

Amanda Nadia Diniz

***Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* em
relação a outros enteropatógenos em cães diarreicos**

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

Coorientador: Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

UFMG – Escola de Veterinária

Belo Horizonte

2016

D585c Diniz, Amanda Nadia, 1990-
Clostridium perfringens e *Clostridium difficile* em relação a outros enteropatógenos em
cães diarreicos / Amanda Nadia Diniz. – 2016.
71 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Coorientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Diarreia em animais – Teses. 3. *Clostridium perfringens* –
Teses. 4. *Clostridium difficile* – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Silva, Rodrigo
Otávio Silveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

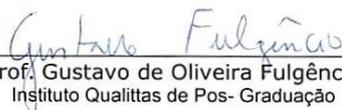
AMANDA NADIA DINIZ

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 26 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente - Orientador



Prof. Gustavo de Oliveira Fulgêncio
Instituto Qualittas de Pos- Graduação



Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva
Pós - Doutorado - EV-UFMG

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho
Aos meus pais, aos meus irmãos,
À avó Geralda e
Aos animais.**

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pelas infinitas oportunidades de crescimento e aprendizado.
À minha mãe, Marta, pelo apoio e pelo amor incondicional.
Ao meu pai, Antônio Carlos, pelo exemplo e incentivo.
Aos meus irmãos, Carol e Junior, pela amizade e pelo companheirismo.
À tia Natália, pelos momentos de descontração e bons conselhos.
Ao meu namorado, Guilherme, pela cumplicidade, amor e carinho.
Ao meu orientador, Prof. Francisco Lobato, pelos aprendizados pessoais e profissionais.
Ao Rodrigo, amigo e coorientador exemplar, essencial para a realização desta conquista.
Ao Carlos, amigo da vida, presente em todos os momentos e que tornou meus dias no laboratório mais divertidos e serenos.
Aos amigos Alex, Luciana, Isabela, Aila, Filipe, Fabíola, Juliana, Vanessa, Joana, Augusto, João Pedro Pataxó e Matheus pela torcida e pelas risadas.
Aos alunos Ana Carolina, Laura, Izabella, Luciana e Marcos pelas ajudas, apesar dos afazeres da graduação e pela convivência agradável.
A todos que passaram pelo Laboratório de Anaeróbios nos últimos quatro anos, que tiveram participação nesta conquista.
À clínica Vether e ao Hospital da Escola de Veterinária da UFMG pelo apoio e obtenção das amostras.
À Ecodiagnóstica pelo fornecimento dos testes imunocromatográficos.
Às instituições de fomento de fomento PRPq - UFMG, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por viabilizar financeiramente a realização do experimento.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Diarreia em cães	15
3.2 <i>Clostridium perfringens</i>	16
3.2.1 O agente: breve introdução	16
3.2.2 A doença em cães	17
3.2.3 Diagnóstico	19
3.2.4 Tratamento e Controle	21
3.3 <i>Clostridium difficile</i>	21
3.3.1 Histórico do microrganismo	21
3.3.2 O agente	22
3.3.3 Patogenia	22
3.3.4 A doença em cães	24
3.3.5 Diagnóstico	25
3.3.6 Ribotipagem	27
3.3.7 Controle e Tratamento	29
3.4. Outros enteropatógenos de importância em cães	30
3.4.1 <i>Salmonella spp.</i>	30
3.4.2 <i>Escherichia coli</i>	31
3.4.3 Parvovirus canino	32
3.4.4 Coronavírus canino	34
3.4.5 Rotavírus	35
3.4.6 <i>Giardia intestinalis</i>	35

4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Local de Realização do Experimento	36
4.2 Material fecal de cães	36
4.3 <i>Clostridium perfringens</i>	37
4.3.1 Isolamento	37
4.3.2 Genotipagem e detecção de fatores de virulência adicionais por PCR	38
4.3.3 Pesquisa de enterotoxina	39
4.4 <i>Clostridium difficile</i>	39
4.4.1 Isolamento	39
4.4.2 Confirmação da identidade dos isolados de <i>C. difficile</i> e detecção de fatores de virulência por PCR	39
4.4.3 Ribotipagem	40
4.4.4 Pesquisa das toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>	40
4.5 <i>Salmonella</i> spp.	41
4.5.1 Isolamento	41
4.6 <i>Escherichia coli</i>	41
4.6.1 Isolamento	41
4.6.2 Detecção de fatores de virulência por PCR	41
4.7 Extração de DNA e Amplificações	44
4.8 Pesquisa direta de Parvovirus tipo 2, Coronavirus, Rotavirus e <i>Giardia</i>	44
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
8. CONCLUSÕES	52
9. REFERÊNCIAS	52
10. ANEXO I	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genotipagem de <i>Clostridium perfringens</i> de acordo com a produção das quatro toxinas principais (alfa, beta, épsilon e iota) e presença de quatro fatores de virulência adicionais (toxinas beta-2, NetB, NetE e enterotoxina)	16
Tabela 2: Ribotipos de <i>C. difficile</i> relatados em cães segundo país de origem e autoria no período de 2005 a 2015.	29
Tabela 3: Patotipos de <i>E. coli</i> e presença de fatores de virulência de acordo com o patotipo identificado.....	35
Tabela 4: Distribuição das amostras de fezes dos cães por faixa etária e proporção das amostras de animais diarreicos e aparentemente saudáveis.	37
Tabela 5: Lista de primers de <i>C. perfringens</i> utilizados nas pcrs, suas respectivas denominações, sequência, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referências bibliográficas.	38
Tabela 6: Lista de primers de <i>C. difficile</i> utilizados nas pcrs, suas respectivas denominações, sequência, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referências bibliográficas.	40
Tabela 7: Lista de primers de <i>Salmonella</i> utilizados nas pcrs, suas respectivas denominações, sequências, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referência bibliográfica.....	41
Tabela 8: Lista de primers de <i>E. coli</i> utilizados nas pcrs, suas respectivas denominações, sequência, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referências bibliográficas.	42
Tabela 9: Resultados dos enteropatógenos <i>C. perfringens</i> , <i>C. difficile</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , Parvovirus (CPV), Rotavírus (CRV), Coronavírus (CCV) E <i>Giardia</i> em cães diarreicos e não diarreicos, total resultados positivos, percentual e valor p.....	46
Tabela 10: Resultados, coinfeções e óbitos em isolados de <i>C. perfringens</i> de acordo com os genes <i>cpe</i> , <i>netE</i> toxina CPE.....	48
Tabela 11: Resultados da PCR e ELISA de <i>C. difficile</i> em cães diarreicos e não diarreicos.....	50
Tabela 12: Porcentagem dos ribotipos 014/020, 106, 602(CE), SLO231, SLO002, 010, 009, 053 de <i>C. difficile</i> nos grupos de cães diarreicos e não diarreicos.	51
Tabela 13: Descrição dos óbitos e enteropatógenos encontrados no grupo de cães diarreicos..	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação das toxinas A e B no intestino humano. Fonte: Adaptado de Rupnik et al., (2009)	19
Figura 2: Colônias características de <i>C. difficile</i> . Superfície irregular, coloração acinzentada, aspecto de vidro moído	23
Figura 3: Percentual de fezes diarreicas dos cães de acordo com a faixa etária de 0 a 6 meses; 7 a 12 meses; 13 a 60 meses e maiores do que 61 meses.	40
Figura 4: Duodeno. Numerosos bacilos Gram positivos semelhante a bactérias do gênero <i>Clostridium</i> aderidos a superfície necrótica dos vilos.	56

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência da infecção por *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* frente a outros enteropatógenos de relevância em cães, como parvovírus, coronavírus, rotavírus, *Giardia* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Foram coletadas 154 amostras fecais, sendo 92 de cães diarreicos, oriundos de hospitais veterinários e 62 amostras de cães aparentemente saudáveis (controle). Dividiu-se os cães em quatro faixas etárias: 0 a 6 meses (imunidade passiva), 7 a 12 meses (estabelecimento da imunidade ativa), 13 a 60 meses (adultos) e maiores do que 61 meses (idosos). Após isolamento de *C. perfringens* em meio seletivo, realizou-se PCR para os seguintes genes: *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpb2*, *cpe*, *netB*, *netE*, *netF* e *netG*. As estirpes isoladas de *C. difficile* foram submetidas a ribotipagem e detecção dos seguintes genes *tcdA*, *tcdB*, *tpi* e *cdtB*. Realizou-se ainda ELISA para detecção das toxinas A/B em amostras de fezes de onde foram isoladas estirpes toxigênicas de *C. difficile* e, além disso, ELISA para a detecção da enterotoxina (CPE) nas amostras de fezes de cães que foram positivos para estirpes de *C. perfringens cpe* +. Para o diagnóstico diferencial de outros enteropatógenos, realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. por isolamento; detecção dos patótipos de *E. coli* por isolamento seguido de PCR, e testes rápidos para detecção de Parvovirus canino tipo 2 (CPV), coronavírus canino (CCV), rotavírus canino (CRV) e *Giardia* spp. Não foi identificado nenhum enteropatógeno em 52,1% dos animais diarreicos e em 50% dos cães saudáveis. Houve uma associação positiva entre a presença do gene *cpe* de *C. perfringens* e a ocorrência de diarreia ($p=0,006$), sendo a toxina CPE encontrada em metade dessas amostras fecais. O gene codificador da recém descrita toxina NetE foi encontrado em 70% das estirpes de *C. perfringens* positivas para *cpe*, todas oriundas de animais com idade superior a 12 meses. A frequência de estirpes toxigênicas de *C. difficile* aumentou em cães com idade superior a 60 meses e o ribotipo 014/020 foi o mais frequente no presente estudo. Entre as coinfeções detectadas destacam-se dois casos em que os cães eram positivos para *C. perfringens* tipo A *cpe*+ e *netE*+*netF*+ e *C. difficile*, algo inédito na literatura. Este estudo sugere que *C. difficile* e *C. perfringens* são importantes nas diarreias em cães e podem ocorrer em coinfeções com outros enteropatógenos, inclusive entre agentes do gênero *Clostridium*.

Palavras-chaves: diarreia, parvovirus, rotavírus, coronavírus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Giardia*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the occurrence of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* infection compared to other enteropathogens in dogs, such as parvovirus, coronavirus, rotavirus, *Giardia* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. A total of 154 fecal samples were collected, 92 from diarrheic dogs, from veterinary hospitals, and 62 from apparently healthy dogs (control group). The dogs were divided into four age groups: 0-6 months (passive immunity), 7-12 months (establishment of active immunity), 13-60 months (adults) and older than 61 months (seniors). After isolation of *C. perfringens* in selective media, the presences of the following genes were evaluated by PCR: *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpb2*, *cpe*, *netB*, *netE*, *netF* e *netG*. The isolated strains of *C. difficile* were ribotyped and the presences of the following genes were evaluated by PCR: *tcdA*, *tcdB*, *tpi* e *cdtB*. Two ELISAs were used to detect A/B toxins and enterotoxin in stool samples that were positive for isolation of *C. difficile* and *C. perfringens* strains positive for the gene *cpe*, respectively. The differential diagnosis of other enteropathogens included *Salmonella* spp. by isolation; isolation of *E. coli* followed by PCR; and immunochromatography tests to detect canine parvovirus type 2 (CPV), canine coronavirus (CCV), canine rotavirus (CRV) and *Giardia* spp. Approximately in 52,1% of diarrheic animals and 50% of healthy dogs were negative for all enteropathogens tested. There was a positive association between the presence of CPE gene (*cpe*) from *C. perfringens* and the occurrence of diarrhea ($p=0.006$), the CPE toxin was also detected in half of these fecal samples. The gene encoding the recently described NetE toxin (*netE*) was found in 70% of *C. perfringens* strains positive for CPE, all from adult dogs (aging more than 12 months). The frequency of isolation of *C. difficile* toxigenic strains increased in dogs over the age of 60 months, and the ribotype 014/020 was the most frequent in this study. Among the co-infections detected, stand out the first description of *C. perfringens* type A *cpe*+ and *netE*+ *netF*+ and *C. difficile* coinfection in two dogs. This study suggests that *C. difficile* and *C. perfringens* are important enteropathogens in dogs and can occur in co-infections with other microorganisms, including *Clostridium* species.

Key words: diarrhea, parvovirus, rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Giardia*.

1. INTRODUÇÃO

A diarreia é uma queixa comum na clínica de pequenos animais, caracterizada pelo aumento da frequência, fluidez e/ou volume das fezes (Hume, 2014) e tem como consequências o desequilíbrio ácido-básico e hidroeletrolítico, além da diminuição da absorção de nutrientes. Esta afecção possui elevada morbidade e sua mortalidade é variável, tendo relação direta com o patógeno e a instituição correta e rápida do tratamento (Gizzi et al., 2014).

As diarreias podem ocorrer devido a fatores não-infecciosos ou infecciosos (Mahl, 1994; Simpson, 2004). Quando o quadro de diarreia é infeccioso, vários enteropatógenos podem estar envolvidos, destacando-se os seguintes agentes bacterianos nas diarreias caninas: *Escherichia coli* diarreiogênica, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* (Marks & Kather, 2011). Em relação aos agentes virais, são mais frequentes: parvovírus e coronavírus. Além disso, pode-se incluir a participação de parasitas tais como *Giardia* spp., *Isospora* spp. e helmintos.

Grande parte dos enteropatógenos de cães diarreicos são também componentes normais da microbiota de animais saudáveis, o que torna ainda mais desafiador o entendimento e o diagnóstico laboratorial dessa enfermidade. *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* são exemplos clássicos disto pois, apesar dos diversos estudos envolvendo estes microrganismos, existem algumas lacunas na patofisiologia e na participação destes agentes nos episódios de diarreia. As coinfeções também podem ocorrer, sendo muitas vezes responsáveis pelo agravamento do quadro clínico, dificultando o diagnóstico dos agentes causais das diarreias.

A grande maioria das clínicas veterinárias de pequenos animais não possuem laboratórios para a realização do diagnóstico etiológico e, muitas vezes, desconhecem os prováveis agentes envolvidos nos quadros de diarreia, o que favorece o uso de antimicrobianos de forma empírica e o agravamento do quadro clínico do paciente, além de contribuir para a seleção de estirpes resistentes aos antimicrobianos empregados (Batterby & Harvey, 2006).

Adiciona-se ao agravamento do quadro clínico, o risco zoonótico oferecido por alguns enteropatógenos. A partir dos anos 90, período que houve uma mudança de comportamento e intensificação do convívio dos proprietários com os animais de estimação, aumentou-se o risco de transmissão de alguns enteropatógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Bartonella* spp. e *Giardia* spp. (Mani & Maguire, 2009). Ainda mais recente, a transmissão de *C. difficile* entre animais domésticos e seres humanos tem sido foco de discussão (Silva et al., 2013).

No Brasil são raros os trabalhos relacionados à epidemiologia e prevalência dos patógenos causadores de diarreias em cães, apesar da reconhecida importância para saúde canina e humana. Dessa forma, um estudo complexo abordando de forma profunda *C. perfringens* e *C. difficile* frente aos principais enteropatógenos relatados em cães pode contribuir para se conhecer a frequência da infecção e coinfeções, além de elucidar o papel dos potenciais agentes nos quadros de diarreia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência da infecção por *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* frente a coinfeção por outros enteropatógenos de relevância em cães.

2.2 Objetivos específicos

1. Isolar e caracterizar *C. perfringens* e *C. difficile* a partir de fezes de cães saudáveis e diarreicos.
2. Avaliar a associação de *C. perfringens* e *C. difficile* com outros enteropatógenos comuns em cães.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diarreia em cães

A diarreia é uma doença frequente em cães e pode se manifestar em diversas faixas etárias desta espécie. Apesar de comum, inexistem relatos até o momento que estabeleçam as taxas de incidência desta enfermidade na espécie canina, diferentemente de outras espécies, como os bovinos, por exemplo (Coura et al., 2015). Sua etiologia é complexa e envolve a interação de diversos fatores infecciosos, nutricionais, imunológicos e ambientais. Os principais sinais clínicos da diarreia são a desidratação progressiva, desequilíbrio ácido básico e hidroeletrólítico, aumento da frequência de defecação e alteração da consistência e volume das fezes, que se não tratados, podem culminar com a morte do animal (Hume, 2014)

Os patógenos causadores de diarreia podem ocasionar diarreia por três mecanismos principais:

- 1) Aumento da taxa de secreção, com modificações no transporte de íons e água, mantem-se a integridade da mucosa. A diarreia causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica, produtora de uma enterotoxina que altera a concentração de sinalizadores intracelulares é um exemplo disto.
- 2) Alteração da integridade intestinal, devido a atrofia das vilosidades/má absorção, o que tem como consequência o desenvolvimento de uma diarreia osmótica. Um exemplo são os quadros de diarreia ocasionador por *Salmonella* spp. que invade a mucosa intestinal, provoca uma inflamação, podendo ocasionar a atrofia das vilosidades intestinais, resultando em má digestão/má absorção dos nutrientes e da água. A presença de nutrientes não absorvidos no lúmen intestinal tem um efeito osmótico, retendo água no intestino.
- 3) Inflamação, estimulando a secreção de eletrólitos e fluido e o aumento de células de defesa. A infecções por *C. difficile* exemplificam as diarreias inflamatórias.

Percebe-se que os estudos referentes aos agentes etiológicos de diarreia em cães no Brasil são direcionados, na maioria das vezes, a apenas um enteropatógeno e quando abrangem uma diversidade maior, utilizam-se de técnicas limitadas (Gizzi et al., 2014; Rodrigues et al., 2015). Isto dificulta bastante o real entendimento da ocorrência e associação do quadro clínico com os enteropatógenos. Trabalhos desta natureza são importantes pois podem conscientizar os clínicos sobre a importância da realização dos diagnósticos e também direcionar os tratamentos para que eles sejam realizados com mais eficiência e cautela.

3.2 *Clostridium perfringens*

3.2.1 O agente: breve introdução

O gênero *Clostridium* foi primeiramente descrito por A. Prazmowski em 1880 e, desde então, foram identificadas mais de 225 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas. *Clostridium perfringens* é um bastonete, anaeróbio estrito, Gram-positivo, esporulado e amplamente distribuídos no ambiente e no trato intestinal dos vertebrados. É um importante patógeno, pois, está envolvido em enfermidades no trato gastroentérico e lesões histotóxicas em diversas espécies animais. Este microrganismo é classificado em cinco tipos (A-E) de acordo com a presença de um ou mais dos cinco genes responsáveis pelas principais toxinas produzidas: *cpa* (alfa), *cpb* (beta), *etx* (épsilon), *iap* (iota), como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Genotipagem de *Clostridium perfringens* de acordo com a produção das quatro toxinas principais (alfa, beta, épsilon e iota) e presença de quatro fatores de virulência adicionais (toxinas Beta-2, NetB, NetE e enterotoxina)

Tipo	Toxina (gene)						
	Alfa (<i>cpa</i>)	Beta (<i>cpb</i>)	Épsilon (<i>etx</i>)	Iota (<i>iap</i>)	Beta-2 (<i>cpb2</i>)	Enterotoxina (<i>cpe</i>)	NetB e NetE (<i>netB</i> , <i>netE</i>)
A	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-
B	+	+	+	-	+/-	+/-	-
C	+	+	-	-	+/-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	+/-	-

Além das toxinas principais, existem pelo menos outros 11 genes de toxinas identificadas (Songer, 1996), mas apenas algumas foram relatadas como potencialmente causadoras de doenças em outras espécies animais. Dentre elas, merecem importância a enterotoxina (CPE), beta-2 (CPB2) e as toxinas causadoras de enterite necrótica (NetB, NetE, NetF, NetG). É importante ressaltar que, apesar da detecção de genes por PCR não confirmar a expressão desses, estudos demonstram que em estirpes do gênero *Clostridium* há uma alta concordância entre a detecção de genes de toxina e sua produção *in vitro* (Uzal et al., 2014).

Cada toxina possui um mecanismo de ação que está intimamente relacionado com os sintomas clínicos das doenças que os agentes provocam. Dentre as toxinas principais, a toxina alfa provoca hemólise intravascular, danos capilares e agregação plaquetária; a toxina beta forma poros e altera a permeabilidade vascular; a toxina épsilon altera a permeabilidade vascular e a toxina iota desorganiza o citoesqueleto celular. Já em relação aos fatores de virulência adicionais, a enterotoxina, a toxina beta-2 e as toxinas de enterite necrótica formam poros nas células alvo (Uzal et al., 2014).

As toxinas beta, épsilon e iota podem causar doenças clínicas em diversas espécies animais, sendo responsáveis, por exemplo, pela disenteria e enterotoxemia dos cordeiros e pela

enterite necrótica dos javalis (Songer, 1996). Existem poucos relatos sobre a prevalência desses genes em cães diarreicos ou saudáveis, não parecendo ser importante nessa espécie (Goldstein et al., 2012).

A toxina beta-2 foi descrita em casos de enterite necrótica em leitões e tiflocolite em equinos (Waters et al., 2003; Waters et al., 2005), mas na espécie canina ela aparenta não ser relevante (Goldstein et al., 2012). A enterotoxina (CPE) é comumente encontrada nas estirpes do tipo A de *C. perfringens* (Songer, 1996) e foi relatada em quadros de intoxicação alimentar em humanos e doenças intestinais em diversas espécies animais, como equinos, suínos e humanos (Sasaki et al., 1998; Uzal et al., 2014). Até pouco tempo, acreditava-se que a toxina CPE poderia estar envolvida nos quadros clínicos entéricos em cães, uma vez que há uma associação entre a presença dessa toxina (ou do seu gene codificador) e a ocorrência de diarreia em cães. Porém, recentemente foram descritos novos genes de fatores de virulência, denominados como *netE*, *netF* e *netG* e que parecem estar envolvidos nos quadros de diarreias em cães (Gohari et al., 2015). Essas toxinas, até o momento, foram encontradas exclusivamente em estirpes positivas para o gene *cpe*.

3.2.2 A doença em cães

C. perfringens tipo A é comumente encontrado em cães. *Clostridium perfringens* tipo C foi relatado em cães com quadro de enterite hiperaguda hemorrágica fatal, entretanto, este é o único trabalho até o presente momento a relatar esta doença, o que nos leva a crer que se trata de um achado infrequente e acidental (Weese et al., 2011).

O papel de *C. perfringens* tipo A nos quadros de diarreias em cães não é totalmente elucidado e sabe-se que este microrganismo é comumente encontrado na microbiota de animais saudáveis e diarreicos. Estudos demonstram que a associação com fatores de virulência adicionais, como *Necrotic enteritis toxin* (Net), e outras toxinas como a enterotoxina (CPE) que podem culminar em quadros clínicos severos (Gohari et al., 2015; Silva & Lobato, 2015).

A patogênese da doença associada a *C. perfringens* (CPAD) também não é compreendida. A maioria dos estudos apontam *C. perfringens* como um patógeno primário para a ocorrência da diarreia, enquanto alguns autores sugerem que sua participação seja oportunista a lesões ocasionadas por outros patógenos. Um estudo avaliando infecções por parvovírus no período de 1987 a 1990 identificou a coinfeção entre este agente viral e *C. perfringens* em 69% (74/108) dos cães avaliados, indicando que esta associação pode ser frequente (Turk et al., 1992), principalmente pelos sintomas e lesões ocasionadas por estes dois enteropatógenos serem muito semelhantes (Sasaki et al., 1998). Porém, deve-se salientar que no referido estudo não houve uma avaliação completa dos genes de virulência de *C. perfringens* (tais como *cpe* e *netE*), impedindo qualquer diferenciação entre microbiota e agente agressor.

Em cães saudáveis, a taxa de isolamento de *Clostridium perfringens* tipo A é variável, compreendida entre 11 a 100%. Em cães diarreicos os valores são semelhantes, entre 27 e 86% (Weese et al., 2001a; Cassutto & Cook, 2002; Marks et al., 2002; McKenzie et al., 2010). A detecção de CPE nas fezes, comumente por ELISA, ou a detecção do gene *cpe* nas estirpes de *C. perfringens* isoladas é mais frequente nos cães com diarreia (Weese et al., 2001; Thiede et al.,

2001; Marks et al., 2002; Weese, 2011). Vale ressaltar que estes achados não são definitivos para o diagnóstico laboratorial, pois tanto CPE quanto o gene *cpe* podem ser encontrados em cães saudáveis (Marks et al., 2002; Silva et al., 2013).

Os sinais clínicos característicos de CPAD são inespecíficos e facilmente confundidos com doenças causadas por outros enteropatógenos. De maneira geral, as lesões localizam-se tanto no intestino delgado quanto no grosso, há aumento do muco fecal, aumento da frequência de defecação e tenesmo. A severidade dos quadros clínicos de diarreia é variável, podendo ser autolimitante, recorrente ou agudo com enterite necrohemorrágica fatal (Weese et al., 2011; Uzal et al., 2014). Além disto, os fatores predisponentes para a ocorrência destes episódios são desconhecidos (Schlegel et al., 2012), sendo que alguns autores sugerem que o estresse físico, a queda da resposta imune e a diminuição da motilidade intestinal possam favorecer a anaerobiose no trato gastroentérico e consequentemente a multiplicação de *C. perfringens* (Sasaki et al., 1998).

São poucos os relatos de diarreia recorrente. Weese et al., (2001b) descreveram dois cães com episódios de vômito e diarreia intermitente, ambos positivos para CPE. A resolução do quadro clínico só se deu com a instituição de um tratamento prolongado com cefalexina e alteração da dieta para uma de maior digestibilidade. De maneira análoga a este relato, Carman & Lewis (1983) relataram um caso de diarreia intermitente crônica e sugeriram a participação de *C. perfringens* tipo A pela neutralização da toxina alfa nas fezes com uma antitoxina homóloga, sendo instituído um tratamento com metronidazol por 10 dias e modificação da dieta para a remissão dos sintomas.

A diarreia nosocomial por *C. perfringens* enterotoxigênico também deve ser considerada. Em uma análise retrospectiva dos cães internados em um hospital veterinário na província de Ontário, no Canadá, foram identificados diversos cães que desenvolveram diarreia após a hospitalização. Nestes, detectou-se CPE nas fezes dos animais diarreicos e descartou-se o envolvimento de outros enteropatógenos. Acrescido a isto, um animal foi eutanasiado e necropsiado e os achados histológicos foram sugestivos de enterite clostridial (Kruth et al., 1989).

Em um relato de caso feito por Sasaki et al., (1996), um cão em bom estado nutricional apresentou um episódio de vômito e diarreia hemorrágica durante a noite e, na manhã seguinte, o animal foi a óbito. A necropsia foi realizada e observou-se o conteúdo fecal sanguinolento, mucosa intestinal com necrose hemorrágica e visualização de bacilos Gram-positivos aderidos em toda superfície intraluminal. Sugeriu-se o envolvimento de *C. perfringens* tipo A pelo isolamento e pela imunofluorescência indireta. Outro episódio semelhante a este foi relatado por Schlegel et al., (2012), no qual o animal foi encontrado morto pelos proprietários e esses observaram uma grande quantidade de sangue junto ao animal. A necropsia revelou uma gastroenterite hemorrágica aguda, com a mucosa do trato gastrointestinal difusamente hemorrágica e o conteúdo sanguinolento, além da necrose em toda sua extensão. Microscopicamente, visualizou-se muitos bacilos Gram-positivos aderidos à mucosa avaliada. Vários enteropatógenos foram pesquisados, entretanto, apenas *C. perfringens* foi encontrado em grandes quantidades. Este foi o primeiro relato de caso de gastroenterite hemorrágica fatal em que realizou-se a genotipificação de *C. perfringens*. O isolado era tipo A e positivo para *cpe* e *cpb2*, entretanto, não foi feito nenhum ensaio como o ELISA para identificar as toxinas e não houve pesquisa dos genes codificadores das toxinas NetE, NetF e NetG (Schlegel et al., 2012); desconhecidas até aquele momento.

A síndrome de diarreia aguda hemorrágica (AHDS) relatada em cães pode ser entendida como um conjunto de sinais clínicos inespecíficos, tais como vômito agudo e diarreia hemorrágica. A etiologia é incerta, porém alguns autores consideram marcante a participação do gênero *Clostridium*, especialmente *C. perfringens*, pela ação da enterotoxina, e pela semelhança aos relatos descritos deste enteropatógeno (Cave et al., 2002; Unterer et al., 2014). Existe apenas um estudo que visualizou as lesões por endoscopia e biópsia, a histologia e a presença de bactérias em cães, especificamente com gastroenterite hemorrágica, e os estudos anteriores a esse descreviam apenas os achados *post mortem*. A autólise e a necrose, em mamíferos, possuem aparência morfológica muito similar, o que aumenta os fatores de confundimento para avaliar os achados de necropsia observados. A participação de parvovírus foi descartada por imunohistoquímica e ELISA nesses casos. Não foi visualizada nenhuma inflamação aguda ou destruição da superfície da mucosa epitelial, apenas necrose hemorrágica da mucosa ao longo de todo trato intestinal e sugeriu-se a participação de *C. perfringens* pelo isolamento do agente em todos os animais com gastroenterite hemorrágica e pela aderência de bacilos Gram positivo na superfície das vilosidades intestinais (Unterer et al., 2014).

Allenspach (2015) relatou o possível envolvimento de *C. perfringens* nesta síndrome, porém foi demonstrado que a toxina CPE nem sempre é encontrada nos episódios da AHDS, evidenciando que esta toxina não é tão importante quanto se acreditava. Os autores sugeriram ainda que poderiam existir outros agentes ou toxinas que tivessem relação com os quadros apresentados. Posteriormente, em um estudo de Busch et al., (2015) foi avaliada a severidade dos quadros clínicos de AHDS e a presença das toxinas CPE de *C. perfringens* e as toxinas A/B de *C. difficile* e as conclusões dos autores seguiam a mesma linha de raciocínio descrita por Allenspach (2015), concluindo que a presença dessas toxinas não pode ser empregada como parâmetro para prever a doença ou o seu agravamento, pois nem sempre são encontradas. Recentemente, foram descritas novas toxinas e há indícios que essas podem estar envolvidas na patogênese das gastroenterites hemorrágicas fatais em cães e equinos (Gohari et al., 2015). Estas toxinas formadoras de poros foram sequenciadas e denominadas NetE, NetF e NetG, do inglês *Necrotic enteritis toxin* (Net). Sabe-se que pertencem a superfamília da α toxina de *Staphylococcus aureus* e CPB e NetB de *C. perfringens*. Além disto, estas novas proteínas são potentes agentes citolíticos que podem proteger a bactéria contra as respostas imunes celulares do hospedeiro, destruindo as barreiras epiteliais e liberando substâncias que favorecerão o crescimento e colonização de *C. perfringens* tipo A. Evidências sugerem que uma população clonal deste microrganismo pode estar envolvida em diferentes doenças entéricas, uma vez que 80% dos isolados avaliados de equinos e cães em gel de eletroforese em campo pulsado (PGFE) demonstraram 100% de semelhança genética (Gohari et al., 2015). Os genes *netE* e *netF* estão localizados em um grande plasmídeo conjugativo enquanto *netG* encontra-se em outro grande plasmídeo conjugativo que possui o gene *cpe* (Gohari et al., 2015). Apesar da evolução dos últimos anos, ainda são necessários mais estudos para entender o real envolvimento destas toxinas nos casos e caracterizar melhor o papel delas nos quadros de diarreia na espécie canina.

3.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico dos quadros de CPAD é difícil pois pode ser facilmente confundido com outras doenças e não existe um teste padrão ouro para avaliar os métodos disponíveis (Goldstein et al., 2011). Para saber se *C. perfringens* está envolvido no episódio de diarreia deve-se isolar, tipificar o microrganismo e detectar as toxinas nas fezes (Silva & Lobato, 2015). Além disto, é

importante associar os resultados laboratoriais com o histórico do animal, o quadro clínico e os sintomas de enterite, colite ou enterocolite (Guilford & Strombeck, 1996).

Diversos meios de cultura podem ser utilizados para realizar o isolamento de *C. perfringens*, o mais comum é o ágar SPS (sulfito polimixina sulfadiazina), um meio seletivo, no qual colônias sulfito-redutoras, que possuem o centro enegrecido, são sugestivas de *C. perfringens*. O pré-enriquecimento deste microrganismo em caldo de infusão cérebro coração (BHI) também pode ser realizado (Goldstein et al., 2012).

Estudos foram feitos para associar a contagem de esporos nas fezes e a presença de CPE, entretanto não houve correlação entre esta variável e a presença das toxinas (Weese et al., 2001a). A detecção de toxinas nas fezes é amplamente utilizada e recomendada como uma forma de diagnosticar as toxinas produzidas por *C. perfringens* em seres humanos e animais, pois sabe-se que existe uma associação positiva entre presença de CPE e a diarreia. Todavia, para tal objetivo são utilizados testes imunoenzimáticos como o ELISA e inexistem estudos sobre a sensibilidade e a especificidade destes testes em cães, assim a interpretação dos resultados requerem cautela, já que podem ocorrer resultados falsos e prejudicar o tratamento e resolução do quadro clínico (Marks & Kather, 2003b; Weese, 2011; Silva & Lobato, 2015). A partir disto, associar técnicas de biologia molecular como PCR para identificar *cpe* tem demonstrado considerável importância nestas interpretações, pois há também uma correlação entre este gene e a ocorrência de diarreia.

Marks & Kather (2002) avaliaram cães diarreicos e não diarreicos quanto a presença de CPE por ELISA e a identificação do gene *cpe* por PCR. Ao analisar somente os dados do ELISA, a CPE foi identificada em 34% dos animais diarreicos e em 14% dos animais não diarreicos. Ao associar a detecção da toxina à presença do gene, considerando como positivos apenas os animais que foram positivos para os dois testes, a incidência passou para 28% em animais diarreicos e apenas 4% em animais não diarreicos, diminuindo o número de animais falso positivos e aumentando, assim, a especificidade do diagnóstico. No estudo de Goldstein et al., (2012) comparou-se a presença de *cpe* nas amostras testadas e a detecção de CPE por ELISA e os autores concluíram que o teste ELISA apresentou 100% de especificidade, uma vez que nenhuma das amostras foi negativa para o gene e positiva para as toxinas e, apesar do pequeno número de amostras positivas, o intervalo de confiança foi grande. Todavia, a sensibilidade do teste foi moderada (83%), o que exige bom senso na interpretação dos resultados, pois podem existir muitos resultados falso negativos.

Como foi mencionado anteriormente, este agente também pode ser encontrado em animais saudáveis e como não existe um entendimento completo de CPAD, tanto a presença da toxina CPE quanto do gene *cpe* são sugestivos do envolvimento de *C. perfringens* nos casos de gastroenterite em cães. Com a descoberta das toxinas causadoras de enterite necrótica (Net), até então desconhecidas, demonstrou-se que a presença de CPE e do gene *cpe* não são tão significativos quanto se imaginava em relação a ocorrência dos quadros severos da doença. A única comprovação evidenciada até o momento foi a localização do gene da enterotoxina (*cpe*) e *netG*, que estão localizados no mesmo plasmídeo de *cpe* (Gohari et al., 2015).

De acordo com Silva & Lobato (2015), para um diagnóstico mais robusto e confiável, é necessário excluir o envolvimento de outros enteropatógenos e associar a detecção de toxinas,

com a cultura e isolamento do patógeno, e nos casos em que houver o óbito, pesquisar na microscopia a presença de grande quantidade de bacilos ao longo de toda mucosa e observar as lesões ao longo de toda sua extensão.

3.2.4 Tratamento e Controle

Até o momento inexistem imunoproliféricos para controle e prevenção de enterites causadas por *C. perfringens*. De maneira geral, institui-se o tratamento suporte comumente utilizado nas doenças diarreicas, com fluidoterapia, nutrição parenteral, uso de carvão ativado e antimicrobianos (Weese et al., 2010). Existem poucos estudos direcionando o tratamento de CPAD em cães. A terapia com antimicrobianos é contra-indicada nos quadros autolimitantes, e o tratamento é recomendado apenas nos quadros agudos, moderados a severos como as gastroenterites hemorrágicas ou diarreias crônicas. Dentre os medicamentos indicados, metronidazol e tilosina são os antibióticos de escolha, entretanto, ampicilina, eritromicina, tetraciclina e cefalexina também podem ser usados (Weese et al., 2010). Um estudo feito avaliando a sensibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. perfringens* revelou que muitos isolados eram resistentes a tetraciclina, não sendo recomendado o uso deste fármaco (Marks & Kather, 2003a). Doses subterapêuticas devem ser evitadas pois especula-se que *C. perfringens* seja capaz de transferir genes de resistência inter e intra espécies (Rood, 1983; Shoemaker et al., 2001). Outro estudo, nesta mesma linha de pesquisa avaliou a resistência antimicrobiana de isolados de diferentes origens de *C. perfringens* e constataram a resistência a tetraciclina e a macrolídeos em diferentes amostras (Marks et al., 2003; Park et al., 2010; Gobeli et al., 2012). Há ainda outras contraindicações em relação ao uso de tetraciclina em filhotes e em fêmeas adultas durante o período gestacional e amamentação, pois este fármaco indisponibiliza alguns minerais como o cálcio, magnésio, ferro e alumínio, devido a formação de quelantes insolúveis (Andrade et al., 2002; Crespillo et al., 2007). Embora as tetraciclina possam não ser evidentemente tóxicas para filhotes caninos e felinos, o efeito quelante sobre o cálcio ósseo e dentário podem resultar em distúrbios de crescimento, deformidades ósseas (Boothe & Hoskins, 1997), displasias e descoloração do esmalte dentário (Hosgood & Hoskins, 1998). Outras reações adversas incluem a potencial toxicidade hepática e renal relacionada à excreção desses compostos, além das graves alterações na microflora intestinal relacionadas à alta taxa de recirculação entero-hepática das tetraciclina (Crespillo et al., 2007).

Acredita-se que com as recentes descobertas de Gohari et al., (2015) sejam desenvolvidos em um futuro próximo novos produtos imunoproliféricos capazes de proteger os animais dos quadros hiperagudos e fatais ocasionados pelas toxinas NetE, NetF e NetG em cães.

3.3 Clostridium difficile

3.3.1 Histórico do microrganismo

C. difficile foi descrito pela primeira vez como parte da microbiota intestinal de crianças recém-nascidas por Hall e O'Tolle em 1935. A nomenclatura inicial deste microrganismo foi atribuída pela morfologia e dificuldade de isolamento do agente, denominando-o *Bacillus difficilis*. Na década de 40, Hambret et al., (1943) desenvolveram um modelo em roedores para avaliar o tratamento de gangrena gasosa com penicilina em razão do aumento do número de casos na segunda guerra mundial. Porém, surpreendentemente, os cobaias apresentavam tiflites pelo uso

de antibióticos, sendo essa afecção mais letal do que indução da gangrena gasosa. A partir da década de 70, novos estudos demonstraram a importância deste microrganismo como um patógeno entérico, principalmente pelo aumento dos relatos de diarreia e colite pseudomembranosa em pacientes internados e sob antibioticoterapia prolongada (Lyerly et al., 1988). Naturalmente, os estudos se direcionaram no intuito de se identificar o agente causal envolvido nestes casos e, no final da década de 70, demonstrou-se que *C. difficile* e suas toxinas estavam presentes em grandes quantidades nas fezes de pacientes com colite pseudomembranosa e diarreia nosocomial (George et al., 1978). Hoje, este agente é o principal causador de diarreia associada à antibioticoterapia em seres humanos (Balassiano et al., 2012).

Em animais, os primeiros estudos que relataram e isolaram *C. difficile* foram na década de 80, em suínos, equinos e cães (Jones e Hunter, 1983; Ehrlich et al., 1984), mas somente em meados da década de 90 este microrganismo foi reconhecido como um causador de diarreia nestas espécies (Songer, 2010). Existem relatos de infecções por *C. difficile* em diversos outros animais domésticos como coelhos, bovinos e felinos (Martins et al., 2001; Weese et al., 2001a; Bano et al., 2008), porém, este agente não é tão comum e/ou tão conhecido como nas primeiras espécies mencionadas.

3.3.2 O agente

Clostridium difficile é um bastonete, Gram positivo, anaeróbio estrito, capaz de esporular em condições adversas, e pode ser encontrado no ambiente e trato gastrointestinal de mamíferos. Tem sido considerado um importante agente causador de diarreias em diversas espécies como homem, suínos, equinos e cães (Poxton et al., 2001; Post et al., 2002).

Ao isolar este microrganismo a partir das fezes, pode-se classificar as estirpes em dois tipos: toxigênicas e não toxigênicas. As amostras toxigênicas são aquelas capazes de produzir pelo menos uma das duas toxinas principais (toxina A e toxina B). As estirpes capazes de produzir ambas são identificadas como A+B+, enquanto aquelas que possuem deleções são identificadas como A-B+, ou mais raro, A+B-. Em cães, estirpes variantes como A-B+ foram encontradas apenas em animais que haviam frequentado hospitais humanos. As estirpes não toxigênicas não possuem a ilha de patogenicidade contendo os genes produtores das toxinas de *C. difficile*, sendo denominadas A-B-.

As estirpes toxigênicas possuem os genes das toxinas A (*tcdA*) e B (*tcdB*) e, em função disto, tem a capacidade de produzir as toxinas A e B, consideradas as principais responsáveis para o desenvolvimento da doença em animais. Entretanto, é necessário ter cautela para avaliar a presença de tais genes, pois estudos demonstram que alguns animais, apesar de possuírem estirpes positivas para os genes *tdcA* e *tcdB*, apresentam-se aparentemente saudáveis (Weese et al., 2001b; Marks et al., 2002).

3.3.3 Patogenia

Existem algumas lacunas em relação a patogenia da diarreia por *C. difficile* que impedem o completo entendimento da doença. A infecção ocorre pela ingestão dos esporos disseminados no ambiente, os quais podem ser provenientes de animais doentes ou portadores assintomáticos

(animais saudáveis). Normalmente, a microbiota intestinal de um animal saudável impede a colonização do agente, mas para que a doença ocorra é necessário uma disbiose, ou seja, uma alteração na microbiota intestinal que permita a infecção e colonização por *C. difficile* e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença pela ação de suas toxinas: a toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina) (Båverud, 2002; Hopman et al., 2011). Em cães, os fatores que ocasionam esta disbiose não são completamente elucidados, entretanto, sugere-se que o uso de antimicrobianos seja um destes fatores (Silva et al., 2013).

A lesão no intestino parece ser iniciada pela toxina A, a qual possui receptores localizados na lâmina basal das células epiteliais e, uma vez internalizada, compromete as junções celulares, permitindo a ação da toxina B, cujos receptores localizam-se na região baso-lateral do epitélio, amplificando a lesão. Estas toxinas são internalizadas por endocitose e provocam o arredondamento celular e a destruição do citoesqueleto, o que pode ter como consequência a apoptose pela condensação da actina (Lyerly et al., 1988). Outro fato que ocorre devido a destruição da integridade do epitélio intestinal é a intensa migração leucocitária que resulta na formação da pseudomembrana característica da doença em seres humanos (Hookman et al., 2009). Abaixo, a figura 1 ilustra a patogenia descrita.

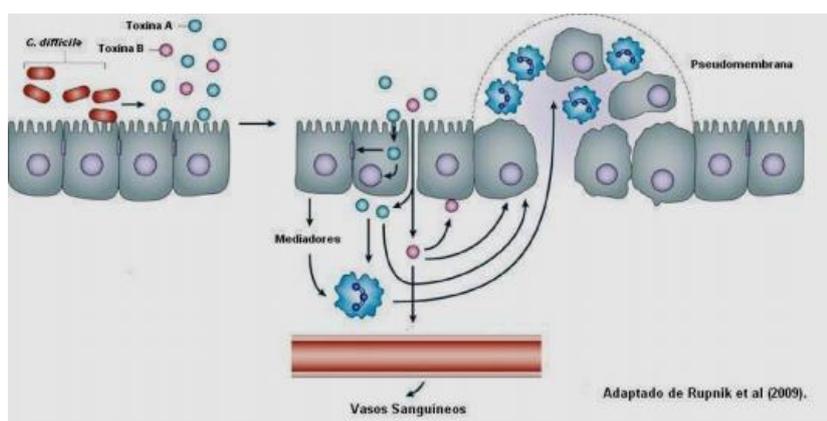


Figura1: Mecanismo de ação das toxinas A e B no intestino humano. Fonte: Adaptado de Rupnik et al., (2009)

Muito tem sido discutido sobre a importância das toxinas A e B, principalmente em relação as alterações celulares e a toxicidade destas nas infecções por *C. difficile*. De acordo com o estudo de Kuehne et al., (2011) tanto a toxina A quanto a toxina B são importantes para o desenvolvimento dos sintomas de CDI, especialmente, em quadros mais severos pois a toxina A é responsável por causar dano inicial ao cólon, favorecendo e amplificando a ação da toxina B nos enterócitos.

Há ainda uma terceira toxina conhecida como toxina binária (CDT), muito semelhante as outras toxinas binárias produzidas por bactérias do gênero *Clostridium*, como a toxina iota, produzida pelo *C. perfringens* tipo E, e a toxina C2, produzida pelo *C. botulinum* tipo C (Samie et al., 2008). Ainda não se sabe o real significado deste fator de virulência. Alguns estudos bioquímicos e moleculares demonstraram que os principais sintomas da infecção por *C. difficile* (CDI) tais como a diarreia secretória e inflamação da mucosa colônica são causados, principalmente, pelas toxinas A e B (Thelestam & Olarte, 2000; Rupnik & Just, 2006; Jank et al., 2007). Outros estudos, apontam a ação sinérgica da toxina binária com as toxinas A/B,

amplificando e aumentando a despolimerização do citoesqueleto por um mecanismo complementar. Como consequência há um agravamento do quadro clínico e a exacerbação dos sintomas (Gonçalves et al., 2004). Além da desorganização celular, esta toxina parece formar protusões nas células alvos com consequente extravasamento de material do citosol, formando uma malha densa na superfície celular que facilitaria a adesão e multiplicação de *C. difficile* no intestino (Schwan et al., 2009).

3.3.4 A doença em cães

A importância de *C. difficile* em cães diarreicos ainda não foi bem estabelecida, entretanto, existem relatos de diagnóstico em casos de diarreia crônica, diarreia aguda e surto de infecção em um hospital veterinário de pequenos animais (Berry & Levett, 1986; Weese & Armstrong, 2003). A doença é limitada ao intestino e manifestações extraintestinais são raras (Smith & King, 1962; Rupnik et al., 2009). Os sinais clínicos são inespecíficos e variáveis, podendo ocorrer episódios de diarreia autolimitante a quadros mais severos, com fezes aquosas, presença de muco, dor abdominal, aumento da motilidade intestinal, febre, leucocitose e lesões inflamatórias no intestino grosso e delgado, quadros assintomáticos também podem ocorrer (Barlett, 2008; Rupnik et al., 2009). A tentativa de indução experimental da doença nesta espécie doméstica não foi bem-sucedida, impedindo a obtenção de respostas mais específicas (Clooten et al., 2003). Silva et al., (2013) demonstraram, pela primeira vez no Brasil, maior frequência das toxinas A e B por ELISA em cães diarreicos em comparação a cães não diarreicos, semelhante a estudos previamente descritos (Weese et al., 2001b; Marks et al., 2002; Clooten et al., 2008). Em amostras de animais não diarreicos foram detectadas toxinas pelo teste ELISA, sugerindo a ocorrência da doença na forma subclínica ou do carreamento das mesmas por animais aparentemente saudáveis (Silva et al., 2013).

Alguns estudos indicam que não há diferença estatística significativa em relação ao isolamento do agente em cães diarreicos e não diarreicos pelo fato do agente ser normalmente encontrado na microbiota dos animais aparentemente saudáveis (Weese et al., 2001a; Marks et al., 2002; Chouicha & Marks, 2006). Percebe-se uma variação na taxa de isolamento de acordo com os locais que os cães costumam frequentar. A taxa de isolamento em cães saudáveis em ambiente doméstico varia de 0 a 10% (Perrin et al., 1993; Struble et al., 1994; Al Saif & Brazier, 1996), nos animais internados em hospitais veterinários esta taxa está entre 18 a 40% (Riley et al., 1991; Struble et al., 1994) e os que visitam hospitais humanos aumenta para 58% (Lefebvre et al., 2006). Tanto Struble et al., (1994) quanto Chouicha & Marks (2006) e Silva et al., (2013) encontraram maior frequência de estirpes toxigênicas em cães diarreicos do que em cães saudáveis, apontando para uma associação significativa entre a presença das toxinas A e B e diarreia.

Alguns estudos apontam que o isolamento de *C. difficile* pode ser influenciado pela idade dos cães. Struble et al., (1994) relataram um aumento do risco de colonização por *C. difficile* em animais mais velhos, enquanto Weese et al., (2001) não encontraram associação significativa entre a frequência de isolados e a idade dos cães. Além destas incertezas, não se sabe o papel desta bactéria nas enterites em cães e nem se as toxinas A e B são capazes de exercer ação primária no intestino, provocando lesões intestinais, ou se é necessária alguma lesão prévia ocasionada por outro microrganismo, ou um fator desconhecido que desencadeie a colonização, multiplicação e produção de toxina por *C. difficile* (Weese et al., 2001; Busch et al., 2015).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença na espécie canina ainda não foram bem elucidados. Em humanos, sabe-se que a antibioticoterapia prévia e a hospitalização são os principais fatores de risco (Vaishnavi, 2009). Em cães, não há um consenso, alguns autores sugerem que a doença seja nosocomial (Riley et al., 1991), outros que esta seja associada a comunidade e ao ambiente no qual os animais estão inseridos (Struble et al., 1994; Clooten et al., 2008). Artigos recentes inferem que em cães a doença parece ser adquirida na comunidade, portanto, a antibioticoterapia e a hospitalização não são tão relevantes como em humanos e equinos. Acredita-se que por algum fator ainda desconhecido os indivíduos são colonizados e desenvolvem o quadro de diarreia (Weese, 2011).

Em um estudo realizado por Clooten et al., (2008) foram avaliados a prevalência e os fatores de risco na colonização por *C. difficile* nos animais que deram entrada no hospital para internação, nos hospitalizados e nos que estavam internados utilizando antibióticos e quimioterápicos. Todos os animais colonizados por *C. difficile* no momento da internação e que apresentavam fezes normais, não desenvolveram diarreia, sugerindo que a colonização prévia por *C. difficile* seja um fator de proteção importante para o desenvolvimento de diarreia por este microrganismo durante a hospitalização. A grande maioria dos animais que foram colonizados por *C. difficile* durante a admissão no hospital não haviam sido submetidos a antibioticoterapia prévia, demonstrando que a simples exposição ao ambiente hospitalar favoreceu para a colonização destes cães. O grupo específico composto por animais sob antibioticoterapia e sob uso de imunossupressivos apresentou maior taxa de colonização por *C. difficile*, o que indica que a utilização destes medicamentos associado a internação podem predispor o desenvolvimento de CDAD em cães (Shim et al., 1998).

Em um estudo feito em Ontario, Canadá, cães aparentemente saudáveis que possuíam contato com pessoas hospitalizadas foram avaliados e *C. difficile* foi o microrganismo mais comum dentre os pesquisados, sendo isolado em 19% dos animais e destes, 69% eram toxigênicos. Os autores sugerem que uma das possíveis fontes das estirpes toxigênicas seja o ambiente hospitalar e a exposição contínua a estas estirpes poderiam provocar quadros de diarreia (Lefebvre et al., 2006).

Considerando as discordâncias entre os estudos referentes aos fatores de risco da infecção por *C. difficile* em cães, são necessários novos estudos a fim de elucidar se a antibioticoterapia compõe um fator de risco para a espécie canina, apesar de estudos sugerirem que existem outros fatores predisponentes, como a contaminação de ambientes hospitalares com estirpes toxigênicas de *C. difficile* (Clooten et al., 2008).

3.3.5 Diagnóstico

Não existem sinais clínicos patognomônicos para identificar CDI, além disto, os métodos para diagnóstico são limitados e os clínicos não possuem o hábito de pesquisar o agente etiológico envolvido nos quadros em cães (Marks & Kather, 2003b). Este panorama dificulta a caracterização e o conhecimento da frequência deste patógeno nos quadros entéricos, principalmente no Brasil, onde existem poucos estudos.

É importante ressaltar que o diagnóstico da diarreia causada por *C. difficile* deve ser realizado pela associação do histórico clínico, e pelo diagnóstico laboratorial a partir do isolamento e identificação do agente pela reação de polimerase em cadeia (PCR) e detecção das toxinas A e B, por soroneutralização celular ou pelo teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Delmeé, 2001).

No diagnóstico bacteriológico, utiliza-se ágar Cicloserina Cefoxitina Frutose (CCFA), um meio seletivo, enriquecido com antibióticos, frutose e suplementado ou não com taurocolate, um sal biliar que favorece a germinação de esporos de *C. difficile*. As colônias de *C. difficile* apresentam morfologia com aspecto conhecido como “vidro moído”, com formato rizóide e irregular, de coloração acinzentada e odor característico (Delmeé, 2001). Na morfotinturação, é possível observar bastonetes Gram positivos com esporos subterminais (Vaishnavi, 2009). Porém, apenas o isolamento de *C. difficile* não é conclusivo, pois o agente pode ser encontrado na microbiota de cães, estejam saudáveis ou diarreicos (Yaeger et al., 2002; Ferreira et al., 2003; Arroyo et al., 2005; Yaeger et al., 2007; Clooten et al., 2008).

O uso de técnicas moleculares associada ao isolamento do agente tem se mostrado essencial, especialmente nos estudos relacionados a epidemiologia e caracterização da doença (Lemeé et al., 2004; Arroyo et al., 2005). Além disso, pela tipificação é possível identificar os genes responsáveis pela produção dos fatores de virulência de *C. difficile* (Stubbs et al., 2000).

A detecção das toxinas A e B pela citotoxicidade em células é considerada como “padrão-ouro” para diagnóstico de infecções causadas por *C. difficile*, sendo possível observar o efeito citopático causado pelas toxinas A e B em linhagem celular (Lyerly et al., 1988). Várias linhagens celulares podem ser utilizadas para detecção das citotoxinas, como a CHO (Chinese Hamster Ovary) e a VERO (African Green Monkey Kidney), considerada a mais sensível (Delmeé, 2001). As principais vantagens desta técnica são a alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, o tempo para obtenção do resultado é longo, a execução deste método exige mão de obra treinada e qualificada e poucas amostras podem ser processadas por vez se comparadas com o teste ELISA (ensaio imunoenzimático).

Os testes imunoenzimáticos (ELISA's) podem detectar as toxinas ou a glutamato desidrogenase, um antígeno comum produzido constitutivamente por todas as estirpes de *C. difficile*. Estes métodos são de fácil execução, não necessitam de profissionais especializados e os resultados são obtidos rapidamente, o que auxiliou na ampla utilização deste nas pesquisas. Normalmente é utilizado como um primeiro teste (Manabe et al., 1995; Goldenberg et al., 2010) e aconselha-se para o diagnóstico de CDI a associação com outras metodologias de diagnóstico, tais como PCR e isolamento (Chouicha & Marks, 2006). Todos os testes de ELISA disponíveis comercialmente foram elaborados para o diagnóstico da doença em humanos, não se sabia até então qual a aplicabilidade dos resultados na espécie canina. Chouicha & Marks (2006) publicaram um estudo em amostras fecais de cães a partir da avaliação de cinco kits comerciais de ELISA disponíveis no mercado. Como resultado, todos os testes demonstraram baixa sensibilidade (7 a 33%) sendo inadequados para serem utilizados para o diagnóstico de CDI em cães, podendo apresentar muitos resultados falso-negativos. Todavia, quando associado à tipificação e à identificação das estirpes toxigênicas havia uma melhora significativa na sensibilidade do teste (93%) (Chouicha & Marks, 2006).

Espera-se que os animais com achados clínicos sugestivos de CDI apresentem resultados positivos para o isolamento e outros testes imunoenzimáticos, como o teste de ELISA. Entretanto, os resultados laboratoriais requerem muito cuidado na interpretação, pois podem identificar o microrganismo por isolamento e não detectar as toxinas pelo ELISA. Nestes casos é necessário um raciocínio clínico para interpretar os resultados, pois quando há o isolamento de *C. difficile* não toxigênico e não se detecta as toxinas, há indícios que o quadro em questão não será CDI. Porém, pode se considerar que o teste utilizado apresentou um resultado falso-negativo ou as toxinas não estavam sendo expressadas no momento da coleta.

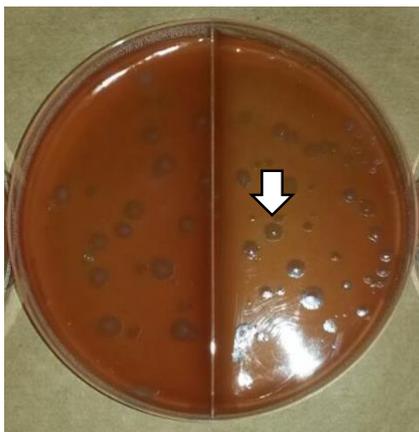


Figura 2: Colônias características de *C. difficile*. Superfície irregular, coloração acinzentada, com aspecto de vidro moído.

3.3.6 Ribotipagem

A ribotipagem é uma forma de tipificação que consiste em amplificação por PCR de regiões espaçadoras gênicas e intergênicas do RNA ribossomal 16S - 23S (Stubbs et al., 1999). Esta técnica permite observar a variação filogenética e taxonômica do agente em estudo, auxiliando na compreensão da epidemiologia das estirpes em diferentes espécies. Para avaliar e comparar com os diferentes ribotipos encontrados em diferentes regiões do mundo, foi criado um banco de dados para anaeróbios em Cardiff, no Anaerobe Reference Unit (ANRU), localizado no Reino Unido. Em estudos realizados no Canadá e Estados Unidos percebe-se que o banco de dados utilizado é diferente e as identificações dos ribotipos ocorrem por letras. Como a nomenclatura não é unificada, existe uma dificuldade para comparar os isolados de *C. difficile* de todos os continentes, que seguem o padrão Cardiff, dos estudos realizados na América do Norte.

O método é considerado altamente discriminativo, reproduzível, rápido e de fácil execução (Arroyo et al., 2005). São raros os estudos em cães e até o presente momento e existem poucas publicações com esta técnica na América Latina. Atualmente, discute-se o potencial zoonótico desta bactéria, pois ribotipos isolados em cães são semelhantes aos encontrados frequentemente em humanos. Há ainda a hipótese de que os animais domésticos possam atuar como reservatórios e disseminadores de *C. difficile* no meio ambiente (Jhung et al., 2008; Norman et al., 2011; Koene et al., 2011; Weese et al., 2014). Mas como a transmissão entre animais e humanos não foi ainda comprovada, são necessários estudos desta natureza.

Os ribotipos comumente relatados nos estudos em humanos são 014/20 e 002 e, coincidentemente, são os mais prevalentes em animais no mundo. O ribotipo 078, associado a

surtos e casos severos em cidades europeias, também pode ser encontrado em muitas espécies animais, especialmente em leitões. O conhecimento dos ribotipos presentes em diferentes regiões do mundo pode ajudar consideravelmente no entendimento da epidemiologia deste patógeno (Rupnik et al., 2009).

Em um estudo realizado no Canadá, Arroyo et al., (2005) avaliaram os ribotipos de isolados de *C. difficile* em cães (n=92) e identificaram nove diferentes ribotipos. Apesar desta diversidade, houve predomínio de dois na maioria das amostras estudadas: ribotipo A (50%) e B (16%). Outro estudo também realizado em Ontário (Canadá) avaliou a presença do agente em cães e no ambiente. Nos ambientes avaliados 18% (8/44) possuíam dois ou mais ribotipos presentes. O microrganismo foi isolado concomitantemente nos cães e no ambiente em quatro casas, mas contrariando as expectativas, em todos os casos os ribotipos caninos e do ambiente foram distintos. Já em um estudo em cães hospitalizados em uma unidade de tratamento intensivo em Ontário, Canadá, apresentaram 11 diferentes ribotipos, e novamente houve a predominância de dois ribotipos, um toxigênico, denominado arbitrariamente como tipo A, encontrado em 90% dos isolados toxigênicos e um não toxigênico, identificado como tipo B, encontrado em 74% dos isolados (Clooten et al., 2007). Como já citado anteriormente, a não adequação dos estudos de ribotipagem com o padrão de ribotipos de Cardiff impede comparações com outros estudos e reduz a possibilidade de discussão.

Lefebvre e colaboradores (2006) pesquisaram a prevalência de agentes zoonóticos em cães que visitavam pacientes hospitalizados em Ontario, Canadá, e *C. difficile* foi isolado em 58 cães e 28% dos isolados foram semelhantes aos comumente reportados em cães. Nesse mesmo estudo, foram reportadas 30 amostras semelhantes entre si, mas estas eram inexistentes no banco de dados do pesquisador, o que corresponde a 52% dos isolados, entretanto, a identificação dos ribotipos encontrados não foi mencionada.

Na Holanda, em um estudo que incluiu cães saudáveis, os ribotipos 010 e 014/20 foram os mais comuns nessa espécie (Koene et al., 2011). Em Thuringia, um estado alemão, Schneeberg et al., (2012) realizou um estudo de ribotipagem em diferentes abrigos de cães. Ao todo, cinco ribotipos diferentes foram encontrados, sendo eles 010, 014/020, 039, 045 e SLO066. Os ribotipos 014/20 e 010 foram encontrados em mais de um abrigo e os demais isolados apresentaram apenas um ribotipo.

Wetterwik et al., (2013), em um estudo realizado na Suécia, pesquisaram a frequência de *C. difficile* em amostras de cães saudáveis e diarreicos e avaliaram os ribotipos de cada grupo. Em cães saudáveis foram encontrados apenas ribotipos não toxigênicos 009 e 010, enquanto em cães diarreicos apenas o ribotipo 014/20.

Um estudo global pesquisou os ribotipos de *C. difficile* em amostras de diferentes espécies animais em 12 países: Áustria, Bélgica, Canadá, República Checa, Dinamarca, Alemanha, Itália, Escócia, Eslovênia, Espanha, Suíça e EUA. O ribotipo 014/20 foi encontrado em todas as espécies analisadas. Foram encontrados nove ribotipos, sendo dois mais frequentes 014/020 e 010. De maneira geral, os animais parecem apresentar menor variabilidade de ribotipos se comparados aos humanos (Janezic et al., 2012).

Na Itália, em um estudo de isolados de *C. difficile* em cães foram encontrados seus diferentes ribotipos, sendo novamente o 010 e o 014/020 os mais comuns. Os demais ribotipos encontrados foram: 031/1, 012, 039/2 e PR07805 (Spigaglia et al., 2015). Em Assam (Índia) isolou-se e caracterizou-se *C. difficile* a partir de fezes de cães não diarreicos, sendo identificados ao todo oito ribotipos, três toxigênicos (012, 014, 026) e cinco não toxigênicos (010, SLO 131, ACD 001 e ACD 003). O ribotipo mais frequente foi o 012, identificado em seis dos 16 isolados (37,5%) (Hussain et al., 2015).

Na Tabela 2 são compilados todos os estudos de ribotipagem em cães publicados até o momento. Excluiu-se os estudos realizados na América do Norte por esses não utilizarem o padrão *Cardiff*, impedindo comparações.

Tabela 2: Ribotipos de *C. difficile* relatados em cães segundo país de origem e autoria no período de 2012 a 2015.

Ribotipo(s) frequentes	Ribotipos encontrados	País	Estudo
010 e 014/20	012,021,107	Holanda	Koene et al., 2012
010 e 014/20	039,045 e SLO066	Alemanha	Schneeberg et al., 2012
010 e 014/20	002, 012,001,056, SLO 024, (CE)039, (CE)097	Vários	Janezic et al., 2012
009, 010 e 014/20	-	Suécia	Wetterwik et al., 2013
010 e 014/20	031/1, 012, 039/2 e PR07805	Itália	Spigaglia et al., 2015
12	014,026, 010, SLO 131, ACD 001 e ACD 003	Índia	Hussain et al., 2015
010 e 014/020	009, 053, 106, 602 (CE), SLO002, SLO 199, SLO 231	Brasil	Silva et al., 2015

3.3.7 Controle e Tratamento

Geralmente, o tratamento de CDI ocorre de forma semelhante ao empregado em quadros de diarreias, com a instituição do tratamento suporte e avaliação contínua da evolução dos sinais clínicos. Nos casos de diarreia associada a antibioticoterapia, é recomendado a descontinuidade, se possível.

O uso de antimicrobianos para o tratamento de *C. difficile* pode ser instituído, mas não é necessário realizá-lo em todos os casos, pois alguns quadros podem apresentar resolução espontânea e serem autolimitantes (Weese, 2011). A droga de escolha é o metronidazol, na dosagem de 10 a 15 mg/kg, via oral, BID, por cinco dias. Contudo, o uso de vancomicina, a segunda droga de escolha, é recomendada nos casos não responsivos da doença ou quando há resistência ao metronidazol. Além disto, este medicamento é utilizado no tratamento da forma severa da doença em humanos e há uma preocupação com o surgimento de microrganismos resistentes, de forma que alguns trabalhos não recomendam o uso corriqueiro deste fármaco (Marks & Kather, 2003b; Båverud, 2004; Weese et al., 2011). Outros cuidados também podem ser incorporados no tratamento da doença, tais como o uso de probióticos, adsorbantes intestinais como o carvão ativado e modificação da dieta (Kaur et al., 2002).

O tratamento de cães aparentemente saudáveis não é indicado, uma vez que não existem indícios que esta prática elimine a colonização. Também não se indica o tratamento de pets caso um dos membros da família apresente quadros isolados ou recorrentes de CDI (Marks & Kather 2003).

É importante salientar a necessidade do isolamento físico de animais suspeitos de CDI, pois, de forma análoga aos hospitais humanos, estes indivíduos podem contribuir com a disseminação do agente no ambiente e entre os pacientes. Cuidados como a higienização das mãos com água e sabão pelos clínicos também devem ser utilizados, especialmente pelos que possuem contato direto com os portadores de CDI, já que o microrganismo e seus esporos não são eliminados pelo processo de desinfecção das mãos com álcool (Macleod-Glover & Sadowski, 2010). São raros estudos avaliando a imunidade de animais ao *C. difficile* e suas toxinas, principalmente em cães, sendo necessário em um futuro próximo, o desenvolvimento de vacinas na prevenção da doença.

3.4. Outros enteropatógenos de importância em cães

Além de *C. perfringens* e *C. difficile*, diversos outros enteropatógenos são importantes em processos diarreicos em cães, e a interação entre estes patógenos é desconhecida. Entre os agentes bacterianos destacam-se *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (Cave et al., 2002; Weese, 2011). Já dentre os agentes virais, é reconhecida a importância de parvovírus, coronavírus e rotavírus (Buonavoglia et al., 2006; Brandão et al., 2009; Goddard & Leisewitz, 2010). Além disso, *Giardia* spp. é um dos patógenos comumente relatados por clínicos de pequenos animais como causador de distúrbios entéricos em animais domésticos. Os principais aspectos clínicos, patológicos, epidemiológicos, bem como aspectos relativos ao diagnóstico e tratamento das enfermidades causadas por estes patógenos serão brevemente relatados em subtópicos.

3.4.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um bastonete Gram negativo, aeróbio, não esporulado, móvel, intracelular facultativo e pertence à família Enterobacteriaceae. Existem mais de 2400 sorotipos deste microrganismo associados a doenças em homens e animais, sendo inclusive uma importante causa de intoxicação alimentar em seres humanos (Marks & Kather, 2003b). Estudos avaliando a frequência de *Salmonella* spp. em cães encontraram valores compreendidos entre 0 a 6,3%, sendo ligeiramente mais alta em animais errantes, demonstrando que o microrganismo não é comumente encontrado no trato gastrointestinal de cães saudáveis (Cave et al., 2002; Marks & Kather, 2003b; Lefebvre et al., 2006; Bagcigil et al., 2007). Mesmo em animais diarreicos, a taxa de isolamento não ultrapassou 2%, o que ratifica a hipótese de que *Salmonella* spp. não é um habitante comum da microbiota de cães e sugere que a salmonelose não ocorra com grande frequência em animais adultos, como se acreditou no passado (Sato & Kuwamoto, 1999; Cave et al., 2002; Fukata et al., 2002). Um fator de risco para a presença do agente e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da doença é o tipo de alimentação. A taxa de isolamento em amostras fecais de animais com dieta a base de alimentos crus foi de 30%. Além disso, *Salmonella* spp. foi isolada em 80% dos alimentos pesquisados, sendo uma perigosa fonte de infecção para os animais (Finley et al., 2007). Outros importantes fatores de risco para a ocorrência da doença são aglomerações e más condições higiênicas, que aumentam a pressão de infecção; e a idade dos animais, sendo mais comuns em animais mais jovens devido à microbiota imatura e à imunidade em formação (Megid et al., 2001).

O animal, quando exposto a esta bactéria, pode ser colonizado temporariamente e não apresentar a doença ou se infectar e apresentar sinais clínicos. A manifestação da doença pode variar com quadros de diarreia leve e autolimitante a quadros severos de gastroenterite hemorrágica até a morte dos animais. Os episódios de diarreia por esta bactéria ocorrem como consequência à adesão desta a porção apical do epitélio intestinal e indução de intensa resposta inflamatória com infiltrados polimorfonucleares (PMN) focais e difusos, abscessos na cripta, necrose epitelial, edema e aumento da secreção (Layton & Galyov, 2007; Santos, 2014). É comum a ocorrência de quadros septicêmicos em animais infectados, podendo levar os animais ao óbito mesmo antes do aparecimento de quaisquer sinais gastrointestinais (Megid et al., 2001). O diagnóstico clínico de salmonelose é feito a partir da associação dos sintomas clínicos com a possível exposição aos fatores de risco. Já o diagnóstico laboratorial *ante mortem* baseia-se no isolamento do microrganismo a partir das fezes. Em caso de óbito, utiliza-se o conteúdo intestinal, para confirmação de quadros entéricos e de espécimes como sangue e linfonodos, a fim de aumentar o valor diagnóstico e comprovar o envolvimento desta bactéria, já que os quadros septicêmicos são comuns (Weese, 2011). O tratamento baseia-se na terapia suporte com fluidoterapia, uso de protetores gástricos e inibidores de vômitos. O uso de antibióticos não é recomendado, uma vez que a colonização é transitória e os antimicrobianos podem aumentar o risco de resistência às drogas e a ocorrência de diarreia associada a antibioticoterapia. Entretanto, nos casos severos da doença e em pacientes imunocomprometidos, pode-se fazer o uso de antimicrobianos e a droga de escolha é definida através de antibiograma (Weese, 2011).

3.4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pleomórfica, Gram negativo, não esporulada, pertencente a família Enterobacteriaceae e normalmente encontrada no trato gastroentérico de animais saudáveis. Quando envolvida em quadros de gastroenterite, estas estirpes possuem fatores de virulência adicionais e além disto, quando o sistema imune do hospedeiro está debilitado, o organismo torna-se incapaz de debelar a infecção. Em cães, os marcadores de virulência associado as *E. coli* diarreogênicas (DEC) são definidos de acordo com existência de fatores de colonização (adesinas) que favorecem a permanência das bactérias no intestino mesmo com intensos movimentos peristálticos, ou toxinas secretadas que atuam nos mecanismos fisiológicos das células dos hospedeiros.

Os patótipos de *E. coli* são classificados pela forma da doença ou presença de fatores de virulência, destacando-se: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enteroagregativas (EAEC) e produtoras de toxina Shiga (STEC). O grupo denominado EPEC é identificado pelo gene da intimina (*eae*). Esse gene é responsável pela adesão da bactéria às vilosidades intestinais e ocasionam as lesões A/E (attaching/effacing) que alteram a arquitetura das microvilosidades. Para determinar se as colônias são típicas ou atípicas pesquisa-se o gene *bfpA*, presente nas colônias típicas e é responsável pela aderência localizada da bactéria ao epitélio intestinal. O grupo ETEC se liga aos enterócitos no intestino delgado através das fímbrias, permitindo sua multiplicação e colonização. Além disto, podem possuir o gene das toxinas termolábeis (LT) ou termoestáveis (ST). EIEC, positivas para o gene *ipaH*, possuem o potencial de destruição intestinal e inflamação, podendo ocasionar sinais clínicos extraintestinais como vômitos, cefaleia, mal-estar generalizado e diarreia. EAEC formam agregados bacterianos localizados na superfície celular com arranjos semelhantes a “tijolos empilhados” (aderência agregativa), de tal forma que esta configuração é considerada uma condição obrigatória para o padrão típico de aderência agregativa (Andrade et al., 2011).

Pesquisa-se o gene *aaf*, uma fímbria de adesão agregativa, ou o gene *aggr*, que regula a biogênese de *aaf* (Beutin, 1999; Jaffari et al., 2012; Puño Sarmiento et al., 2013). Por fim, STEC possuem como genes identidade *stx1*, *stx2* e suas variantes, que são potentes citotoxinas codificadas por fagos. Stx possui uma estrutura A1B5, onde a subunidade B é responsável pela ligação da toxina a célula alvo e a subunidade A pela quebra do RNA ribossomal, resultando em inibição da síntese proteica, o que é letal para a célula (Gyles, 2007). Na tabela 3 a seguir encontram-se os patotipos de *E. coli* pesquisados e os genes de acordo com o patotipo.

Tabela 3: Patotipos de *E. coli* e presença de fatores de virulência comuns de acordo com cada patotipo.

Patotipos	Fatores de virulência comuns
EPEC	<i>eae, bfpA</i>
ETEC	<i>elt, eltB, LT, ST, STa, STb, STaP, F18, F41, K88, K99</i>
EIEC	<i>IpaH</i>
EHEC	<i>eae, stx1, stx2</i>
STEC	<i>stx1, stx2, stx2b</i>
EAEC	<i>aggr</i>

Destes patotipos, os mais comuns em cães são EPEC, STEC e ETEC. Fatores como as fontes de infecção e os reservatórios são importantes para conhecer a epidemiologia desta doença, uma vez que se sabe que bezerros, cabras, leitões e outros animais podem atuar como reservatórios para os humanos com quadros de diarreia por *E. coli* (Puño Sarmiento et al., 2013). Mas, pouco se sabe em relação ao envolvimento de cães na transmissão destas bactérias patogênicas aos humanos e, inclusive, se os fatores de virulência encontrados em outras espécies de animais, como bezerros e suínos, podem também ser encontrados em *E. coli* do trato gastrointestinal dos caninos.

De maneira geral, sabe-se que estirpes patogênicas de *E. coli* são isoladas a partir de fezes de animais saudáveis e os sinais clínicos dos portadores podem variar de assintomáticos a quadros de diarreia hemorrágica. O sinal clínico predominante de infecção por STEC é diarreia aquosa profusa, enquanto a infecção por EIEC apresenta quadros de diarreia hemorrágica, com lesões principalmente no intestino grosso (Jaffari et al., 2012). O diagnóstico é complexo, pois sabe-se que a incidência de estirpes patogênicas e não patogênicas é semelhante em animais aparentemente saudáveis e diarreicos. Porém, por meio da associação do histórico e dos sinais clínicos com o isolamento e caracterização dos fatores de virulência por técnicas biomoleculares, é possível saber se há o envolvimento de *E. coli* patogênica. O tratamento baseia-se na terapia suporte, com reposição de fluido e eletrólitos ao animal. O uso de antimicrobianos é controverso, sendo indicado a seleção por antibiograma. Geralmente utiliza-se amoxicilina clavulanato e cefalosporinas de segunda geração, especialmente em animais com quadros severos de septicemia (Jaffari et al., 2012).

3.4.3 Parvovirus canino

Parvovirus canino são da família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Parvovirus*, espécie *Canine parvovirus*. São vírus pequenos, esféricos, medindo 20 a 25 nm de diâmetro, possuem capsídeo icosaédrico, são não envelopado s, possuem DNA fita simples e são conhecidos por ocasionar doenças em diversas espécies de mamíferos, entretanto, a maioria dos

parvovirus são espécie-específicos. (Pollock, 1984; Smith-Carr et al., 1997; Lamm & Rezabek, 2008). Parvovirose é uma importante causa de diarreia em cães, apresentando alta morbidade e mortalidade variável em animais jovens (Goddard & Leisewitz, 2010).

A enterite aguda causada por CPV-2 pode acometer cães de qualquer idade, raça ou sexo, porém filhotes entre seis semanas e seis meses são os mais susceptíveis (Pollock & Coyne, 1993; Hoskins, 1997; Prittie, 2004), devido ao declínio de anticorpos maternos e a resposta imune imatura dos filhotes neste período (Pollock, 1982; Pollock, 1984; O'Brien, 1994). Dentre os fatores predisponentes a infecção por parvovírus pode-se mencionar a falha vacinal, infestação por parasitos intestinais, elevada densidade populacional, estresse e pouca higiene ambiental (Brunner & Swango, 1985; Hoskins, 1997; Smith-Carr et al., 1997). Além disto, algumas raças são mais predispostas a esta enfermidade por características genéticas, como Rottweiler, Doberman, Pinscher, Pit Bull Terrier Americano e Labrador Retriever (Brunner & Swango, 1985; Houston et al., 1996; Smith-Carr et al., 1997). Entre os cães acima de seis meses de idade, os machos parecem ser duas vezes mais susceptíveis ao CPV entérico do que as fêmeas (Houston et al., 1996). A sazonalidade também foi reportada com pico de incidência no verão e uma queda durante o inverno (Houston et al., 1996; Shakespeare 1999). Os animais são expostos ao CPV-2 através da via fecal-oral e a evolução clínica dependerá da cepa viral, da dose infectante, e do status imune do hospedeiro (Hoskins, 1997; Smith-Carr et al., 1997). A excreção fecal do vírus ocorre três dias após o contato inicial, podendo ser encontrado até três ou quatro semanas após os sinais clínicos ou subclínicos (Johnson & Smith, 1983; Macartney et al., 1984).

O mecanismo básico de ação do parvovírus é o uso do núcleo das células do hospedeiro para se replicar, mas é importante ressaltar que a replicação viral ocorre apenas em células com rápida divisão celular, como as da cripta intestinal, as precursoras da medula óssea e os miocardiócitos. Como consequência desta replicação viral, ocorre morte celular e falha da mitose. (Smith-Carr et al., 1997; Lamm & Rezabek, 2008). A replicação viral inicia-se no tecido linfóide da orofaringe, nos linfonodos mesentéricos, timo e dissemina nas criptas do intestino delgado, via hematogena, em até quatro dias após a infecção (Appel et al., 1980; Meunier et al., 1985; Pollock & Coyne, 1993; Hoskins, 1997; Smith-Carr et al., 1997). Como as células da cripta não amadurecem e não migram em condições ideais para o topo das vilosidades, ocorre destruição do epitélio, além do colapso e atrofia das vilosidades e uma diminuição da capacidade de absorção e assimilação de nutrientes (Pollock & Coyne, 1993; Smith-Carr et al., 1997; Hoskins, 1997).

As manifestações clínicas da parvovirose são a enterite aguda e diversos sinais clínicos inespecíficos, incluindo depressão, letargia, febre, vômito e diarreia mucosa ou hemorrágica (Lamm & Rezabek, 1993; Prittie, 2004). A taxa de sobrevivência está intimamente relacionada com a instituição do tratamento, variando de 64% em cães tratados a 9,1% em animais não tratados (Otto et al., 1997). O tratamento suporte é essencial, como a fluidoterapia para corrigir da desidratação e o desequilíbrio eletrolítico, a hipoglicemia, além do uso de antieméticos, analgésicos e nutrição enteral. Dentre as drogas antimicrobianas recomendadas pode-se mencionar ampicilina, 20 mg/kg, amoxicilina clavulanato 20 mg/kg (Macintire & Smith-Carr, 1997; Prittie, 2004).

O diagnóstico definitivo inclui a demonstração de CPV nas fezes dos cães doentes, sorologia, hemograma e avaliação dos sinais clínicos e histórico do animal (Pollock & Carmichael, 1988). Entre as formas de demonstração de CPV, incluem-se: microscopia

eletrônica, isolamento viral, hemaglutinação fecal, imunocromatografia e PCR (Pollock & Carmichael, 1988; Macintire & Smith-Carr, 1997; Desario et al., 2005; JinSik et al., 2006).

O controle e a prevenção desta enfermidade são essenciais para a diminuição da incidência da parvovirose, e isto é feito a partir dos protocolos vacinais, sendo recomendada a vacinação anual das mães, a fim de garantir a proteção via colostro e, nos filhotes, três doses de vacina: na sexta, nona e décima segunda semana de vida (Goddard & Leisewitz, 2010). No que se refere a capacidade protetora e a composição das vacinas de CPV, recomenda-se que as vacinas contenham todas as variantes de CPV-2 ou as cepas circulantes no ambiente, uma vez que a vacina contra um tipo não oferece proteção eficaz em relação aos demais tipos (Cavalli et al., 2008). Deve-se ressaltar que as vacinas comercializadas atualmente possuem apenas CPV-2a e CPV-2b (Marulappa & Kapil, 2009). Acrescido a estes cuidados, é importante assegurar a higiene dos canis e a desinfecção das superfícies para prevenir a disseminação da doença (Pollock & Coyne, 1993; Hoskins, 1997; Prittie, 2004).

Atualmente, CPV-2a e CPV-2b são as espécies de parvovírus descritas com maior frequência em estudos globais da doença em cães (Goddard & Leisewitz, 2010). Porém, o estudo realizado no Brasil por Pinto e colaboradores (2012) identificou CPV-2c como o tipo mais comum nas amostras que foram avaliadas. Os relatos envolvendo o tipo CPV-2c surgiram no ano 2000, indicando elevada virulência, morbidade e morte rápida. O primeiro relato ocorreu na Itália e em seguida houveram novos casos em diferentes países do mundo como: Reino Unido, Espanha, países da América do Sul, dentre outros (Buonavoglia et al., 2001; Nakamura et al., 2004; Decaro et al., 2006; Decaro et al., 2007; Hong et al., 2007; Perez et al., 2007; Vieira et al., 2008).

3.4.4 Coronavirus canino

Coronavírus são classificados como vírus da ordem Nidovirales, família *Coronaviridae* gênero *Alphacoronavirus*, espécie *Alphacoronavirus 1*, subfamília *Coronavirinae* (Adams & Cartens, 2012), possuem RNA não segmentado, de fita simples, sentido positivo, envelopados, pleomórficos, arredondados, com até 220 nm de diâmetro (Lai & Holmes, 2001). O coronavírus canino (CCoV) é classificado em dois tipos: CCoV tipo 1 (CCoV-I) e CCoV tipo 2 (CCoV- II). O CCoV tipo 1 esta envolvido em quadros leves a moderados da doença, e os sintomas são inapetência, vômitos, diarreia fluida esverdeada e desidratação, enquanto CCoV tipo 2 é mais patogênico, os sintomas são mais severos, podendo ocorrer o óbito dos enfermos (Decaro & Buonavoglia, 2008). Geralmente, os quadros fatais da doença ocorrem associados a outros patógenos como parvovírus (CPV-2), adenovírus canino tipo 1 (ADV-1) (Decaro et al., 2007) ou ao vírus da cinomose (Decaro et al., 2004). Os filhotes de seis a 12 semanas de idade aparentam ser mais susceptíveis a doença, a qual possui elevada taxa de morbidade e baixa taxa de mortalidade (Cartwright & Lucas, 1972; Vandenberghe et al., 1980; Carmichael & Binn 1981; Tennant et al., 1991).

A infecção ocorre através do ambiente contaminado com o vírus, que ao atingir o intestino delgado, replica-se nas vilosidades e ocasionam o achatamento das células epiteliais, atrofia das vilosidades e depressão das criptas (Zapullì et al., 2008). Para o diagnóstico, faz-se o isolamento viral em cultura de células e visualização de sincícios, pode se identifica-lo também a partir de técnicas como a imunofluorescência, testes imunocromatográficos, ELISA, PCR e qPCR. O tratamento suporte, similar ao utilizado para parvovirose, também é realizado. A prevenção e o

controle da coronavirose baseiam-se na vacinação, colostragem adequada dos filhotes, isolamento dos animais enfermos, controle da densidade populacional, além da higiene e desinfecção do ambiente (Brandão et al., 2012).

3.4.5 Rotavirus

Rotavirus são vírus da família *Reoviridae*, não envelopados, possuem multicamadas icosaédricas de proteínas do capsídeo, com aproximadamente 75 nm de diâmetro e o genoma consiste em 11 segmentos em um RNA de fita dupla de forma que cada segmento é composto por um gene. São classificados em grupos e sorotipos. Existem sete grupos distintos (A a G) (Pedley et al., 1983; Nakata et al., 1986). Classificados sorologicamente avaliando a reação com antígenos detectáveis por testes sorológicos, como imunofluorescência, ELISA e imunomicroscopia. Os grupos A, B e C foram descritos em humanos e animais, enquanto os grupos D, E, F, G foram descritos apenas em animais (Estes & Cohen, 1989; Estes & Kapikian, 2006). Os sorotipos são definidos de acordo com as proteínas estruturais extra-capsídeo, VP7 e VP4, responsáveis pela neutralização do vírus. A transmissão interespecie pode ocorrer devido a elevada similaridade genética entre os diferentes vírus (Castrutti et al., 1985).

Uma vez no ambiente, o rotavírus é capaz de resistir às condições adversas e permanecer por longos períodos, o que facilita a infecção dos animais pelo contato via fecal-oral com rotavírus (CRV), que ao atingir o intestino delgado é internalizado nos enterócitos por endocitose e no citosol via transcrição e tradução se multiplica, formando vírions que são disseminados para as porções distais das vilosidades do trato intestinal após a lise dos enterócitos infectados. Consequentemente, células imaturas das criptas migram para o ápice das vilosidades, o que causa diminuição da absorção e secreção, levando a acumulação de fluido no lúmen do intestino (Holland, 1990; Ramig, 2004). Além disto, a proteína NSP4, uma proteína não estrutural, age como uma enterotoxina viral e aumenta a concentração de Ca^{++} intracelular, alterando a homeostase celular do hospedeiro e corroborando para o episódio de diarreia (Dhama et al., 2009). Normalmente, os episódios mais severos de rotavirose ocorrem quando há coinfeção entre rotavírus e outras bactérias presentes no trato intestinal ou outros vírus, como parvovírus (CPV) e coronavírus (CCoV).

Os achados clínicos são inespecíficos, os cães adultos infectados são na maioria das vezes assintomáticos, porém filhotes até os três meses de idade são mais susceptíveis e podem apresentar diarreia, inapetência e desconforto abdominal (Fulton et al., 1981; Martela et al., 2001). O diagnóstico depende da identificação do vírus nas fezes ou da detecção da resposta imune a partir dos anticorpos, como na imunofluorescência indireta ou ELISA. O tratamento suporte é indicado, e como forma de prevenir a doença é essencial o controle da densidade populacional e a higiene do ambiente (Dhama et al., 2009), uma vez que não existe vacina contra rotavirose para cães.

3.4.6 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis (sinônimo: *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*) é um protozoário comum, causador de diarreia e gastroenterite em humanos, cães e gatos. A partir de técnicas moleculares são classificados em sete tipos (A - G) (Ballweber et al., 2010). Normalmente, os cães são infectados com os tipos C e D e os humanos com os tipos A e B (Monis et al., 2003; Abe

et al., 2003; Sulaiman et al., 2003; Xiao & Fayer, 2008). O tipo A foi dividido em subtipos de A-I a A-IV e o subtipo A-I, apesar de incomum, foi relatado em cães e gatos, o que sugeriu a hipótese que os animais domésticos possam ser agentes zoonóticos de *Giardia intestinalis* (Ballweber et al., 2010).

A infecção ocorre via oral-fecal a partir do contato com alimentos, água ou ambientes contaminados com cistos de *Giardia*. No intestino delgado, os trofozoítos colonizam e aderem às microvilosidades, o que dificulta a absorção de nutrientes, e iniciam então a replicação por fissão binária. Ao atingir o cólon transformam-se em cistos, formas mais resistentes, e são eliminados nas fezes, contaminando o ambiente e retroalimentando o ciclo do agente (Ballweber et al., 2010). Cães de todas as faixas etárias estão susceptíveis a infecção por este agente, entretanto este apresenta maior frequência em cães jovens, até 12 meses e também naqueles que vivem em canis e abrigos (Itoh et al., 2006; Meireles et al., 2008; Gates & Nolan, 2009).

Os sinais clínicos da infecção são inespecíficos, associados com diarreia aguda ou crônica, perda de peso, desconforto abdominal, náusea e vômito. Mas a maioria dos animais infectados apresentam-se assintomáticos (Kirsten et al., 2004). Além disto, estudos relatam que a frequência da doença aumenta nos períodos de inverno (Fontanarrosa et al., 2006). O diagnóstico pode ser realizado a partir de imunofluorescência indireta ou ensaios que detectem o agente (como kits de testes imunocromatográficos). Além destas técnicas, pode-se visualizar os trofozoítos, em soluções salinas, e os cistos por flotação ou sedimentação, através de microscopia óptica (Ballweber et al., 2010). Os tratamentos mais eficazes utilizam drogas como nitroimidazol,

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Realização do Experimento

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

4.2 Material fecal de cães

Foram coletadas 154 amostras fecais no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Destas, 92 de animais diarreicos e 62 de animais aparentemente saudáveis. Os espécimes de cães diarreicos foram coletados no Hospital Veterinário da UFMG e em duas clínicas particulares parceiras do estudo (Clínica Vether e Veterinária São Francisco). As amostras de cães diarreicos foram obtidas de acordo com a demanda dos casos que ocorriam nas clínicas durante o período de um ano (julho de 2014 a julho de 2015). O parâmetro utilizado para considerar as fezes como diarreicas foi o aumento da frequência, fluidez e/ou volume das fezes (Hume, 2014). Tais espécimes clínicos foram coletados durante a rotina do atendimento ambulatorial e dados clínicos e epidemiológicos (idade, sexo e aspecto da diarreia) foram anotados para avaliação futura.

As amostras de fezes de animais aparentemente saudáveis (grupo controle) foram obtidas a partir de cães de alunos da Escola de Veterinária da UFMG, em feiras de adoção e também através de proprietários que estavam com seus cães em praças públicas. Todos os animais

incluídos no grupo controle não possuíam histórico de doenças gastrointestinais nos últimos seis meses e encontravam-se clinicamente saudáveis. Sempre que possível, avaliava-se o hemograma dos animais participantes do experimento. Os espécimes foram acondicionados em tubos coletores de material clínico e mantidos a - 20 ° C até o processamento.

As amostras de cães controle foram coletadas de acordo com a faixa etária, com o objetivo de parrear com as idades do grupo de cães diarreicos, na proporção mínima de um animal controle para cada dois cães diarreicos (Tabela 4). As divisões das faixas etárias foram definidas ao longo do experimento com o intuito de englobar diferentes fases da vida de um cão e encontrar possíveis relações destes dados com os patógenos pesquisados, mantendo as proporções definidas entre o grupo diarreico e controle. Assim, até os seis meses, avaliou-se a fase em que os filhotes não são totalmente imunocompetentes e estão sob a proteção colostrálica, no qual os anticorpos maternos podem ser encontrados no organismo dos filhotes até a sexta ou décima sexta semana de vida. Além disto, este período engloba também o início dos protocolos vacinais, que ocorrem a partir dos 45 dias de vida, e finalizam-se até os quatro meses. Dos sete aos doze meses os cães já são considerados imunocompetentes. Dos 13 até os 60 meses avaliou-se os cães considerados adultos jovens e a faixa etária a partir dos 61 meses englobou animais da fase adulta até idades mais avançadas (idosos), especialmente para as raças de cães de grande porte.

Tabela 4: Distribuição das amostras de fezes dos cães por faixa etária e proporção das amostras de animais diarreicos e aparentemente saudáveis.

Cães	Faixa etária (Meses)				Total
	0 a 6	7 a 12	13 a 60	> 61	
Diarreicos	30 (32,6%)	17 (18,4%)	16 (17,3%)	29 (31,5%)	92
Não diarreicos	15 (24,1%)	11 (17,7%)	21 (33,8%)	15 (24,1%)	62
Total	45 (29,2%)	28 (18,1%)	36 (23,3%)	44 (28,5%)	154 (100%)
Proporção*	2,0	1,54	0,76	1,93	1,48

*Proporção de amostras de cães diarreicos e controle

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA) da UFMG, protocolo nº 51/2015.

Não foram realizadas pesquisas para agentes parasitológicos pois para a realização destes procedimentos necessitavam-se de fezes frescas e as amostras fecais obtidas foram acondicionadas em temperatura de congelamento (-20° C). Além disto, a mão de obra e recursos disponíveis eram limitados, dificultando ainda mais a execução das técnicas.

4.3 *Clostridium perfringens*

4.3.1 Isolamento

Para isolamento de *C. perfringens* foram utilizados dois protocolos em paralelo: plaqueamento direto e plaqueamento após enriquecimento. No protocolo de plaqueamento direto, uma alçada de fezes, equivalente a 0,08 a 0,12 gramas, foram diluídas em 900 µL de salina 0,85% p/v e plaqueadas em ágar sulfito de polimixina sulfadiazina (SPS, Disco Laboratories, Detroit,

EUA). As placas foram incubadas em a 37 °C por 24 horas em câmara de anaerobiose (Thermo Scientific, Brasil).

No protocolo de pré-enriquecimento, uma alçada ou 50 µL de cada amostra foram adicionados a um tubo rosca contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco, Estados Unidos da América) e incubadas a 37 °C por 24 horas em ambiente de anaerobiose. Após esse período, 10 µL foram plaqueados em ágar SPS e incubados de acordo com os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

4.3.2 Genotipagem e detecção de fatores de virulência adicionais por PCR

Três a cinco colônias sulfitorredutoras, sugestivas de *C. perfringens*, foram submetidas a PCR para genotipificação (Vieira et al., 2008) e detecção dos seguintes fatores de virulência adicionais: beta-2 (*cpb2*) e enterotoxina (*cpe*) (Vieira et al., 2008). Somente os animais positivos para o gene *cpe* foram submetidos a PCR para detecção dos genes *netB*, *netE* e quando o último fosse identificado, pesquisava-se também os genes *netF* e *netG* (Gohari et al., 2015). O desenho dos primers utilizados encontram se na Tabela 5.

Tabela 5: Lista de primers de *C. perfringens* utilizados nas PCRs, suas respectivas denominações, sequência, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referências bibliográficas.

Agente	Gene	Primer	Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>C. perfringens</i>	<i>cpa</i>	CPA_F	TGCTAATGTTACTGCCGTTGATAG	247	Uzal et al., 1997
		CPA_R	ATAATCCCAATCATCCCAACTATG		
	<i>cpb</i>	CPB_F	AGGAGGTTTTTTTTATGAAG	1025	Uzal et al., 1997
		CPB_R	TCTAAATAGCTGTTACTTTGT		
	<i>etx</i>	ETX_F	TACTCATACTGTGGGAACCTTCGATACAAGC	403	Uzal et al., 1997
		ETX_R	CTCATCTCCCATAACTGCACTATAATTTCC		
	<i>iA</i>	IA_F	TTTTAACTAGTTCATTTCTAGTTA	298	Uzal et al., 1997
		IA_R	TTTTTGTATCTTTTTCTCTAGATT		
	<i>cpe</i>	CPE_F	GGAGATGGTTGGATATTAGG	223	Meer & Songer, 1997
		CPE_R	GGACCAGCAGTTGTAGATA		
	<i>beta-2</i>	beta 2_F	ATTATGTTTAGGAATACAGTTA	741	Heap et al., 2009
		beta 2_R	CAATACCCTTCACCAAATACTC		
	<i>netE</i>	<i>netE</i> _F	TAGAAAACGTTCAATTGTATGG	601	
		<i>netE</i> _R	AGAAAGCGCTGATACAGCTAATAAA		
<i>netF</i>	<i>netF</i> _F	AACAATATGTACAGGTATAACT	862	Gohari et al., 2015	
	<i>netF</i> _R	TTGATAGGTATAATATGGTTCT			
<i>netG</i>	<i>netG</i> _F	TTGTTCCAGGATTAGTAGCATT	860		
	<i>netG</i> _R	CATGAGTTGCATAAGTTGGTGT			
<i>netB</i>	<i>netB</i> _F	CGCTTCACATAAAGGTTGGAAGGC	316	Bailey et al., 2013	
	<i>netb</i> _R	TCCAGCACCAGCAGTTTTTCCT			

4.3.3 Pesquisa de enterotoxina

A pesquisa da enterotoxina de *C. perfringens* foi realizada diretamente no conteúdo fecal dos cães diarreicos, exclusivamente naqueles positivos para *C. perfringens cpe*, e por meio de um kit de ELISA comercial (Ridascreen, *Clostridium perfringens* Enterotoxin, R-Biopharm, Alemanha). As reações foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4 *Clostridium difficile*

4.4.1 Isolamento

Para isolamento de *C. difficile* foram utilizados dois protocolos em paralelo: plaqueamento direto e plaqueamento após enriquecimento. No protocolo de plaqueamento direto, as amostras fecais foram submetidas a um choque com álcool absoluto (96%) na proporção 1:1 (v/v) durante 30 minutos a 37 °C (Borriello & Honour, 1981). Em seguida, 10µL foram plaqueados em ágar CCFA (Himedia, Índia) enriquecido com 0,1% de taurocolate (Sigma-Aldrich Co, St. Louis) e sangue equino a 5% (v/v) e incubadas 37 °C por, no mínimo, 72 horas (Ramirez et al., 2010) em câmara de anaerobiose (Modelo 1025/1029, Thermo Scientific). No protocolo de pré-enriquecimento, uma alçada ou 50 µL de fezes foram adicionadas em caldo taurocolate cicloserina cefotaxina frutose (TCCFB), um caldo seletivo composto por taurocolate; um sal biliar, dois antibióticos: cicloserina e cefoxitina, e frutose como carboidrato. Estes foram incubados em ambiente de anaerobiose a 37 °C por 5 a 7 dias. Em seguida, uma alíquota de 500 µL do caldo foi submetido ao choque com álcool absoluto (96%) na proporção 1:1 (v/v) durante 30 minutos a 37 °C, seguido por plaqueamento de 20 µL em ágar sangue enriquecido com 0,1% taurocolate e incubado por, no mínimo, 72 horas a 37 °C em câmara de anaerobiose.

4.4.2 Confirmação da identidade dos isolados de *C. difficile* e detecção de fatores de virulência por PCR

Para cada amostra, três a cinco colônias com características morfotinturiais sugestivas de *C. difficile* foram coletadas e submetidas a extração térmica do DNA e submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção de um gene constitutivo (*tpi*) e dos genes codificadores da toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) e toxina binária (*cdtB*) (Silva et al., 2011). Os primers utilizados na reação são descritos na Tabela 6. Estirpes positivas para pelo menos um dos genes codificadores de toxinas foram consideradas toxigênicas, enquanto aquelas positivas apenas para o gene *tpi* foram classificadas como não toxigênicas.

Tabela 6: Lista de primers de *C. difficile* utilizados nas PCRs, suas respectivas denominações, sequência, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referências bibliográficas.

Agente	Gene	Primer	Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Referência	
<i>C. difficile</i>	<i>tcdA</i>	tcdA_F	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT	365	Sambol et al., 2000	
		tcdA_R	GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT			
	<i>tcdB</i>	tcdB_F	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA	160		
		tcdB_R	ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT			
	<i>Tpi</i>	tpi_F	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	210		Dhalluin et al., 2003
		tpi_R	CATAATATTGGGTCTATTCTTAC			
	<i>cdtB</i>	cdtB_F	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	262		Persson et al., 2008
		cdtB_R	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG			

4.4.3 Ribotipagem

A ribotipagem foi realizada de acordo com Bidet et al., (1999). Uma colônia de cada estirpe foi adicionada a 100 µl de água ultrapura e fervida por 12 minutos. Após centrifugação a 15.000 x g por 10 minutos, 5 µl do sobrenadante foram utilizados como molde para uma PCR de 50 µl contendo 1 µM de primers 5'- CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG- 3' e 5'- GCGCCCTTTGTAGCTTGACC-3', 2U de taq polimerase (Pharmacia, Reino Unido), 2,25 mM MgCl₂. O mix foi submetido a 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min (Stubbs et al., 1999). Após a reação, o produto foi concentrado para um volume final de aproximadamente 25 µl por aquecimento a 75 °C por 105 min e então submetido a eletroforese por 6 horas a 8 °C com 150 mA e em gel de agarose a 3%. Para facilitar a leitura, o marcador de peso molecular foi adicionado a cada cinco canaletas de amostras (100 bp; Advanced Biotechnologies, Epsom, União Britânica). As bandas resultantes foram observadas após coloração com brometo de etídio por 20 min (0.5 µg/µl) e comparadas com a biblioteca de ribotipos do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG por meio do software Bionumerics® (Applied Maths NV, Bélgica). Os ribotipos não identificados pelo Laboratório de Anaeróbios foram encaminhadas para o *Institute of Public Health Maribor* (Eslovênia) para identificação.

4.4.4 Pesquisa das toxinas A e B de *Clostridium difficile*

Uma alíquota dos espécimes positivos para isolamento de *C. difficile* toxigênico foram submetidos a pesquisa das toxinas A e B por meio de um *kit* comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Wampole *C. difficile* TOX A/B II - Techlab, Estados Unidos da América). As reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5 *Salmonella* spp.

4.5.1 Isolamento

Para o isolamento de *Salmonella* spp. foram utilizados dois protocolos em paralelo: plaqueamento direto e plaqueamento após enriquecimento. No plaqueamento direto, a amostra fecal foi diluída na proporção 1:10 em salina 0,85% p/v e em seguida plaqueada em ágar Hektoen (Difco Hektoen Enteric Agar, BD, Estados Unidos da América) e incubadas em aerobiose, a 37°C por 24 horas.

O protocolo de enriquecimento foi realizado em paralelo, a partir de uma alçada ou 50 µL de fezes que foram adicionados ao caldo BHI (Difco, Estados Unidos da América), e incubados em ambiente de aerobiose a 37°C por 24 horas. Após este período, 1 mL do caldo foi transferido para 9 mL de água peptonada (Buffered Peptone Water, BD, Estados Unidos da América) e então incubados em ambiente de aerobiose a 37°C por 24 horas. Após a incubação, 1mL foi transferido para 9 mL de caldo tetrionato (Tetrathionate Broth Base w/o Iodine & BG, Himedia, Índia) e incubados em aerobiose a 42°C por 48 horas. Em sequência, 10 µL eram semeados ágar Hektoen (Difco Hektoen Enteric Agar, BD, Estados Unidos da América) e incubados em ambiente de aerobiose a 37°C por 24 horas para avaliação do crescimento de colônias sugestivas de *Salmonella* spp. (Waltman, 2000). Três a cinco colônias verdes com centro enegrecido foram coletadas e submetidas a extração térmica para realização da PCR de acordo com Kwang et al., (1996) a fim de identificar o gene *ompC* e confirmar a identidade da mesma. O desenho do primer utilizado encontra se na Tabela 7.

Tabela 7: Lista de primers de *Salmonella* utilizados nas PCRs, suas respectivas denominações, sequências, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referência bibliográfica.

Agente	Gene	Primer	Sequência 5´- 3´	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>Salmonella</i> spp.	<i>OmpC</i>	S18	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT	159	Kwang et al., (1996)
		S19	AGAGGTGGACGGTTGCTGCCGTT		

4.6 *Escherichia coli*

4.6.1 Isolamento

Foi realizado o plaqueamento direto em ágar MacConkey (MacConkey II Agar, BD, Estados Unidos da América) e as placas foram incubadas na estufa de aerobiose à 37°C por 24 horas (Puño-Sarmiento et al., 2013). Em paralelo, o protocolo de enriquecimento foi realizado pela adição de uma alçada ou 50 µL em caldo BHI, que foi incubado em estufa de aerobiose sob as mesmas condições já citadas e posteriormente foi feito o plaqueamento direto em ágar MacConkey.

4.6.2 Detecção de fatores de virulência por PCR

De cada espécime, uma a três colônias sugestivas de *E. coli* foram coletadas e submetidas a extração térmica do DNA. Os cinco patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli*

enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foram determinados de acordo com os genes codificadores de fatores de virulência, sendo pesquisados: intimina ou *eae* (proteína da membrana externa) e *bfp* uma proteína que determina a adesão típica ou atípica da bactéria às células, toxinas: shiga 1 (*stx1*), toxina shiga 2 (*stx2* e *stx2b*), a toxina termoestável (*sta*, *stb* e *stap*), toxina termolábil (*LT*, *elt*), fímbrias (*F41*, *F18*, *K99*, *K88*, *987*) e genes relacionados as EAEC e EIEC (*ipaH* e *aggR*) (Ratchtrachenchai, 1997; Toma et al., 2003; Aranda et al., 2004; Blanco et al., 2006; Macedo et al., 2007; Puño-Sarmiento et al., 2013; Kartsev et al., 2015). As referências e o desenho dos primers utilizados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8: Lista de primers de *E. coli* utilizados nas PCRs, suas respectivas denominações, sequência, tamanho do segmento em pares de base (pb) e referências bibliográficas.

Gene/ Alvo	Primer	Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>eae</i>	eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	Blanco et al., 2006
	eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>bfp</i>	<i>bfp</i> F	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326	Gunzburg et al., 1995
	<i>bfp</i> R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>stx1</i>	stx1_F	TTCGCTCTGCAATAGGTA	555	Andrade et al., 2012
	stx1_R	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT		
<i>stx2</i>	stx2_F	AATAGTATA CGG ACA GCG AT	733	Macedo et al., 2007
	stx2_R	TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC		
F41	F41_F	AGTATCTGGTTCAGT GAT GG	612	Macedo et al., 2007
	F41_R	CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC		
<i>IpaH</i>	ipaH 1	G TTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	600	Aranda et al., 2004
	ipaH 2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
<i>stb</i>	stb_F	TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT	113	Macedo et al., 2007
	stb_R	CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA		
LT	LT_F	GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT	272	Macedo et al., 2007
	LT_R	TGG TCT CGG TCA GAT ATG T		
987	987_F	GTA ACTCCACCGTTTGTATC	409	Macedo et al., 2007
	987_R	AAGTTACTGCCAGTCTATGC		
<i>stx2b</i>	stx2B_F	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC	118	Andrade et al., 2012
	stx2F_R	AGGGGTCGATATCTCTGTCC		
<i>eltB</i>	ltB_F	GGGTTATTTACGGCGTTACTATCC	271	Kartsev et al., 2015
	ltB_R	GGGGTGTGAATCTTAATGTGTCC		
<i>elt</i>	elt_F	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322	Toma et al., 2003
	elt_R	CCATACTGATTGCCGCAAT		
<i>stap</i>	<i>stap</i> _F	CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT	158	Macedo et al., 2007
	<i>stap</i> _R	TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG		
F18	F18_F	TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA	313	Macedo et al., 2007
	F18_R	ACTTACAGTGCTATTCGACG		
K88	K88_F	GTATCTGTCCGAGAATATCA	499	Macedo et al., 2007
	K88_R	GTTGGTACAGGTCTTAATGG		
K99	K99_F	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG	314	Macedo et al., 2007
	K99_R	GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTC		
<i>sta</i>	sta_F	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA	190	Andrade et al., 2012
	sta_R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA		
<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	Ratchtrachenchai, 1997
	aggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		

4.7 Extração de DNA e Amplificações

A extração térmica foi realizada a 98°C por 20 minutos (Baum et al., 2004). As amplificações ocorreram em termociclador (Veriti 96 - Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos da América) e os produtos foram visualizados sob luz UV em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América). 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).

4.8 Pesquisa direta de Parvovirus tipo 2, Coronavirus, Rotavirus e *Giardia*

Todas as amostras de fezes foram submetidas a três testes imunocromatográficos em cassetes (testes rápidos) para Parvovírus Canino tipo 2, Coronavírus, Rotavirus e *Giardia* spp. (Ecodiagnóstica, Brasil). As reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das frequências foi analisada por meio de tabelas de contingência a 5% de significância, pelo teste exato de Fisher (Sampaio, 2010), buscando encontrar associações principalmente entre os patógenos pesquisados, idade e ocorrência de diarreia. Para o cálculo de Odds Ratio utilizou-se o programa VassarStats (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 154 animais observados, 40,3% encontravam-se aparentemente saudáveis e 59,7% apresentavam um ou mais sinais clínicos indicativos de diarreia. Em relação a faixa etária dos 92 animais diarreicos avaliados, 33,7% tinham idade entre zero e seis meses, 18,4% entre sete a 12 meses, 16,3% entre 13 e 60 meses e 31,5% eram maiores do que 61 meses (Figura 3). Percebe-se uma distribuição bimodal da ocorrência de diarreia nos dois extremos de idades: filhotes até seis meses e idosos com idade superior a 61 meses, equivalendo a mais de 65% do total das amostras coletadas.

Dentre os animais diarreicos, 52,1% obtiveram resultado negativo para todos os enteropatógenos pesquisados, sendo possivelmente quadros causados por fatores não infecciosos, como mudanças repentinas na dieta, alimentos gordurosos ou com baixa digestibilidade, estresse, intoxicações (Mahl, 1994; Simpson, 2004). Deve-se considerar ainda que outros agentes infecciosos não pesquisados, como *Campylobacter* spp., *Norovirus*, *Lawsonia* e agentes parasitários não inclusos neste estudo possam ter sido os responsáveis por alguns desses quadros (Marks et al., 2011). Além disso, como a sensibilidade dos testes não é 100%, alguns animais infectados com microrganismos presentes no escopo deste trabalho podem ter sido erroneamente inseridos nesta categoria. Em um estudo visando identificar coinfeção entre enteropatógenos caninos, não se encontrou causa infecciosa em apenas 31,7% dos animais diarreicos (Gizzi et al., 2014). Apesar desta diferença, deve-se ressaltar que os experimentos foram realizados em áreas geográficas diferentes e a técnica utilizada no trabalho citado foi PCR em tempo real, mais sensível que diversos métodos utilizados no presente estudo.

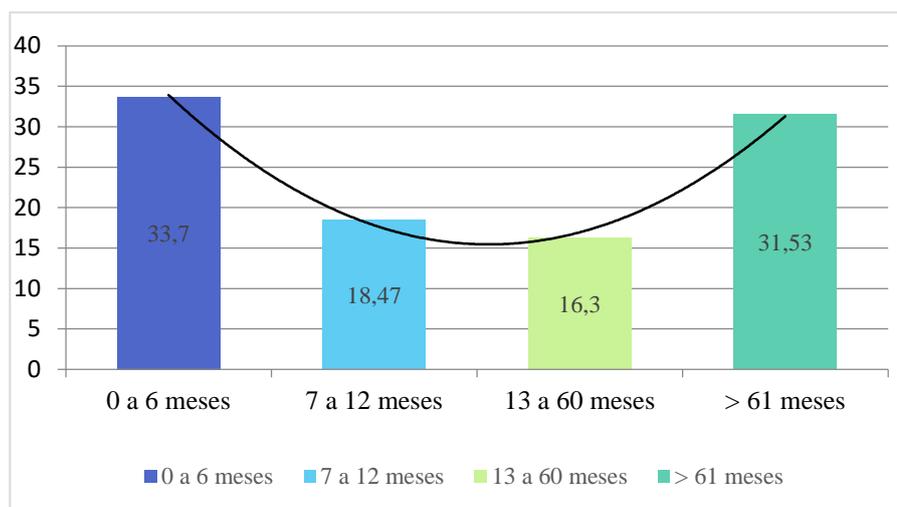


Figura 3: Percentual de fezes diarreicas dos cães de acordo com a faixa etária de 0 a 6 meses; 7 a 12 meses; 13 a 60 meses e maiores do que 61 meses.

Ainda em relação aos animais diarreicos, foi possível identificar pelo menos um dos agentes patogênicos pesquisados em 47,8%. Já em relação aos cães aparentemente saudáveis, foram observados possíveis patógenos em 50% dos animais. Na tabela 9 estão dispostas as porcentagens de infecção de animais diarreicos e aparentemente saudáveis de acordo com o agente etiológico encontrado, sendo eles, *C. perfringens*, *C. difficile*, patótipos de *E. coli*, *Salmonella*, parvovírus (CPV), rotavírus (CRV), coronavírus (CCV) e *Giardia*.

As taxas de isolamento de *C. perfringens* tipo A encontradas no presente estudo se encontram dentro da ampla faixa de variação citada em outros trabalhos (11 a 100%), e já é bem estabelecido na comunidade científica o fato deste agente ser comumente encontrado no trato gastrointestinal de cães saudáveis (Weese et al., 2001b, Marks et al., 2002; Silva et al., 2013). Especificamente em cães diarreicos, as taxas de isolamento descritas na literatura variam de 27 a 86%, em consonância com o resultado encontrado neste experimento (Weese et al., 2001b; Cassutto & Cook, 2002; Marks et al., 2002; McKenzie et al., 2010). Apesar da diferença numérica entre as taxas de isolamento, a análise estatística demonstrou que não houve associação significativa entre cães saudáveis e diarreicos, em contraste com o relatado por Gizzi et al., (2014) em que a detecção do microrganismo foi significativamente maior no grupo de animais diarreicos. Considerando que este patógeno é comumente isolado em cães independente da condição clínica e os resultados encontrados no presente estudo, pode-se inferir que a identificação de *C. perfringens* tipo A não é um bom marcador para o diagnóstico de diarreia por este agente, como já esperado (Marks et al., 2002; Goldstein et al., 2012; Silva & Lobato, 2015).

Tabela 9: Resultados dos enteropatógenos *C. perfringens*, *C. difficile*, *E. coli*, *Salmonella*, Parvovirus (CPV), Rotavírus (CRV), Coronavírus (CCV) e *Giardia* em cães diarreicos e não diarreicos, total resultados positivos, percentual e valor p.

Agente	Resultado	Diarreico (%)	Não diarreico (%)	Total (%)	Valor p	ODDS RATIO (O. R.)
<i>C. perfringens</i>	tipo A	50	35,4	44,1	0,097	1,81
	<i>cpe</i> +	10,8*	0	6,4	0,006	Infinito
	<i>cpe</i> + <i>net</i> +	7,6	0	4,5	0,042	Infinito
	ELISA CPE	5	0	n.s.a	n.s.a	n.s.a
<i>C. difficile</i>	Isolamento	20,6*	4,8	14,2	0,008	5,11
	A+B+	11,9*	0	7,1	0,032	Infinito
	A-B-	8,7	4,8	7,1	0,526	1,87
	ELISA A/B	63,6	0	n.s.a	n.s.a	n.s.a
<i>E. coli</i>	EPEC	11,9	17,7	14,2	0,352	0,62
	STEC	1,0	3,2	1,9	0,565	0,32
	ETEC	3,2	1,6	2,5	0,648	2,05
	ATÍPICA	1,0	0	0,006	1	Infinito
<i>Salmonella</i>	+	0	0	0	n.s.a	n.s.a
CRV	+	1,0	1,6	1,2	1	0,67
CCV	+	2,1	3,2	2,5	1	0,66
CPV	+	10,8 *	0	6,4	0,01	Infinito
<i>Giardia</i>	+	10 *	3,2	7,1	0,05	3,25

* Indica nível de significância com o valor $p < 0,050$

n.s.a indica que a análise não se aplica ao dado apresentado.

Em relação a impossibilidade de associar a detecção do agente ao quadro clínico de diarreia, diversos grupos de estudo têm procurado um marcador molecular para associar a diarreia por *C. perfringens* em cães, sendo o gene *cpe*, responsável pela produção da enterotoxina, um dos mais pesquisados neste sentido (Weese et al., 2001). Esta associação foi descrita em diversos estudos e revisões publicadas: Marks & Kather (2003b); Weese (2011); Goldstein et al., (2012); Silva et al., (2013); Silva & Lobato, (2015). No presente estudo, *C. perfringens cpe* positivo foi encontrado em 10,8% das amostras de cães diarreicos e em 0% dos animais não diarreicos, sendo forte a associação entre a presença de *C. perfringens cpe* positivo e a ocorrência de diarreia (valor $p = 0,006$). Um total de 21,7% das estirpes de *C. perfringens* isoladas de cães diarreicos foram positivas para a presença deste gene, ao passo que nenhuma estirpe isolada de animais não diarreicos apresentou-se como *cpe* positiva, mais um indício de que esse gene, identificado em mais de um quinto das estirpes de animais diarreicos, tenha alguma relação com quadros diarreicos na espécie em questão, em consonância com o relatado em estudos prévios (Weese et al., 2001b; Cave et al., 2002; McKenzie et al., 2010; Silva et al., 2013).

As fezes dos animais positivos para *C. perfringens cpe* foram submetidos ao ELISA para pesquisa da toxina CPE, sendo que cinco das dez amostras (50%) testadas foram positivas. Existem três hipóteses para explicar a ausência da toxina CPE em fezes positivas para *C. perfringens cpe* positivo. A primeira, é relativa a expressão gênica: das 10 estirpes isoladas,

apenas cinco estariam expressando o gene e produzindo a toxina. A segunda hipótese seria sustentada na possibilidade da degradação da toxina em alguns espécimes fecais, inviabilizando sua detecção. Por fim, a terceira hipótese (até certo ponto ligada a segunda) diz respeito à sensibilidade do teste ELISA utilizado. Sabe-se que o teste foi padronizado para humanos e especula-se que sua sensibilidade para espécimes de cães não seja alta, o que levaria a uma considerável quantidade de animais falso-negativos. Testes de ELISA para a pesquisa da toxina CPE são utilizados em clínicas em várias partes do mundo para o diagnóstico de diarreia por *C. perfringens* e alguns trabalhos já relataram que há uma associação entre a detecção da toxina nas fezes e a presença de diarreia (Marks et al., 2002; Silva et al., 2013; Busch et al., 2015). Ainda assim, não há um consenso que a toxina CPE desempenhe um papel essencial nos quadros de CPAD (Allenspach, 2015; Busch et al., 2015).

A ausência de confirmação categórica que a enterotoxina é responsável por quadros de diarreia em cães levou a pesquisas buscando outros fatores de virulência, destacando-se as recém descritas toxinas NetE, NetF e NetG (Gohari et al., 2015). No presente estudo, os genes *netE*, *netF* e *netG* foram encontrados em sete amostras de *C. perfringens*, todas essas positivas ainda para o gene *cpe* e oriundas de cães com diarreia. Além disto, na análise estatística o valor p encontrado foi de 0,042 indicando que houve uma associação entre a presença dos genes *netE*, *netF* e *netG* e a ocorrência de diarreia. Esse resultado corrobora com o descrito por Gohari et al., (2015), que também encontrou os genes *netE*, *netF* e *netG* exclusivamente em cães adultos e diarreicos. Avaliando exclusivamente as estirpes *cpe* positivas, 70% foram positivas para os genes supracitados. Todos os animais positivos possuíam idade superior a 12 meses (adultos), apresentavam-se, em sua maioria, com fezes hemorrágicas e com os quadros de evolução rápida. No estudo de Gohari et al., (2015) todas as amostras diarreicas que possuíam os genes das três recém descritas toxinas do grupo Net eram hemorrágicas, o que está em consonância com o presente estudo. Entretanto, todos os casos avaliados por Gohari et al., (2015) foram fatais. Já no presente estudo, apenas um dos sete casos foi fatal (14,28%), levando a crer que a infecção por *C. perfringens* possa estar envolvida em quadros agudos, porém menos dramáticos que aqueles inicialmente descritos por Gohari et al., (2015). Deve-se enfatizar ainda que a toxina CPE foi encontrada ainda em três casos dos sete descritos (42,8%). Levando em consideração os estudos prévios e os achados do presente trabalho, sugere-se que estas toxinas realmente tenham um importante papel na diarreia por *C. perfringens* em cães, fomentando novos estudos a fim de compreender sua importância, envolvimento e gravidade nestes quadros.

Ainda não existe um consenso para diagnóstico laboratorial da infecção por *C. perfringens* em cães. Com isso, preparou-se uma tabela avaliando diferentes panoramas de diagnóstico (Tabela 10). Deve-se destacar que foram detectadas quatro coinfeções nas quais isolou-se *E. coli* enteropatogênica, *Giardia* e *C. difficile*. A idade destes animais eram 23, 17, 12 e 147 meses respectivamente (Tabela 10). O cão de 12 meses que possuía coinfeção entre *C. perfringens* e *C. difficile* toxigênico foi a óbito e os achados relevantes deste caso serão descritos a diante.

A detecção de CPE e *cpe* ocorreu principalmente em cães adultos, sendo que 90% destes possuíam idade igual ou superior a 12 meses. É interessante salientar que nos relatos de casos fatais de diarreias em cães por *C. perfringens* de Sasaki et al., (1998) e Schlegel et al., (2012), os animais tinham seis e dois anos, respectivamente, corroborando com a idéia de que esta afecção parece ser mais frequente em cães na fase adulta.

Tabela 10: Resultados, coinfeções e óbitos em isolados de *C. perfringens* de acordo com os genes *cpe*, *netE* e toxina CPE.

<i>C. perfringens</i>	Proporção (%)	Coinfeções	Idade
<i>cpe</i> ⁺ e CPE ⁺	1/5 (20%)	CCV	3 meses
<i>cpe</i> ⁺ e <i>net</i> ⁺ (CPE + ou -)	4/5 (80%)	<i>C. difficile</i> toxigênico EPEC <i>Giardia</i>	Entre 12 e 147 meses

Ao todo foram identificadas 12 coinfeções, sendo dez comorbidades não fatais e duas fatais. Em relação as dez coinfeções não fatais, sete casos possuíam fezes hemorrágicas e três fezes não hemorrágicas. Gizzi *et al.*, (2014) sugeriram que as coinfeções são mais comuns em cães até 12 meses de idade, achados que estão em consonância com o presente estudo uma vez que em 66,7% (8 das 12 coinfeções) os cães tinham até um ano de idade.

Os dois casos fatais ocorreram em cães com fezes hemorrágicas e os resultados revelaram coinfeção entre *C. perfringens* e outros dois agentes: CCV e *C. difficile*. Porém, deve-se salientar que não houve diferença significativa em relação a coinfeção e o risco de morte dos animais. Trabalhos que endossam este achado como o de Griffiths *et al.*, (2011) e Bhavnani *et al.*, (2012), enfatizam que nas coinfeções os patógenos agem em sinergia e um microrganismo pode favorecer a presença do outro, aumentando a quantidade e/ou virulência destes, resultando em quadros mais severos. A coinfeção entre o isolado de *C. perfringens* portador do gene *cpe* e CCV sugerem justamente esse sinergismo, pois sabe-se que as lesões ocasionadas por CCV nos enterócitos não são severas a ponto de culminar com o óbito. Além disto, a coronavirose possuiiria elevada morbidade e baixa mortalidade, sendo os casos mais severos, geralmente, associados a agentes secundários (Tennant *et al.*, 1991), como *C. perfringens* neste caso.

O outro caso fatal de coinfeção ocorreu em um cão de 147 meses que foi diagnosticado com infecção por *C. perfringens* (estirpe positiva para os genes *cpe*, *netE*, *netF*) e *C. difficile* (estirpe toxigênica e detecção das toxinas A/B). O histórico do animal revelou que este estava com a vacinação em dia e não havia apresentado nenhuma doença nos últimos meses. Após apresentar um episódio de diarreia hemorrágica por dois dias, o cão foi levado ao hospital veterinário. Os clínicos relataram que o animal encontrava-se apático, severamente desidratado e foi a óbito poucas horas após a internação. Realizou-se a necropsia e dentre os achados, observou-se a distensão do intestino delgado por gases e o conteúdo intestinal hemorrágico. Na histopatologia foram encontradas lesões sugestivas de necrose nas vilosidades e muitos bacilos Gram positivos aderidos na superfície luminal dos vilos, semelhante a bactérias do gênero *Clostridium* (Figura 4). A evolução aguda do quadro e os achados *post mortem* são compatíveis com quadros de diarreia aguda associada a *C. perfringens* tipo A (Weese, 2011; Marks *et al.*, 2011; Schlegel *et al.*, 2012), sendo ainda semelhantes aos casos fatais de diarreia hemorrágica canina associados as toxinas NetE, NetF e NetG (Gohari *et al.*, 2015). Além do caso descrito, outro de coinfeção entre *C. perfringens* e *C. difficile* foi diagnosticado no presente estudo. Esse, porém, não foi fatal e o cão recuperou-se após três dias de tratamento com trimetoprim/sulfadiazina (Bactrim®), omeprazol e fluidoterapia. Estes achados sugerem que a infecção por *C. perfringens* pode estar envolvida em casos menos severos de enterite hemorrágica,

contrariando os relatos por Gohari et al., (2015). Além disto, os achados levam a acreditar que a infecção por *C. perfringens* pode ter sido um fator predisponente para *C. difficile* ou vice-versa. Estes casos foram os primeiros relatados no mundo de coinfeção entre esses dois agentes e demonstram a necessidade de novos estudos para compreender se há algum sinergismo entre *C. perfringens* e *C. difficile* em distúrbios entéricos, bem como compreender os fatores predisponentes das diarreias por *C. perfringens netE* positivos em cães.

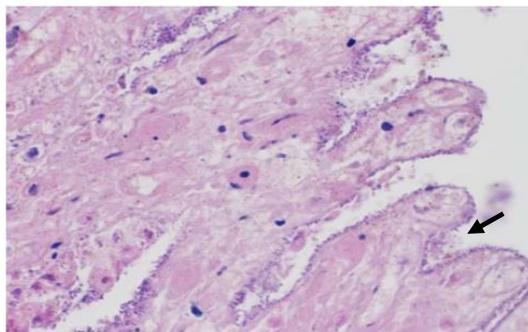


Figura 4: Duodeno. Numerosos bacilos Gram positivos semelhante a bactérias do gênero *Clostridium* aderidos a superfície necrótica dos vilos.

C. difficile foi encontrado em todas as faixas etárias, mas com maior frequência de estirpes toxigênicas em cães com idade superior a 60 meses. Para análise de coinfeções, foram considerados positivos para a infecção por *C. difficile* quando houve, simultaneamente, o isolamento de estirpes toxigênicas e a detecção das toxinas A/B por ELISA. Na tabela 11 encontram-se os dados compilados referentes aos resultados de detecção de *C. difficile*. Considerando os grupos de animais diarreicos e não diarreicos, isolou-se *C. difficile* em 22 cães, o que corresponde a 14,28% (22/154) do total de fezes avaliadas. Considerando apenas o grupo de animais diarreicos a frequência de isolamento foi 20,6% (19/92), sendo oito isolados não toxigênicos (8,7%) e 11 isolados toxigênicos (11,96%) (Tabela 11). Os três animais restantes eram do grupo não diarreicos, equivalendo a 4,84% (3/62) e neles foram encontrados apenas isolados não toxigênicos (Tabela 11). As taxas de isolamento de *C. difficile* em cães diarreicos e não diarreicos se encontram dentro das faixas de variação esperadas de acordo com a literatura: dentre os cães que vivem em ambiente doméstico e são saudáveis, representados aqui pelos animais não diarreicos, esta taxa varia entre 0 e 10% (Perrin et al., 1993; Struble et al., 1994; Al Saif e Brazier et al., 1996) e nos animais internados em hospitais veterinários esta taxa varia entre 18 e 40% (Riley et al., 1991; Struble et al., 1994).

Foram encontradas 11 amostras toxigênicas de *C. difficile* (A+B+), todas em cães diarreicos. Uma associação positiva entre a presença de estirpes toxigênicas e a presença de diarreia foi detectada (valor $p=0,032$), corroborando estudos anteriores (Silva et al., (2013) e sugerindo que esse agente possa ter uma participação importante como um enteropatógeno em cães. É importante salientar, porém, que o diagnóstico não pode ser embasado apenas no isolamento do agente, uma vez que portadores positivos parecem ocorrer em todas as espécies domésticas (Arroyo et al., 2005). Focando na detecção das toxinas A/B, todas as fezes positivas para estirpes toxigênicas de *C. difficile* foram posteriormente submetidas a um ELISA para detecção das toxinas A/B. Dessas, 63,6% (7/11) foram positivas. Deve-se destacar, porém que o ELISA para detecção das toxinas A/B foi padronizado para seres humanos e estudos demonstram

sua baixa sensibilidade para espécimes clínicos de cães (Silva et al., 2013), o que pode ter gerado parte dos resultados negativos encontrados. Outra explicação possível seria o isolamento de um animal portador assintomático (carreador) ou mesmo de esporos que estavam de passagem no trato gastrointestinal, principalmente ao considerar que a origem destas fezes foi um hospital veterinário, local com elevada contaminação ambiental.

Considerando todas as 11 estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (A-B-) encontradas no estudo, oito (8,6%) eram do grupo de cães diarreicos e três (4,8%) de não diarreicos, não havendo diferença entre esses grupos. Vale salientar que alguns estudos apontam que animais colonizados por *C. difficile* não toxigênico são menos susceptíveis a quadros de CDI devido à capacidade protetora frente à colonização das estirpes toxigênicas (Nagaro et al., 2013). Em face disto, estirpes não toxigênicas tem sido estudadas para o uso como possíveis vacinas para seres humanos e animais (Songer et al., 2007; Nagaro et al., 2013).

Tabela 11: Resultados da PCR e ELISA de *C. difficile* em cães diarreicos e não diarreicos.

<i>Clostridium difficile</i>	Diarreicos	Não diarreicos	Total
Isolamento	19/92 (20,6%)	3/62 (4,8%)	22/154 (14,2%)
Estirpes toxigênica e ELISA negativo	4/92 (4,3%)	0	4/154 (2,6%)
Estirpe toxigênica e ELISA positivo	7/92(7,6%)	0	7/154 (4,5%)
Estirpe não toxigênica	8/92 (8,7%)	3/62 (4,8%)	11/154 (7,1%)
Negativo	73/92 (79,5%)	59/62 (95,1%)	132/154 (85,7%)

Foi identificado o envolvimento de *C. difficile* em dois casos fatais, sendo um deles, associado a *C. perfringens*, já mencionado anteriormente. No outro caso, um cão de 147 meses foi positivo para *C. difficile* toxigênico e suas toxinas, sem envolvimento de outro enteropatógeno. De maneira análoga a estes dados relatados, Weese & Armstrong (2003) descreveram um surto de *C. difficile* em um hospital veterinário de pequenos animais onde todos os cães avaliados possuíam idade superior a 12 meses. De forma semelhante ao presente estudo, os autores relataram o óbito de dois cães positivos para *C. difficile* toxigenico, também sem envolvimento de outro enteropatógeno.

Dos 22 isolados de *C. difficile*, foi realizada a ribotipagem de 15 estirpes e os dados foram descritos na tabela 12. O ribotipo 014/020 foi o mais prevalente nos isolados toxigênicos, encontrado em 77,7% das amostras, enquanto o ribotipo 010 foi o mais frequente entre as estirpes não toxigênicas. Estes ribotipos também foram prevalentes em cães nos estudos de outros países como Holanda, Alemanha, Suécia e Itália (Koene et al., 2012; Schneeberg et al., 2012; Janezic et al., 2012; Wetterwik et al., 2013; Spigaglia et al., 2015). De acordo com Janezic et al., (2012) e Silva et al., (2015), o ribotipo 014/020 é frequentemente encontrado em quadros de CDI em humanos e diversas espécies animais. Muito tem-se discutido com relação ao potencial zoonótico deste agente, principalmente considerando a relação próxima entre os humanos e seus cães de estimação. Dentre os ribotipos não toxigênicos, o ribotipo 009 é o mais frequentemente

encontrado (Janezic et al., 2012), entretanto, no presente estudo, houve uma considerável diversidade de ribotipos e identificação de um novo ribotipo (SLO231).

Tabela 12: Porcentagem dos ribotipos 014/020, 106, 602(CE), SLO231, SLO002, 010, 009, 053 de *C. difficile* nos grupos de cães diarreicos e não diarreicos.

Cães	Ribotipo								Total
	009	010	053	014/020	106	602(CE)	SLO 002	SLO 231	
Diarreicos	1 (7,1%)	3 (21,4%)	1 (7,1%)	6 (42,8%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	0	14
Não diarreicos	0	0	0	0	0	0	0	1 (100%)	1
Total	1 (6,6%)	3 (20%)	1 (6,6%)	6 (40%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	15

Um ponto interessante a ser observado é a ocorrência de casos de diarreia sanguinolenta em cães filhotes e adultos. Na faixa etária de 0 a 6 meses o enteropatógeno mais frequente foi CPV, detectado em seis dos 21 casos com identificação de enteropatógenos envolvidos nos episódios de diarreia desta faixa etária (28,5%), cujo patógeno apresenta uma infecção comumente associada a casos hemorrágicos e fatais. Já em cães adultos, a parvovirose parece ser extremamente incomum, tendo sido detectada no presente estudo em apenas dois dos 47 animais com idade superior a 12 meses (4,2%). Por outro lado, o principal agente detectado em casos de diarreia sanguinolenta em adultos foi *C. perfringens cpe* positivo e/ou *netE*, *netF* e *netG* positivo, tendo sido encontrado no presente estudo em seis casos dos 19 cães adultos (31,5%) que apresentavam diarreia sanguinolenta.

As fezes sanquinolentas compreenderam 30 das 92 (32,6%) amostras de diarreia avaliadas, sendo 10 casos fatais. Dos 30 espécimes sanguinolentos, houve identificação de pelo menos um enteropatógeno em 17 (57%) amostras, sendo que em 13 (43%) casos não foi possível detectar o possível agente causador. A Tabela 13 resume os agentes encontrados nos casos fatais. Entre os 10 óbitos ocorridos, *C. difficile* ou *C. perfringens* estavam presentes (sozinhos ou em associação) em quatro (40%), ressaltando a importância desses dois agentes comumente subestimados pelos clínicos de pequenos animais.

Tabela 13: Descrição dos óbitos no grupo de cães diarreicos com os respectivos patógenos envolvidos.

Óbitos	Agente(s) encontrado(s)
Caso 1	<i>C. difficile</i> toxigênico e as toxinas A/B
Caso 2	<i>C. difficile</i> toxigênico sem as toxinas A/B
Caso 3	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)
Caso 4	<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)
Caso 5	Parvovírus (CPV)
Caso 6	<i>C. perfringens</i> e <i>C. difficile</i>
Caso 7	<i>C. perfringens</i> e Coronavírus (CCV)
Caso 8	Não identificado
Caso 9	Não identificado
Caso 10	Não identificado

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo colaborou para o melhor entendimento da etiologia da diarreia por *C. perfringens* e *C. difficile*, sugerindo que tais enteropatógenos são bem mais comuns na clínica de pequenos animais do que inicialmente se pensava. As associações encontradas entre animais adultos e casos de diarreia por *C. perfringens netE* positivo reforçam a hipótese deste agente atuar como causador de enterite hemorrágica nesta espécie.

8. CONCLUSÕES

Estirpes toxigênicas de *C. difficile* e *C. perfringens* tipo A *cpe* positivos e/ou *netE*, *netF* positivos são enteropatógenos associados a diarreia em cães. Coinfecções com outros enteropatógenos ou mesmo entre ambos agentes do gênero *Clostridium* podem ocorrer.

9. REFERÊNCIAS

- ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 65, p. 29–33, 2003.
- ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, v. 157, p. 1411–1422, 2012.
- AL SAIF, N.; BRAZIER, J. S. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology*, v. 45, p. 133–137, 1996.
- ALLENPACH, K. Bacteria involved in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Veterinary Record*, v. 176, p. 251-252, 2015.

- ANDRADE, G. I. et al., Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical animal health and production*, v. 44, n. 7, p. 1783–90, out. 2012.
- ANDRADE, J. A. B.; HAAPALAINEN, E. F.; NETO, U. F. *Escherichia coli* enteroagregativa como agente provocador de diarreia persistente: modelo experimental utilizando microscopia óptica de luz. *Rev. paul. pediatr.*, v. 29, n. 1, p. 60-66, 2011.
- ANDRADE S. F. Drogas que atuam no sistema nervoso periférico. In: Andrade SF. Manual de terapêutica veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p.401-429.
- APPEL, M.; MEUNIER, P., POLLOCK, R. et al., Canine viral enteritis, a report to practitioners. *Canine Pract.*, v. 7, n. 4, p. 22–36, 1980.
- ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol.*, v. 42, p. 5849–5853, 2004.
- ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U. et al., Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxinproducing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 267, p. 145–150, 2007.
- ARROYO, L.G.; KRUTH, S. A.; WILLEY, B. M. et al., PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Med Microbiol.*, v. 54, p. 163-166, 2005.
- ARROYO, L. G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J. S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol.* v. 120, p. 179–183, 2007.
- BALASSIANO, I. T.; YATES, E. A.; DOMINGUES, R. M. et al., *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, v. 61, n. 2, p. 169-79, 2012.
- BALLWEBER, L. R.; XIAO, L.; BOWMAN, D. et al., Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.*, v. 26, n. 4, p. 180-189, 2010.
- BANO, L. Prevalence and Molecular Characterization of *Clostridium difficile* isolated from rabbits and detection of its main toxins. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, 2008, Verona. *Proceedins of the...* Verona: [s.n], 2008. p. 911-914. Disponível em: < <http://world-rabbit-science.com/WRSAProceedings/Congress-2008-Verona/Papers/P-Bano.pdf> >. Acesso em: 3 nov. 2015.
- BAGCIGIL, A.F.; IKIZ, S.; DOKUZEYLU, B. et al., Fecal shedding of *Salmonella* spp. in dogs. *J Vet Med Sci.* v. 69, p.775-777, 2007.
- BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* v. 46,p. 8-12, 2008.

- BATTERBY, I.; HARVEY, A. Differential diagnosis and treatment of acute diarrhea in the dog and cat. *In practice*, v. 28, p. 480-488, 2006.
- BÅVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary quarterly journal*, v. 24, p. 203-219, 2002.
- BAYLEI, M. A.; MACKLIN, K. S.; KREHLING, J. T. Use of a Multiplex PCR for the Detection of Toxin-Encondin genes netB and tpeL in Strains of *Clostridium perfringens*. *ISRN Vet Sci.*, v. 2013, p. 1-4, 2013.
- BERRY, A. P; LEVETT, P. N. Chronic diarrhea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *Vet Rec.*, v.118, p.102-103, 1986.
- BEUTIN, L. Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, v. 30, p. 285–298, 1999.
- BHAVNANI, D.; GOLDSTICK, J. E.; CEVALLOS, W. et al., Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. *Am J Epidemiol*, v. 5, p. 387-395, 2012.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G. et al., Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic Escherichia coli. *Int. Microbiol.*, v. 9, n. 2, p. 103–110, 2006.
- BRANDÃO, P. E.; LOVATO, L. T.; SLHESSARENKO, R. D. Coronaviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*, 2. ed, Brasil: Santa Maria, 2012, 1008p.
- BRIDGER, J. C. Novel rotaviruses in animals and man. *CIBA Found. Symp.*, v. 128, p. 5-23 1987.
- BOOTHE D. M, HOSKINS J. D. Terapia com drogas e com componentes sanguíneos. In: Hoskins JD. *Pediatria veterinária: cães e gatos do nascimento aos seis meses*. 2. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. p.33-48.
- BRUNNER, C. J.; SWANGO, L. J. Canine parvovirus infection: effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. *Compend Contin Educ Pract Vet*, v. 7, n. 12, p. 979-988, 1985.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A. et al., Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol*, v. 82, n. 12, p. 3021-3025, 2001.
- BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N.; MARTELLA, V. et al., Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis.*, v. 12, n. 3, p. 492-494, 2006.
- BUSCH, K.; SUCHODOLSKI, J. S.; KÜHNER, K. A. et al., *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Vet Rec.*, v. 176, n. 10, 2015.
- CARMAN, R.J.; LEWIS, J. C. Recurrent diarrhoea in a dog associated with *Clostridium perfringens* type A. *Vet Rec.*, v. 112, n. 15, p. 342-343, 1983.

- CARMICHAEL, L. E.; BINN, L. N. New enteric viruses in the dog. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v. 25, p. 1-37, 1981.
- CARTWRIGHT, S.; LUCAS, M. Vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet Rec.*, v. 91, p. 571-572, 1972.
- CASSUTTO, B. H.; COOK, L. C. An epidemiological survey of *Clostridium perfringens*-associated enterotoxemia at an army veterinary treatment facility. *Mil Med.*, v. 167, n. 3, p. 219-222, 2002.
- CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M. et al., A comparison of rotavirus strains of bovine, simian and porcine origin. *European Journal of Epidemiology*, v. 1, p. 274-280, 1985.
- CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; DESARIO, C. et al., Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin Vaccine Immunol*, v. 15, n. 3, p. 534-539, 2008.
- CAVE, N. J.; MARKS, S. L.; KASS, P. H. et al., A. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 221, n. 1, p. 52-59, 2002.
- 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. K.; KRUTH, S. A.; WEESE, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med.*, v. 17, n. 2, p. 123, 2003.
- 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.
- CRESPILLO, A. M.; MARTINS, M. I. M; SOUSA, F. F; LOPES, M. D; PAPA, F. O. Abordagem terapeutica do paciente neonato canino e felino: 2. Aspectos relacionados a terapia intensiva, antiparasitarios e antibioticos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.425-432, 2007.
- DECARO, N.; CAMERO, M.; GRECO, G. et al., Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.*, v. 27, n. 2, p. 177-181, 2004.
- DECARO, N.; MARTELLA, V.; DESARIO, C. et al., First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, v. 53, n. 10, p. 468-472, 2006.
- DECARO, N.; CAMPOLO, M.; ELIA, G. et al., Infectious canine hepatitis: an "old" disease reemerging in Italy. *Res Vet Sci.*, v. 83, n. 2, p. 267-273, 2007.
- DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D. D. et al., Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis*, v. 13, n. 8, p. 1222-1224, 2007.

- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet microbiol.*, v. 132, n. 3-4, p. 221-34, 2008.
- DELMEÉ, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 7, n. 8, p. 411-416, 2001.
- DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M. et al., Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus. *J Virol Methods*, v. 126, n. 1, p. 179-185, 2005.
- DHALLUIN, A.; LEMÉE, L.; PESTELCARON, M. et al., Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (tpi) gene. *Syst Appl Microbiol*, v. 26, n. 1, p. 90-96, 2003.
- DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M. et al., Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun*, v. 33, p. 1-23, 2009.
- PINTO, L. D.; STRECK, A. F.; GONÇALVES, K. R. et al., Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res*. v. 165, p. 29-33, 2012.
- EHRlich, M. et al., Acute diarrhea in horses of the Potomac River area: examination for clostridial toxins. *J Am Vet Med Assoc*, v.185, n.4, p.433-435, 1984.
- ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.*, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.
- ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. 5th ed., v. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 1917–74.
- FERREIRA, C.E.; NAKANO, V.; DURIGON, E.L. et al., Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.4, p.451- 455, 2003.
- FINLEY, R.; RIBBLE, C.; VANDERMEER, J. A. et al., The risk of Salmonellae shedding by dogs fed *Salmonella*-contaminated commercial raw food diets. *Can Vet J.*, v. 48, n. 1, p. 69-75, 2007.
- FONTANARROSA, M. F.; VEZZANI, D.; BASABE, J. et al., An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Vet. Parasitol.*, v. 136, p. 283–295, 2006.
- FRANCK, S.M., BOSWORTH, B.T., MOON, H.W., 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1795–1797.
- FULTON, R.W.; JOHNSON, C. A.; PEARSON, J. et al., Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea. *Am J Vet Res.*, v. 42, p. 841–843, 1981.
- FUKATA, T.; NAITO, F.; YOSHIDA N. et al., Incidence of *Salmonella* infection in healthy dogs in Gifu Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci*. v. 64, p.1079-80, 2002.

- GARDNER, T. B.; HILL, D. Treatment of Giardiasis. *R Clin Microbiol Rev.*, v. 14, n. 1, p. 114-128, 2001.
- GATES, M. C.; NOLAN, T. J. Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Vet. Parasitol.*, v. 166, p. 153–158, 2009.
- GEORGE, R.H.; SYMONDS, J.M.; DIMOCK, F. et al., Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J.*, v.18, n.1, p.695, 1978.
- GIZZI, A. B. R.; OLIVEIRA, S. T.; LEUTENEGGER, C. M. et al., Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet Res*, v. 10, n. 23, p. 1-8, 2014.
- GOBELI, S.; BERSET, C.; BURGNER, I. et al., Antimicrobial susceptibility of canine *Clostridium perfringens* strains from Switzerland, *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, v. 154, n. 6, p. 247-250, 2012.
- GODDARD, A.; LEISEWITZ, A. L. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, v. 40, n. 6, p. 1041-1053, 2010.
- GOHARI, I. M.; PARREIRA, V. R.; NOWELL, V. J. et al., A Novel Pore-Forming Toxin in Type A *Clostridium perfringens* Is Associated with Both Fatal Canine Hemorrhagic Gastroenteritis and Fatal Foal Necrotizing Enterocolitis. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. 1-27, 2015.
- GOLDENBERG, S. D.; CLIFF, P. R.; FRENCH, G. L. Glutamate Dehydrogenase for Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *J Clin Microbiol.*, v. 48, n. 8, p. 3050-3051, 2010.
- GONÇALVES, C.; DECRÉ, D.; BARBUT, F. et al., Prevalence and characterization of a binary toxin (actinspecific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.5, p.1933-1939, 2004.
- GUILFORD, W. G.; STROMBECK, D. R. Gastrointestinal tract infections, parasites, and toxicosis. In: GUILFORD, W. G., CENTER, S. A.; STROMBECK, D. R. et al., Strombeck's Small Animal Gastroenterology, 3rd ed., USA: Philadelphia, WB Saunders, 1996, p. 411–432.
- GYLES, C.L. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. *J Anim Sci*, v.85, p.45–62, 2007.
- GUNZBURG, S. T.; TORNIERPORTH, N. G.; RILEY, L. W. Identification of enteropathogenic Escherichia coli by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 5, p. 1375–1377, 1995.
- HALL, I.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficilis. *Am J Dis Child.*, v. 49, n. 2, p. 390-402, 1935.
- HAMBRE, D. M. et al., The toxicity of penicillin as prepared for clinical use. *J Am Med Associat.*, v.206, p.642, 1943.

- HEAP, J. T.; PENNINGTON, O. J.; CARTMAN, S. T. et al., A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Meth*, v. 78, n. 1, p. 79-85, 2009.
- HÖGENAUER, C.; HAMMER, H. F.; KREJS, G. J. et al., Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis.*, v. 27, n. 4, p. 702-710, 1998.
- HOLLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev*, v. 3, p. 345–375, 1990.
- HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C. et al., Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest.*, v. 19, n. 5, p. 535-539, 2007.
- HOSGOOD G., HOSKINS J.D. Anaesthesia and pain management. In: Hosgood G, Hoskins JD. (Ed.). *Small animal medicine and surgery*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. p.18-40
- HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol.*, v.15, n.13, p.1554-80, 2009.
- HOPMAN, N.E.; KEESSEN, E.C.; HARMANUS, C. et al., Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol.*, v.149, n.1, p.186-92, 2011.
- HOSHINO, Y.; SAIF, L. J.; SERENO, M. M. et al., Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol.*, v. 62, p. 744-748, 1988.
- HOSHINO, Y.; SERENO, M. M.; MIDTHUN, K. et al., Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, v. 82, n. 24, p. 8701-8704, 1985.
- HOSKINS, J. D. Update on canine parvoviral enteritis. *Vet Med*, v. 92, n. 8, p. 694-709, 1997.
- HOUSTON, D. M.; RIBBLE, C. S.; HEAD, L. L. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc.*, v. 208, n. 4, p. 542-546, 1996.
- HUME, D. Z. Diarrhea. In: SILVERSTEIN, D.; HOPPER, K. *Small animal critical care medicine*. 2 ed., USA: Philadelphia, Saunders Elsevier. v. 40, 2014, cap. 121, p. 639-642, 2014.
- ITOH, N.; KANAI, K.; HORI, Y. et al., Prevalence of *Giardia intestinalis* and other zoonotic intestinal parasites in private household dogs of the Hachinohe area in Aomori prefecture, Japan in 1997, 2002 and 2007. *J. Vet. Sci.*, v. 10, n. 4, p. 305–308, 2009.
- JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J Microbiol.*, v. 4, n. 3, p. 102-117, 2012.
- 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.

- JANK, T.; GIESEMANN, T.; AKTORIES, K. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology*, v. 17, p. 15R–22R, 2007.
- JHUNG, M. A.; THOMPSON, A. D.; KILLGORE, G. E. et al., Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis.*, v. 14, n. 7, p. 1039-45, 2008.
- JONES, M. A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *Vet Rec.* v.112, p. 253, 1983.
- JINSIK, O.; GUNWOO, H.; YOUNGSHIK, C. et al., One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 13, n. 4, p. 520–524, 2006.
- JOHNSON, R.H.; SMITH, J. R. Epidemiology and pathogenesis of canine parvovirus. *Aust Vet Pract*, v. 13, n. 1, p. 31, 1983.
- KARTSEV, N. N.; FURSOVA, N. K.; PACHKUNOV, D. M. et al., Molecular characterization of enterotoxin-producing *Escherichia coli* collected in 2011-2012, Russia. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.
- KOENE, M.G.; 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, 2011.
- KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci.* v. 15, p.1-9.
- KRUTH, S. A.; PRESCOTT, J. F.; WELCH, M. K. et al., Nosocomial diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 195, n. 3, p. 331-334, 1989.
- KUEHNE, S. A.; CARTMAN, S. T.; MINTON, N. P. Both, toxin a and toxin b, are important in *Clostridium difficile* infection. *Gut microbes.*, v. 2, n. 4, p. 252-255, 2011.
- KWANG, J.; LITTLDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, v. 22, p. 46-51, 1996.
- LAI, M. M. C.; HOLMES, K. V. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.), *Fields Virology*. 4ed., USA: Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, p. 1163–1185, 2001.
- LAMM, C. G.; REZABEK, G. B. Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 38, n. 4, p. 837-850, 2008.
- LEFEBVRE, S. L.; WALTNER-TOEWS D.; PEREGRINE A. S. et al., Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. *J Hosp Infect*, v. 62, p. 458-466, 2006.

- 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.
- LOPEZ, J.; ABARCA, K.; PAREDES, P. et al., Intestinal parasites in dogs and cats with gastrointestinal symptoms in Santiago, Chile. *Rev. Med. Chil.*, v. 134, n. 2, p. 193–200, 2006.
- LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C., WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev.* v.1, p.1-18,1988.
- MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I. A. P.; THOMPSON, H. et al., Canine parvovirus enteritis. 2. Pathogenesis. *Vet Rec.*, v. 115, n. 18, p. 453-460, 1984.
- MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P. et al., Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.1117-1123, 2007.
- MACINTIRE, D. K.; SMITH-CARR, S. Canine parvovirus. Part II. Clinical signs, diagnosis, and treatment. *Compend contin educ pract vet.*, v. 19, n. 3, p. 291–302, 1997.
- 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.
- MAHL, A. As gastroenterites do cão. *Cães e Gatos*, v. 9, p. 24, 1994.
- MANABE, Y. C.; VINETZ, J. M.; MOORE, R. D. et al., *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med*, v. 123, n. 11, p. 835-40, 1995.
- MANI, I.; MAGUIRE, J. H. Small animal zoonoses and immunocompromised pet owners. *Top Companion Anim m.*, v. 24, p. 164-174, 2009.
- MARKS, S.; KATHER, E.; KASS, P. et al., Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med*, v. 16, n. 5, p. 533-540, 2002.
- MARKS, S. L., KATHER, E. J. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs, *Vet. Microbiol.*, v. 94, n. 1, p. 39-45, 2003a.
- MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, v. 33, n. 5, p. 1029-1060, 2003b.
- MARKS, S. L.; RANKIN, S. C.; BYRNE, B. A. et al., Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med.*, v. 25, n. 6, p. 1195-1208, 2011.
- MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; GRECO, G. et al., Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-type rotaviruses isolated from dogs. *Virus Research*, v. 74, n. 1-2, p. 17–25, 2001.

- 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.
- MARULAPPA, S. Y.; KAPIL, S. Simple Tests for Rapid Detection of Canine Parvovirus Antigen and Canine Parvovirus-Specific Antibodies. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 16, n. 1, p. 127-131, 2009.
- MCKENZIE, E.; RIEHL, J.; BANSE, H. et al., Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. *J Vet Intern Med.*, v. 24, n. 1, p. 97-103, 2010.
- MEER, R. R.; SONGER, J. G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res.*, v. 58, n. 7, p. 702-705, 1997.
- MEGID, J.; ASSIS, M. Z.; BRITO, C. J. et al., Salmonelose em cães de experimentação. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 38, n. 1, p. 44-45, 2001.
- MEIRELES, P.; MONTIANI-FERREIRA, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Parana state, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 152, n. 3-4, p. 242-248, 2008.
- MEUNIER, P. C.; COOPER, B. J.; APPEL, M. J. et al., Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Vet Pathol.*, v. 22, n. 6, p. 617-624, 1985.
- NAGARO K. J.; PHILLIPS, S. T.; CHEKNIS, A. K. et al., Nontoxigenic *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.
- NAKAMURA, M.; TOHYA, Y.; MIYAZAWA, T. et al., A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol.*, v. 149, n. 11, p. 2261-2269, 2004.
- NAKATA, S.; ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y. et al., Antigenic Characterization and ELISA Detection of Adult Diarrhea Rotaviruses. *J. Infect. Dis.*, v. 154, n. 3, p. 448-455, 1986.
- NORMAN, K. N.; SCOTT, H. M.; HARVEY, R. B. et al., Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *App Environm Microbiol.*, v. 77, n. 16, p. 5755-5760, 2011.
- O'BRIEN, S. E. Serologic response of pups to the low-passage, modified-live canine parvovirus-2 component in a combination vaccine. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 204, n. 8, p. 1207-1209, 1994.
- OTTO, C. M.; DROBATZ, K. J.; SOTER, C. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med.*, v. 11, n. 2, p. 65-70, 1997.
- PARK, M.; ROONEY, A. P.; HECHT, D. W. et al., Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and minocycline resistance in *Clostridium perfringens*. *Arch Microbiol.*, v. 192, n. 10, p. 803-810, 2010.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.
- PEDLEY, S.; BRIDGER, J. C.; BROWN, J. F. et al., Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J. Gen. Virol.*, v. 64, p. 2093-2101, 1983.

- PEREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V. et al., First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol.*, v. 124, n. 1, p. 147-152, 2007.
- PERRIN, J.; COSMETATOS, I.; GALLUSSER, A. et al., *Clostridium difficile* associated with typhlocolitis in an adult horse. *J Vet Diagn Invest.* v.5, p. 99-101,1993.
- PERSSON, S.; TORPDAHL, M.; OLSEN, K. E. P. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect*, v. 14, n. 11, p. 1057-1064, 2008.
- PINTO, L. D.; STRECK, A. F.; GONÇALVES, K. R. et al., Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.*, v. 165, n. 1, p. 29-33, 2012.
- POLLOCK, R. V.; CARMICHAEL, L. E. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 180, n. 1, p. 37-42, 1982.
- POLLOCK, R. V. The parvoviruses. II. Canine parvovirus. *Compend Contin Educ Pract Vet.*, v. 6, n. 7, p. 653-654, 1984.
- POLLOCK, R. V.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. In: BARLOUGH, J. E. Manual of small animal infectious diseases. USA: New York, Churchill Livingstone, 1988. p. 101–107.
- POLLOCK, R. V.; COYNE, M. J. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, v. 23, n. 3, p. 555-568, 1993.
- POST, K. W.; JOST, B. H.; SONGER, J. G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J. Vet. Diag. Invest.*, v. 14, p. 258-259, 2002.
- POXTON, I. R.; MCCOUBREY, J.; BLAIR, G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 7, n. 8, p. 421-427, 2001.
- PRESCOTT, J. F.; JOHNSON, J. A.; PATTERSON, J. M. et al., Haemorrhagic gastroenteritis in the dog associated with *Clostridium welchii*. *Vet. Rec.*, v. 103, n. 6, p. 116-117, 1978.
- PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care*, v. 14, n. 3, p. 167-176, 2004.
- PUÑO-SARMIENTO, J.; MEDEIROS, L.; CHICONI, C. et al., Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol.*, v. 166, n. 3-4, p. 676-680, 2013.
- RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.*, v. 78, n. 19, p. 10213–10220, 2004.
- RAMIREZ, N.; LIGGINS, M.; ABEL-SANTOS, E. Kinetic evidence for the presence of putative germination receptors in *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol.*, v. 192, n. 16, p. 4215-4222, 2010.
- RATCHTRACHENCHAI, O. A.; SUBPASU, S.; ITO, K. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. *Bull. Dep. Med. Sci.*, v. 39, n. 4, p. 211–220, 1997.
- RILEY, T. V.; ADAMS, J. E.; O'NEILL, G. L. et al., Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiol Infect.*, v. 107, n. 3, p. 659-665, 1991.

- RODRIGUES, C. G.; MELO R. T., BELCHIOLINA B. F. et al., Occurrence and characterization of *Campylobacter* spp. isolates in dogs, cats and children. *Pesq. Vet. Bras.* v. 35, n. 4, p. 365-370, 2015.
- ROOD, J. I. Transferable tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains of porcine origin. *Can J Microbiol.*, v. 29, n. 10, p. 1241-1246, 1983.
- RUIZ, V. L. A.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F. et al., Isolation of rotavirus from asymptomatic dogs in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 4, p. 996-999, 2009.
- RUPNIK, M.; JUST, I. In: ALOUF, J. A.; POPOFF, M. R. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 3ed, USA: Burlington, Academic Press, 2006, p. 409-429.
- RUPNIK, M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev.*, v. 32, n. 3, p. 541-555, 2008.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, v. 7, n. 7, p. 526-536, 2009.
- SAMBOL, S. P.; MERRIGAN, M. M.; LYERLY, D. et al., Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infect Immun.*, v. 68, n. 10, p. 5480-5487, 2000.
- SANTOS, R. L. Pathobiology of Salmonella, Intestinal Microbiota, and the Host Innate Immune Response. *Front Immunol.* v. 5, p. 252, 2014
- SASAKI, J.; GORYO, M.; ASAHINA, M. et al., Hemorrhagic enteritis associated with *Clostridium perfringens* type a in a dog. *J Vet Med Sci.*, v. 61, n. 2, p. 175-177, 1999.
- SATO, Y., KUWAMOTO R. A case of canine salmonellosis due to *Salmonella infantis*. *J Vet Med Sci.* v. 61, p.71-2, 1999.
- SCHLEGEL, B. J.; VAN DREUME, T.; SLAVIC, D. et al., *Clostridium perfringens* type A fatal acute hemorrhagic gastroenteritis in a dog. *Can. Vet. J.*, v. 53, n. 5, p. 555-557, 2012.
- SCHNEEBERG, A.; RUPNIK, M.; NEUBAUER, H. et al., Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, v.18, p.484-488, 2012.
- SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. et al., *Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLoS Pathog.*, v. 5, n. 10, p. 1-14, 2009.
- SHAKESPEARE, A. S. The incidence of gastroenteritis diagnosis among sick dogs presented to the Onderstepoort Veterinary Academic Hospital correlated with meteorological data. *J S Afr Vet Assoc.*, v. 70, n. 2, p. 95-97, 1999.
- SHIM, J. K.; JOHNSON, S.; SAMORE, M. H. et al., Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet.* v. 351, p. 633-666, 1998.
- SHOEMAKER, N. B.; VLAMAKIS, H.; HAYES, K. et al., Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol.*, v. 67, n. 2, p. 561-567, 2001.

- SHUKLA, R.; GIRALDO, P.; KRALIZ, A. et al., Cryptosporidium spp. and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. *Can. Vet. J.*, v. 47, n. 12, p. 1179–1184, 2006.
- 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, 2013.
- SILVA, R. O.; LOBATO, F. C. *Clostridium perfringens*: a review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe*, v. 33, p. 14-17, 2015.
- SILVA, R. O. S. S.; RUPNIK, M.; DINIZ, A. N. et al., *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 8, p. 1062-1065, 2015.
- SIMPSON, K. W. Gastric disease, 6ed., USA: Philadelphia, WB Saunders Co., v. 2, 2004, p. 1310–1331.
- SMITH, L. D.; KING, E. O. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *J Bacteriol.*, v. 84, p. 67-67, 1962
- SMITH-CARR, S.; MACINTIRE, D. K.; SWANGO, L. J. Canine parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination. *Compend Contin Educ Pract Vet.*, v. 19, n. 2, p. 125-133, 1997.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, n. 2, p. 216-234, 1996.
- SONGER, J. G.; JONES, R.; ANDERSON, M. A. et al., Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Vet Microbiol.*, v. 124, n. 3-4, p. 358-361, 2007.
- SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, v.140, p. 399-404, 2010
- SPIGAGLIA, P.; DRIGO, I.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P.; BANO, L.; BACCHIN, C.; PUIATTI, C.; TONON, E.; BERTO, G.; AGNOLETTI, F. Antibiotic resistance patterns and PCR-ribotyping of *Clostridium difficile* strains isolated from swine and dogs in Italy. *Anaerobe*. v.31, p. 42-46, 2015
- STRUBLE, A. L.; TANG, Y. J.; KASS, P. H., et al., Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*.v. 6, p. 342–347, 1994.
- STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M. et al., Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett*, v.186, p.307-312, 2000.
- SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; BERN, C. et al., Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 9, n. 11, p. 1444–1452, 2003.

- TENNANT, B. J.; GASKELL, R. M.; KELLY, D. F. et al., Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res. Vet. Sci.*, v. 51, n. 1, p. 11–18, 1991.
- THELESTAM, M.; CHAVES-OLARTE, E. Cytotoxic effects of the *Clostridium difficile* toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 250, p. 85–96, 2000.
- THIEDE, S.; GOETHE, R.; AMTSBERG, G. Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Vet Rec.*, v. 149, n. 9, p. 273-274, 2001.
- TILTON, R. C.; VAN KRUININGEN, H. J.; KWASNIK, I. et al., Toxigenic *Clostridium perfringens* from a parvovirus-infected dog. *Clin Microbiol.*, v. 14, n. 6, p. 697-697, 1981.
- TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N. et al., Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *E. coli*. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 6, p. 2669-2671, 2003.
- TURK, J.; FALES, W.; MILLER, M. et al., Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc.* v. 200, p 991-994, 1992.
- UNTERER, S.; BUSCH, K.; LEIPIG, M. et al., Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med.*, v. 28, n. 1, p. 52-58, 2014.
- UZAL, F. A.; FREEDMAN, J.; SHRESTHA, A. et al., Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.*, v. 9, n. 3, p. 361-377, 2014.
- VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Microbiol.*, v. 27, n. 4, p. 289-300, 2009.
- VANDENBERGHE, J.; DUCATELLE, R.; DEBOUCK, P. et al., Coronavirus infection in a litter of pups. *Veterinary Quarterly*, v. 2, n. 3, p. 136-141, 1980.
- VIEIRA, M. J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J. et al., Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. *J Vet Diagn Invest.*, v. 20, n. 4, p. 488-491, 2008.
- WALTMAN, W. D. Methods for the cultural isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella* in Domestic Animals. 1. ed. Inglaterra: Londres, CABI Publishing, 2000. Cap.21, p.355-372.
- WATERS, M.; RAJU, D.; GARMORY, H. S. et al., Regulated expression of the beta2-toxin gene (cpb2) in *Clostridium perfringens* type a isolates from horses with gastrointestinal diseases. *J Clin Microbiol.*, v. 43, n. 8, p. 4002-4009, 2005.
- WATERS, M.; SAVOIE, A.; GARMORY, H. S. et al., Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 8, p. 3584-3591, 2003.
- WEESE, J. S.; GREENWOOD, S. J.; STAEMPFLI, H. R. Recurrent diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in 2 dogs. *Can Vet J.*, v. 42, n. 4, p. 292-294, 2001a.

WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. et al., The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med.*, v. 15, n. 4, p. 374-378, 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. Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, v. 41, n. 2, p. 287-309, 2011.

WILCOX, H. Cleaning up *Clostridium difficile* infection. *The Lancet*, v. 348, n. 9030, p. 767-769, 1996.

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. 2013.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.*, v. 38, n. 11, p. 1239–1255, 2008.

YAEGER, M. J.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. A. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 14, p. 281-287, 2002.

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

ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; CAVICCHIOLI et al., Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. *Res Vet Sci.* v. 84, p 278-282, 2008.

10. ANEXO I

Cópia do artigo aprovado na revista *Anaerobe*.