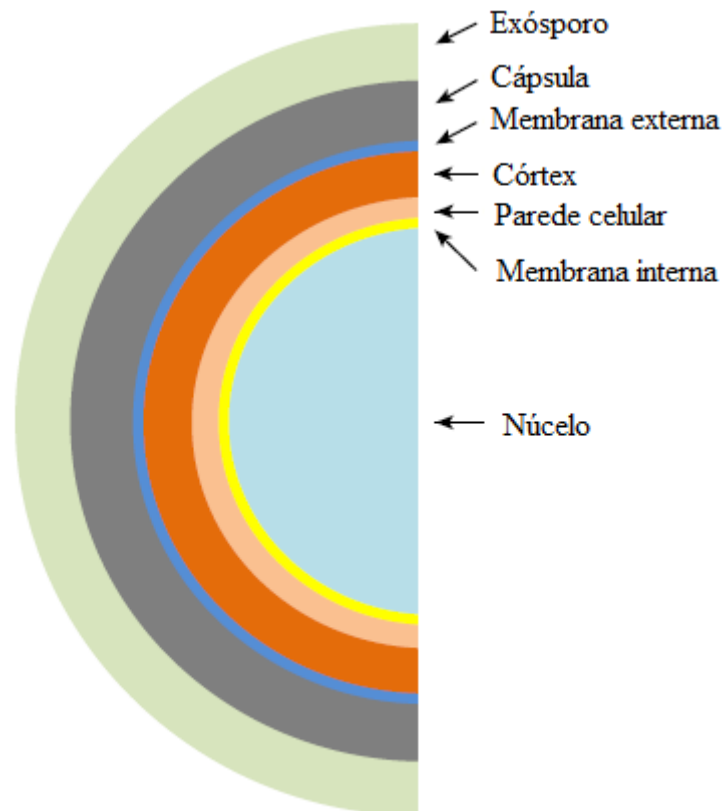
#### 3.2.1. Esporulação e Germinação

A infecção do trato gastrointestinal de humanos e animais se inicia com a ingestão da forma esporulada do microrganismo, a qual tem um papel central na transmissão da doença por manter o patógeno em um ambiente inóspito para a célula vegetativa (Rupnik et al., 2009). Os sinais externos que servem de gatilho para o início da esporulação são desconhecidos, mas fatores de estresse como a falta de nutrientes são apontados como possíveis responsáveis (Paredes-Sabja et al., 2014).

Internamente, o processo de esporulação é mediado pelo fator regulador de transcrição *Spo0A* que, após ser fosforilado por quinases da família *orphan histidine kinases*, inicia o processo de divisão irregular da célula, dando origem à célula mãe e ao pré-esporo (Paredes-Sabja et al., 2014). A regulação dos passos subsequentes tem a participação ativa de quatro fatores sigma de RNA polimerase, que comandam desde os primeiros estágios na célula mãe e no pré-esporo, visando à produção das proteínas necessárias para a formação do esporo, até o engolfamento final e liberação do mesmo. Em *Bacillus subtilis*, em que esse processo é muito bem descrito, sabe-se que os fatores sigma atuam num mecanismo de regulação cruzada, o que não ocorre em *C. difficile* (Pereira et al., 2013). Também já foram demonstradas diferenças no processo regulatório entre *C. difficile* e outros microrganismos do gênero *Clostridium*, o que pode auxiliar na explicação das diferenças no processo de formação e na morfologia do esporo entre as espécies do gênero (Al-Hinai et al., 2014).

O esporo de *C. difficile*, assim como o de outras espécies, é uma estrutura bastante resistente devido a três fatores básicos. O primeiro deles é o baixo conteúdo de água, já que o esporo se mantém viável mesmo com baixos teores de água (25 a 60% do peso total), sendo bastante resistente à desidratação. O segundo diz respeito ao alto conteúdo de ácido dipicolínico (cerca de 10% do peso total) que fornece rigidez à estrutura, conferindo resistência ao calor seco, calor úmido e diversos desinfetantes. Por fim, destaca-se a saturação do DNA por pequenas proteínas ácido-solúveis, que condensam o material genético minimizando a possibilidade de danos (Paredes-Sabja et al., 2014).

A estrutura do esporo, esquematizada na figura 1, é composta por um núcleo central, onde fica alocado o DNA, o RNA e a maioria das enzimas necessárias para a germinação, além de sete camadas envoltórias, cada uma com suas particularidades (Paredes-Sabja et al., 2014). O córtex, uma espessa camada de peptideoglicano ligeiramente modificado, é uma das mais importantes. Além de auxiliar na proteção, essa camada é essencial na germinação do esporo, uma vez que os resíduos de lactamato- $\delta$ -murâmico, substituintes do ácido murâmico da célula vegetativa, reconhecem as enzimas líticas, levando à ruptura da camada envoltória (Paredes-Sabja et al., 2014)



Adaptado de *TRENDS in Microbiology*

**Figura 1.** Desenho esquemático de um esporo bacteriano representando o núcleo e suas diversas camadas envoltórias (Fonte: Paredes-Sabja et al., 2014)

Outras duas importantes camadas são a cápsula e o exósporo. Como são mais externas e normalmente mais espessas, essas camadas são indispensáveis para a comunicação entre o esporo e o meio externo. Recentemente descobriu-se que o esporo de *C. difficile* é capaz de interagir com receptores não identificados de células do epitélio intestinal (Paredes-Sabja et al., 2012). Além disso, estirpes sem a camada de exósporo aderem melhor a linhagens de célula intestinal e germinam melhor *in vitro*, porém, apresentam menor resistência a desinfetantes como álcool e calor (Escobar-Cortes et al., 2013). Apesar das proteínas responsáveis pelas funções citadas não serem conhecidas, a confirmação da capacidade de interação do esporo com células do órgão alvo chama atenção para uma possível importância na patogenia da doença.

Em relação ao processo de germinação, importante passo para a instalação da doença, as informações são mais escassas. A indução da germinação se dá por pequenas moléculas chamadas germinantes, que variam de espécie para espécie. Os germinantes mais conhecidos de *C. difficile* são alguns sais biliares, como taurocolate, glicocolate, deoxicolate, além da L-glicina, que atua como co-germiante (Sorg & Sonenshein, 2008). Os germinantes se ligam aos receptores do tipo serina proteases presentes no esporo e induzem uma cascata ainda não bem esclarecida de reações que culminam na hidrólise do córtex, hidratação do núcleo e crescimento da célula bacteriana (Paredes-Sabja et al., 2014). Uma importante descoberta feita a respeito da germinação de *C. difficile* foi a identificação de quenodesoxicolato, outro sal biliar, como



inibidor da germinação, apresentado uma interação mais forte com o esporo que o taurocolate (Sorg & Sonenshein, 2009).

### 3.2.2. Adesinas e flagelo

*C. difficile* possui algumas adesinas de superfície que podem participar do processo de colonização. Entre elas se encontram as proteínas associadas à superfície celular (S-layer) (Calabi et al., 2002), proteases, como a Cwp84 (Janoir et al., 2007) e proteínas do choque térmico como a GroEl (Hennequin et al., 2001).

A primeira proteína de parede celular de *C. difficile* identificada como uma adesina foi relatada por Waligora et al. (2001), os quais identificaram e caracterizaram uma proteína nomeada Cpw66, produziram anticorpos contra dois domínios reconhecidos e observaram que tais anticorpos inibiam parcialmente a aderência das estirpes em cultura celular.

A partir da identificação desta adesina, vários estudos foram empenhados na descoberta de outras importantes proteínas com essa função. Hannequin et al. (2003) identificaram a presença da proteína ligadora de fibronectina (Fbp68, posteriormente denominada FbpA) na superfície celular de *C. difficile* e, ao realizar o teste de competição inibitória, perceberam uma inibição parcial tanto na ligação do microrganismo com a fibronectina quanto na ligação com cultura celular.

Apesar da descoberta de diversas proteínas com função de adesina, poucos estudos foram elaborados para elucidar o mecanismo dessas substâncias ou a real importância das mesmas *in vivo*. Barketi-Klai et al. (2011) tentaram elucidar um pouco mais o papel da FbpA ao produzir um mutante com a ausência desta proteína. Em testes *in vitro* houve um surpreendente aumento da adesão do mutante em dois tipos de cultura celular. Em camundongos dixênicos não houve diferença na colonização do ceco entre as duas estirpes, já em animais monoxênicos a colonização cecal da estirpe mutante foi significativamente menor. Estes resultados sugerem uma participação da proteína no processo de colonização intestinal, mas ainda estão longe de elucidar o real papel de tais substâncias no estabelecimento da infecção.

O flagelo é outra estrutura de reconhecida importância como fator de virulência na maioria dos patógenos gastrointestinais, seja por tornar o microrganismo capaz de se mover em direção ao sítio de infecção, por facilitar a adesão ao sítio de infecção, ou por auxiliar na formação de biofilmes, os quais dificultam a atuação de antimicrobianos e facilitam a recorrência da infecção (Baban et al., 2013).

A participação do flagelo de *C. difficile* como fator de formação de biofilme foi demonstrado com a produção de mutantes isogênicos com a deleção da flagelina FliC. Os mutantes apresentaram uma significativa redução no acúmulo de biofilme após 5 dias, sugerindo que esta flagelina desempenha um papel importante, porém tardio, na formação e manutenção do biofilme (Đapa et al, 2013). Ainda no mesmo estudo foi demonstrado que a protease Cwp84 e o fator de transcrição *Spo09*, envolvido no processo de esporulação, possuem papéis determinantes na formação do biofilme, apontando para uma possível interação entre este processo e a esporulação.

Quanto à função de adesinas atribuídas aos flagelos, não há consenso entre os pesquisadores. Tasteyre et al (2001) demonstrou que estirpes mutantes para a ausência das proteínas FliC e FliD apresentaram significativa diminuição na adesão ao ceco de camundongos axênicos quando comparadas às amostras originais. Já Dingle et al. (2011) demonstraram que mutantes com deleção genes *fliC* e *fliD*, responsáveis pela produção das proteínas FliC e FliD, foram mais eficientes em se ligarem em linhagem celular de origem humana *in vitro*.

Em um dos estudos mais recentes com o objetivo de esclarecer o papel das flagelinas como adesinas, Baban et al. (2013) testaram duas estirpes com flagelo, suas respectivas mutantes para a ausência dos genes *fliC*, *fliD* e *flgE*, e mutantes com o flagelo presente, porém paralisado, quanto à capacidade de adesão *in vitro* e *in vivo*. Em uma das estirpes, demonstrou-se que a cepa com flagelo paralisado era mais eficiente que a cepa selvagem para a colonização *in vivo*, resultado que não foi confirmado na outra estirpe. Já nos testes *in vitro*, enquanto uma das estirpes com deleção dos genes foi mais eficaz para aderir à cultura de células que seus pares, a outra estirpe apresentou resultados contrários. Tais resultados apontam para uma significativa diferença entre as estirpes, dificultando a generalização do papel das flagelinas como adesinas.

Uma observação constante nesses estudos é o aumento da virulência em modelos animais de amostras mutantes com depleção dos genes responsáveis pela produção das flagelinas (Dingle et al., 2011; Baban et al., 2013). Barketi-Klai et al. (2014) compararam a expressão gênica da estirpe mutante (flagelina ausente) com a estirpe selvagem e observaram uma significativa regulação positiva de genes responsáveis pelo metabolismo, transporte de membranas, crescimento celular, fermentação e resistência a antimicrobianos, sugerindo que a expressão desses genes podem estar relacionados com o aumento de virulência das estirpes mutantes. Os genes responsáveis pela esporulação também apresentaram regulação positiva nas estirpes mutantes, demonstrando uma maior capacidade de esporulação das estirpes com ausência das flagelinas.

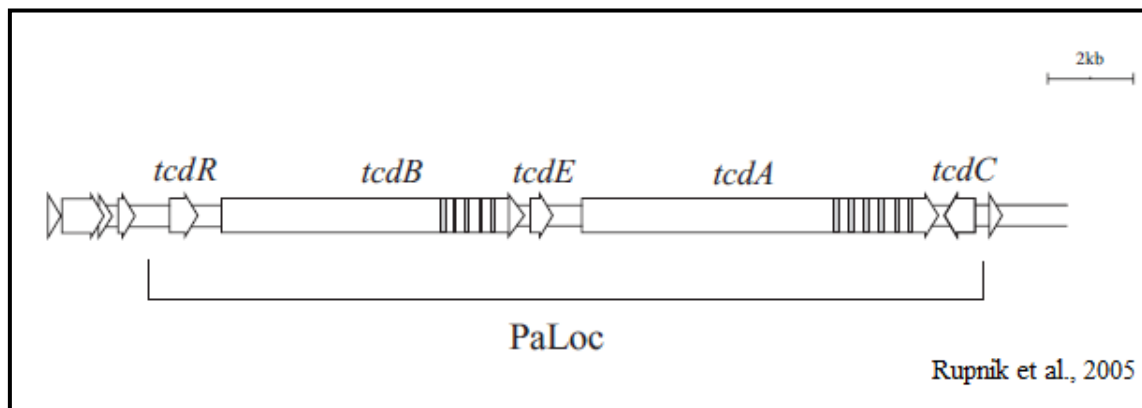
### 3.2.3. Toxinas

*C. difficile* produz três toxinas, sendo elas a toxina A (TcdA), toxina B (TcdB) e toxina binária (CDT) (Rupnik et al., 2005). Os genes responsáveis pela produção das toxinas TcdA e TcdB são os genes *tcdA* e *tcdB* respectivamente e ambos estão incluídos no *locus* de patogenicidade denominado *PaLoc* (figura 2). Além dos genes responsáveis pela produção das toxinas, esse *locus* possui mais três genes, *tcdR*, *tcdE* e *tcdC* (Voth & Ballard, 2005).

O gene *tcdR* é responsável pela produção da proteína TcdR, que possui estrutura semelhante a proteínas ligantes de DNA, funcionando como um promotor para os genes *tcdA* e *tcdB*. Dessa forma, ela funcionaria como um regulador positivo para expressão dos genes responsáveis pela produção das toxinas (Voth & Ballard, 2005).

Já a proteína TcdC, produzida pelo gene *tcdC* atua como um regulador negativo. A sua expressão é máxima no início fase exponencial de crescimento, porém cai significativamente na fase estacionária, momento no qual a produção de toxinas de *C. difficile* aumenta (Voth & Ballard, 2005). Trabalhos apontam que a TcdC é uma antagonista da TcdR (Matamouros et al., 2007).

Por fim, a TcdE é uma proteína semelhante a holina responsável por aumentar a permeabilidade das células bacterianas devido à formação de poros semelhantes àqueles formados por bacteriófagos. Estirpes com deleção do gene *tcdE* possuem crescimento similar à estirpe normal, porém o acúmulo de toxina no meio é bem reduzido (Govind & Dupuy, 2012).



**Figura 2.** Esquema do gene de patogenicidade de *Clostridium difficile* (PaLoc) ilustrando os genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* e *tcdR*.

As toxinas TcdA e TcdB são monoglicosiltransferases homólogas capazes de inativar GTPases em células hospedeiras (Pruitt et al., 2012). A TcdA é tóxica principalmente para células do trato gastrointestinal, sendo chamada de enterotoxina, ao passo que a TcdB é tóxica para um grande número de células, o que a denomina citotoxina (Borriello, 1998).

Uma vez liberadas no lúmen intestinal, estas toxinas se ligam aos receptores e são internalizadas por endocitose. Para a TcdA, os receptores são constituídos por dissacarídeos presentes na superfície luminal das células, já os receptores de TcdB são desconhecidos, porém, por se tratar de uma citotoxina, considera-se que esses receptores tenham caráter ubíquo. Com a fusão do lisossomo há um abaixamento do pH e clivagem proteolítica das toxinas, expondo as porções funcionais e as porções hidrofóbicas. As porções hidrofóbicas são responsáveis pelo escape das porções funcionais do fagossomo para o citosol (Voth & Ballard, 2005). No citosol, as porções funcionais levam à glicosilação das GTPases da família Rho. Essas enzimas possuem diversas funções, como a manutenção do citoesqueleto de actina, manutenção da barreira epitelial através das junções celulares e sinalização celular para a regulação da resposta imune (Carter et al., 2010). A glicosilação inativa estas enzimas e, como consequência, observa-se grandes impactos na morfologia celular, como perda das vilosidades, arredondamento celular e deslocamento do núcleo. A barreira epitelial também é prejudicada devido à desorganização das junções celulares (Voth & Ballard, 2005). O rompimento da barreira epitelial permite a entrada das toxinas até as camadas basais, aumentando a possibilidade de internalização da TcdB e ampliando os efeitos anteriormente descritos. A presença de toxinas e outras substâncias entre as células intestinais, bem como os fatores quimiotáticos produzidos pelas células, recrutam grande número de neutrófilos, linfócitos e demais células inflamatórias, caracterizando o quadro de colite (Rupnik et al., 2009). A morte celular pode ser consequência da atuação das células inflamatórias recrutadas ou devido ao mecanismo de apoptose, já que a inativação das GTPases estimula a ativação das caspases, responsáveis pelo desencadeamento desse processo (Carter et al., 2010). A pseudomembrana, observada na doença em humanos, nada mais é que um acúmulo de restos celulares e células inflamatórias decorrentes deste processo (Hookman & Barkin, 2009).

No que diz respeito à importância relativa de cada uma das toxinas na patogenia da doença, vários pontos de vista devem ser considerados. Alguns dos receptores para a TcdA já são conhecidos e bem estudados, como o  $\alpha$ -galactosil, Lewis X, Lewis Y e Lewis I, todos presentes na membrana apical das células (Tucker & Wilkins, 1991). Sabe-se que coelhos neonatos são mais resistentes à doença devido à diminuição da expressão de receptores para a TcdA (Eglow et al., 1992). Somado a isso o fato de ainda não terem sido identificados receptores para TcdB na porção luminal das células endoteliais, muitos autores consideraram por muito tempo a TcdA como a toxina essencial para a virulência de *C. difficile* (Keel & Songer, 2007). Entretanto, Lyras et al. (2009) demonstraram exatamente o contrário. Em um modelo de infecção experimental em hamsters, foi utilizada uma estirpe selvagem A+B+ e quatro mutantes feitos a partir desta, duas A-B+ e duas A+B-. A taxa de mortalidade dos animais desafiados com os mutantes A-B+ foi similar à dos animais desafiados com a estirpe selvagem e significativamente maior que a encontrada em animais desafiados com os mutantes A+B-. Tais resultados apontam a TcdB como toxina essencial para a virulência de *C. difficile* por ser capaz de agir sem a ação prévia da TcdA e de causar o mesmo efeito que a ação sinérgica de ambas. Apesar desta descoberta, a TcdA não deve ser desprezada. Em recente estudo, Pruitt et al. (2012) demonstraram que a TcdA é capaz de modificar uma gama maior de GTPases quando comparada a TcdB, apontando para uma especificidade diferenciada entre as toxinas mesmo com a grande homologia entre elas.

A terceira toxina de *C. difficile* reconhecida é a toxina binária, também chamada de CDT, é uma ADP-ribosiltransferase binária formada por um componente enzimático (CDTa) e um componente de ligação e transporte (CDTb) (Gerding et al., 2014). Diferentemente das duas toxinas anteriores, a CDT é codificada em uma região separada do cromossomo, conhecido como *CdtLoc*. Esse *locus* é mais simples, possuindo apenas um gene de regulação, *cdtR*, e dois genes responsáveis pela codificação do componente enzimático e do componente de ligação, respectivamente, *cdtA* e *cdtB* (Rupnik et al., 2009).

A ação tóxica para as células só é possível devido à sinergia dos dois componentes, sendo o CDTb responsável por ligar ao receptor lipoproteico e se oligomerizar com outras porções CDTb com a finalidade de formar um sítio de ligação para a porção CDTa. Quando o complexo é fagocitado e há a diminuição do pH e o complexo de CDTb oligomerizado forma um poro no endossomo permitindo a passagem da porção CDTa para o citosol (Gerding et al., 2014). No citosol, a CDT transfere um grupo ADP-ribosil para os monômeros de actina, sequestrando-os nessa forma e impedindo sua polimerização. Como consequência, há uma despolimerização do citoesqueleto e reorientação dos microtúbulos, formando projeções em direção ao lúmen intestinal as quais se configuram como anteparos físicos, facilitando a aderência de novas bactérias. Além disso, a toxina reorienta vesículas contendo componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina e fibronectina) para serem excitados no lúmen, deixando-o mais viscoso e mais favorável pra aderência de novos microrganismos (Schwan et al., 2014).

A importância clínica da CDT e o seu papel na patogenia da doença causada por *C. difficile* ainda não foram totalmente esclarecidos. Em humanos, estudos apontam uma maior taxa de mortalidade em pacientes infectados por estirpes CDT+ (Gerding et al., 2014). Um consenso entre os pesquisadores é que a CDT atua sinergicamente à TcdA e à TcdB amplificando os efeitos das mesmas e agravando o quadro clínico (Gonçalves et al., 2004). Entretanto, Kuehne et al. (2014) demonstraram que uma estirpe A-B-CDT+ foi capaz de levar 37,5% dos animais desafiados à óbito com algumas lesões normalmente não observadas na doença clássica, como

inflamação e hemorragia do intestino delgado. Estas observações apontam para um possível papel da CDT na patogênese da infecção por *C. difficile*.

### 3.3. Tipificação das amostras

A partir da descoberta de *C. difficile* como agente etiológico da colite pseudomembranosa em humanos, iniciaram-se diversos estudos objetivando a tipificação desse microrganismo. Primordialmente, devido à escassez de informações e tecnologias da época, as tipificações eram baseadas em padrões de resistência a antibióticos, padrões de proteínas solúveis, padrões de bacteriocinas e *Western immunoblotting* (Killgore et al., 2008).

Os estudos genômicos foram iniciados apenas na década de 1980, sendo primeiramente utilizado o método de análise por enzimas de restrição (*restriction enzyme analysis* - REA). A técnica consiste em realizar a digestão de todo o genoma das cepas isoladas com uma enzima de restrição e analisar os padrões de digestão por eletroforese em gel de poliacrilamida (Kuijper et al., 1987). A análise por REA é capaz de diferenciar a estirpe mais comumente relacionada à doença em humanos das demais estirpes, classificando-a como BI. Além disso, esta metodologia se mostrou eficiente em discriminar estirpes BI oriundas de diferentes surtos (Killgore et al., 2008). Apesar de robusta, a técnica foi atualmente substituída por outros métodos de tipificação mais aprimorados ou de mais fácil execução e/ou análise.

Um aprimoramento da técnica de REA muito utilizado na América do Norte é conhecido como gel de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE). O método também consiste em digestão completa do DNA, entretanto, é utilizada uma enzima de restrição específica (SmaI) e a separação das bandas geradas é feita por eletroforese em campo pulsado. A enzima gera fragmentos maiores, os quais são eficientemente separados pelos campos elétricos em dois planos produzidos por esta técnica de eletroforese (Killgore et al., 2008). As estirpes classificadas como BI por REA são identificadas como *North American Pulsed Field type 1* (NAP1) neste método, o qual é mais eficiente que aquele, porém, mais trabalhoso (Tenover et al., 2011).

O método atualmente mais utilizado para a tipificação na Europa e que tem sido bastante disseminado no mundo devido à facilidade de execução e eficiência em distinguir as amostras é a ribotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Keel et al., 2007). A técnica consiste em extração do DNA ribossomal, amplificação de uma região espaçadora compreendida entre os genes 16S e 23S e revelação por eletroforese tradicional ou capilar (Stubbs et al., 1999). A definição de ribotipo é feita por comparação com bancos de amostras, sendo o banco de Cardiff/Leeds, no Reino Unido, e o de Maribor, na Eslovênia os maiores do mundo (Killgore et al., 2008).

A técnica atualmente utilizada para a ribotipagem das estirpes de *C. difficile* foi padronizada por Bidet et al. (1999) e, desde então, estudos avaliando os ribotipos tem sido conduzidos em diversas partes do mundo. Tais estudos esclarecem as diferenças de distribuição geográfica do microrganismo (Hernández-Rocha et al., 2012), diferenças e similaridades entre estirpes que circulam entre humanos e animais (Janezic et al., 2012) e relação entre ribotipo e patogenicidade e/ou severidade de infecção (Walk et al., 2012).

As estirpes classificadas como BI por REA e como NAP1 por PFGE são comumente classificadas como 027 neste método, sendo uma das estirpes mais estudadas devido sua característica hipervirulenta (Lanis et al., 2013). Possíveis fatores que explicam a caracterização da estirpe NAP1/027/BI como hipervirulenta são a modificação no comprimento do gene regulatório *tcdC*, levando a produção de uma proteína TcdC afuncional, o que faz com que a estirpe produza maiores quantidades de toxinas; a presença dos genes responsáveis pela produção de CDT, configurando um fator de virulência adicional normalmente não encontrado nas demais estirpes; a presença e a expressão do gene *gyrA*, que torna a estirpe resistente a fluorquinolonas e a presença de flagelos funcionais, conferindo motilidade à estirpe (Hunt & Ballard, 2013).

Estudos com pacientes humanos suspeitos de apresentarem a CDI apontam para uma grande frequência da estirpe 027, o que motivou pesquisas com o intuito de elucidar seus possíveis fatores de virulência adicionais (Tenover et al., 2011). Entretanto, estudos que também consideram espécimes isoladas de indivíduos saudáveis, animais e/ou meio ambiente apontam para alta frequência da estirpe 078 (Keel et al., 2007) e da estirpe 014/020 (Janezic et al., 2012). Apesar disso, existem marcantes diferenças entre o perfil das estirpes de diferentes regiões geográficas, sendo necessários mais estudos para elucidar a real prevalência dos ribotipos de acordo com a localidade (Hernández-Rocha et al., 2012). No Brasil, existem relatos de ribotipos 014/020 e 106 em pacientes humanos imunossuprimidos (Balassiano et al., 2009) e, além destes, do ribotipos 053 em quatis (Silva et al., 2014d). Um estudo ainda em andamento no país, realizado com estirpes isoladas de animais e humanos, tem demonstrado que as estirpes 014/020, 106 e 009 são as mais frequentes, sendo essa última uma estirpe não toxigênica.

Outros métodos de tipificação também são utilizados, como a tipificação de sequências multilocus (MLST) e polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP). Tais técnicas também servem para o mesmo propósito e a concordância entre os diferentes métodos é relativamente grande, de forma que a escolha do método vai depender do propósito do pesquisador e das tecnologias disponíveis (Killgore et al., 2008).

### 3.4. A doença

A infecção por *C. difficile* se inicia pela ingestão de esporos presentes no ambiente. Uma maior contaminação ambiental pode ocorrer na presença de pacientes infectados ou portadores saudáveis de estirpes toxigênicas (Keel & Songer, 2006). Em geral, a microbiota intestinal saudável impede o estabelecimento do agente por competição, contendo o avanço da infecção. Dessa forma, para que ocorra a colonização intestinal por *C. difficile* e consequente doença é necessário que haja um desequilíbrio da microbiota indígena, o qual pode estar presente em animais neonatos, cujo estabelecimento da microbiota ainda não está completo, ou em pacientes submetidos à terapia antimicrobiana (Hookman & Barkin, 2009).

Fatores relacionados ao estabelecimento da doença, bem como os sintomas e sinais clínicos diferem entre humanos e as demais espécies animais acometidas. (Keessen et al., 2011a). Tais particularidades serão brevemente relatadas nas seções a seguir.

### 3.4.1. Humanos

A doença em humanos ocorre em indivíduos adultos e tem como principal fator de risco a administração prévia de antimicrobianos. Entre os antimicrobianos mais relacionados com o estabelecimento da infecção por *C. difficile* (ICD) se encontram a clindamicina, as cefalosporinas e as fluorquinolonas (Honda & Dubberke, 2014). Entretanto, drogas imunossupressoras (como quimioterápicos) e doenças imunossupressoras também podem aumentar o risco da ICD por, assim como os antimicrobianos, causarem depleção da microbiota indígena (Britton & Young, 2014). Apesar da forma clássica de apresentação da doença, Nishimura et al. (2014) relataram um surpreendente caso de colite pseudomembranosa em uma mulher saudável não submetida a terapia antimicrobiana, apontando para possíveis mudanças na epidemiologia do agente.

Ao contrário do que acontece em adultos, o isolamento de estirpes toxigênicas de *C. difficile* em crianças de até 18 meses é comum, inclusive aquelas causadoras de ICD em adultos, como *C. difficile* ribotipo 001 (Adlerberth et al., 2014). As crianças podem desempenhar o papel de carreadoras saudáveis do agente até os 36 meses de vida, período em que a taxa de colonização de indivíduos saudáveis passa a ser similar a de adultos (0 a 3%) (Schutze et al., 2013). A doença não é muito comum nesta faixa etária, entretanto, os índices das doenças em neonatos e lactentes têm aumentado, respondendo, respectivamente, a 5 e 26% do total de casos de ICD em crianças (Schutze et al., 2013).

Os sintomas observados dependem da severidade da infecção, e podem variar desde uma diarreia autolimitante até megacólon tóxico, sendo a colite pseudomembranosa a lesão mais característica da ICD em humanos. Febre alta e expressivos aumentos de leucócitos e creatinina séricos também são observados, servindo como indicadores clínicos para avaliar a severidade da doença (Moore & Donaldson, 2013).

Entre os anos de 2000 e 2006 o número de casos nos Estados Unidos mais do que dobrou. Já no período compreendido entre 2006 e 2010 a incidência da ICD aumentou timidamente, de 8,0‰ para 8,75‰. Entretanto, a doença ainda é responsável por cerca de 14000 mortes por ano no país, custando aos cofres públicos cerca de US\$ 2,1 bilhões por ano (Honda & Dubberke, 2014).

A postura ideal para evitar contaminação do ambiente hospitalar e de outros pacientes ali presentes passa por uma conduta consciente dos profissionais de saúde. Deve ser feito o isolamento do paciente suspeito e imediata realização do teste diagnóstico seguida da introdução do tratamento (Moore & Donaldson, 2013). A utilização de paramentação específica (aventais e luvas) para o setor de isolamento, a higienização das mãos após o contato com o paciente e a utilização de desinfetantes com cloro ativo para a desinfecção do ambiente também são essenciais para evitar a disseminação da ICD no ambiente hospitalar (Macleod-Glover & Sadowski, 2010).

O tratamento é realizado com antimicrobianos, preferencialmente metronidazol ou vancomicina, mas nem sempre é eficaz. Além disso, os pacientes que se recuperam tem uma grande chance de ter a recorrência da doença por possuírem a microbiota associada menos diversa, seja naturalmente ou em consequência dos fortes antimicrobianos usados (Moore & Donaldson, 2013). Informações mais aprofundadas a respeito das opções de tratamento podem ser encontradas na revisão de Oldfield IV et al. (2014). Uma das alternativas discutidas na revisão é

a possibilidade do transplante fecal de um indivíduo saudável para pacientes com ICD recorrente. A recorrência da doença está relacionada a alterações permanentes na microbiota intestinal devido a uso prolongado de antibióticos. Desta forma, o conteúdo fecal transplantado seria uma fonte para o paciente reestabelecer a diversidade da microbiota, a qual forneceria uma prevenção natural contra a infecção. Mais de 90% dos pacientes que recebem o transplante obtêm sucesso no tratamento, e a taxa de recorrência chega ser menor que 15% (Oldfield IV et al., 2014).

#### 3.4.2. Equinos

Assim como em humanos, a ocorrência de ICD em equinos pode estar ligada a administração de antimicrobianos, sendo eritromicina, trimetoprima/sulfonamidas,  $\beta$ -lactâmicos, clindamicina e rifampicina os mais relatados como promotores do desequilíbrio inicial da microbiota (Diab et al., 2013). A associação entre terapia com antimicrobianos e desenvolvimento de ICD é mais frequente em adultos, entretanto, pode ocorrer em neonatos e animais jovens que porventura tenham passado por tratamentos com alguma dessas drogas (Båverud, 2002).

Em potros de até sete dias de idade, a doença normalmente ocorre sem a administração prévia de antimicrobianos. Os esporos presentes no ambiente são ingeridos pelo animal e encontram uma microbiota ainda em formação, sendo hábeis para colonizar e produzir as toxinas. A doença não associada a antimicrobianos também pode ocorrer potros mais velhos e animais adultos, sugerindo a presença de outros fatores predisponentes, como estresse e mudança brusca de dieta (Båverud, 2002).

O caráter nosocomial também está presente nesta espécie. Além do aumento do risco à exposição à estirpe toxigênica, o animal pode ser submetido ao uso de antimicrobianos, mudanças alimentares e excessivas manipulações, aumentando seu estresse, o que contribui para o estabelecimento de ICD (Chapman, 2009).

Os principais sinais clínicos são diarreia e cólica, podendo vir acompanhadas de mucosas hiperêmicas, taquicardia, taquipneia e desidratação. O desconforto abdominal devido à distensão intestinal associado à febre é mais comum nos animais adultos. Já a ICD espontânea dos potros é caracterizada por diarreia aquosa ou sanguinolenta, depressão, desidratação e toxemia logo após o nascimento, podendo levar ao óbito (Diab et al., 2013). À necropsia, observa-se que as lesões em potros se concentram mais no intestino delgado, podendo ou não ter lesões no cólon e no ceco, já em animais adultos as lesões aborais são mais frequentes (Diab et al., 2013).

Em recente trabalho realizado no Brasil, Silva et al. (2013a) isolou *C. difficile* de 4,6% das 153 amostras de fezes de equinos diarreicos e não diarreicos. Entretanto, a taxa de isolamento entre os animais diarreicos hospitalizados foi de 28,6%, diferença essa explicada pelo desconhecimento da doença por veterinários de campo, os quais tratam os animais para outros enteropatógenos e, posteriormente, sugerem o internamento após agravamento do quadro. Além disso, as sete amostras em que houve detecção de TcdA e TcdB eram oriundas de animais diarreicos, sugerindo que a ICD subclínica não é um evento de importância nesta espécie como descrito em suínos.



### 3.4.3. Suínos

Em suínos, *C. difficile* acomete leitões de um a sete dias de idade (Songer & Anderson, 2006). A infecção dos animais após o nascimento é rápida, de forma que com um dia de vida 68% dos animais já estão positivos para o isolamento de *C. difficile*, número que sobe para 94% entre 2 e 14 dias de vida (Schneeberg et al., 2013). Em uma hora pós-parto já é possível encontrar animais infectados, e, num estudo envolvendo 72 leitões, Hopman et al., (2011) encontraram 100% de animais positivos para *C. difficile* após 48h de vida. No mesmo estudo, esta estirpe também foi isolada de gaiolas e de porcas no período compreendido entre o pré-parto e o pós-parto, sendo importantes fontes de contaminação para os neonatos.

Após as duas primeiras semanas de vida, a taxa de isolamento de animais cai bruscamente. Weese et al. (2010) encontraram uma prevalência de apenas 3,7% em animais de 62 dias de vida. Já Schneeberg et al. (2013) não isolaram *C. difficile* de animais a partir de 49 dias de idade. Além disso, não há relatos da doença em animais de outras faixas etárias, reforçando a teoria de que a ICD afeta apenas suínos neonatos, diferente do que ocorre em equinos e humanos (Keessen et al., 2011a).

Outra característica que difere a apresentação da doença em suínos é o fato dela não ter relação direta com o uso de antimicrobianos, sendo a dose infectante e a idade dos animais fatores predisponentes muito mais relevantes para o desenvolvimento de ICD na espécie. Apesar disso, o uso de antimicrobiano preventivo nos primeiros dias de vida associado à alta higiene das instalações nas granjas tecnificadas pode predispor os leitões a ICD por retardar a formação de sua microbiota (Arruda et al., 2013).

A doença normalmente é subclínica e resulta em um baixo desenvolvimento corporal e diminuição em índices zootécnicos da granja. Colite e edema de mesocólon são comumente encontrados em animais acometidos, enquanto apenas parte dos animais infectados apresenta diarreia (Songer & Anderson, 2006). Na última década, a ICD tem aumentado significativamente, principalmente em granjas tecnificadas, onde os outros agentes patogênicos já se encontram sob controle. A detecção de toxinas varia entre 29 e 50% em animais oriundos de diferentes granjas (Yaeger et al., 2007). Tanto a morbidade quanto a mortalidade variam em torno de 20%, entretanto taxas de mortalidade de 50% já foram encontradas (Songer et al., 2000).

No Brasil, levantamentos recentes sugerem uma alta prevalência da doença no Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Lippke et al., 2011; Silva et al., 2011). Neste último, observou-se que mais da metade das granjas avaliadas possuíam a doença no plantel, sugerindo uma grande disseminação do agente (Silva et al., 2011). Em um estudo de diagnóstico diferencial dos principais enteropatógenos em leitões na maternidade (Rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* e *C. difficile*), foram encontradas as toxinas TcdA e TcdB e/ou lesões histológicas características de *C. difficile* em mais de 30% dos animais, sugerindo crescente importância desse agente nessa faixa etária (Cruz Junior et al., 2013).

#### 3.4.4. Outros animais

Em cães, existem desde relatos de diagnóstico de diarreia crônica causada por *C. difficile* (Berry & Levett, 1986) até um surto de infecção nosocomial pelo agente (Weese & Armstrong, 2003). De forma similar ao que ocorre em humanos e equinos, a administração prévia de antimicrobianos e de drogas imunossupressoras parece funcionar como fator de risco para o desenvolvimento de ICD nesta espécie (Clooten et al., 2008). Em relação à idade não existem dados consistentes, entretanto, Weese et al. (2001a) não encontraram associação entre frequência de isolamento de *C. difficile* e idade dos animais.

Em cães saudáveis, a taxa de isolamento varia de 0 a 10%, já em cães internados em hospitais veterinários esses números sobem para 18 a 40% (Clooten et al., 2008). Marks et al. (2002) não encontraram diferença significativa no isolamento do agente em cães diarreicos e não-diarreicos, o que corrobora com outros estudos que afirmam que *C. difficile* pode fazer parte da microbiota normal (Weese et al., 2001a). Entretanto, a taxa de isolamento de estirpes toxigênicas normalmente é maior em cães diarreicos que cães saudáveis (Chouicha & Marks, 2006), assim como a detecção das toxinas TcdA e TcdB (Silva et al., 2013b).

Outras espécies domésticas que já tiveram casos de ICD relatados foram gatos (Weese et al., 2001b), coelhos (Bano et al., 2008) e bovinos (Martins et al., 2001). Já entre as espécies selvagens existem relatos da doença em elefantes asiáticos (Bojesen et al., 2006), jaguatirica (Silva et al., 2013c), entre outros. Apesar disso, nestas espécies a ocorrência de distúrbios gastrointestinais relacionadas à *C. difficile* parecem ser esporádicas e não há um maior detalhamento sobre suas características.

#### 3.5. Diagnóstico: prós e contras

O diagnóstico clínico de ICD, assim como outras bactérias do gênero *Clostridium*, se baseia na detecção das toxinas A e B, responsáveis por causar a doença. Por este motivo, o teste de soroneutralização celular (SNC) foi considerado durante muito tempo o padrão ouro para diagnóstico de ICD. Neste teste, uma preparação de filtrado da amostra fecal é aplicada sobre uma monocamada de celular com e outra sem a presença de antitoxinas de *C. difficile* ou *C. sordellii* (reação cruzada). Após 24h, é observado se houve efeito citopático e se este foi causado pelas toxinas A/B (Burnham & Carroll, 2013). Apesar de eficiente, estudos reavaliando o teste frente a PCR e TC demonstraram que sua sensibilidade é menor do que se imaginava (Cohen et al., 2010; Carroll e Bartlett, 2011). Além disso, a manutenção de linhagens celulares é outro ponto desfavorável pelo alto custo e necessidade de pessoal treinado (Post et al., 2002).

Com isso, o teste de cultura toxigênica (CT), tem sido considerado o novo padrão ouro para o diagnóstico da doença (Cohen et al., 2010). O teste se baseia na inoculação do espécime fecal em um meio seletivo para microrganismos anaeróbios que contenha substâncias inibitórias para a microbiota normal, promovendo crescimento de *C. difficile*. Como nessa etapa são recuperadas estirpes toxigênicas e não toxigênicas, os isolados devem ser submetidos a testes que avaliam a produção das toxinas, como SNC e testes imunoenzimáticos (ELISA) ou testes que avaliem os genes responsáveis pela codificação das toxinas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Carroll & Bartlett, 2011).

Os protocolos para isolamento são variáveis entre pesquisadores e laboratórios, entretanto, algumas técnicas podem aumentar a taxa de isolamento. O pré-tratamento do espécime clínico com etanol 70% (v/v) ou choque térmico podem favorecer a predominância dos esporos de *C. difficile* (Marler et al., 1992). O meio padrão usado para o isolamento é o ágar cicloserina cefoxitina frutose (CCFA) (George et al., 1979), o qual pode ser acrescido de substâncias como sangue equino, taurocolate e lisozima para estimular a germinação dos esporos (Carroll & Bartlett, 2011). Um estudo recente demonstrou um aumento significativo na taxa de isolamento ao utilizar uma etapa anterior de enriquecimento aplicando as amostras em caldo cicloserina cefoxitina frutose, suplementado com 0,1% de taurocolate (Lister et al., 2014). O incremento da técnica de isolamento aumenta consideravelmente a sensibilidade teste, mas o torna ainda mais inviável para a rotina de diagnóstico, sendo indicado apenas para fins experimentais ou epidemiológicos (Cohen et al., 2010).

A PCR convencional é uma interessante técnica para a identificação de estirpes toxigênicas (Silva et al., 2011). Entretanto, a padronização desta técnica normalmente requer o prévio isolamento do microrganismo, inviabilizando sua utilização rotineira. Uma alternativa recente e ainda pouco utilizada, mas que tem apresentado alta sensibilidade e especificidade para amostras provenientes de humanos e suínos é a PCR em tempo real (rPCR) realizada diretamente das fezes (Keessen et al., 2011b, Berry et al., 2014). Entretanto, ainda não há dados consistentes na literatura a respeito da eficácia desta técnica em outros animais domésticos. Somado a isso, a técnica enfrenta o grande entrave do custo, que ainda é bastante elevado, inviabilizando o uso na rotina.

A opção atualmente mais disseminada para o diagnóstico dessa enfermidade é a utilização dos kits de ELISA para a detecção das toxinas TcdA e TcdB, que são de fácil e rápida execução (Carroll & Bartlett, 2011). Deve-se enfatizar, porém, que os kits presentes no mercado nem sempre possuem sensibilidade adequada, sendo comumente inferior a 60% em alguns deles, correndo-se o risco de subotimizar o diagnóstico (Planche et al., 2008). Como a padronização dos kits é realizada visando a detecção das toxinas TcdA e TcdB a partir de fezes de humanos, é imprescindível realizar testes avaliando sua performance quando aplicados em espécimes clínicos de animais (Chouicha & Marks, 2006). Trabalhos avaliando o desempenho dos kits de ELISA em espécimes caninos (Chouicha & Marks, 2006) e suínos (Keessen et al., 2011b, Silva et al., 2013d) sugerem que tais produtos apresentam sensibilidade e/ou especificidade baixas. Já para equinos, os testes avaliados apresentaram resultados bastante satisfatórios, possibilitando o uso na rotina clínica (Medina-Torres et al., 2010, Silva et al., 2014b).

Uma possibilidade que tem sido muito difundida para o diagnóstico humano, mas ainda não foi testada em animais é a identificação da enzima glutamato desidrogenase (GDH), metabólito produzido em grandes quantidades por *C. difficile* (Carroll & Bartlett, 2011). Como o teste identifica tanto estirpes toxigênicas como não toxigênicas, é necessário um teste em sequência para identificar as toxinas e concluir o diagnóstico, seja ELISA ou PCR (Goldenberg et al., 2010). Estudos têm demonstrado sensibilidade satisfatória do diagnóstico utilizando GDH, de forma que o teste é recomendado como teste de triagem para pacientes humanos nos Estados Unidos pela Society for Healthcare Epidemiology of America and the Infectious Diseases Society of America (Cohen et al., 2010).

### 3.6. Prevenção e Controle

O método de prevenção mais utilizado para as enfermidades clostridiais é a vacinação utilizando toxóides como antígenos (Lobato et al., 2013). Em um dos trabalhos precursores que avaliou a imunização como forma de prevenção, a utilização de toxóide TcdA ou uma mistura de toxóides TcdA e TcdB foi eficaz para prevenir o desafio orogástrico em hamsters. Já o toxóide de TcdB sozinho e o filtrado de um caldo contendo uma estirpe não toxigênica de *C. difficile* não conferiram proteção, sugerindo que a TcdA era essencial para a patogenia do microrganismo. Apesar do resultado obtido ter sido positivo, o trabalho objetivava determinar qual toxina tinha papel mais importante na patogenia, de forma que o adjuvante utilizado foi o adjuvante de Freund, inviabilizando a utilização dessas vacinas em animais domésticos e seres humanos (Kim et al., 1987).

Num trabalho mais recente visando a produção de uma vacina eficaz, Anosova et al. (2013) obtiveram bons resultados utilizando toxóides ultrapurificados e adjuvante Sanofi Pasteur, uma mistura de fosfato de potássio e alumínio. O processo de purificação dos toxóides permite a determinação da dose mínima necessária para conferir proteção, entretanto encarece o procedimento, inviabilizando seu uso em massa (Mizrahi et al., 2014). Outra experiência positiva foi a utilização de uma quimera de TcdA e TcdB contendo os respectivos domínios de ligação aos receptores das toxinas e hidróxido de alumínio como adjuvante (Tian et al., 2012). Já a utilização de toxóide TcdB em aplicação intraperitoneal em hamsters utilizando RIBI como adjuvante preveniu o desenvolvimento de ICD após desafio com uma estirpe *C. difficile* A-B+, porém não impediu a colonização (Siddiqui et al., 2012).

O grupo de pesquisa francês Sanofi-Pasteur se encontra bem adiantado em relação aos demais no que tange a imunização contra as toxinas A e B de *C. difficile*. Foglia et al. (2012) relataram o sucesso obtido após os testes de fase I de uma vacina em humanos. A vacina testada causou apenas eritema local em 46% dos pacientes inoculados frente a 15% do grupo controle, sendo considerada segura. No final de 2013, em comunicado oficial, o instituto de pesquisa relatou a conclusão com sucesso dos testes de fase II e início dos testes de fase III, que avaliaria segurança, imunogenicidade e eficácia da vacina na prevenção de ICD. Os resultados são bastante esperados pela comunidade científica, pois podem revelar a primeira vacina para a prevenção da doença.

Como ainda não se tem uma vacina eficaz contra as toxinas A/B, estratégias diferentes já foram utilizadas visando à imunização ativa em animais de laboratório. Em uma delas, Permpoonpattana et al. (2011) administraram por via oral, em hamsters, esporos de *Bacillus subtilis* expressando domínios C-terminal das toxinas TcdA e TcdB. Tal estratégia estimulou a produção de anticorpos contra ambas as toxinas e conferiu proteção parcial contra o desafio toxigênico. Já a vacina oral contra Cwp84, uma das adesinas de *C. difficile*, reduziu a colonização do microrganismo em 26% e aumentou a taxa de sobrevivência em 33% no grupo imunizado após desafio (Sandolo et al., 2011).

No que tange a imunização passiva, os trabalhos iniciais datam do início da década de 1990. Lyerly et al. (1991) conseguiram prevenir a ICD em hamsters administrando, por via intragástrica, IgG bovina concentrada a partir do colostro. A partir de então, anticorpos produzidos em diferentes espécies e administrados por diferentes vias foram testados, prevenindo parcialmente ou completamente a ICD em hamsters ou camundongos (Mizrahi et

al., 2014). Entretanto, a imunização passiva oferece proteção momentânea, sendo indicada apenas para pacientes com alto grau de risco para ICD (Cohen et al., 2010).

Trabalhos mais recentes têm avaliado a utilização de imunização passiva visando o tratamento da ICD, fornecendo uma opção ou um complemento ao tratamento clássico, o qual é baseado na administração de antimicrobianos como metronidazol, vancomicina e fidaxomicina. Roberts et al. (2012) produziram anticorpos anti TcdA e anti TcdB em modelo murino e avaliaram a sua eficiência em evitar a ICD em hamsters. A administração dos anticorpos 24 horas após o desafio reduziu entre 40 e 90% a mortalidade em comparação ao grupo controle, demonstrando relativa eficiência no uso de anticorpos auxiliando o tratamento (Roberts et al., 2012). Em animais domésticos nos quais a doença tem importância nos primeiros dias de vida, como suínos e equinos, a imunidade passiva adquirida no colostro poderia ser uma importante via de prevenção da doença. Entretanto, até o momento, não existem estudos nesse sentido.

Como ainda não há uma estratégia de prevenção comprovadamente eficaz e amplamente disseminada no campo da imunologia, alternativas são avaliadas visando impedir o contato ou a colonização do paciente por uma estirpe toxigênica do microrganismo (Pokrywka et al., 2014). Além de práticas básicas de higiene por parte da equipe de saúde e pacientes, a utilização de desinfetantes adequados em instalações hospitalares, sejam humanas ou animais, são de extrema importância (Vohra & Poxton, 2011). Com raras exceções, os desinfetantes perdem grande parte do seu potencial de ação na presença de matéria orgânica, sendo importante uma limpeza prévia, em especial em instalações veterinárias.

Em um trabalho avaliando a eficiência de três desinfetantes clorados distintos (Dismozon, Kohrsolin extra e Kohrsolin FF), Horejsh & Kampf (2011) demonstraram que os três eram capazes de reduzir o número de esporos em 10000 vezes num tempo de exposição de pelo menos duas horas. Já Vohra & Poxton (2011), buscando avaliar uma ação mais imediata, testaram cinco diferentes compostos e constataram que o composto cujo princípio ativo era dicloroisocianureto de sódio (Actichlor) foi o que apresentou um resultado global melhor, conseguindo reduzir a concentração de esporos em 1000 vezes em diversas superfícies. Apesar disso, nem os desinfetantes mais potentes são capazes de eliminar na totalidade os esporos, sendo necessárias ações adicionais para evitar a contaminação do paciente.

Dentre as estratégias mais modernas visando o controle da enfermidade, a proposta de Howerton et al. (2013) chama atenção. Ao administrar a camundongos 50mg/kg de derivado sulfônico de metabenzenocolate (CamSa), um sal biliar antagonista ao processo de germinação do esporo, impediu-se a mortalidade por ICD. A sintomatologia e os quadros de lesão também foram mínimos quando comparados ao grupo controle. Entretanto, quando a substância é administrada 24h antes do desafio há um aumento da severidade dos sintomas. Além disso, essa estratégia não oferece proteção para um possível desafio com células vegetativas (Howerton et al., 2013).

Outra possibilidade visando tanto à prevenção da colonização de *C. difficile* quanto o estímulo de ações imunomodulatórias é o uso de probióticos (Fitzpatrick, 2013). O agente há mais tempo conhecido com propriedades benéficas contra a infecção de *C. difficile* é *Saccharomyces boulardii* (Toothaker & Elmer, 1984). Além de produzir proteases que se ligam aos receptores da toxina A, os efeitos imunomodulatórios do *S. boulardii* são importantes para frear o avanço da ICD. Entre eles se encontram a redução dos fluidos secretados e a redução da produção de

agentes pró-inflamatórios, levando a uma consequente redução da inflamação (Fitzpatrick, 2013). Apesar de sua reconhecida eficiência por pesquisadores e alguns clínicos, o uso de uma apresentação comercial do agente como co-tratamento e prevenção de recorrência de ICD levou uma paciente idosa a um quadro de fungemia por *S. boulardii* (Thygesen et al., 2012). Um microrganismo do mesmo gênero, *Saccharomyces cerevisiae*, também já foi apontado como probiótico eficaz contra ICD em testes realizados em camundongos (Martins et al., 2005). Entretanto, a possibilidade de fungemia por esse agente também é real (Santino et al., 2014).

No que diz respeito às bactérias, *Lactobacillus acidophilus* impediu ICD em camundongos, diminuindo o nível de toxinas encontrado no ceco e o grau de inflamação (Kaur et al., 2011). Outro microrganismo que apresentou sucesso quando utilizado como probiótico em modelo animal de camundongo foi *Bacillus coagulans*, prevenindo a recorrência da doença (Fitzpatrick et al., 2012). De acordo com o autor, o microrganismo ainda demonstrou inúmeras atividades imunomodulatórias interessantes, como redução na produção de toxinas, redução de diversas substâncias pró-inflamatórias e redução de COX-2, um dos responsáveis pela diarreia.

Os estudos mais recentes têm avaliado como probióticos a mistura de estirpes e fatores simbióticos, de forma que microrganismos do gênero *Bifidobacterium* estão em voga por serem predominantes na microbiota humana (Kondepudi et al., 2014). Estudos em animais domésticos alvo, bem como estudos sistemáticos em humanos ainda não foram realizados, de forma que as conclusões a respeito dos benefícios dos probióticos partem de estudos com modelos animais e poucos relatos de caso em humanos. Por achar esses dados ainda inconsistentes e devido ao risco de fungemias e bacteremias, o uso dos probióticos como prevenção de ICD não é recomendado pelo *The Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) (Cohen et al., 2010).

Uma alternativa visando à prevenção da ICD é a utilização de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD), uma vez que elas não possuem os genes responsáveis pela produção das toxinas causadoras da doença, mas, aparentemente, mantêm a mesma capacidade de colonização (Sambol et al., 2002). Essa proposta foi idealizada pela percepção de que comumente animais ou humanos colonizados com estirpes NTCD possuíam um risco muito menor de adquirir estirpes toxigênicas e, conseqüentemente, de desenvolver ICD, levantando a hipótese de exclusão competitiva (Kyne et al., 2000). Apesar desta proposta ser muito similar àquela dos probióticos, os pesquisadores não a encaixam como um probiótico devido às divergências a respeito da definição do termo (Sanders, 2008).

Estudos utilizando hamsters demonstraram que a administração prévia de estirpes NTCD é capaz de prevenir a ICD após desafios a curto e a longo prazo (Borriello & Barclay, 1985; Sambol et al., 2002). Recentemente, um resultado promissor também foi relatado em humanos. Villano et al. (2012) demonstraram que estirpes NTCD administradas em múltiplas doses são capazes de colonizar o trato intestinal de pacientes submetidos a tratamento com antimicrobianos, justamente o grupo de risco para infecção por *C. difficile*. No que diz respeito a suínos, um trabalho realizado pela Universidade de Arizona, em uma granja dos Estados Unidos, comparou a administração oral de esporos NTCD com a pulverização dos mesmos nas tetas e períneo das porcas. O grupo que recebeu administração oral de esporos foi o que apresentou menor taxa de detecção de toxina nos leitões e ambos os grupos apresentaram peso ao desmame significativamente maior que os grupos controle. Tais resultados suportam a

hipótese de que uma colonização prévia por estirpes NTCD pode diminuir as perdas causadas pela ICD em suínos (Songer et al., 2007).

Apesar do aparente sucesso na utilização de estirpes NTCD, nunca houve a tentativa de usar estirpes NTCD nacionais para a prevenção de ICD em modelos experimentais. Além disso, não se sabe em quanto tempo após a administração da estirpe os animais se mantêm protegidos, nem a viabilidade dos esporos de estirpes NTCD quando submetidos a métodos de conservação, fazendo-se necessários mais estudos para tais esclarecimentos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios e no Laboratório de Soros e Vacinas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

### 4.2. Amostras

Foram utilizadas cinco estirpes NTCD de *C. difficile* previamente isoladas de suínos (n=1), equinos (n=1) e cães (n=3). As estirpes, oriundas da bacterioteca do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa (EV-UFMG), haviam sido previamente isoladas de animais aparentemente saudáveis. A caracterização como não-toxigênicas pela ausência dos genes codificadores da toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) e toxina binária (*cdtB*) foi realizada por PCR (Silva et al., 2011) e ausência de detecção das toxinas A e B por SNC (Silva et al., 2013a). Além disso, as estirpes também foram previamente caracterizadas pelo ribotipo de acordo com a PCR padronizada por Bidet et al. (1999).

#### 4.2.1. Confirmação de toxigenicidade das estirpes NTCD por PCR

As amostras da bacterioteca foram descongeladas e plaqueadas em ágar Müller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, EUA) suplementado com 5% de sangue equino e 0,1% de taurocolate (Sigma-Aldrich Co, St. Louis) (AST). As placas foram mantidas em anaerobiose a 37°C por 48h. Três colônias de cada estirpe foram diluídas em microtubos estéreis contendo em água ultrapura (Milli-q Plus QPack 1E, Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). Realizou-se extração térmica de DNA em água (98°C, 20 minutos) e posterior centrifugação a 3.000 x g a 4°C por 20 minutos, sendo o sobrenadante utilizado como molde de DNA. Foram utilizados oito primers conforme indicado na tabela 1. O protocolo de PCR utilizado foi o descrito por Silva et al. (2011) e como controle utilizou-se a estirpe de referência de *C. difficile* originária do *American Type Culture Collection* (ATCC 9689). Os produtos foram aplicados em gel de agarose a 1,5% suplementado com 0,01% de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após corrida eletroforética (120V, 30mA, 40 minutos) as bandas foram observadas sob luz ultravioleta e analisadas em comparação a um marcador de tamanho molecular (100bp DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, Brasil).

**Tabela 1.** Iniciadores específicos usados na PCR *multiplex*, para amplificação dos genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB* e *cdtB* de *Clostridium difficile*.

Genes	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>tcdA</i>	tcdA_F	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT	365 ou 110	
	tcdA_R	GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT		
<i>tcdB</i>	tcdB_F	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA	160	Lemee et al. (2004)
	tcdB_R	ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT		
<i>tpi</i>	tpi_F	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	210	
	tpi_R	CATAATATTGGGTCTATTCCCTAC		
<i>cdtB</i>	cdtB_F	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	260	Persson et al. (2008)
	cdtB_R	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG		

#### 4.2.2. Avaliação da ausência de produção de toxinas das estirpes NTCD

Para confirmação da ausência de produção de toxinas, cada estirpe NTCD foi inoculada em três tubos rosca contendo 15mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco Laboratories, Detroit, EUA). Após crescimento por 72h em ambiente de anaerobiose, a cultura foi submetida à centrifugação a 3.000 x g a 4°C por 20 minutos. No sobrenadante avaliou-se a presença de toxinas (SNC) enquanto o *pellet* foi utilizado para avaliação da produção de esporos (item 4.2.3.).

Para a SNC, o sobrenadante passou por filtro de 0,22µm e foi utilizado para pesquisa de efeito citopático em células de rim de macaco verde Africano (VERO). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Sigma-Aldrich, Inc., EUA) suplementado com 8% de soro fetal de bovino. Para proteção do efeito citopático foi utilizado anticorpo antitoxinas de *Clostridium sordellii*. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, incubada por 24h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As estirpes foram avaliadas pela presença de efeito citopático, determinado pelo arredondamento celular. O filtrado também foi utilizado para a detecção de toxinas por um teste ELISA (Techlab Tox A/B II - Techlab, Blacksburg, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.2.3. Avaliação da produção de esporos *in vitro* das estirpes NTCD

O *pellet* obtido na etapa anterior foi ressuscitado com 5,0mL de álcool 70% v/v e incubado a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas três centrifugações consecutivas (3000 x g, 4°C, 20 minutos) com troca da solução de álcool por solução tampão salina fosfato 1x (PBS) (Lennette & Schmidt, 1979). O *pellet* final foi ressuscitado em 1,0mL de PBS e submetido a choque térmico em banho-maria (70°C, 30 minutos). Após essa etapa, houve o resfriamento das soluções em banho-maria até 37°C e posterior diluição seriada de base 10 até a diluição 10<sup>-5</sup>.

As soluções provenientes das diluições foram plaqueadas em AST. Após a incubação em câmara de anaerobiose por 72h a 37°C foi realizada a contagem bacteriana em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As contagens obtidas foram transformadas em logaritmos na base 10, dos quais foram calculados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste t de Student (p<0,05) (GraphPad Prism 6, EUA).



#### 4.2.4. Susceptibilidade antimicrobiana e avaliação de genes de resistência

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi determinado pelo método de concentração inibitória mínima (CIM), utilizando o método de diluição em agar Brucella (Difco Laboratories, Detroit, EUA), suplementado com 5% de sangue equino, 5,0mg/mL de hemina e de 1,0mg/mL de vitamina K tal como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CSLI, 2011).

Os seguintes agentes antimicrobianos foram testados: clindamicina, eritromicina, lincomicina, metronidazol, penicilina, oxitetraciclina, tilosina e vancomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As concentrações testadas de cada agente antimicrobiano foram: 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0, 64,0, 128,0 e 256,0µg/mL. Para controle foi utilizado o modelo de referência *Bacterioides fragilis* (ATCC 25285) (CSLI, 2011). As interpretações de sensibilidade e resistência das estirpes quanto aos antimicrobianos testados foram conduzidas seguindo os pontos de corte indicados no CSLI (2011).

A presença de genes de resistência a macrolídeos (erythromycin ribosomal methylase – *ermB*) e à oxitetraciclina (*tetM*) foram detectados por PCR como previamente relatado por Spigaglia et al. (2007). Já a detecção de genes de resistência à bacitracina (*bcrA*, *bcrB*, *bcrD* e *bcrR*) seguiram o descrito em Charlebois et al. (2012).

#### 4.2.5. Seleção da estirpe

Uma das estirpes foi selecionada para as fases subsequentes do experimento, sendo considerados critérios obrigatórios para a seleção o resultado negativo para o efeito citopático em células e para a detecção de toxinas por ELISA.

As outras características foram consideradas de acordo com os seguintes níveis de prioridade:

- a) Ribotipo mais comum;
- b) Maior produção de esporos;
- c) Alto perfil de resistência antimicrobiana;
- d) Espécie em que a estirpe foi isolada (suínos, equinos, cães nessa ordem de prioridade).

### 4.3. Esporos

#### 4.3.1. Produção de esporos

Os esporos de *C. difficile* foram produzidos de acordo com Yang et al. (2009) com algumas modificações. As estirpes de *C. difficile* foram inoculadas em oito erlenmeyers contendo 250mL de BHI com posterior incubação a 37°C por 96h em anaerobiose. Após esse período, as culturas foram mantidas por 96h em ambiente de aerobiose na temperatura ambiente.

O conteúdo de cada erlenmeyer foi centrifugado a 3000 x g, a 4°C, por 30 minutos, ressuspendido com 25mL de PBS 1x e transferido para tubo de centrifugação tipo Falcon de 50

mL. A centrifugação foi repetida por três vezes para a retirada do meio de cultura. Os *pellets* foram ressuspensos com álcool 70% v/v e mantidos em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Procedeu-se nova centrifugação seguindo os parâmetros especificados anteriormente (ressuspensão com PBS 1x). Essa etapa foi repetida oito vezes, sendo que após a última centrifugação, apenas 5mL de PBS foram utilizados para ressuspender cada um dos conteúdos dos frascos.

Um volume de 10µL de cada uma das soluções foi pipetado, plaqueado com alças de Drigalski em agar Müller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, EUA) suplementado com 5% com sangue equino e incubado em aerobiose e anaerobiose a 37°C por 24h para avaliação da pureza. As soluções não contaminadas foram reunidas em um béquer, alíquotadas sob agitação em microtubos no volume de 1mL e mantidas congeladas a -20°C.

#### 4.3.2. Avaliação da solução de esporo congelada e preparo do liofilizado

Seis alíquotas da solução de esporos foram descongeladas e a porcentagem de esporos foi avaliada por meio da coloração de Gram e coloração de esporos Wirtz-Conklin (Hamouda et al., 2002) observada sob imersão de óleo em aumento de 1000x em microscópio óptico binocular (Nikon E200, Nikon, Tóquio, Japão).

Para realizar a determinação da concentração de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foram feitas diluições seriadas na base 10 de cada uma das alíquotas (variando de  $10^3$  a  $10^8$ ) e inoculou-se 20 µL de cada solução em AST. Após incubação por 48h em ambiente de anaerobiose, placas com 30 a 300 colônias foram contadas para o cálculo da média de UFC/mL.

Uma vez determinada a concentração de esporos, procedeu-se o descongelamento de algumas alíquotas e rediluição com PBS para que a concentração alcançasse  $1,0 \times 10^8$  esporos/mL. Essa nova solução foi realíquotada em frascos de vidro estéreis e congeladas a -80°C por 24h em ultra congelador (Revco, Thermo Scientific, Waltham, EUA). No dia seguinte, procedeu-se a liofilização das amostras em liofilizador de bancada Enterprise (Terroni, São Paulo, Brasil). Metade dos frascos contendo a estirpe liofilizada foi armazenada a 4°C e a outra metade em uma sala com temperatura controlada a 20°C.

#### 4.3.3. Contagem de esporos

Um dia após a produção das estirpes liofilizadas e, a partir deste dia, mensalmente, três alíquotas de cada uma das formas de armazenamento (4°C e 20°C) foram tiradas ao acaso para a realização de métodos de contagem de esporo. As amostras foram ressuspensas com 1,0mL de água destilada estéril e submetidas à diluição seriada de base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ).

No primeiro método, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer (Celeromics, Cambridge, Inglaterra) conforme nota técnica do fabricante. As diluições de  $10^{-2}$  foram utilizadas para realizar a contagem através de observação em microscópio óptico binocular (Nikon E200, Nikon, Tóquio, Japão) no aumento de 400x.

O segundo método foi a técnica de número mais provável (NMP) utilizando três repetições para cada diluição (Cochran, 1950). As diluições utilizadas foram as de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ , de forma que 1mL de cada uma das diluições foi pipetado para um tubo rosca contendo 9mL de BHI. Após o

inóculo, os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos e incubados em anaerobiose por 72h a 37°C. A concentração mais provável foi estimada com base no número de tubos por diluição em que houve crescimento bacteriano, seguindo os cálculos sugeridos por Cochran (1950).

O terceiro método foi a recuperação de esporos viáveis em AST ou contagem em placas (CP). Foram utilizadas as diluições de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ , submetidas previamente a tratamento térmico de 60°C por 30 minutos. De cada diluição foram plaqueados 20µL em AST e, após incubação por 48h em ambiente de anaerobiose, placas com 30 a 300 colônias foram contadas para o cálculo da média de UFC/mL.

As contagens obtidas foram transformadas em logaritmos na base 10, dos quais foram calculados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Foram realizadas correlações entre os métodos de contagem. Para a estimativa de validade da melhor forma de armazenamento, foi realizada uma regressão linear dos diferentes métodos de contagem (GraphPad Prism 6, EUA).

#### 4.4. Animais

Os hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), sexo feminino, de 6 a 8 semanas de idade, foram adquiridos junto ao Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais ficaram alojados individualmente em gaiolas previamente esterilizadas por autoclavagem (121°C, 20 minutos) cobertas por uma camada de maravalha e suprimento de água e comida a vontade, também previamente esterilizados. As gaiolas foram acondicionadas em estantes ventiladas, equipadas com filtros absolutos (Alesco Co., Monte Mor, Brasil) para impedir a contaminação ambiental e dos animais.

##### 4.4.1. Desenho experimental

O modelo de infecção experimental utilizado para o desenvolvimento desta etapa foi o mesmo padronizado por Silva et al. (2014c). Já as etapas experimentais foram adaptadas de Sambol et al. (2002).

Para a definição do tempo dos desafios com amostras toxigênicas de *C. difficile*, quatro hamsters foram submetidos a uma dose de 30mg/kg de clindamicina por via intramuscular. *Pellets* individuais de fezes foram coletados antes da administração de clindamicina e a cada 24h, pesados, diluídos (até a diluição  $10^{-9}$ ), plaqueados em AST e incubados em câmara de anaerobiose (Thermo Scientific, Waltham, EUA) a 37°C por 24h para crescimento microbiano. Após 24h as placas foram desincubadas e utilizadas para a determinação da população bacteriana intestinal contável. As contagens obtidas foram transformadas em logaritmos na base 10, dos quais foram calculados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ) (GraphPad Prism 6, EUA).

##### 4.4.2. Definição dos grupos experimentais

Nesta etapa, 30 animais foram divididos por sorteio aleatório em cinco grupos. O grupo I foi considerado o grupo controle negativo (vida), os grupos II e III foram os grupos tratados com as estirpes NTCD. Os seus respectivos controles positivos (morte) foram os grupos IV e V (tabela 2).

**Tabela 2.** Esquema de inoculação de estirpes NTCD de *C. difficile* em hamsters para avaliação de proteção ao longo do tempo contra infecção por estirpes toxigênicas.

Grupo (n)	Dia 0	24h	36h	72h	Dia 28
I (6)	CLI	-	-	-	Eutanásia
II (6)	CLI	NTCD	T	-	
III (6)	CLI	NTCD	-	T	
IV (6)	CLI	-	T	-	
V (6)	CLI	-	-	T	

Legenda: CLI: Clindamicina (30mg/kg); NTCD: Estirpe não toxigênica de *C. difficile*; T: Estirpe toxigênica.

#### 4.4.3. Depleção da microbiota e administração da estirpe NTCD

No dia 0 do experimento, todos os animais receberam 100µL de uma solução a 90mg/mL de clindamicina por via intramuscular com o objetivo de causar depleção da microbiota indígena. Passadas 24h após a administração do antimicrobiano, os animais dos grupos II e III receberam 500µL de uma solução contendo 10<sup>7</sup> UFC de esporos da estirpe NTCD através de gavagem intraesofágica, seguindo o planejamento descrito na tabela 2.

#### 4.4.4. Desafio com estirpe toxigênica de *C. difficile*

O desafio toxigênico foi realizado com 500µL de uma solução contendo 10<sup>8</sup> esporos de uma estirpe de *C. difficile*, isolada de um suíno com ICD cuja toxigenicidade foi confirmada pelos ensaios descritos nos itens 4.2.1. e 4.2.2. Os grupos II e IV foram desafiados no tempo 36h (12h após a administração da estirpe NTCD) e os grupos III e V foram desafiados no tempo 72h (48h após a administração da estirpe NTCD) (tabela 2).

#### 4.4.5. Coleta de fezes

Nos dias 0 a 10 e nos dias 15 e 28 foi coletado um *pellet* de fezes de cada animal diluído em 1mL de solução PBS. As alíquotas foram congeladas a -20°C e, ao final da etapa experimental com animais, as amostras foram submetidas ao isolamento de *C. difficile* seguido de caracterização da estirpe por PCR (Silva et al., 2011). Amostras com isolamento positivo para a estirpe toxigênica foram submetidas à detecção de toxinas pelo método de ELISA.

#### 4.4.6. Necropsia

Os animais que vieram a óbito durante o experimento foram necropsiados para observação das lesões macroscópicas e coleta do cólon em formol para histopatologia. O conteúdo intestinal foi coletado para isolamento de *C. difficile* e identificação de toxinas por ELISA. No dia 28, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados com pentobarbital sódico (100mg/Kg) associado com lidocaína (10mg/kg) por via intraperitoneal e, posteriormente, foram submetidos ao mesmo procedimento dos animais que vieram a óbito.

#### 4.4.7. Análise dos dados

A estratégia foi analisada de acordo com os seguintes critérios. A etapa seria considerada válida caso nenhum dos animais do grupo controle negativo (I) viesse a óbito nem fosse colonizado pelas estirpes toxigênica ou NTCD durante o período experimental. Para a análise da proteção conferida pela estirpe NTCD foi construído um gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier em função do tempo experimental. As curvas foram analisadas pelo teste de Mantel-Cox para a definição de proteção ou não da estratégia utilizada (GraphPad Prism 6, EUA).

#### 4.4.8. Aprovação do comitê de ética

Utilização dos animais aprovada sob o protocolo 13/2014 , CEUA-UFGM.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Amostras

#### 5.1.1. Descrição das amostras

As amostras, oriundas da bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios, foram codificadas e as informações básicas sobre elas se encontram na tabela 3. Todas estas amostras foram isoladas de animais saudáveis em trabalhos anteriores da equipe do Laboratório de Anaeróbios com o intuito de avaliar a ocorrência da doença em suínos (Silva et al., 2011), equinos (Silva et al., 2013a) e caninos (Silva et al., 2013b).

**Tabela 3.** Caracterização das amostras não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) da bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios quanto à espécie da qual foi isolada, o ribotipo e o perfil toxigênico.

Amostra	Espécie de isolamento	Ribotipo	PCR	Deteção de toxinas
S1	Suíno	053	<i>tpi</i> (+), <i>tcdA</i> (-), <i>tcdB</i> (-), <i>cdtb</i> (-)	Negativo
E1	Equino	053	<i>tpi</i> (+), <i>tcdA</i> (-), <i>tcdB</i> (-), <i>cdtb</i> (-)	Negativo
C1	Canino	009	<i>tpi</i> (+), <i>tcdA</i> (-), <i>tcdB</i> (-), <i>cdtb</i> (-)	Negativo
C2	Canino	009	<i>tpi</i> (+), <i>tcdA</i> (-), <i>tcdB</i> (-), <i>cdtb</i> (-)	Negativo
C3	Canino	009	<i>tpi</i> (+), <i>tcdA</i> (-), <i>tcdB</i> (-), <i>cdtb</i> (-)	Negativo

Em suínos, foram isoladas 12 estirpes entre 60 espécimes clínicos pesquisados. Dessas estirpes, quatro eram A+B+, cinco eram A-B+ e três eram A-B-, estas últimas, isoladas de animais não diarreicos e negativos para a detecção de TcdA e TcdB (Silva et al., 2011). Das três potenciais estirpes isoladas, apenas uma pode ser recuperada e incluída nesse estudo, sendo caracterizada como S1.

Em equinos foram isoladas sete estirpes num total de 153 amostras fecais. Dentre elas, quatro eram toxigênicas (A+B+), todas isoladas de animais diarreicos, e três eram NTCD, sendo duas provenientes de animais não diarreicos e uma oriunda de um animal diarreico (Silva et al., 2013a). A estirpe NTCD isolada de um animal diarreico não foi incluída nesse estudo, pois o critério de seleção inicial eram que as estirpes fossem isoladas de animais sem sintomas gastrointestinais. Dentre as duas estirpes NTCD restantes, apenas uma foi possível de ser recuperada para este estudo, nomeada de E1.

Nos caninos, isolaram-se 12 estirpes num total de 57 espécimes clínicos. Dez dessas amostras seguiam o perfil A+B+ e apenas duas, isoladas de animais aparentemente saudáveis, eram perfil A-B- (Silva et al., 2013b). Ambas foram incluídas neste estudo e receberam os códigos C1 e C2. Além desta, uma terceira amostra de canino isolada após a publicação do trabalho em questão também foi incluída nesse trabalho sob o código de C3.

#### 5.1.2. Avaliação da toxigenicidade das estirpes NTCD de *C. difficile*

Quando submetidos ao PCR para identificação molecular *C. difficile* (Silva et al., 2011), as cinco estirpes apresentaram o mesmo perfil. Todas foram positivas para o gene *tpi*, responsável pela produção da enzima triose fosfato isomerase. Esse gene está presente em todas as estirpes de *C. difficile*, mas não em outras espécies, sendo considerado um gene constitutivo (Lemee et al., 2004). Já o resultado para os genes codificadores de toxinas, *tcdA*, *tcdB* e *cdtB*, foram negativos, sugerindo a incapacidade genética da produção de toxinas.

Apesar do teste de CT seguido por PCR ser suficiente para comprovar a não toxigenicidade das estirpes, realizou-se testes adicionais visando à confirmação da ausência de produção de toxinas *in vitro*. A utilização de testes em sequência já é uma realidade para o diagnóstico da doença em humanos (Carroll & Bartlett, 2011). Laboratorialmente, tal precaução, além de aumentar a confiabilidade do resultado, é útil para comprovar que não houve contaminação ou troca de identificação das estirpes da bacterioteca, bem como descartar possíveis erros ocorridos durante a técnica de PCR.

No teste de SNC, o filtrado de nenhuma das estirpes foi capaz de causar efeito citopático, nem quando utilizado puro sobre as células VERO. No ELISA todas as amostras foram negativas. Estes resultados comprovaram que todas as estirpes eram incapazes de produzir as toxinas A/B em concentrações detectáveis pelos métodos utilizados *in vitro*, qualificando-as para os posteriores testes realizados com o intuito de definir a estirpe a ser utilizada na etapa experimental de proteção da infecção em modelo animal.

#### 5.1.3. Ribotipos das estirpes NTCD de *C. difficile*

As amostras NTCD presentes nesse estudo foram classificadas em dois diferentes ribotipos, sendo eles 053 e 009 (este último também conhecido como SLO064). A maioria dos estudos

que envolvem ribotipagem focam os ribotipos toxigênicos. O ribotipo 053 é um dos mais frequentes na Áustria, porém, naquele país, este ribotipo é toxigênico e comumente ligado a casos de ICD (Indra et al., 2008). Um grupo da Suíça também relatou o isolamento de uma estirpe 053 toxigênica na saída de uma estação de tratamento de águas residuais (Romano et al., 2012). Apesar do perfil toxigênico desta estirpe na Europa, dois recentes estudos no Brasil relataram o isolamento da estirpe 053 NTCD de *C. difficile* em quatis (*Nasua nasua*) e carnívoros silvestres, demonstrando as diferenças geográficas se fazem presentes mesmo dentro de um mesmo ribotipo (Silva et al., 2014d; Silva et al., 2014e). Além disso, um estudo em andamento no Brasil realizado pela equipe do Laboratório de Anaeróbios (UFMG) já isolou a estirpe 053 NTCD em espécies domésticas como suínos, equinos, bovinos e caninos, demonstrando que ela aparenta ser comum no país. Ainda que seja conhecida a existência de estirpes 053 toxigênicas, as estirpes nacionais não possuem os genes responsáveis para a produção de toxinas, sendo seguras para utilização ao objetivo que o presente trabalho se propunha. Como não existe prova irrefutável na literatura de transmissão horizontal destes genes, uma possível explicação para as diferenças no perfil toxigênico entre amostras do mesmo ribotipo seria a perda genética dos mesmos por mutação ao longo do processo evolutivo (Janezic et al., 2012).

Já a estirpe 009 é mundialmente conhecida como NTCD e frequentemente isolada em diversos estudos com humanos e/ou animais saudáveis (Urbán et al., 2001; Keel et al., 2007; Koene et al., 2012; Janezic et al., 2012; Romano et al., 2012; Wetterwik et al., 2013). Além disso, o mesmo estudo em andamento no Brasil citado anteriormente, tem apontado a estirpe 009 como a mais frequente no país dentre as NTCD, sendo isolada de humanos, cães e equinos. Tais características, em especial os preliminares encontrados no Brasil, qualificaram todas as estirpes para o prosseguimento no estudo, uma vez que são frequentes no país e comuns a diversas espécies, colocando-as como fortes candidatas ao uso na prevenção de ICD.

#### 5.1.4. Avaliação da produção de esporos *in vitro* das estirpes NTCD de *C. difficile*

As médias das contagens de esporo e seus respectivos desvios-padrão se encontram na tabela 4. Os fatores genéticos e moleculares que influenciam na multiplicação das estirpes de *C. difficile* ainda não estão totalmente esclarecidos, mas a participação do fator de regulação de esporulação (Spo0A), de moléculas de superfície (como a Cpw 84) e do flagelo têm sido investigados como possíveis influenciadores deste processo (Đapa et al, 2013). Em relação aos fatores externos, as condições de anaerobiose, temperatura e nutrientes disponíveis são essenciais para a replicação bacteriana (Lobato et al., 2013). Além desses fatores, a multiplicação de *C. difficile* é estimulada por sais biliares como taurocolate, comumente acrescido nos meios de crescimento, e glicocolate (Sorg & Sonenshein, 2008).

**Tabela 4.** Média do log<sub>10</sub> das contagens de esporos de cada uma das estirpes NTCD

Estirpe	S1	E1	C1	C2	C3
Média log(10)	4,72 ± 0,03	5,42 ± 0,05	6,68 ± 0,03	6,21 0,06	5,37 ± 0,03
contagem ± DP	d	c	a	b	c

Obs.: Letras diferentes significam médias diferentes pelo teste t de Student (p < 0,05).

Como se pode observar, as estirpes que produziram maior quantidade de esporos foram as provenientes de cães, com destaque para a estirpe C1, sendo considerada muito alta por

apresentar diferença estatística quando comparada a todas as outras estirpes. A estirpe oriunda de equino teve um desempenho intermediário, já a estirpe isolada de suínos foi a que apresentou a menor produção dentre todas. Uma elevada produção de esporos era uma das características de maior impacto para a seleção de estirpes para este experimento, já que a dose sugerida para a prevenção da doença nos animais é alta ( $10^7$  esporos/animal). Como pode ser observado nesta etapa, houve uma diferença de quase duas unidades logarítmicas entre as estirpes de maior e menor produção, significando uma produção cerca de cem vezes maior pela estirpe mais eficiente.

#### 5.1.5. Concentração Inibitória Mínima e genes de resistência a antimicrobianos das estirpes NTCD de *C. difficile*

Os resultados obtidos no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) bem como os genes de resistência presentes em cada estirpe se encontram na tabela 5. Todas as estirpes (100%) foram sensíveis ao metronidazol, à penicilina, à tilosina e à vancomicina. O metronidazol e a vancomicina são os antimicrobianos de escolha para o tratamento da ICD em espécies como humanos e equinos, e dificilmente são encontradas estirpes de *C. difficile* resistentes a essas drogas (Båverud et al., 2003, Piřs et al., 2013, Silva et al., 2014f). Entretanto, ao contrário do que foi encontrado aqui, alguns estudos demonstraram estirpes resistentes à penicilina e tilosina, chegando a índices de até 25% das estirpes resistentes a este último antimicrobiano (Båverud et al., 2003, Silva et al., 2014f).

No grupo das lincosamidas, duas estirpes (40%) NTCD foram resistentes à lincomicina todas elas (100%) apresentaram resistência à clindamicina para clindamicina, similar ao que já foi relatado na literatura (Huang et al., 2010). As lincosamidas são antimicrobianos comumente utilizados contra infecções causadas por microrganismos anaeróbios Gram-positivo e o tratamento com clindamicina é considerado um dos principais fatores de risco para ICD devido a grande taxa de resistência de *C. difficile* a essa base farmacêutica (Huang et al., 2010).

**Tabela 5.** Susceptibilidade antimicrobiana por concentração inibitória mínima (CIM) das cinco amostras NTCD frente às oito drogas testadas.

Antimicrobianos	Estirpes				
	S1	E1	C1	C2	C3
<b>Clindamicina</b>	Res.	Res.	Res.	Res.	Res.
<b>Eritromicina</b>	Mod.	Mod.	Mod.	Sen.	Mod.
<b>Lincomicina</b>	Res.	Sen.	Res.	Sen.	Sen.
<b>Metronidazol</b>	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.
<b>Oxitetraciclina</b>	Mod.	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.
<b>Penicilina</b>	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.
<b>Tilosina</b>	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.
<b>Vancomicina</b>	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.	Sen.
<b>Genes de Resistência</b>	-	<i>bacA</i> , <i>bacB</i>	<i>tetM</i>	<i>bacB</i>	<i>bacA</i>

Legenda: Sen.: Sensível; Mod.: Moderadamente sensível; Res.: Resistente

Dentre as estirpes testadas, quatro (80%) e uma (20%) foram consideradas moderadamente sensíveis à eritromicina e oxitetraciclina, respectivamente, entretanto, nenhuma



delas foi considerada resistente a esses antimicrobianos, diferente do encontrado por Silva et al. (2014f). Acredita-se que a resistência a estes dois antimicrobianos seja mediada por genes dos grupos *erm* e *tet*, respectivamente, e estudos têm encontrado significativas taxas de resistência a essas drogas, provavelmente pelo uso indiscriminado das mesmas (Slavić et al., 2011). No presente trabalho, não se encontrou nenhuma estirpe portadora do gene *ermB*, de forma que a sensibilidade moderada da maioria das estirpes presentes nesse estudo possivelmente seja devido à presença de outros genes do grupo *erm*. Em uma estirpe (20%) foi encontrado o gene *tetM*, proporção similar aos 27% encontrados por Spigaglia et al. (2007) em um estudo utilizando 100 isolados de *C. difficile*, entretanto, naquele estudo constatou-se que as amostras também possuíam o gene *ermB*, sugerindo uma associação entre estes dois genes, resultado que não foi confirmado aqui.

No que diz respeito aos genes de resistência à bacitracina, os estudos em *C. difficile* ainda estão em andamento e se baseiam nos estudos envolvendo *Clostridium perfringens* (Charlebois et al., 2012). No estudo citado, 24,2% das estirpes isoladas de aves apresentaram resistência à bacitracina no teste de CIM e presença dos quatro genes responsáveis por esta resistência. Em *C. perfringens*, os quatro genes se encontram presentes em um mesmo *operon*, o que justifica o fato das estirpes normalmente possuírem todos (ou nenhum) deles. No presente estudo, três amostras (60%) apresentaram um ou mais desses genes, entretanto nenhuma delas apresentou os quatro genes, sugerindo que, em *C. difficile*, eles possivelmente não se encontram no mesmo *operon*. A amostra isolada de suínos não apresentou nenhum dos genes de resistência pesquisados, ao contrário do sugerido pela literatura, que o uso constante de antimicrobianos como promotores de crescimento na suinocultura estimularia a transferência horizontal destes genes e seleção de amostras multirresistentes (Slavić et al., 2011).

É importante ressaltar que a escolha de uma estirpe resistente ou potencialmente resistente a um grande número de antimicrobianos é interessante, uma vez que um dos fatores de risco para o estabelecimento da doença em algumas espécies, como humanos e equinos, é a terapia antimicrobiana (Båverud et al., 2003, Huang et al., 2010). Dessa forma, é ideal que a estirpe NTCD tenha um alto perfil de resistência para competir com a estirpe toxigênica de *C. difficile* mesmo em indivíduos submetidos a terapias com tais fármacos.

Tendo em vista esse aspecto, destacam-se as estirpes C1 e S1, que apresentaram resistência confirmada frente as duas lincosamidas testadas e resistência potencial a macrolídeos e tetraciclinas. Vale ressaltar que, dentre as cinco estirpes, a C1 foi a única a apresentar crescimento em concentrações de clindamicina superiores a 16µg/mL. Esse dado é particularmente interessante devido ao fato que a depleção da microbiota dos hamsters no modelo experimental ser realizada com altas concentrações de clindamicina. Dessa forma, é importante que a estirpe seja capaz de colonizar o intestino dos animais mesmo sob altas concentrações dessa droga. As estirpes E1, C2 e C3, quando comparadas as duas anteriormente citadas, apresentaram resistência há um menor número de bases farmacêuticas e menor número de genes de resistência a antimicrobianos, sendo, assim, consideradas com um perfil de resistência relativo baixo.

### 5.1.6. Seleção da estirpe

Todas as estirpes foram confirmadas como não toxigênicas pelos três métodos realizados, de forma que nenhuma foi eliminada devido a esse critério. A tabela 6 resume os dados que nortearam a seleção da estirpe.

**Tabela 6.** Classificação das estirpes NTCD quanto ao ribotipo, produção relativa de esporos *in vitro*, perfil relativo de resistência a antimicrobianos e espécie na qual foi isolada

Estirpe	Ribotipo	Produção relativa de esporos <i>in vitro</i>	Perfil relativo de resistência a antimicrobianos	Espécie de origem da estirpe
S1	053	Baixa	Alto	Suíno
E1	053	Média	Baixo	Equino
C1	009	Muito alta	Alto	Canino
C2	009	Alta	Baixo	Canino
C3	009	Média	Baixo	Canino

Como observado na tabela 6, foram encontrados apenas dois ribotipos diferentes, sendo eles 009 e 053. O ribotipo 009 é mais comum ao redor do mundo e já foi isolado de cães, gatos, equinos, humanos e meio ambiente (Keel et al., 2007; Koene et al., 2012; Janezic et al., 2012). No Brasil, esse ribotipo tem se mostrado o mais frequente entre os NTCD, entretanto, não há relatos do isolamento deste ribotipo em suínos, uma das espécies em que a doença é a mais importante. No que diz respeito ao ribotipo 053, não é muito relatado na literatura, e os poucos relatos tratam de estirpes toxigênicas (Indra et al., 2008; Romano et al., 2012). Já no Brasil, só foram isoladas estirpes 053 NTCD até o momento e, apesar de terem sido detectadas em menor número quando comparadas a 009, foram isoladas de uma diversidade maior de espécies, inclusive suínos. Considerando estas análises, ambos os ribotipos apresentaram pontos positivos e negativos, não sendo possível definir qual estirpe deveria ser utilizada apenas por esse critério. Visto que os dois ribotipos parecem ser comuns a várias espécies, todos os isolados continuaram a ser analisados de acordo com os demais critérios.

A avaliação da produção de esporos *in vitro* foi um critério essencial para a escolha da estirpe. Apesar de inicialmente as estirpes isoladas de suíno e de equino serem preferidas pela importância da doença nas espécies, a produção de esporos das duas estirpes em questão foi bem menor que a produção daquelas isoladas de cão. A escolha de uma cepa oriunda de um cão não se configura em um problema, pois, além da doença também acometer animais dessa espécie (Silva et al., 2013b), o ribotipo encontrado é comum a várias outras.

Dentre as três amostras de cão, além de ter apresentado uma maior produção de esporos *in vitro*, a estirpe C1 também apresentou um maior perfil de resistência aos antimicrobianos em relação a C2 e a C3. Apesar da estirpe S1 também ter apresentado um interessante perfil de resistência, a sua baixa produção de esporos inviabilizou sua escolha. Considerando a tabela 6 e as discussões acima, a estirpe C1 foi selecionada para a produção de esporos e prevenção de ICD em hamsters.

## 5.2. Viabilidade dos esporos

### 5.2.1. Avaliação dos esporos NTCD de *C. difficile* produzidos

No teste respiratório, não houve crescimento de colônias em aerobiose em nenhuma das oito unidades experimentais. As colônias com crescimento em anaerobiose foram características morfológicamente (figura 3) e no teste Gram e tiveram sua identidade NTCD confirmadas pela técnica de PCR (Silva et al., 2011).



**Figura 3.** Colônias das estirpes não toxigênicas de *Clostridium difficile* (NTCD) em ágar sangue suplementado com taurocolate (AST) se apresentando grandes, branco-acinzentadas, aspecto rugoso e bordas irregulares.

Uma quantidade total de 40 alíquotas contendo 1,0mL de solução de esporos foi congelada em microtubos estéreis e, posteriormente, seis delas foram descongeladas e submetidas às análises de porcentagem e contagem de esporos. Utilizando a coloração de Gram, estimou-se uma porcentagem de esporos de 90%, já utilizando a técnica de Wirtz-Conklin, mais adequada para a visualização dos esporos, estimou-se um percentual médio de 95% de esporos.

A utilização de uma solução com uma proporção superior a 90% de esporos é importante devido à alta resistência típica dessa forma bacteriana, a qual sofre menores alterações na concentração de UFC após armazenamento (Silva et al., 2014c). Apesar de alguns trabalhos com modelos de ICD em hamsters utilizarem apenas células vegetativas (Mcvay & Rolfe, 2000; Kokkotou et al., 2008) ou proporções inferiores a 90% de esporos quando comparado às células vegetativas

(Ochsner et al., 2009), optou-se por usar, no presente estudo, uma solução praticamente isenta de células vegetativas, em consenso com outros autores (Sambol et al., 2002; Nagaro et al., 2013).

As seis alíquotas foram submetidas a contagem bacteriana pelo método de recuperação de esporos em placa. As contagens brutas variaram de  $3,6 \times 10^8$  a  $4,5 \times 10^8$  UFC/mL. Submetendo tais contagens ao logaritmo de base 10, obteve-se média de  $8,60 \pm 0,04$ , o que corresponde a uma contagem média de  $3,98 \times 10^8$  UFC/mL, variando entre  $3,65 \times 10^8$  e  $4,35 \times 10^8$  UFC/mL. Para efeitos práticos foi considerada a contagem média de  $4,0 \times 10^8$  UFC/mL.

Em um estudo objetivando a produção de esporos para a avaliação de desinfetantes a serem utilizados contra *C. difficile*, Hasan et al. (2011) determinaram como critérios básicos para a seleção do método de produção uma concentração acima de  $10^8$  esporos/mL ( $8 \log_{10}$ ) e com proporção de esporos superior a 90%. Os resultados encontrados no presente trabalho atendem estes requisitos mesmo com a utilização de um meio líquido para a produção de esporos, que normalmente favorece uma maior proporção de células vegetativas (Hasan et al., 2011).

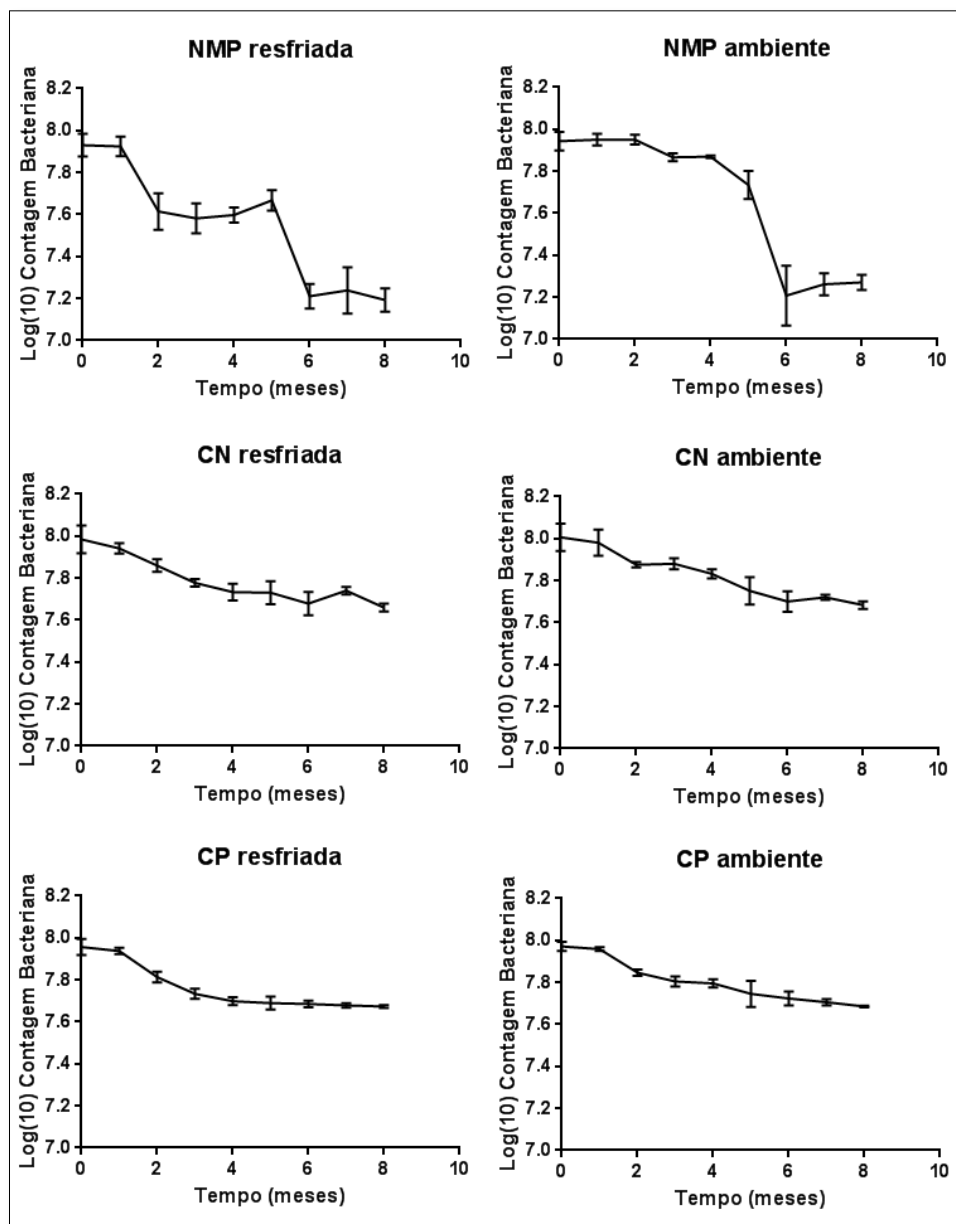
Baseando-se nas contagens obtidas acima, a solução passou por nova diluição até atingir a concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Esta nova solução foi realiquotada em tubos de vidro estéreis, no volume de 1,0mL e submetidos à liofilização, gerando um número final de  $10^8$  esporos por tubo liofilizado. A determinação da quantidade de esporos foi dez vezes superior àquela sugerida para a proteção ( $10^7$  esporos/animal) já considerando que no processo de liofilização e ao longo do tempo poderia haver perda de esporos (Weese et al., 2000).

#### 5.2.2. Contagem de esporos das estirpes NTCD de *C. difficile*

As amostras liofilizadas foram submetidas mensalmente a três métodos de contagem de esporos para avaliação da estabilidade dos mesmos ao longo do tempo. Os gráficos da evolução do  $\log_{10}$  das contagens se encontram na figura 4.

Como é possível observar, todas as contagens ao longo dos meses pesquisados ficaram entre 7 e  $8 \log_{10}$  (que corresponde a quantidades entre  $10^7$  e  $10^8$  esporos), de forma que a queda na concentração foi menor que uma unidade logarítmica, ou seja, menor que 10 vezes. Também é possível observar que, com exceção dos gráficos gerados pelo método NMP, as curvas apresentam uma tendência de uma queda linear e branda. Uma possível explicação para essa queda linear se apoia no fato que alguns esporos são capazes de germinar mesmo em condições adversas, devido a possíveis defeitos na cápsula ou ativação espontânea dos fatores genéticos de germinação (Paredes-Sabja et al., 2014). Uma vez iniciado o processo de germinação, ele não é interrompido, de forma que as células vegetativas procedentes encontram um ambiente desfavorável e acabam entrando em processo de apoptose (Paredes-Sabja et al., 2012).

Os demais estudos que trazem dados a respeito da quantidade de esporos viáveis ao longo do tempo normalmente são aqueles que avaliam eficiência de desinfetantes, como o de Lawley et al. (2010), onde se observa uma brusca queda da concentração de esporos em poucos minutos ou horas, entretanto, como os objetivos são muito diferentes do presente estudo, não há possibilidade de realizar nenhuma comparação entre as curvas geradas. Interpretações mais detalhadas dos dados de contagem serão feitas nos tópicos subsequentes, embasados nas análises estatísticas realizadas.



**Figura 4.** Evolução da média do  $\log_{10}$  das contagens de esporos ao longo do tempo pelos métodos de contagem número mais provável (NMP), câmara de Neubauer (CN) e contagem em placas (CP) nas duas diferentes formas de armazenamento: temperatura ambiente (20°C) e resfriada (4°C).

#### 5.2.2.1. Avaliação dos métodos de contagem de esporos de *C.difficile*

Foram selecionados três métodos de contagem para a avaliação mensal das amostras estocadas refrigeradas e a temperatura ambiente. O método de contagem em placas (CP) é o mais comumente utilizado em rotinas laboratoriais e considerado um padrão adequado para contagem de microrganismos esporulados (Yang et al., 2009). O método de número mais provável (NMP) é uma técnica estatística muito utilizada atualmente para contagem de microrganismos em

alimentos, sendo indicada para microrganismos em baixas concentrações ou de difícil crescimento (Cochran, 1950; Blodgett, 2014). Já a câmara de Neubauer (CN), um popular hemocitômetro, é bastante utilizada para mensurar concentração de células em soluções, em especial concentrações espermáticas, sendo uma técnica rápida e de fácil execução (Imade et al., 1993).

Apesar do uso bastante disseminado da CP, houve receio da utilização apenas desse método de contagem, pois os esporos poderiam entrar em estado de superdormência e terem sua concentração subestimada em um meio sólido (Rodriguez-Palacios & LeJeune, 2011). Para incrementar a capacidade de detecção desse método, acrescentou-se ao meio uma quantidade de 0,1% de taurocolate, um dos co-fatores de germinação (Sorg & Sonenshein, 2008). Além disso, foi estabelecido um protocolo de aquecimento a 60°C por 30 minutos das soluções antes do plaqueamento, com o intuito de estimular a reativação dos possíveis esporos superdormentes (Rodriguez-Palacios & LeJeune, 2011).

O método de NMP foi a alternativa encontrada para realizar a estimativa de esporos através de utilização de meios líquidos, que são mais adequados para germinação de esporos e multiplicação bacteriana (Hasan et al., 2011). Entre as técnicas de NMP, existe a possibilidade da utilização de três ou cinco repetições por diluição (Cochran, 1950). Apesar da maior robustez da técnica utilizando cinco repetições por diluição, optou-se pelo uso de três repetições por diluição devido a maior praticidade desta.

Como alternativa de fácil execução e baixo custo, optou-se pela realização da contagem em um hemocitômetro, sendo utilizada a CN. Além de ser comumente utilizada para a contagem de células em laboratórios de patologia clínica (Silva et al., 2007), a CN é uma ferramenta importante para a determinação de concentração espermática em diversas espécies (Imade et al., 1993) e também já foi adaptada para realizar a contagem de alguns patógenos (Marcel et al., 2001). A utilização desse equipamento para a estimativa de esporos é possível devido à refração dessas estruturas em microscópio óptico, tornando sua visualização relativamente fácil. Uma possível desvantagem deste método é a superestimação da quantidade de esporos, já que tanto as estruturas viáveis quanto as inviáveis são contadas (Hasan et al., 2011).

Para mensurar a concordância entre os três métodos foram realizadas correlações de Pearson. Os resultados se encontram na tabela 7, de forma que as estirpes mantidas a 4°C são apresentadas como resfriadas e as mantidas a 20°C estão descritas como temperatura ambiente.

Independente da forma de armazenamento, as maiores correlações foram encontradas entre os métodos CP e CN e as menores correlações foram entre os métodos CP e NMP. Apesar dos menores índices de correlação obtidos quando o método NMP estava presente, ainda considera-se uma associação forte, por ser maior que 0,7 (Filho e Junior, 2009). Tais valores indicam que os três métodos de contagem são bastante similares entre si, em especial os métodos de CP e CN.

Embasando esses dados, em todas as contagens mensais as médias do  $\log_{10}$  de CP e CN só diferiram estatisticamente pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ) no mês três (temperatura ambiente) e no mês sete (resfriada), em ambas a CN foi ligeiramente maior. Já o NMP foi estatisticamente diferente dos dois métodos em sete ocasiões, sendo que em seis deles apresentou resultados

inferiores às outras contagens e em apenas uma delas o método NMP apresentou resultados superiores.

Era esperado que a CN apresentasse os maiores resultados por considerar até mesmo as partículas não viáveis (Hasan et al., 2011). Entretanto, como a CP apresentou alta correlação com o CN, pode-se inferir que não existem grandes quantidades de partículas inviáveis e as adaptações feitas no método de CP foram eficientes para recuperação de esporos. Já em relação ao método NMP, esperava-se que ele apresentasse resultados superiores ao CP por utilizar meios de cultura líquidos, entretanto isso não ocorreu. Uma possível explicação para esse fato é a escolha do método com apenas três tubos por diluição, que gera uma tabela com um número mais reduzido de probabilidades (quando comparado ao método de cinco tubos). Dessa forma, um tubo turvo a menos pode gerar uma diferença de até uma unidade logarítmica (Cochran, 1950).

Como o NMP é a técnica mais trabalhosa, dispendiosa e cara, além de apresentar a menor concordância em relação às demais, o presente estudo sugere que a sua utilização para contagem de esporos liofilizados de *C. difficile* não seja adequada. Já no que diz respeito às técnicas CP e CN, ambas apresentaram resultados similares e coerentes com o esperado, podendo ser utilizadas para realização desta mensuração. Deve-se ressaltar que o método de CN é mais barato, pois só necessita da câmara de Neubauer e um microscópio óptico; mais rápido, dando o resultado em poucos minutos; e menos trabalhoso, por se basear apenas na montagem e leitura de uma lâmina.

**Tabela 7.** Valores de correlação (r) e seu respectivo P valor (P) entre os métodos de contagem em placas (CP), câmara de Neubauer (CN) e número mais provável (NMP) de acordo com cada uma das formas de armazenamento: temperatura ambiente e resfriada.

<b>Temperatura ambiente</b>			
	<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>NMP</b>
CP	-	r = 0,978 P = 0,00001	r = 0,806 P = 0,00900
CN	r = 0,978 P = 0,00001	-	r = 0,868 P = 0,00200
NMP	r = 0,806 P = 0,00875	r = 0,868 P = 0,00239	-
<b>Resfriada</b>			
	<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>NMP</b>
CP	-	r = 0,973 P = 0,00001	r = 0,834 P = 0,00500
CN	r = 0,973 P = 0,00001	-	r = 0,867 P = 0,00300
NMP	r = 0,834 P = 0,00515	r = 0,867 P = 0,00250	-

#### 5.2.2.2. Avaliação da temperatura na viabilidade dos esporos NTCD de *C. difficile*

De forma geral, microrganismos anaeróbios necessitam de complicados protocolos de armazenamento, com utilização de diferentes crioprotetores e congelamento em nitrogênio líquido. Isso se dá, entre outros motivos, devido à sua grande sensibilidade ao oxigênio (Novik et al., 2009). Já os microrganismos anaeróbios esporulados possuem os esporos como formas de resistência a condições adversas, inclusive altos teores de oxigênio, não necessitando de complicados protocolos de armazenamento (Freeman & Wilcox, 2003). No presente estudo foram avaliadas duas formas de armazenamento de esporos, sendo ambas liofilizadas, uma delas mantida a 4°C e a outra estocada a 21°C.

Normalmente, as formas mais comuns de armazenamento são a refrigeração e o congelamento (Freeman & Wilcox, 2003). Weese et al. (2000) acondicionaram amostras fecais de equinos contendo esporos de *C. difficile* a 4°C em condição de aerobiose e anaerobiose e relataram uma diminuição na recuperação de esporos dos espécimes fecais de equinos estocados em aerobiose durante um período de 30 dias. No que diz respeito ao congelamento, um estudo recente com esporos de *Clostridium sporogenes* demonstrou que após quatro semanas há uma redução significativa da viabilidade de esporos quando comparada àquela dos esporos estocados a 4°C (Mah et al., 2009). Estes resultados não foram confirmados por Freeman & Wilcox (2003), que, ao avaliarem a viabilidade de esporos de *C. difficile* em emulsões fecais a 4°C e -20°C durante 56 dias, relataram não haver alterações na taxa de recuperação de esporos.

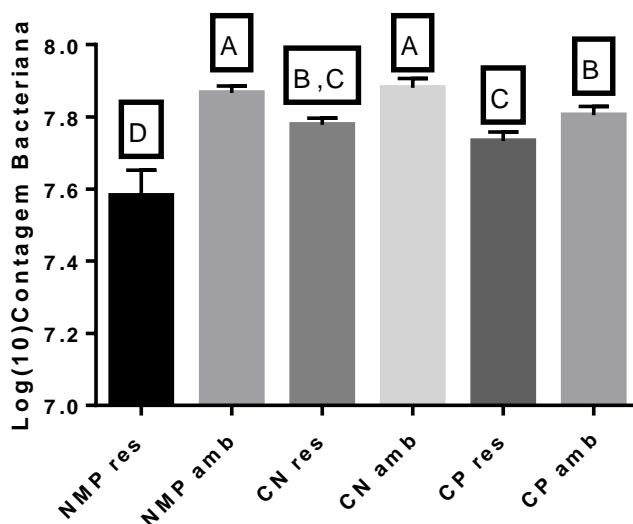
Apesar do congelamento se mostrar bastante eficiente, a manutenção de cadeia de frios é algo complicado. Considerando a utilização destas soluções em instalações animais, cujo acesso muitas vezes é difícil, o congelamento acaba se tornando inviável. Tendo em vista esta dificuldade, optou-se pela utilização de esporos liofilizados, uma vez que esta forma de armazenamento já é utilizada por muitas décadas, é capaz de preservar os microrganismos por longos períodos de tempo e reduz o volume e o peso do material, facilitando o transporte (Gitaitis, 1987; Milošević et al., 2007).

As duas formas de armazenamento (4 e 20°C) apresentaram contagens estatisticamente iguais no momento zero e no primeiro mês comparando o mesmo método de contagem. Entretanto, nos meses dois e três foram observadas diferenças estatísticas nas contagens de acordo com a temperatura de armazenamento, como pode ser observado na figura 5. No mês em questão as estirpes resfriadas tiveram desempenho inferior às estirpes acondicionadas em temperatura ambiente em todos os métodos de contagem, sendo a maior discrepância observada através do método NMP. No mês dois diferença similar a esta foi encontrada também pelo método NMP. A partir do mês quatro até o final das contagens, apesar de serem observadas diferenças numéricas apontando maiores concentrações nas estirpes acondicionadas a temperatura ambiente, não foram observadas diferenças estatísticas, sugerindo que as contagens se igualaram após as diferenças observadas na figura 5.

A possível explicação para a diferença observada entre os dois métodos de armazenamento seria uma maior dormência dos esporos estimulada pela temperatura mais baixa, porém, era de se esperar uma diferença mais acentuada nos meses finais da contagem (Rodríguez-Palacios & LeJeune, 2011). Uma hipótese para a diferença ter sido pontual seria o fato das temperaturas mais baixas inviabilizarem mais rapidamente os esporos mais instáveis, causando um declínio inicialmente mais brusco das amostras armazenadas a 4°C. Posteriormente esses esporos



também se tornam inviáveis nas amostras armazenadas a 20°C, retomando a similaridade entre as contagens.



**Figura 5.** Média de  $\log_{10}$  das contagens de *C. difficile* do mês três de acordo com o método de contagem e as temperaturas de armazenamento. Legenda: NMP: número mais provável; CN: câmara de Neubauer; CP: contagem em placas; amb: temperatura ambiente (20°C); res: resfriada (4°C). Letras diferentes significam valores diferentes pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

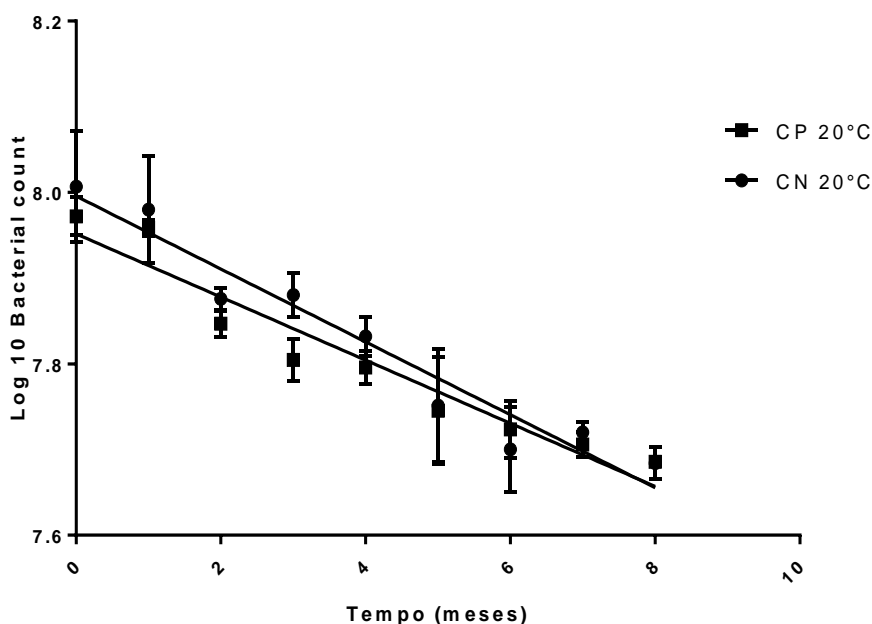
Conforme os resultados obtidos, as alíquotas armazenadas a 20°C (temperatura mais próxima à temperatura ambiente) apresentaram um desempenho relativamente superior às armazenadas a 4°C. Somado a isso a possibilidade do esporo liofilizado ser capaz de percorrer longas distâncias sem a necessidade de manutenção de cadeia de frios, o presente trabalho indica a manutenção dos esporos liofilizados a 20°C (locais frescos e arejados). Tal resultado é de extrema importância, pois a não manutenção de cadeia de frios em produtos que necessitam da mesma, como as vacinas para prevenção de diversas doenças, é uma das grandes responsáveis por falhas destas estratégias (Lobato et al., 2013).

#### 5.2.2.3. Tempo de viabilidade das alíquotas de esporos de *C.difficile*

Como foi possível observar nos tópicos anteriores, as formas mais adequadas para a contagem foram a CP e a CN e a temperatura de conservação mais adequada foi 20°C (próxima à temperatura ambiente). Tendo isso em vista e observando a tendência linear da queda na concentração de esporos, foi realizada uma análise de regressão linear desses dois métodos de contagem, a figura 6 representa as curvas geradas a partir desta regressão.

As curvas obtidas podem ser representadas por equações, de forma que a equação para o método CP foi  $Y = -0,03684 * X + 7,952$ , apresentando um  $R^2 = 0,8815$ . Já a equação para o método CN foi  $Y = -0,04253 * X + 7,996$ , com  $R^2 = 0,8623$ . Altos valores de  $R^2$  significam o quanto o modelo é capaz de explicar tal fenômeno, de forma que valores acima de 0,80 são considerados altos (Coelho-Barros et al., 2008).

Considerando que a queda na concentração de esporos siga uma dessas curvas e hipotetizando que uma dose de  $10^7$  esporos é protetora, basta substituir o Y por sete para encontrar o tempo que essas alíquotas atingiriam tal concentração. Os resultados encontrados são 23 meses para o método CN e 25 meses para o método CP, apontando que tais alíquotas teriam uma quantidade sabidamente protetora, logo, um prazo de validade, de no mínimo 23 meses. Comparando esse prazo com o prazo médio de validade de vacinas contra clostridioses, normalmente 24 meses, podemos concluir que o tempo de uso é compatível com outras estratégias preventivas (Lobato et al., 2008).



**Figura 6.** Análise de regressão linear dos métodos de contagem em placas (CP) e em câmara de Neubauer (CN) das alíquotas de esporos de *C. difficile* armazenadas em temperatura próxima a ambiente (20°C).

### 5.3. Desafio animal

#### 5.3.1. Adaptação do modelo experimental

O desafio em animais foi realizado utilizando como base o modelo experimental padronizado por Silva et al. (2014c). Nesse modelo, o desafio toxigênico ocorreu 48 horas após a administração do antimicrobiano. Entretanto, como o objetivo atual era determinar o tempo em que a estirpe NTCD era capaz de proteger contra o desenvolvimento de ICD, era extremamente importante determinar por quanto tempo os animais mantinham a contagem microbiana fecal reduzida após a administração de clindamicina. Deve-se ressaltar que o principal fator de risco

para a doença é o desequilíbrio da microbiota (Carroll & Bartlett, 2011), dessa forma é essencial que o desafio seja realizado em um momento em que a microbiota não esteja recuperada.

Os resultados referentes à população bacteriana intestinal contável dos hamsters se encontram na tabela 8. A população reduziu em mais de quatro unidades logarítmicas com a administração do antimicrobiano por via intramuscular e se manteve relativamente estável até 72h após a administração do fármaco. No tempo decorrido de 96h após a administração do medicamento, a microbiota já se encontrava estatisticamente no mesmo patamar que antes da administração do antimicrobiano. No modelo utilizado por Sambol et al. (2002), o desafio foi feito cinco dias após a administração do antimicrobiano, mesmo sendo usada a mesma dose inicial de clindamicina. Apesar disso, vários fatores podem influenciar no tempo de recuperação da microbiota. Os dois principais são tipo e tamanho das instalações, que podem propiciar maior ou menor contato do animal com suas próprias fezes, e, principalmente, o tipo de microbiota inicial do animal, uma vez que uma microbiota com perfil menos fastidioso e mais resistente ao antimicrobiano tende a recuperar mais rapidamente (Silva et al., 2014c).

**Tabela 8.** Média do  $\log_{10}$  das contagens de microbiota intestinal de hamsters antes e após a administração de clindamicina por via intramuscular.

Momento (h)	0	24	48	72	96
Média $\log_{10}$ contagem $\pm$ DP	11,18 $\pm$ 0,18	6,86 $\pm$ 0,08	7,01 $\pm$ 0,06	7,14 $\pm$ 0,09	11,23 $\pm$ 0,16
	a	c	b	b	a

Obs.: Letras diferentes significam médias diferentes pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

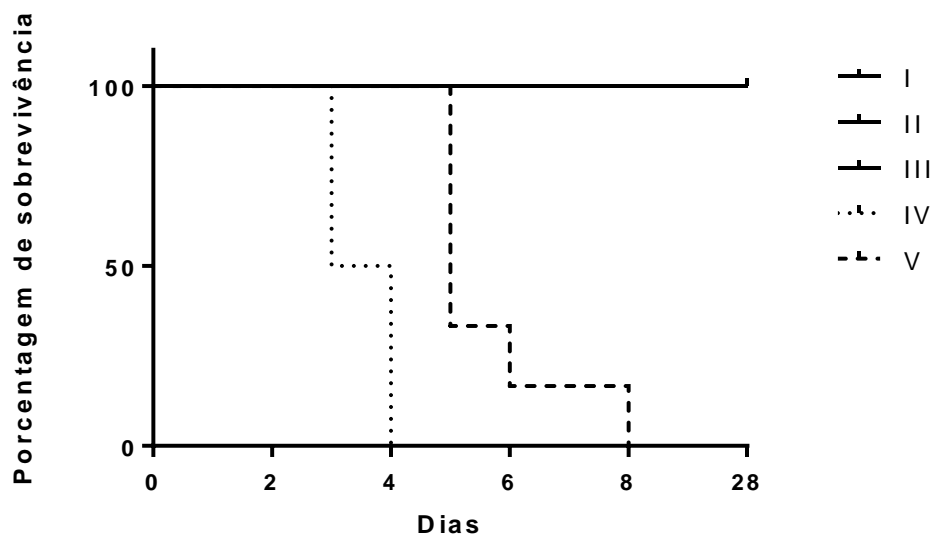
Os resultados obtidos reforçam a importância da padronização de modelos experimentais quando utilizados em diferentes localidades. Além disso, esses resultados foram cruciais para a determinação dos momentos de desafio toxigênico, sendo o primeiro desafio 36h após a administração do antimicrobiano e o segundo 72h após, como presente na tabela 2.

### 5.3.2. Avaliação da porcentagem de sobrevivência dos hamster

A taxa de sobrevivência dos animais em relação ao tempo de experimentação está representada no diagrama de Kaplan-Meier apresentado na figura 7. Como é possível perceber, tanto no grupo controle de vida (I) quanto nos grupos II e III, que receberam a estirpe NTCD antes do desafio, a taxa de sobrevivência foi de 100%. Já nos grupos IV e V todos os animais vieram a óbito, de forma que o último óbito ocorreu no oitavo dia experimental.

Os óbitos dos animais do grupo IV ocorreram entre 36 e 60 horas após o desafio, já os animais do grupo V, desafiados mais tardiamente, tiveram seus óbitos computados num tempo entre 36 e 96 horas após o recebimento da estirpe toxigênica. Tais resultados estão em consonância com o modelo experimental usado como base, em que as mortes se distribuíram num intervalo de 24 a 96 horas após o desafio (Silva et al., 2014c).

As curvas do grupo II e seu respectivo controle (IV) foram estatisticamente diferentes pelo teste de Mantel-Cox com valor  $P = 0,0009$ . Diferença essa também encontrada entre os grupos III e V, com valor  $P = 0,0011$ . Os resultados demonstrados na figura 7 são bastante positivos, porque indicam que a estirpe NTCD utilizada foi capaz de prevenir a doença nos dois grupos testados, tanto no desafio precoce (realizado 12 h após a administração da estirpe NTCD) quanto no tardio (48h após a administração da estirpe NTCD).



**Figura 7.** Diagrama de Kaplan-Meier indicando a porcentagem de sobrevivência dos animais dos grupos experimentais I a V ao longo dos 28 dias experimentais. I: grupo controle de vida; II: estirpe NTCD (24h) + estirpe toxigênica (36h); III: estirpe NTCD (24h) + estirpe toxigênica (72h); IV: estirpe toxigênica (36h); V: estirpe toxigênica (72h).

No trabalho conduzido por Sambol et al. (2002) utilizando uma estirpe NTCD preventivamente e realizando o desafio com três diferentes estirpes toxigênicas, a proteção conferida foi alta, variando de 87 a 97%, mas em nenhum dos ensaios protegeu a totalidade dos animais. Além disso, o desafio toxigênico foi realizado com apenas  $10^2$  esporos por animal, frente a  $10^8$  esporos no presente estudo, indicando que essa estratégia é capaz de prevenir contra uma intensa contaminação ambiental.

Em outro experimento, utilizando duas estirpes NTCD de *C. difficile* com o intuito de prevenir o estabelecimento de ICD hamsters, demonstrou-se que ambas foram capazes de proteger a morte dos animais, uma delas prevenindo a ocorrência de morte em 100% dos animais (Nagaro et al., 2013). Entretanto, de forma similar ao trabalho citado anteriormente, o desafio com a estirpe toxigênica foi realizado com apenas  $10^2$  esporos. O uso de uma quantidade maior de esporos no desafio é importante quando se decide usar essa estratégia para a prevenção da doença em animais, uma vez que é de se esperar que as instalações animais geralmente sejam mais contaminadas que os ambientes hospitalares humanos.

Apesar da semelhança dos dois trabalhos citados anteriormente com o presente estudo, existem diferenças importantes além da quantidade de esporos utilizada no desafio. A primeira delas é que nenhum dos dois trabalhos realizou uma análise tão profunda das estirpes utilizadas, não apresentando o ribotipo das mesmas ou produção de esporos *in vitro*. Além disso, tais trabalhos não avaliaram a forma de acondicionamento dessas estirpes e evolução da concentração ao longo do tempo, de forma que o presente estudo, além de corroborar com os resultados encontrados por estes pesquisadores, acrescenta importantes informações à comunidade científica com relação a viabilidade da utilização da estirpe NTCD como possível produto.

### 5.3.3. Avaliação do conteúdo fecal de hamsters quanto à presença de estirpes NTCD, estirpes toxigênicas e toxinas A e B.

Foram coletados os conteúdos fecais individuais nos 10 primeiros dias de experimentação e nos dias 15 e 28 dos animais de todos os grupos experimentais para a confirmação de colonização e produção de toxinas. No grupo I, o qual não recebeu nenhuma inoculação de microrganismos, houve o isolamento de uma estirpe NTCD em um animal no dia experimental cinco. A colonização de um dos animais desse grupo por qualquer estirpe de *C. difficile* poderia inviabilizar o estudo, uma vez que esse grupo representava o controle ambiental, com objetivo de avaliar o risco de contaminação cruzada. Apesar de tal resultado ser alarmante, provavelmente foi fruto de um erro na identificação da alíquota ou contaminação durante o procedimento de isolamento. Isso porque foi um isolamento pontual, em apenas um animal e somente em um dia, diferentemente do ocorrido nos animais colonizados por essa estirpe, os quais continuaram sendo positivos para a mesma no isolamento fecal por longo período de tempo. Outra possível hipótese para explicar o isolamento pontual seria a passagem da estirpe pelo trato gastrointestinal, porém, como o animal estava com depleção da microbiota, a chance desta estirpe ter se instalado era alta e, como isso não aconteceu, esta hipótese é menos provável que as anteriores. Com isso, conclui-se que não houve contaminação cruzada durante o período experimental, fato importante para validar os dados produzidos por esta etapa experimental.

Os animais dos grupos IV e V, que não receberam a estirpe NTCD, foram positivos para o isolamento da estirpe toxigênica um dia após sua administração até o dia da morte. Estes animais também foram positivos para a detecção das toxinas TcdA e TcdB por ELISA, demonstrando que houve colonização por esta estirpe e produção dos principais fatores de virulência, assim como observado no modelo experimental (Silva et al., 2014c). Apenas um animal do grupo V foi negativo para o isolamento da estirpe toxigênica e para a detecção de toxinas nos dias experimentais 4 (um dia após o desafio) e 5. Entretanto, foi possível isolar a estirpe e detectar as toxinas nos dias 6 e 7, e o animal veio a óbito no dia experimental 8. O comportamento anômalo desse animal pode ser explicado pelo fato desse animal possuir uma microbiota um pouco mais resistente que os demais ou por variações individuais de outras naturezas (Kokkotou et al., 2008).

Em todos os animais do grupo II foi possível isolar tanto a estirpe toxigênica como a NTCD no dia experimental 2. Isso foi possível, pois os animais receberam a estirpe NTCD no dia 1 e foram desafiados com a estirpe toxigênica 12 horas após. Apesar do isolamento, nenhum dos animais foi positivo para detecção de toxinas pelo método de ELISA. Quatro animais deste grupo continuaram eliminando ambas as estirpes no dia 3, novamente sem a presença de toxinas. A partir do dia 4, não foi isolada a estirpe toxigênica de nenhum animal deste grupo. Tais resultados mostram que a estirpe toxigênica passou pelo trato gastrointestinal destes animais, porém sem colonizar e sem produzir seus fatores de virulência principais em quantidades detectáveis, indicando que a estirpe NTCD foi eficaz para impedir esse processo, quando comparado ao grupo IV.

Os animais do grupo III apresentaram comportamento similar ao grupo II no que diz respeito ao isolamento da estirpe toxigênica. Em todos eles foi possível realizar o isolamento desta estirpe no dia 4 (um dia após o desafio) e em dois animais esta estirpe permaneceu sendo isolada no dia 5. Assim como ocorreu nos animais do grupo II, este isolamento não coincidiu

com detecção das toxinas por ELISA, indicando que a estirpe toxigênica também não foi capaz de colonizar os animais deste grupo experimental.

No que diz respeito à estirpe NTCD, foi possível realizar o isolamento em todos os animais dos grupos II e III do dia 3 (um dia após a inoculação) até o dia 28 (último dia experimental). A única exceção foi um animal do grupo V no qual não foi possível realizar o isolamento do seu espécime fecal no dia 28. Esses resultados demonstram que a estirpe continua presente no trato gastrointestinal dessa espécie animal mesmo após a recuperação de sua microbiota.

Outros estudos já tinham demonstrado que a estirpe NTCD pode ser isolada por períodos mais longos que o encontrado nesse trabalho, chegando de 36 a 125 dias (Sambol et al., 2002; Nagaro et al., 2013). Com o intuito de avaliar a prevenção de longo prazo conferida pela estirpe NTCD, em um destes estudos foram realizados desafios tardios, entre 41 e 63 dias após a administração de clindamicina (Sambol et al., 2002). Apesar dos desafios de longo prazo não terem levado esses animais a óbito e visto que a recuperação da microbiota é relativamente rápida, a prevenção provavelmente foi causada pela microbiota restaurada, e não necessariamente devido à presença de estirpes NTCD (Kokkotou et al., 2008). Ainda assim, a presença da estirpe NTCD por longos períodos de tempo pode ser interessante para impedir uma recorrência de infecção (Villano et al., 2012). Essa prevenção seria possível, pois em uma futura administração de antimicrobianos a estirpe residente encontraria condições favoráveis para se multiplicar, impedindo a colonização de uma possível estirpe toxigênica.

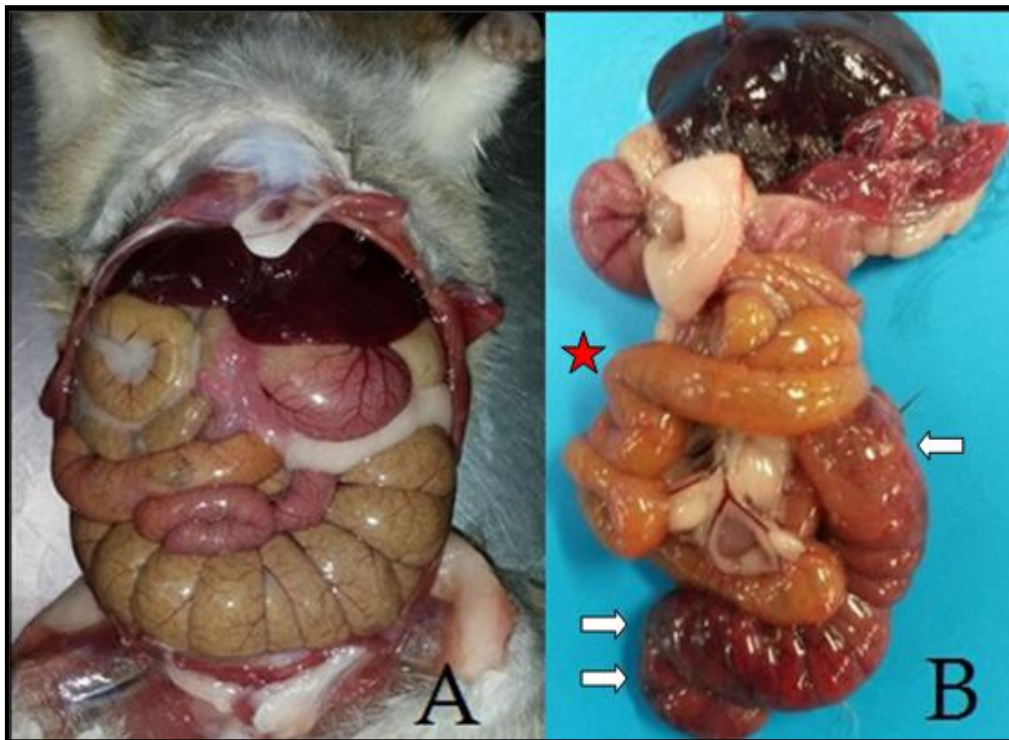
No que diz respeito à produção animal, em específico a suinocultura, a permanência desta estirpe por tempo prolongado no trato gastrointestinal levaria à disseminação da estirpe nas instalações. Com isso, ao longo do tempo, ao invés dos animais se infectarem com as estirpes toxigênicas, eles passariam a ingerir estirpes NTCD, contribuindo para a diminuição da incidência da doença mesmo sem a administração contínua da estirpe NTCD (Songer et al., 2007).

#### 5.3.4. Avaliação das lesões macro e microscópicas após necropsia

Todos os animais foram necropsiados no momento que vieram a óbito ou ao final do experimento, após eutanásia. A figura 8 ilustra algumas diferenças encontradas na necropsia entre os animais eutanasiados ao final do experimento (A) e os animais que vieram a óbito (B).

Em todos os animais os animais que vieram a óbito (pertencentes aos grupos IV e V) foram encontradas lesões similares às apresentadas na figura 8b: cólon hiperêmico, hemorrágico, com aumento da quantidade de gás e conteúdo hemorrágico (setas brancas), sugestivo de tiflíte hemorrágica, lesão geralmente causada por *C. difficile*. Esses resultados são compatíveis com os encontrados pelo modelo experimental padronizado por Silva et al. (2014c).

Os animais que vieram a óbito em até 48h após o desafio toxigênico apresentaram graus mais acentuados de hemorragia e maior acúmulo de gás nos intestinos do que os animais que morreram mais tardiamente. Provavelmente, os animais que vieram a óbito mais rápido apresentaram uma maior depleção da microbiota intestinal, possibilitando uma colonização mais rápida da estirpe toxigênica, grande produção de toxina, refletindo em lesões mais acentuadas (Britton & Young, 2014).



**Figura 8.** Fotografias referentes às necropsias de hamsters (*Mesocricetus auratus*). Órgãos da cavidade abdominal. Em (A) observa-se o aspecto normal dos órgãos em um animal submetido à eutanásia. Em (B) observa-se intestino delgado moderadamente hiperêmico com aumento da quantidade de gás (estrela vermelha) e o cólon intensamente hiperêmico e hemorrágico com aumento da quantidade de gás (setas brancas).

Dentre os 12 animais que vieram a óbito, outras lesões foram encontradas foram: duodeno moderadamente hemorrágico (83,3% dos animais), aumento da quantidade de gás no estômago (58,3%), aumentada quantidade de gás no intestino delgado (50%). Essas lesões não são comumente relatadas nos trabalhos envolvendo desafio com modelos experimentais (Sambol et al., 2002, Nagaro et al., 2013, Silva et al., 2014c). O aumento da produção de gás no intestino é uma característica das bactérias do gênero *Clostridium* (Lobato et al., 2013), logo, uma produção aumentada de gás *ante* ou *post-mortem* em um sítio poderia se dissipar no trato gastrointestinal, levando aos sinais observados. Já no que diz respeito à hemorragia do duodeno, uma possível explicação seria a permanência nesse sítio de receptores funcionais da TcdA, presentes em hamsters jovens (Rolfe & Song, 1993).

Microscopicamente, não foram encontradas lesões nos animais do grupo I (n=6). O cólon dos animais dos grupos II (n=4) e III (n=5) apresentou apenas quantidade aumentada de bacilos no lúmen intestinal sem lesões dignas de nota no epitélio e parede intestinal, o que poderia ser explicado pela permanência da estirpe NTCD no lúmen. Já nos animais dos grupos IV (n=6) e V (n=5) foi possível observar uma intensa congestão e hemorragia difusa na mucosa, além de desprendimento do epitélio e discreto infiltrado inflamatório neutrofílico, sugestivos de tiflíte hemorrágica, comumente observada em animais com ICD (Songer & Anderson, 2006). A associação dos achados macro e microscópicos com o isolamento da estirpe toxigênica de *C. difficile* e a detecção das toxinas TcdA e TcdB por ELISA do conteúdo intestinal de todos os

animais que vieram a óbito confirmam que a reprodução da doença ocorreu de fato como preconizado pelo modelo experimental (Silva et al., 2014c).

### 5.3.5. Comparação da utilização de NTCD com outras estratégias preventiva

A utilização da estirpe NTCD como estratégia preventiva apresenta algumas vantagens quando comparada com outras já utilizadas. Howerton et al. (2013), ao utilizar 50mg/kg de quenodesoxicolato, um sal biliar antagonista da germinação dos esporos de *C. difficile*, concomitantemente ao desafio, conseguiram proteção total em hamsters. Entretanto, a administração do sal não conferiu proteção adequada quando administrado 24 horas antes do desafio, como ocorre na utilização da estirpe NTCD. Somado a isso, o fato dos sais biliares comerciais terem elevados preços de mercado torna a utilização dessa estratégia questionável.

O uso de imunidade passiva como forma preventiva também tem sido avaliada. Babcock et al. (2006) conseguiram proteção bem menor à encontrada no presente estudo, variando de 23 a 74%, frente ao desafio com a toxina 24h após administração de anticorpos em camundongos. Além da proteção apenas parcial conferida pelos anticorpos, os trabalhos ainda não têm uma padronização sobre a dose e a via de administração a serem utilizadas (Mizrahi et al., 2014). A falta de constância na utilização de anticorpos para a prevenção de ICD tem feito com que eles sejam avaliados apenas como uma opção de tratamento (Roberts et al., 2012).

A utilização de imunização ativa contra adesinas, como a Cpw84, também apresentou menor proteção em modelo animal comparado ao uso da estirpe NTCD. Sandolo et al. (2011), após uma imunização em três doses, conseguiram proteção de 40% dos animais frente ao desafio toxigênico. Este estudo deixa claro que a Cpw84 não é a única adesina importante para colonização, o que inviabiliza o uso dessa estratégia de forma isolada.

A imunização contra as toxinas TcdA e TcdB seria a forma mais eficaz de prevenção da doença, uma vez que estimularia uma imunidade duradoura contra o fator desencadeador da doença (Mizrahi et al., 2014). Anosova et al. (2013) conseguiram uma taxa de 91% de proteção em hamsters ao imunizá-los com duas doses intervaladas de duas semanas contendo 5µg de toxóides purificados. Tian et al. (2012) conseguiram proteção total utilizando três doses contendo 100µg de uma quimera com domínios de TcdA e TcdB. Apesar de nenhuma estratégia de imunização ativa ser utilizada comumente em animais domésticos, as recentes pesquisas tem apontado caminhos para tornar essa realidade possível. Entretanto, mesmo com a inserção dessa ferramenta, o uso da estirpe NTCD não seria abolido, uma vez que elas não previnem a colonização do trato gastrointestinal por *C. difficile* (Villano et al., 2012). Em seres humanos internados com risco de adquirir ICD, a estirpe NTCD poderia ser administrada até o paciente passar pelo processo de imunização e produzir seus próprios anticorpos. Já em animais que apresentam a doença nos primeiros dias de vida, como os suínos, caso a mãe não tenha sido vacinada, ou a imunidade passiva não seja capaz de prevenir a doença, pode-se utilizar o recurso da estirpe NTCD.

No que diz respeito ao uso de probióticos, o primeiro estudo a comprovar a eficácia de *Saccharomyces boulardii* contra ICD data de 1984, conseguindo reduzir em 29% a taxa de mortalidade de hamsters pré-tratados com clindamicina (Toothaker & Elmer, 1984). Em outro estudo envolvendo experimentação em camundongos, a taxa de proteção chegou a 56% (Corthier et al., 1986). Atualmente, sabe-se que, além da produção de uma proteína capaz de impedir a



ligação da TcdA aos seus receptores, *S. boulardii* possui algumas importantes propriedades imunostimulatórias, como a redução da produção de agentes pró-inflamatórios (Chen et al., 2006). Apesar dos constantes avanços a respeito das propriedades de *S. boulardii*, a proteção conferida por essa estratégia preventiva em modelos animais nunca foi total. Além disso, um recente relato de fungemia por esse microrganismo em uma paciente que estava recebendo este probiótico devido a suspeita de diarreia por *C. difficile* tem aumentado o receio dos profissionais de saúde quanto ao uso desta estratégia preventiva (Thygesen et al., 2012).

Diversos outros microrganismos tem sido testados como possíveis probióticos para a prevenção de ICD, alguns deles apresentando resultados bastante satisfatórios, como pode ser observado na revisão sobre o tema publicada por Fitzpatrick (2013). Ainda assim, o uso de probióticos pressupõe a administração constante ou em diversas doses do microrganismo em questão. Só assim ele é capaz de conferir efeitos benéficos ao organismo, protegendo o indivíduo de uma possível infecção (Sanders, 2008). Considerando os sistemas de produção animal, em especial a suinocultura, a administração diária de um produto (frequência sugerida para o uso de um probiótico) causaria grandes transtornos no manejo dos animais, dificultando ou até impossibilitando o uso de tal estratégia. Além disso, a administração precoce do produto é essencial no caso específico da suinocultura devido às características da doença nessa espécie (Songer & Anderson, 2006), o que faz com que a utilização da estirpe NTCD, quando comparada aos probióticos, seja mais vantajosa, por fornecer uma proteção mais duradoura e mais facilmente aplicável (Sambol et al., 2002).

Apesar de ainda haver receio de alguns pesquisadores e profissionais de saúde quanto ao uso de estirpes NTCD para a prevenção devido a um ainda não provado risco de reversão de virulência, os estudos em relação a essa estratégia têm avançado em modelos animais (Nagaro et al., 2013) e humanos (Villano et al., 2012). As próximas etapas deste trabalho visam o teste das estirpes NTCD em animais de produção, em especial suínos.

## 6. CONCLUSÕES

Dentre as cinco estirpes caracterizadas, a estirpe C1 (ribotipo 009) foi selecionada para as etapas seguintes por possuir alta produção de esporos *in vitro* e apresentar um bom perfil de resistência a antimicrobianos.

Os métodos de contagem em placas (CP) e câmara de Neubauer (CN) apresentaram alta correlação, podendo ser usados para a contagem de esporos liofilizados. A temperatura próxima a ambiente (20°C) foi a mais adequada para conservação da amostra, de forma que, estocada nessas condições a estirpe teria um tempo mínimo de prateleira de 23 meses.

Por fim, a estirpe NTCD selecionada foi eficaz na prevenção de ICD em hamsters, sendo capaz de prevenir 100% dos animais, os quais não apresentaram nenhum sinal característico da doença. Tais resultados abrem o caminho para o teste desta estratégia em espécies de produção, como suínos, ampliando os campos de pesquisa aplicados à sanidade animal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERBERTH, I; HUANG, H.; LINDBERG, E. et al. Toxin-Producing *Clostridium difficile* strains as long-term gut colonizers in healthy infants. *J Clin Microbiol.*, v.52, n.1, p.173-179, 2014.

AL-HINAI, M. A.; JONES, S. W.; PAPOUTSAKIS, E. T.  $\sigma^K$  of *Clostridium acetobutylicum* is the first known sporulation-specific sigma factor with two developmentally separated roles, one early and one late in sporulation. *J Bacteriol.*, v.196, p.287-299, 2014.

ANOSOVA, N. G.; BROWN, A. M.; LI, L. et al. Systemic antibody responses induced by a two-component *Clostridium difficile* toxoid vaccine protect against *C. difficile*-associated disease in hamsters. *J Med Microbiol.*, v.62, n.9, p.1394-1404, 2013.

ARRUDA, P. H. E.; MADSON, D. M.; RAMIREZ, A. et al. Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe.*, v.22, p.104-110, 2013.

BABAN, S. T.; KUEHNE, S. A.; BARKETI-KLAI, A. et al. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLOS ONE.*, v.8, n.9, p.1-12, 2013.

BABCOCK, G. J.; BROERING, T. J.; HERNANDEZ, H. J. et al. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infect Immun.*, v.74, n.11, p.6339-6347, 2006.

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

BANO, L.; BUSANI, L.; COCCHI, M. et al. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from rabbits and detection of its main toxins. In: 9<sup>TH</sup> WORLD RABBIT CONGRESS, 2008, Verona, Itália. *Pathology and hygiene*. Verona, 2008, p.911-914.

BARKETI-KLAI, A.; HOYS, S.; LAMBERT-BORDES, S et al. Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *J Med Microbiol.*, v.60, p.1155-1161, 2011.

BARKETI-KLAI, A.; MONOT, M.; HOYS, S. et al. The flagellin FliC of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during *in vivo* infection. *PLOS ONE.*, v.9, n.5, 2014.

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

- BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J.*, v.35, n.5, p.465-471, 2003.
- BERRY, A. P.; LEVETT, P. N. Chronic diarrhea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *Vet Rec.*, v.118, p.102-103, 1986.
- BERRY, N.; SEWELL, B.; JAFRI, S. et al. Real-time polymerase chain reaction correlates well with clinical diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.*, v.87, n.2, p.109-114, 2014.
- BIDET, P.; BARBUT, F.; BURGHOFFER, B. et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett.*, v.175, n.2, p.261-266, 1999.
- BLODGETT, R. Most probable number from serial dilutions. In: HAMMACK, T.; DAVIDSON, M.; FENG, P. et al. Bacteriological Analytical Manual (BAM). 4. ed. U. S. Food and Drug Administration, 2014 (última atualização). Disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tab1>, Acesso em 15 abr. 2014.
- BOJESEN, A. M.; OLSEN, K. E.; BERTELSEN, M. F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephans maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol.*, v.116, n.4, p.329-335, 2006.
- BORRIELLO, S. P.; BARCLAY, F. E. Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonization with non-pathogenic strains. *J Med. Microbiol.*, v.19, p.339-350, 1985.
- BORRIELLO, S. P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.*, v.41, p.13-19, 1998.
- BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Role of intestinal microbiota in resistance colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterol.*, v.146, p.1547-1553, 2014.
- CALABI, E.; WARD, B.; WREN, B et al. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol.*; v.40, n.5, p.1187-1199, 2001.
- CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol.*; n.65, p.501-521, 2011.
- CARTER, G. P.; ROOD, J. I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease. *Gut Microbes.*, v.1, n.1, p.58-64, 2010.
- CHAPMAN, A. M. Acute diarrhea in hospitalized horses. The veterinary clinics of North America. *Equine Pract.*, v.25, p.363-380, 2009.

CHARLEBOIS, A.; JALBERT, L.; HAREL, J. et al. Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *Plos One*.v.7, n.9, p.1-9, 2012.

CHEN, X.; KOKKOTOU, E. G.; MUSTAFA, N. et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J Biol Chem.*, v.281, p.24449-24454, 2006.

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

CLOOTEN. J.; KRUTH, S.; ARROYO, L. et al. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet Microbiol.*, v.129, p.209-214, 2008.

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

COCHRAN, W. G. Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number". *Biometrics.*, v.6, n.2, p.105-116, 1950.

COELHO-BARROS, E. A.; SIMÕES, P. A.; ACHCAR, J. A. et al. Métodos de estimação em regressão linear múltipla: aplicação a dados clínicos. *Rev Colomb Estad.*, v.31, n.1, p.11-129, 2008.

COHEN, S. H.; GERDING, D, N.; JOHNSON, S. et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol.*, v.31, n.5, 2010.

CORTHER, G.; DUBOS, F.; DUCLUZEAU, R. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol.*, v.32, n.11, p.894-896, 1986.

CRUZ JUNIOR, E. C.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O. S. et al. Levantamento dos enteropatógenos de leitões do nascimento a sete dias de idade no Brasil. *Pesq Vet Bras.*, v.33, n.8, p.963-969, 2013.

DIAB, S. S.; SONGER, G.; UZAL, F. A. *Clostridium difficile* infection in horses: A review. *Vet Microbiol.*, v.167, p.42-49, 2013.

DINGLE T. C.; MULVEY G. L.; ARMSTRONG G. D. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun.*, v.79, p.4061-4067, 2011.

DAPA, T.; LEUZZI, R.; NG, Y. K. et al. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol.*, v.195, n.3, p.545-555, 2013.

EGLOW, R.; POTHOUKAKIS, C.; ITZKOWITZ, S. et al. Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest.*, v.90, p.822-829, 1992.

ESCOBAR-CORTÉS, K.; BARRA-CARRASCO, J.; PAREDES SABJA, D. Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. *J Microbiol Methods.*, v.93, p.25-31, 2013.

FILHO, D. B. F.; JUNIOR, J. A. S. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r)\*. *Rev Polit Hoje.*, v.18, n.1, 2009.

FINNEY, J. M. T. Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Johns Hopkins Med J.*, v.4, p.53-55, 1983. Citado por: WORSLEY, M. A. Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.*, v.41, p.59-66, 1998.

FITZPATRICK, L. R.; SMALL, J. S.; GREENE, W. H. et al. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 limits the recurrence of *Clostridium difficile*-Induced colitis following vancomycin withdrawal in mice. *Gut Pathog.*, v.4, n.1, p.13, 2012.

FITZPATRICK, L. R. Probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* associated disease. *World J Gastrointest Pathophysiol.*, v.4, n.3, p.47-52, 2013.

FOGLIA, G.; SHAH, S.; LUXEMBURGUER, C. et al. *Clostridium difficile*: Development of a novel candidate vaccine. *Vaccine.*, v.30, p.4307-4309, 2012.

FREEMAN, J.; WILCOX, M. H. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *J Clin Pathol.*, v.56, p.126-128, 2003.

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

GEORGE, W. L.; SUTTER, V. L.; CITRON, D. et al. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.9, n.2, p.214-219, 1979.

GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; RUPNIK, M. et al. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes.*, v.5, n.1, p.15-17, 2014.

GITAITIS, R. D. Refinement of lyophilization methodology for storage of large number of bacterial strains. *Plant dis.*, v.71, p.615-616, 1987.

GOLDENBERG, S. D.; CLIFF, P. R.; SMITH, S. et al. Two-step glutamate dehydrogenase antigen real-time polymerase chain reaction assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect.*, v.74, n.1, p.48-54, 2010.

GONÇALVES, C.; DECREÉ, D.; BARBUT, F et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.5, p.1933-1934, 2004.

GOVIND, R.; DUPUY, B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holing-like protein TcdE. *PLoS Pathogen.*, v.8, n.6, p.1-14, 2012.

GURWITH, M. J.; RABIN, H. R.; LOVE, K. Diarrhea associated with clindamycin and ampicillin therapy: preliminary results of a cooperative study. *J Infect Dis.*, v.135, p.104-110, 1977.

HALL I. C.; O'TOOLE E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child.*, v.49, p.390-402, 1935. Citado por: BARTLETT, J.G. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clin Infect Dis.*, v.46, p.4-11, 2008.

HAMOUDA, T.; SHIH, A. Y.; BAKER, J. R. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Lett Appl Microbiol.*, v.34, n.2, p.86-90, 2002.

HASAN, J. A.; JAPAL, K. M.; CHRISTENSEN, E. R. et al. In vitro production of *Clostridium difficile* spores for use in the efficacy evaluation of disinfectants: a precollaborative investigation. *JAOC Int.*, v.94, n.1, p.259-272, 2011.

HENNEQUIN, C.; PORCHERAY, F.; WALIGORA-DUPRIET, A et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology.*, v.147, p.87-96, 2001.

HENNEQUIN, C.; JANOIR, C.; BARC, M. et al. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology.*, v.149, p.2779-2787, 2003.

HERNÁNDEZ-ROCHA, C.; BARRA-CARRASCO, J.; PIZARRO-GUAJARDO, M. et al. Epidemic *Clostridium difficile* ribotype 027 in Chile. *Emerg Infect Dis.*, v.18, n.8, p.1370-1372, 2012.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1977, p.1-56.

HONDA, H.; DUBBERKE, E. R. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Gastroenterol.*, v.30, n.1, p. 54-62, 2014.

HOKMAN, P., BARKIN, J. S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol.*, v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.

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

- HOREJSH, D.; KAMPF, G. Efficacy of three surface disinfectants against spores of *Clostridium difficile* ribotype 027. *Int J Hyg Environ Health.*, v.214, n.2, p.172-174, 2011.
- HOWERTON, A.; PATRA, M.; ABEL-SANTOS, E. A new strategy for the prevention of *Clostridium difficile* infection. *J Infect Dis.*, v.207, n.10, p.1498-1504, 2013.
- HUANG, H.; WEINTRAUB, A.; FANG, H. et al. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe.*, v.16, p.633-635, 2010.
- HUNT, J. J.; BALLARD, J. D. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v.77, n.4, p.567-581, 2013.
- IMADE, G. E.; TOWOBOLA, O. A.; SAGAY, A. S. et al. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. *Arch Androl.*, v.31, n.1, p.17-22, 1993.
- INDRA, A.; SCHMID, D.; HUHULESCU, S. et al. Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006-2007. *J Med Microbiol.*, v.57, n.6, p.702-708, 2008.
- JANEZIC, S.; OCEPEK, M.; ZIDARIC, V. et al. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiol.*, v.12, p.48-55, 2012.
- JANOIR, C.; PÉCHINÉ, S.; GROSDIDIER, C. et al. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol.*, v.189, n.20, p.7174-7180, 2007.
- KAUR, S.; VAISHNAVI, C.; PRASAD, K. K. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* & epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Res.*, v.133, p.434-441, 2011.
- KEEL, M. K.; SONGER, J. G. The comparative pathology of *Clostridium difficile* associated disease. *Vet Pathol.*, v.43, n.3, p.225-240, 2006.
- KEEL, M. K.; BRAZIER, J. S.; POST, K. W. et al. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* from pigs, calves and other species. *J Clin Microbiol.*, v.45, n.6, p.1963-1964, 2007.
- KEEL, M. K.; SONGER, J. G. Density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs. *Vet Pathol.*, v.44, p.814-822, 2007.
- KEESSEN, E. C.; GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A. *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet Microbiol.*, v.153, p.205-217, 2011a.

KEESSEN, E. C.; HOPMAN, N. E.; VAN LEENGOED, L. A. et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n.5, p.1816-1821, 2011b.

KILLGORE, G.; THOMPSON, A.; JOHNSON, S. et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol.*, v.46, n.2, p.431-437, 2008.

KIM, P. H.; IACONIS, J. P.; ROLFE, R. D. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocectitis and transfer of protection to infant hamsters. *Infect Immun.*, v.55, n.12, p.2984-2992, 1987.

KOENE, M. G. J.; MEVIUS, D.; WAGENAAR, J. A. et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect.*, v.18, p.778-784, 2012.

KOKKOTOU, E.; MOSS, A. C.; MICHOS, A. et al. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.52, n.3, p.1121-1126, 2008.

KONDEPUDI, K. K.; AMBALAM, P.; KARAGIN, P. H. et al. A novel multi-strain probiotic and synbiotic supplement for prevention of *Clostridium difficile* infection in a murine model. *Microbiol Immunol.*, v.175, n.2, p.261-266, 2014.

KUEHNE, S. A., COLLERY, M. M.; KELLY, M. L. et al. The importance of toxin A, toxin B and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *J Infect Dis.*, v.209, n.1, p.83-86, 2014.

KUIJPER, E. J.; OUDBIER, J. H.; STUIFBERGEN, W. N. H. M. et al. Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *J Clin Microbiol.*, v.25, n.4, 1987.

KYNE, L.; WARNY, M.; QAMAR, A. et al. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med.*, v.342, p.390-397, 2000.

LANIS, J. M.; HEINLEN, L. D.; JAMES, J. A. et al. *Clostridium difficile* 027/BI/NAP1 encodes a hypertoxic and antigenically variable form of TcdB. *PLoS Pathog.*, v.9, n.8, p.1-11, 2013.

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

LAWLEY, T. D.; CLARE, S.; DEAKIN, L. J. et al. Use of a purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. *Appl. Environ Microbiol.*, v.76, n.20, p.6895-6900, 2010.



- LEMEE, L.; DHALLUIN, A.; TESTELIN, S. et al. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.12, p.5710-5714, 2004.
- LENNETTE, E. H.; SCHMIDT, N. J. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection*. 5. ed. Washington: American Public Health Association, 1979. 1138p.
- LIPPKE, R. T.; BOROWSKI, S. M.; MARQUES, S. M. T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesq Vet Bras.*, v.6, n.31, p.505-510, 2011.
- LISTER, M.; STEVENSON, E.; HEEG, D. et al. Comparison of culture based methods for the isolation of *Clostridium difficile* from stool samples in a research setting. *Anaerobe.*, v.28, p.226-229, 2014.
- LOBATO, F. C. F.; DIAS, L. D.; SALVARANI, F. M. et al. Avaliação da potência de vacinas de *Clostridium septicum* comercializadas no Brasil. *Arq Inst Biol.*, v.75, n.2, p.225-228, 2008.
- LOBATO F. C. F.; SALVARANI, F. M.; GONÇALVES, L. A. et al. Clostridioses dos animais de produção. *Vet Zootec.*, v.20, p.29-48, 2013.
- LYERLY, D. M.; BOSTWICK, E. F.; BINION, S. B. et al. Passive immunization of hamsters against disease caused by *Clostridium difficile* by use of bovine immunoglobulin G concentrate. *Infect Immun.*, v.59, n.6, p.2215-2218, 1991.
- LYRAS, D.; O'CONNOR, J.; HOWARTH, P. M. et al. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature.*, v.458, p.1176-1179, 2009.
- MACLEOD-GLOVER, N.; SADOWSKI, C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Can Fam Physician.*, v.56, n.5, p. 417-423, 2010.
- MAH, J. H.; KANG, D. H.; TANG, J. Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperatures. *J Food Sci.*, v.74, n.1, p.M23-M27, 2009.
- MARCEL, A. M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ, S. S. et al. Aplicación de um método alternativo al conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Trichomonas vaginalis*. *Rev Cubana Med Trop.*, v.53, n.3, p.180-188, 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, p.533-540, 2002.
- MARLER, L. M.; SIDERS, J. A.; WOLTERS, L. C. et al. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J Clin Microbiol.*, v.30, p.514-516, 1992.

- MARTINS, A. M. C. R. P. F.; LEME, M. C. M.; HIPOLITO, M. et al. Descrição de um caso de enterocolite pseudomembranosa em bovino. *Arq Inst Biol.*, v.68, n.1, p.119-121, 2001.
- MARTINS, F. S.; NARDI, R. M.; ARANTES, R. M. et al. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J Gen Appl Microbiol.*, v.51, n.2, p.83-92, 2005.
- MATAMOUROS S.; ENGLAND P.; DUPUY B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol.*, v.64, p.1274-1288, 2007.
- MCVAY, C. S.; ROLFE, R. D. *In vitro* and *in vivo* activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.44, p.2254-2258, 2000.
- MEDINA-TORRES, C. E.; WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins in feces of horses with acute diarrhea. *J Vet Intern Med.*, v.24, n.3, p.628-32, 2010.
- MILOŠEVIĆ, M. B.; MEDIĆ-PAP, S. S.; IGNJATOV, M. V. Lyophilization as a method for pathogens long term preservation. *Proc Nat Sci.*, v.113, p.203-210, 2007.
- MIZRAHI, A.; COLLIGNON, A.; PÉCHINÉ S. Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: State of the art. *Anaerobe.*, v.30, p.210-219, 2014.
- MOORE, L. S. P.; DONALDSON, H. Investigating *Clostridium difficile*. *Brit J Hosp Med.*, v.74, n.10, 146-149, 2013.
- NAGARO, K. J.; PHILLIPS, S. T.; CHEKNIS, A. K. et al. Nontoxicogenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.57, n.11, p. 5266-5270, 2013.
- NISHIMURA, S.; KOU, T.; KATO, H. et al. Fulminant pseudomembranous colitis caused by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in a healthy young woman in Japan. *J Infect Chemother.*, v.20, n.11, p.749-731, 2014.
- NOVIK, G.; SIDARENKA, A.; RAKHUBA, D. et al. Cryopreservation of *Bifidobacteria* and bacteriophages in Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. *J Culture Collections.*, v.6, p.76-84, 2009.
- OLDIFIELD IV, E. C.; OLDIFIELD III, E. C.; JOHNSON, D. A. Clinical update for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.*, v.5, n.1, p.1-26, 2014.
- OCHSNER, U. A.; BELL, S. J.; O'LEARY, A. L. et al. Inhibitory effect of REP3123 on toxin and spore formation in *Clostridium difficile*, and *in vivo* efficacy in a hamster gastrointestinal infection model. *J Antimicrob Chemother.*, v.63, n.5, p.964-971, 2009.

- PAREDES-SABJA, D.; COFRE-ARANEDA, G.; BRITO-SILVA, C. et al. *Clostridium difficile* spore-macrophage interactions: spore survival. *Plos One.*, v.7, n.8, p.1-14, 2012.
- PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination and spores structural proteins. *Trends Microbiol.*, v.22, n.7, p. 406-416, 2014.
- PEREIRA, F. C.; SAUJET, L.; TOMÉ, A. R. et al. The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*. *PLOS Genet.*, v.9, n.10, p.1-19, 2013.
- PERMPOONPATTANA, P.; HONG, H. A.; PHETCHARABURANIN, J. et al. Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun.*, v.79, n.6, p.2295-2302, 2011.
- 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.
- PIRŠ, T.; AVBERŠEK, J.; ZDOVC, I. et al. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. *J Med Microbiol.*, v.62, n.9, p.1478-1485, 2013.
- PLANCHE T.; AGHAIZU A.; HOLLIMAN, R. et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* v.8, n.12, p.777-784, 2008.
- POKRYWKA, M.; FEIGEL, J.; DOUGLAS, B. et al. A bundle strategy including patient hand hygiene to decrease *Clostridium difficile* infections. *Medsurg Nurs.*, v.23, n.3, p.145-148, 2014.
- POST, K. W.; JOST, B. H.; SONGER, J. G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest.*, v.14, n.3, p.258-259, 2002.
- PRÉVOT, A. R. Études de systématique bactérienne. IV. Critique de la conception actuelle du genre *Clostridium*. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, v.61, p.72-91, 1938. Citado por: CATO, E. P.; HASH, D. E.; HOLDEMAN, L. V. et al. Electrophoretic Study of *Clostridium* species. *J Clin Microbiol.*, v.15, n.4, p.668-702, 1982.
- PRUITT, R. N.; CHUMBLER, N. M.; RUTHERFORD, S. A. et al. Structural determinants of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity. *J Biol Chem.*, v.287, p.8013-8020, 2012.
- ROBERTS, A.; MCGLASHAN, J.; AL-ABDULLA, I. et al. Development and evaluation of an ovine antibody-based platform for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Infect Immun.*, v.80, n.2, p.875-882, 2012.

- RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; LEJEUNE, J.T. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol.*, v.77, n.9, p.3085-3091, 2011.
- ROLFE, R. D.; SONG, W. Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters. *Clin Infect Dis.*, v.16, n.4, p.219-227, 1993.
- ROMANO, V.; PASQUALE, V.; KROVACEK, K. et al. Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes from wastewater treatment plants in southern Switzerland. *Appl Environ Microbiol Applied.*, v.78, n.18, p.6643-6646, 2012.
- RUPNIK, M.; DUPUY, B.; FAIRWEATHER, N. F. et al. revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol.*, v.54, p.113-117, 2005.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; DALE, N. G. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.*, v.7, p.526-536, 2009.
- SAMBOL, S. P.; MERRIGAN, M. M.; TANG, J. K. et al. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *J Infect Dis.*, v.186, p.1781-1789, 2002.
- SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis.*, v.46, n.2, p.58-61, 2008.
- SANDOLO, C.; PÉCHINÉ, S.; LE MONNIER, A. et al. Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*. *Eur J Pharm Biopharm.*, v.79, n.3, p.566-573, 2011.
- SANTINO, I.; ALARI, A.; BONO, S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia, a possible consequence of the treatment of *Clostridium difficile* colitis with a probioticum. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, v.27, n.1, p.143-146, 2014.
- SCHNEEBERG, A.; NEUBAUER, H.; SCHMOOCK, G. et al. *Clostridium difficile* genotypes in piglet population in Germany. *J Clin Microbiol.*, v.51, n.11, p.3796-3803, 2013.
- SCHUTZE, G. E.; WILLOUGHBY, R. E.; COMMITTEE OF INFECTIOUS DISEASES et al. *Clostridium difficile* infections in infants and children. *Pediatrics.*, v.131, n.1, p.196-200, 2013.
- SCHWAN, C.; KRUPPKE, A.S.; NÖLKE, T. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic increase pathogen adherence. *PNAS.*, v.11, n.6, p.2313-2318, 2014.
- SIDDIQUI, F.; O'CONNOR, J. R.; NAGARO, K. et al. Vaccination with parenteral toxoid B protects hamsters against lethal challenge with toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* but does not prevent colonization. *J Infect Dis.*, v.205, n.1, p.128-133, 2012.
- SILVA, P. F. N.; BALARIN, M. R.; MARUCHI, H. P. et al. Correlação entre o hemocítômetro e outras técnicas de rotina para a contagem de número de plaquetas de cães atendidos no

Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (H.V.-UEL). *Semin Cienc Agrar.*, v.28, n.4, p.659-664, 2007.

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

SILVA, R. O. S.; RIBEIRO, M. G.; PALHARES, M. S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet J.*, v.45, n.6, p.671-675, 2013a.

SILVA, R. O. S.; SANTOS, R. L. R.; PIRES, P. S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Microbiol.*, v. 44, n.1, p.133-137, 2013b.

SILVA, R. O.; DELIA, M. L.; DE MAGALHÃES SOARES, D. F. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe.*, v.20, p.82-84, 2013c.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. C.; SILVA, M. X. et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enteritis in piglets. *J Swine Health Prod.*, v.21, n.6, p.300-303, 2013d.

SILVA, R. O. S.; NEVES, M. S.; VILELA, E. G. et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.47, p.447-450, 2014a.

SILVA, R. O. S.; NEVES, M. S.; RIBEIRO, M. G. et al. Evaluation of three enzyme immunoassays for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals. *J Equine Vet Sci.*, v.34, n.8, p.1032-1035, 2014b.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. C.; GABARDO, M. P. et al. Padronização de um modelo de infecção de *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*. *Cienc rural.*, v.44, n.8, p.1415-1421, 2014c.

SILVA, R. O.; RIBEIRO DE ALMEIDA, L.; JUNIOR, C. A. et al. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe.*, v.30C, p.99-101, 2014d.

SILVA, R. O.; DELIA, M. L.; TOSTES TEIXEIRA, E. P. et al. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe.*, v.28, p.207-211, 2014e.

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

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol.*, v.30, p.225-420, 1980.

SLAVIĆ, Đ.; BOERLIN, P.; FABRI, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res.*, v.75, n.2, p.89-97, 2011.

SONGER J. G.; POST, K. W; LARSON, D. J. et al. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health Prod.*, v.8, p.185-189, 2000.

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, p.358-361, 2007.

SORG, J. A.; SONENSHEIN, A. L. Bile salts and glycine as co-germinants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol.*, v.190, p.2505-2512, 2008.

SORG, J. A; SONENSHEIN, A. L. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol.*, v.191, p.1115-1117, 2009.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTINI, F.; MASTRANTONIO, P. Detection of a genetic linkage between genes coding for resistance to tetracycline and erythromycin in *Clostridium difficile*. *Microb Drug Resist.*, v.13, n.2, p.90-95, 2007.

STUBBS, S. L. J.; BRAZIER, J. S.; O'NEILL, G. et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol.*, v.37, n.2, p.461-463, 1999.

TASTEYRE A.; KARJALAINEN T.; AVESANI V. et al. Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol.*, v.39, p.1178-1183, 2001.

TENOVER, F. C.; ÅKERLUND, T.; GERDING, D. N. et al. Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America. *J Clin Microbiol.*, v.49, n.5, p.1831-1837, 2011.

THYGESEN, J. B.; GLERUP, H.; TARP, B. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probiotic. *BMJ Case Rep.*, doi: 10.1136/bcr.06.2011.4412, 2012.

TIAN, J. H.; FUHRMANN, S. R.; KLUEPFEL-STAHN, S. et al. A novel fusion protein containing the receptor binding domains of *C. difficile* toxin A and toxin B elicits protective immunity against lethal toxin and spore challenge in preclinical efficacy models. *Vaccine.*, v.30, n.28, p.4249-4258, 2012.

- TOOTHAKER, R. D.; ELMER, G. W. Prevention of clindamycin induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.26, p.552-556, 1984.
- TUCKER, K. D.; WILKINS, T. D. Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect Immun.*, v.59, p.73-78, 1991.
- URBÁN, E.; BRAZIER, J. S.; SÓKI, J. et al. PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. *J Med Microbiol.*, v.50, p.1082-1086, 2001.
- VILLANO, S. A.; SEIBERLING, M.; TATAROWICZ, W. et al. Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrob Agents and Chemother.*, v.56, n.10, p.5224-5229, 2012.
- VOHRA, P.; POXTON, I. R. Efficacy of decontaminants and disinfectants against *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.*, v.60, n.8, p.1218-1224, 2011.
- VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol.*, v.18, n.2, p.247-263, 2005.
- WALIGORA, A.; HENNEQUIN, C.; MULLANY, P. et al. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun.*, v.69, n.4, 2001.
- WALK, S. T.; MICIC, D.; JAIN, R. et al. *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clin Infect Dis.*, v.55, n.12, p.1661-1668, 2012.
- WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest.*, v.12, n.4, p.332-336, 2000.
- WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. et al. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med.*, v.15, p.374-378, 2001a.
- WEESE, J. S.; WEESE, H. E.; BOURDEAU, T. L. et al. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *J Am Vet Med Assoc.*, v.218, n.9, p.1436-1439, 2001b.
- WEESE, J. S.; ARMSTRONG, J. Outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a small animal veterinary teaching hospital. *J Vet Int Med.*, v.17, p.813-816, 2003.
- WEESE, J. S.; WAKEFORD, T.; REID-SMITH, R. et al. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe.*, v.16, p.501-504, 2010.
- WETTERWIK, K.; TROWALD-WIGH, G.; FERNSTRÖM, L. et al. *Clostridium difficile* in faeces from healthy dogs and dogs with diarrhea. *Acta Vet Scand.*, v.55, p.23-26, 2013.

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

YANG, W. W.; CROW-WILLARD, E. N.; PONCE, A. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *J Appl Microbiol.*, v.106, p.27-33, 2009.

## 8. ANEXOS

Artigos publicados durante o período do mestrado:

LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; GONÇALVES, L. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R. O. S.; ALVES, G. G.; NEVES, M. S.; **OLIVEIRA JÚNIOR, C. A.**; PEREIRA, P. L. L. Clostridioses dos animais de produção. *Vet Zootec.*, v.20, p.29-48, 2013.

SILVA, R. O. S.; **OLIVEIRA JUNIOR, C. A.**; COSTA, A. T. R.; DINIZ, A. N.; NEVES, M. S.; LOBATO, F. C. F. An outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets in Brazil. *Semin-Ciênc Agrar.*, v.34, p. 923, 2013.

SILVA, R. O. S.; FERREIRA JUNIOR, F. C.; MARQUES, M. V. R.; **OLIVEIRA JUNIOR, C. A.**; MARTINS, N. R. S.; LOBATO, F. C. F. Genotyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from Tinamidae, Cracidae and Ramphastidae species in Brazil. *Ciênc Rural.* v.44, p.486-491, 2014.

SILVA, R. O. S.; **OLIVEIRA JUNIOR, C. A.**; DINIZ, A. N.; ALVES, G. G.; GUEDES, R. M. C.; VILELA, E. G.; LOBATO, F. C. F. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from animals and humans in Brazil. *Ciênc Rural.*, v.44, p.841-846, 2014.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. C.; GABARDO, M. P.; **OLIVEIRA JUNIOR, C. A.**; SALVARANI, F. M.; PIRES, P. S.; ALVES, G. G.; LOBATO, LOBATO, F. C. F. Padronização de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*. *Ciênc Rural.*, v.44, p.1415-1421, 2014.

SILVA, R. O. S.; TOSTES TEIXEIRA, E. P.; PEREIRA, P. L.; DE MAGALHÃES SOARES, D. F.; CAVALCANTI, Á. R.; KOCUVAN, A.; RUPNIK, M.; **OLIVEIRA JÚNIOR, C. A.**; LOBATO, F. C. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe.*, v.28, p.207-211, 2014.

SILVA, R. O. S.; RIBEIRO DE ALMEIDA, L.; **OLIVEIRA JUNIOR, C. A.**; DE MAGALHÃES SOARES, D. F.; PEREIRA, P. L. L.; RUPNIK, M.; LOBATO, F. C. F. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe.*, v.30, p.99-101, 2014.