

Carlos Augusto de Oliveira Júnior

**AVALIAÇÃO DE UMA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA PARA PREVENÇÃO
DE DIARREIA NEONATAL EM LEITÕES POR *Clostridioides (Clostridium)*
*difficile***

Tese 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 Doutor
em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte

UFMG – Escola de Veterinária

2019

O48a Oliveira Júnior, Carlos Augusto de, 1988-
Avaliação de uma estirpe não toxigênica para prevenção de diarreia neonatal em leitões por *Clostridioides (Clostridium) difficile* / Carlos Augusto de Oliveira Júnior. – 2019. 174 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Leitão (Suíno) – Doenças – Teses. 2. *Clostridium difficile* – Teses. 3. Clostridioses – Teses. 4. Diarreia em Animais – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

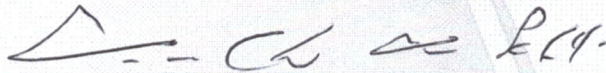
CDD – 636.408 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

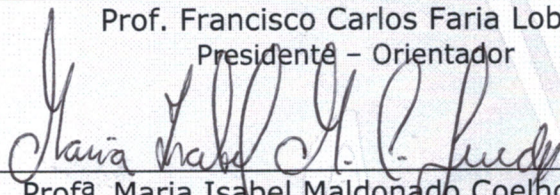
CARLOS AUGUSTO DE OLIVEIRA JÚNIOR

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

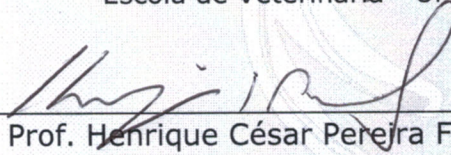
Aprovada em 16 de Janeiro de 2019 , pela banca constituída pelos membros:



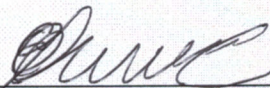
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente - Orientador



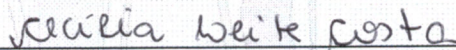
Profª. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Escola de Veterinária - UFMG



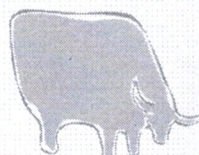
Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Carlos Eduardo Real Pereira
Microbiologia Veterinária Especial - MicroVet -Viçosa



Profª. Cecília Leite Costa
Universidade Federal do Ceará - UFC



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela dedicação de toda uma vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação irretocável e amor incondicional.

À Renata, por ser uma irmã, companheira e minha primeira professora.

Ao Walter, pelas figuras, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pelo amor.

Ao professor Francisco Lobato, por ter sido um segundo pai, me acolhido nessa trajetória e me ajudado a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao professor Rodrigo Silva, pela sincera amizade, pela competência e pelo exemplo profissional único.

Ao Diogo, à Isadora e à Ana Carolina, pelo prazer da convivência e pelo empenho incomparável para que esse trabalho fosse realizado.

À Amanda, à Jordana, à Carolina e ao Rafael, por proporcionarem um ambiente de trabalho leve e oferecer de mais bom grado uma sincera amizade.

À Prhiscylla, ao Guilherme, ao Ronnie, à Laura e à Izabella, por marcarem minha trajetória no Laboratório de Anaeróbios da forma mais positiva possível.

Aos atuais integrantes e a todos passaram pelo Laboratório de Anaeróbios nos últimos oito anos, por terem participado direta ou indiretamente desta conquista.

Aos professores e funcionários do DMVP, pelo suporte e auxílio muitas vezes silencioso, mas essencial.

Ao professor Roberto Guedes, pela efetiva co-orientação, sendo crucial em diversos momentos.

Às professoras Simone Koprowski e Fernanda Radicchi, por todo o empenho e auxílio para que a experimentação com suínos fosse realizada na Fazenda Experimental.

Ao “Bira” e a todos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, por oferecerem as instalações e propiciarem que o experimento fosse executado.

Ao veterinário José Eustáquio e aos administradores e funcionários da granja Pau Preto, que abriram a granja para receber uma etapa da experimentação.

Ao professor Luiz Guilherme de Oliveira da UNESP/Jaboticabal, pela solidariedade em ceder os isoladores para experimentação com os leitões.

Ao Dominique Blanc, por me receber em Lausanne, proporcionando uma experiência pessoal e profissional única.

Ao Fabrice Poncet, pelo auxílio diário e a companhia agradável nos meses em que fiquei distante do país.

Ao CHUV e seus funcionários, por me acolherem no intercâmbio em Lausanne da melhor forma possível.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal, por manter a excelência e permitir que possamos realizar com relativa tranquilidade os nossos experimentos.

Às instituições de apoio e fomento à pesquisa, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por viabilizarem financeiramente o projeto.

À Escola de Veterinária, pela formação de excelência e por proporcionar vivências transformadoras.

À UFMG, casa que já frequento durante metade da minha vida e na qual me sinto extremamente confortável.

Aos grandes amigos da vida, especialmente Priscilla, Lucas, Michele, Mariana, Cris, Suzane, Yaro e Gabriel, que me ensinaram o verdadeiro sentido da amizade.

Aos amigos da graduação, em especial Filipe, Hariany, Isabela Ferreira, Bárbara, Joana, Isabela Lanza e Juliana que demonstram a cada dia que as barreiras só existem se quisermos.

À Aline, ao Augusto e ao Renan, meus irmãos escolhidos, com os quais pretendo seguir compartilhando alegrias e tristezas por toda a vida.

A todos que participaram direta ou indiretamente dessa longa e árdua caminhada.

A você, por se interessar por este trabalho e revisitar esses dados que foram produzidos pelo esforço conjunto de muitas pessoas.

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i> – histórico	23
3.2. Caracterização do microrganismo	24
3.3. Fatores de virulência e patogenia	25
3.4. Esporulação e germinação.....	27
3.5. Colonização.....	29
3.6. Toxinas.....	31
3.7. Epidemiologia molecular	33
3.8. A doença.....	36
3.9. Doença em humanos	36
3.10. Doença em suínos.....	38
3.11. Diagnóstico.....	39
3.12. Prevenção e Controle	41
3.13. Considerações finais.....	44
3.14. Referências Bibliográficas	44
4. CAPÍTULO 1. SEQUENCIAMENTO GENÔMICO COMPLETO DA ESTIRPE DE <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i> Z31	68
4.1. Introdução	68
4.2. Material e Métodos.....	69
4.3. Resultados e discussão	74

4.4.	Conclusão.....	80
4.5.	Referências Bibliográficas	80
5.	CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA DE <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i> Z31 PARA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> (ICD) EM MODELO EXPERIMENTAL SUÍNO.....	87
5.1.	Introdução	87
5.2.	Material e métodos.....	88
5.3.	Resultados	92
5.4.	Discussão.....	96
5.5.	Conclusão.....	98
5.6.	Referências Bibliográficas	98
6.	CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA DE <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i> Z31 PARA A PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> (ICD) EM UMA GRANJA COMERCIAL	102
6.1.	Introdução	102
6.2.	Material e métodos.....	103
6.3.	Resultados	106
6.4.	Discussão.....	110
6.5.	Conclusão.....	113
6.6.	Referências Bibliográficas	113
7.	CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA DE <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i> Z31 E SUA VIABILIDADE A LONGO PRAZO.....	119
7.1.	Introdução	119
7.2.	Material e métodos.....	120
7.3.	Resultados	122
7.4.	Discussão.....	125
7.5.	Conclusão.....	127
7.6.	Referências Bibliográficas	127
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133

9. ANEXOS.....	134
9.1. Artigos publicados.....	134
9.1.1. Artigo publicado referente ao capítulo 1	134
9.1.2. Artigo publicado referente ao capítulo 2	142
9.1.3. Artigo publicado referente ao capítulo 3.....	148
9.1.4. Artigo publicado referente ao capítulo 4.....	155
9.2. Prêmios.....	163
9.2.1. Prêmio Professor Cláudio Bonjardim no V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018.....	163
9.2.2. Grande Prêmio de Iniciação Tecnológica e Inovação na XXVI Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2017.....	165
9.3. Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.....	167
9.3.1. Cadastro SisGen, número A6098AB: Estirpe não toxigênica de <i>Clostridium difficile</i> para prevenção e tratamento de infecção e/ou colonização por <i>Clostridium difficile</i>	167
9.3.2. Cadastro SisGen, número A0E1816: Desenvolvimento de produto para prevenção e tratamento de infecção e/ou colonização por <i>Clostridium difficile</i>	169
9.4. Certificado CEUA 013/2014: Avaliação de estirpes não toxigênicas de <i>Clostridium difficile</i> para a prevenção de diarreia neonatal em leitões.....	171
9.5. Depósito de Know-how: Uso de estirpe não toxigênica de <i>Clostridium difficile</i> para prevenção e tratamento da infecção e/ou colonização por <i>Clostridium difficile</i>	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores utilizados para a pesquisa de toxinas na estirpe Z31 de <i>C. difficile</i> pela técnica de PCR <i>in silico</i>	71
Tabela 2 -	Iniciadores utilizados para a pesquisa de fatores de virulência não-toxinas na estirpe Z31 de <i>C. difficile</i> pela técnica de PCR <i>in silico</i>	71
Tabela 3 -	Iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos na estirpe Z31 de <i>C. difficile</i> pela técnica de PCR <i>in silico</i>	72
Tabela 4 -	Número de genes associados às categorias funcionais gerais de acordo com o agrupamento de grupos ortólogos (COG).....	76
Tabela 5 -	Sumário de fagos preditos pelo PHAST em relação a comprimento, componentes e conteúdo GC.....	77
Tabela 6 -	Porcentagem de detecção das toxinas A/B de <i>C. difficile</i> em leitões dos grupos G1, G2 e G3 nos diferentes momentos experimentais. Letras diferentes significam diferença estatística na detecção das toxinas A/B entre os diferentes grupos experimentais no momento determinada pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).	94
Tabela 7 -	Correlação entre detecção de toxinas (EIA), cultura toxigênica de <i>C. difficile</i> (CT), sinais clínicos (SC), lesões macroscópicas (LMAC) e lesões microscópicas (LMIC) observadas nos leitões. P: valor P; CS: coeficiente de Spearman.....	95
Tabela 8 -	Desenho experimental utilizado para avaliação da estirpe não toxigênica de <i>C. difficile</i> (isolado Z31, ST 3, ribotipo 009) contra a infecção natural por <i>C. difficile</i> (ICD) em leitões localizados em três salas de maternidade (S1, S2 e S3) em uma granja comercial com diagnóstico prévio de ICD.....	105
Tabela 9 -	Taxa de isolamento de <i>C. difficile</i> toxigênico (CD), <i>Clostridium perfringens</i> tipo A β - positivo (CP) e <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (EC) em animais tratados com a estirpe não toxigênica de <i>C. difficile</i> Z31 e animais controle de três salas de maternidade diferentes (S1, S2 e S3) em uma granja de suínos. Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças estatísticas entre as taxas de isolamento nos animais tratados e controle pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).....	107
Tabela 10 -	Ocorrência da infecção por <i>C. difficile</i> (ICD) determinada pela detecção de toxinas A/B em fezes de leitões tratados com a estirpe não toxigênica de <i>C. difficile</i> Z31 e animais controle alocados em três diferentes galpões maternidade (S1, S2 e S3) em uma granja de suínos. Letras diferentes em colunas significam diferenças	

estatísticas entre o grupo tratado e o grupo controle pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).....	108
Tabela 11 - Coinfecções e escore de diarreia em leitões de um dia de vida do grupo tratado com a estirpe não toxigênica de <i>C. difficile</i> Z31 e do grupo controle nas três salas de maternidade diferentes (S1, S2 e S3) em uma granja de suínos.....	110

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Patogenia de *Clostridioides difficile*. Em (A) é demonstrado a maternidade contaminada com esporos que podem ser ingeridos pelos leitões. Uma vez ingeridos (B) os esporos resistem ao pH ácido do estômago e iniciam o processo de germinação no duodeno, com auxílio de alguns ácidos biliares. Ao chegar no cólon (C) as células vegetativas não encontram uma microbiota estabelecida, se aderem e colonizam o epitélio através de suas adesinas (p. ex. SlpA, GroEL, Cwp66, Fpb68). As estirpes toxigênicas produzem, então, as toxinas TcdA, TcdB e, eventualmente, CDT. A toxina CDT é internalizada e causa a protrusão de microtúbulos celulares, que facilita a adesão de outras células toxigênicas. Já as toxinas TcdA e TcdB, quando internalizadas, causam ruptura das junções, arredondamento e apoptose celular. Os enterócitos infectados produzem mediadores inflamatórios (p. ex. IL-1 β , IL-18), os quais são produzidos com maior intensidade por mastócitos e macrófagos após com a ruptura da barreira celular. Dessa forma, há aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de uma grande quantidade de neutrófilos e extravasamento de líquido vascular, intensificado pela presença das toxinas na lâmina própria, causando colite e edema de mesocólon. A diarreia é resultado da má absorção de líquidos causada pelo dano ao epitélio somada ao extravasamento de líquidos para o lúmen. Os animais infectados eliminam grande quantidade de esporos nas fezes (B) os quais aumentam a contaminação do ambiente..... 26
- Figura 2 - Fluxograma demonstrando as etapas de esporulação de *C. difficile* e as camadas do esporo. Inicialmente, uma célula pré-divisional inicia um processo de divisão assimétrica em resposta a estímulos externos, formando a célula mãe e o foresporo. Posteriormente, o foresporo é internalizado e inicia-se a deposição das camadas pela célula mãe. Por fim, há o rompimento da célula mãe com a liberação do esporo maduro com todas suas camadas envoltórias..... 27
- Figura 3 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão da estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31..... 75
- Figura 4 - Árvore filogenética da estirpe Z31 de *C. difficile* representando sua posição relativa no gênero *Clostridioides* baseado em sequências de 16S rRNA. O método estatístico utilizado foi a *maximum likelihood* e o número de *bootstrap* foi de 1000. Assim, os valores próximos aos nós representam a percentagem do número de vezes, em 1000 repetições, em que esse clado foi formado..... 75

Figura 5 -	<i>Heatplot</i> de similaridade entre a estirpe Z31 de <i>C. difficile</i> e as demais estirpes depositadas no GenBank realizada pelo programa Gegenees (Agren et al., 2012).....	77
Figura 6 -	Mapa circular gráfico do genoma de <i>Clostridioides difficile</i> Z31. De fora para o dentro: regiões de fagos previstas pelo PHAST; RNAs; CDS na cadeia <i>reverse</i> ; CDSs na cadeia <i>forward</i> ; Blastn com as estirpes BI9, BJ08, ATCC9689/DSM1296, BI1, 2007855, M120, CF5, CD196, CD630DERM, CD630, Cd5.3; variação de GC (<i>GC skew</i>); conteúdo do GC (<i>GC Content</i>) e genoma da estirpe Z31. As regiões destacadas em vermelho representam as regiões únicas encontradas no genoma da estirpe Z31 em relação às demais.....	78
Figura 7 -	Análise filogenômica entre a estirpe Z31 e as demais estirpes depositadas no GenBank realizada pelo programa Gegenees a partir de fragmentação de sequência com comprimento de 500 nucleotídeos.....	79
Figura 8 -	Desenho experimental utilizado para avaliar o efeito protetor da estirpe não toxigênica de <i>C. difficile</i> (NTCD) Z31 contra o desafio com uma estirpe toxigênica de <i>C. difficile</i> em leitões neonatos. SC: sinais clínicos, incluindo estado de hidratação e consistência das fezes; SC+: sinais clínicos, incluindo estado de hidratação, consistência de fezes, condição corporal e presença de fezes no períneo; EIA: ensaio imunoenzimático para detecção de toxinas A/B; LMAC: lesões macroscópicas, incluindo edema de mesocólon e necrose luminal; LMIC: lesões microscópicas; NTCD: estirpe não toxigênica de <i>C. difficile</i> ; CT: cultura toxigênica de <i>C. difficile</i> ; círculo preto: inóculo de NTCD; círculos brancos: avaliações; quadrados pretos: desafio com a estirpe toxigênica de <i>C. difficile</i>	90
Figura 9 -	Escore dos sinais clínicos em leitões após o desafio (soma dos momentos 24, 48 e 60 h). Foram considerados consistência fecal, estado de hidratação, condição corporal e presença de fezes no períneo. O asterisco indica diferença estatística entre os grupos determinada pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).....	93
Figura 10 -	Mesocólon dos animais experimentais após a necropsia. Em (A) observa-se leve congestão e leve edema de mesocólon em um animal do G2. Em (B) observa-se o mesocólon de um animal do grupo G1 sem alterações aparentes.....	93
Figura 11 -	Escore de edema de mesocólon observados durante a necropsia (A) e através da histopatologia (B). O asterisco indica diferença estatística entre os grupos determinada pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).....	94

Figura 12 - Detecção de isolados de <i>C. difficile</i> toxigênicos e não toxigênicos em G1 e G2 nos diferentes momentos experimentais. O asterisco indica diferença estatística entre o isolamento de estirpes toxigênicas nos grupos, determinada pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$). G1 - animais que receberam e estirpe Z31; G2 - controle positivo; T: estirpes toxigênicas de <i>C. difficile</i> ; NTCD: estirpes não toxigênicas de <i>C. difficile</i>	95
Figura 13 - Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados na granja antes e após a administração da estirpe não toxigênica de <i>Clostridioides difficile</i> Z31 nos leitões neonatos.....	104
Figura 14 - Escores de diarreia em leitões do grupo tratado com a estirpe não toxigênica de <i>Clostridioides difficile</i> Z31 e do grupo controle. Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).....	107
Figura 15 - Escores de diarreia em leitões com um dia de idade de acordo com o agente infeccioso. ICD: infecção por <i>Clostridium difficile</i> ; ETEC: <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica. Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).....	108
Figura 16 - Escores de diarreia em leitões dos grupos tratados e controle que desenvolveram infecção por <i>C. difficile</i> (ICD). Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).....	109
Figura 17 - Escores de diarreia em leitões dos grupos tratado e controle de acordo com o isolamento fecal da estirpe Z31. Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).....	110
Figura 18 - Contagem de esporos (Log_{10}) da estirpe Z31 em cinco diferentes meios de cultura. Os meios foram incubados em condições anaeróbicas a 37 °C até o dia 5, posteriormente foram mantidos em condições aeróbicas a 25 °C até o final da experimentação.....	122
Figura 19 - Frequência de esporulação da estirpe Z31 para os cinco meios testados. Letras diferentes no mesmo momento de avaliação indicam diferenças estatísticas entre as taxas de esporulação de Z31 induzidas pelos meios de cultura naquele momento ($p < 0,05$).....	123
Figura 20 - Contagens de alíquotas liofilizadas de esporos da estirpe Z31 armazenadas durante um período de 24 meses a 4 °C ou 25 °C. (A) Contagem de esporos e o desvio padrão das amostras a em cada um dos momentos analisados. (B) Modelo de regressão não linear dos dados originais.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCCs: Ácidos graxos de cadeia curta
- AS: Ágar Müeller-Hinton suplementado com sangue equino
- AST: Ágar Müeller-Hinton suplementado com sangue equino e taurocolato
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- BHI: Infusão Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion*)
- BHIS: caldo BHI suplementado com cisteína e extrato de levedura
- CA-ICD: Infecção por *Clostridioides difficile* associada a comunidade
- CCFA: Ágar cicloserina cefoxitina frutose
- CDS: *Coding Sequence*
- CDT: Toxina binária de *Clostridioides difficile*
- CDTa: Componente enzimático da toxina CDT
- CDTb: Componente de ligação e transporte da toxina CDT
- CHB: Colostro hiperimune bovino
- COG: Agrupamento de grupos ortólogos
- CPM: Colite pseudomembranosa
- CROPs: Região de oligopeptídeos repetitivos combinados
- CT: Cultura toxigênica
- DC: Cultura direta
- DNS: Diarreia neonatal suína
- EIA: Ensaio imunoenzimático
- ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
- GDH: Glutamato desidrogenase
- HMW SLP: Proteína de camada-S de alto peso molecular
- ICD: Infecção por *C. difficile*
- IDSA: *Infectious Disease Society of America*
- LMAC: Lesões macroscópicas
- LMIC: Lesões microscópicas
- LMW SLP: Proteína de camada-S de baixo peso molecular
- MLST: *Multilocus Sequence Typing*

NAATs: Técnicas de amplificação de ácido nucleico

NTCD: (Estirpe) não toxigênica de *Clostridioides difficile* (*non-toxigenic Clostridioides difficile*)

PaLoc: Locus de patogenicidade de *Clostridioides difficile*

PBS: Tampão fosfato salina

PCR: Reação da cadeia em polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PFGE: Gel de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

PYG: Caldo peptona, extrato de levedura, glicose

REA: Análise por enzimas de restrição (*Restriction Enzyme Analysis*)

RCM: Meio Clostridial Reforçado

RT: Ribotipo

RT-PCR: PCR em tempo real

SB: Meio de esporulação

SC: Sinais clínicos

SHEA: *Society for Healthcare Epidemiology of America*

SNC: Soroneutralização celular

SNV: Polimorfismos de nucleotídeo único

ST: *Sequence Type* (MLST)

TcdA: Toxina A de *Clostridioides difficile*

TcdB: Toxina B de *Clostridioides difficile*

TY: Meio triptose-extrato de levedura

UFC: Unidades formadoras de colônia

RESUMO

Clostridioides (Clostridium) difficile é um dos maiores causadores de diarreia neonatal em suínos e estudos tem apontado para um possível potencial zoonótico deste microrganismo. Apesar da importância do patógeno, não existem medidas específicas para a prevenção e controle da infecção por *C. difficile* (ICD). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar genotipicamente e avaliar o potencial de proteção de uma estirpe não toxigênica de *C. difficile* (NTCD), nomeada de Z31, contra a ICD em suínos. Para tal, o estudo foi dividido em cinco etapas: (1) Caracterização genotípica da estirpe Z31; (2) Avaliação da capacidade preventiva da estirpe Z31 contra a ICD em modelo experimental suíno; (3) Avaliação da capacidade preventiva da estirpe Z31 contra a ICD em uma granja comercial; (4) Avaliação de cinco meios de cultura para a produção e esporulação da estirpe Z31; e (5) Avaliação da viabilidade temporal de esporos liofilizados da estirpe Z31. O sequenciamento genômico revelou que a estirpe Z31 possui um cromossomo circular de 4.298.263 pares de base (bp), contendo genes responsáveis por produção e estabilidade dos esporos (*spo0A*), aderência intestinal (*slpA*) e formação de biofilme (*fliD*), porém, ausência dos genes codificadores das toxinas. Em modelo experimental em suínos neonatos, a Z31 preveniu a ICD, reduzindo os sinais clínicos, as lesões macro e microscópicas e a eliminação fecal do agente. Em uma granja comercial, mesmo na presença de outros enteropatógenos, a Z31 reduziu a ocorrência de ICD, a eliminação fecal de *C. difficile* toxigênico e a ocorrência de diarreia neonatal suína. Os meios BHI e RCM proporcionaram as maiores taxas de crescimento *in vitro* da estirpe Z31, atingindo concentrações de $6,57 \times 10^6$ UFC/mL com proporção de esporos superiores a 98%. Quando liofilizada, a estirpe Z31 manteve uma viabilidade aceitável tanto em temperatura ambiente quanto resfriada, de forma que 40-50% da carga total ainda se encontrava viável após 2 anos de armazenamento. Como conclusão, a estirpe Z31 foi capaz de prevenir a ICD em suínos e demonstrou características desejáveis para o seu potencial uso comercial.

Palavras-chave: *Clostridioides difficile*, clostridioses, probiótico, suínos, diarreia, edema de mesocólon

ABSTRACT

Clostridioides (Clostridium) difficile is one of the main causes of porcine neonatal diarrhea and studies has shown the possible zoonotic potential of this microorganism. Despite the importance of this pathogen, there are no specific measures for the prevention and control of *C. difficile* infection (CDI). Thus, the aim of the present study was to characterize genotypically and evaluate the protective potential of a non-toxigenic *C. difficile* strain (NTCD), named Z31, against CDI in piglets. For this purpose, the study was divided into five stages: (1) Genotypic characterization of the strain Z31; (2) Evaluation of the preventive capacity of the strain Z31 against the CDI in experimental pig model; (3) Evaluation of the preventive capacity of the strain Z31 against CDI in a commercial farm; (4) Evaluation of five culture media for the production and sporulation of the strain Z31; and (5) Evaluation of the temporal viability of freeze-dried spores of the strain Z31. Genomic sequencing revealed that the strain Z31 has a circular chromosome of 4,298,263 base pairs (bp) containing genes responsible for spore production and stability (*spo0A*), intestinal adhesion (*slpA*) and biofilm formation (*fliD*), but absence of toxins encoding genes. In an experimental model in neonatal pigs, the strain Z31 prevented CDI, reducing clinical signs, macro and microscopic lesions and fecal elimination of the agent. In a commercial farm, even in the presence of other enteropathogens, the Z31 reduced the occurrence of CDI, the fecal elimination of toxigenic *C. difficile* and the occurrence of neonatal porcine diarrhea. The BHI and RCM media provided the highest *in vitro* growth rates of the strain Z31, reaching concentrations of 6.57×10^6 CFU/ml with spore ratio greater than 98%. After lyophilization, the strain Z31 maintained acceptable viability at both, ambient and cooled temperatures, so that 40-50% of the total charge was still viable after 2 years of storage. In conclusion, the strain Z31 was able to prevent CDI in pigs and demonstrated desirable characteristics for its potential commercial use.

Key words: *Clostridioides difficile*, clostridiosis, probiotic, swine, diarrhea, mesocolon edema

1. INTRODUÇÃO

Clostridioides (Clostridium) difficile é um bastonete, Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos e potencialmente patogênico para humanos e diversos animais domésticos (Lawson *et al.*, 2016). O microrganismo é capaz de produzir três toxinas, sendo elas as toxinas A, B e binária, as quais são responsáveis por causar danos nos enterócitos, colite e diarreia, levando a uma doença conhecida como infecção por *C. difficile* (ICD) (Aktories *et al.*, 2017). Em humanos, a ICD é uma das mais importantes causas de infecção nosocomial, estando associada a administração de antimicrobianos (Martin *et al.*, 2016). Já em suínos, a ICD acomete leitões de um a sete dias de idade, os quais são susceptíveis à colonização por não possuírem a microbiota intestinal estabelecida. A doença é uma das principais causas de diarreia neonatal em leitões, causando prejuízos significativos para a suinocultura (Grzeškowiak *et al.*, 2018a). Além da importância da doença em suínos, há indícios que o aumento de casos de ICD associado a comunidade (CA-ICD) em humanos esteja relacionado ao possível potencial zoonótico do patógeno (Brown and Wilson, 2018). Apesar da importância de *C. difficile* na saúde humana e animal, não existe nenhum método preventivo específico para a doença, dificultando o seu controle (Moono *et al.*, 2016).

Algumas estirpes deste microrganismo não produzem as toxinas citadas, sendo denominadas estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD). Tais estirpes não são capazes de causar a doença, porém, podem apresentar potencial de colonização do trato intestinal, o que motivou estudos visando a sua utilização para o controle da doença em modelos animais e em humanos (Gerding *et al.*, 2018). No Brasil, um estudo preliminar caracterizou cinco estirpes NTCD isoladas de suínos, equinos e cães quanto ao ribotipo, capacidade de produção de esporos *in vitro* e resistência a antimicrobianos (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Dentre elas, a estirpe denominada Z31, isolada a partir de fezes de um cão saudável, demonstrou maior capacidade de produção de esporos, maior potencial resistência aos antimicrobianos, além de ser identificada como ribotipo 009, o mais comum dentre os não toxigênicos no Brasil. Numa etapa posterior, a estirpe Z31 foi capaz de conferir proteção contra a ICD em hamsters desafiados com uma estirpe toxigênica, o que fomentou estudos da estirpe nas espécies alvo (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). No presente estudo, a estirpe Z31 foi caracterizada genotipicamente, testada contra ICD em suínos e avaliada quanto ao possível uso comercial, conforme brevemente descrito abaixo.

Para avaliar o potencial genético da estirpe Z31 em conferir proteção contra a ICD, foi realizado o sequenciamento completo do seu genoma. Uma vez montado e anotado, foi realizada PCR *in silico* visando a detecção de importantes fatores de virulência relacionados a colonização do hospedeiro, produção de esporos e resistência a antimicrobianos. Tais genes pesquisados eram essenciais para que a estirpe Z31 fosse bem-sucedida em prevenir a ICD através do mecanismo de exclusão competitiva.

Em sequência, a estirpe Z31 foi testada com intuito de prevenir a ICD em um modelo experimental de leitões neonatos convencionais. Os animais foram mantidos em um ambiente controlado, receberam a estirpe Z31 e, posteriormente, foram desafiados com uma estirpe toxigênica previamente isolada de leitões com ICD. Tal etapa era crucial para obtermos a resposta se a estirpe possuía efeito protetor na espécie alvo sob desafio controlado, bem como mensurar com detalhes tais efeitos.

Na etapa subsequente, realizou-se o teste da estirpe Z31 contra ICD em leitões neonatos de uma granja comercial de ciclo completo. A granja em questão foi previamente avaliada para a presença

dos principais enteropatógenos que afetam leitões na primeira semana de vida, sendo *C. difficile* considerado o principal patógeno circulante. Os leitões, então, receberam a estirpe Z31 logo após o nascimento e, no dia seguinte, tiveram as fezes coletadas para isolamento e detecção de toxinas de *C. difficile*. Tal avaliação a campo tinha como objetivo avaliar a capacidade da estirpe Z31 em prevenir a ICD e a diarreia neonatal em condições naturais, na presença de outros enteropatógenos e sob diferentes níveis de desafio.

Posteriormente, visando o possível uso comercial da estirpe Z31, foram realizados testes de crescimento e esporulação em cinco diferentes meios de cultura e avaliação da viabilidade de esporos liofilizados mantidos em duas temperaturas por um período de dois anos. Esta etapa visou dar uma resposta prática a respeito da produção da estirpe Z31 e a cinética de viabilidade dos seus esporos em um tempo de prateleira estimado de dois anos.

Os resultados encontrados no presente trabalho permitiram uma caracterização genotípica e fenotípica mais aprofundada da estirpe Z31 e a elucidação de seu potencial para ser utilizada como método preventivo contra a ICD em suinocultura. Tais dados serão apresentados e discutidos ao longo do trabalho em quatro capítulos, precedidos de uma breve revisão de literatura sobre o tema e sumarizado nas considerações finais.

1. OBJETIVOS

Os objetivos foram subdivididos em objetivo geral e objetivos específicos.

1.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotipicamente a estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31, avaliar seu potencial protetor contra a infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) em leitões e avaliar características fenotípicas importantes da estirpe visando seu potencial uso comercial.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar genotipicamente a estirpe Z31 a partir do sequenciamento completo do genoma;
- Avaliar a capacidade preventiva da estirpe Z31 contra a ICD em modelo experimental suíno;
- Avaliar a capacidade preventiva da estirpe Z31 contra a ICD em uma granja comercial;
- Avaliar cinco meios de cultura para a produção de esporos da estirpe Z31;
- Avaliar a viabilidade de esporos liofilizados da estirpe Z31 por um período de dois anos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Clostridioides (Clostridium) difficile* – histórico

Os primeiros relatos de isolamento de *Clostridioides difficile* foram realizados a partir de mecônio e amostras fecais de crianças entre 0 e 10 dias (Hall and O'Toole, 1935). Os pesquisadores identificaram um bastonete, Gram-positivo, formador de esporos e produtor de um efeito tóxico altamente patogênico para coelhos e cobaias, o qual foi nomeado como *Bacillus difficilis*. Prévot (1938) sugeriu a mudança do gênero para *Clostridium* e, posteriormente, a espécie foi descrita com maiores detalhes em um manual de microrganismos anaeróbios (Holdeman *et al.*, 1977). Após um esforço da comunidade internacional para organizar a classificação taxonômica dos microrganismos, o nome *Clostridium difficile* foi oficializado e publicado no *Approved Lists of Bacterial Names* (Skerman *et al.*, 1980). Com o advento de estudos genéticos, foi proposta uma mudança de família e gênero, de modo que a nova nomenclatura seria *Peptoclostridium difficile* (Collins *et al.*, 1994; Yutin and Galperin, 2013). Entretanto, uma reclassificação foi realizada por Lawson *et al.* (2016) e publicada na lista de validação do *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, oficializando o nome do patógeno como *Clostridioides difficile* (Oren and Garrity, 2016).

O primeiro relato de colite pseudomembranosa (CPM), uma das principais lesões causadas por *C. difficile* em humanos, foi observado após uma cirurgia entérica (Finney, 1893 citado por Worsley, 1998). Entretanto, naquele momento não se conhecia os fatores de risco e os possíveis agentes etiológicos responsáveis pelo estabelecimento da lesão. Estudos preliminares demonstraram que a CPM era associada a cirurgias gastrointestinais e ao uso de antimicrobianos, podendo ou não ser precedida por diarreia. Diversos casos foram relacionados a presença de *Staphylococcus aureus* nas fezes, o qual foi apontado como provável agente etiológico (Smith *et al.*, 1953; Altemeier *et al.*, 1963). Mesmo com os avanços no entendimento da doença, os relatos de diarreia associada ao uso de antimicrobianos, sobretudo clindamicina, continuavam em ascensão devido ao aumento no uso destas drogas (Gorbach and Bartlett, 1977; Gurwith *et al.*, 1977).

No final da década de 1970, diversos estudos associaram a CPM à uma toxina clostridial, a qual era neutralizada por antitoxinas de *Clostridium sordellii*, mas não por antitoxinas de outras espécies de *Clostridium* (Bartlett *et al.*, 1977; Larson and Price, 1977; Rifkin *et al.*, 1977). George *et al.* (1978a) identificaram diversas espécies de *Clostridium* em conteúdo fecal de pacientes com CPM, entretanto, somente o sobrenadante de cultivo de *C. difficile* produzia efeito citopático similar ao do conteúdo fecal dos pacientes, efeito este que também era neutralizado pelas antitoxinas de *C. sordellii*. No mesmo ano, o pesquisador confirmou a participação de *C. difficile* em um caso de CPM de uma paciente (George *et al.*, 1978b). O postulado de Koch foi fechado com um experimento no qual a doença foi reproduzida em hamsters utilizando isolados de *C. difficile* oriundos de conteúdo fecal de humanos com CPM (Larson *et al.*, 1978).

Após a descoberta de *C. difficile* como causador da CPM e da difusão do conhecimento entre os profissionais de saúde durante a década de 1980, o número de casos relacionados ao patógeno subiu, sendo considerado um dos principais patógenos da década de 1990 (Riley, 1998). Devido às variações no curso clínico da doença, houve a proposição de novas nomenclaturas para a enfermidade, como doenças associadas a *C. difficile* e infecção por *C. difficile* (ICD), sendo este

último o nome mais utilizado nos dias atuais (Riley, 1998; Kuijper *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2016). No início da década de 2000, o número de casos continuou em ascensão na América do Norte e na Europa, com aumento da gravidade dos mesmos e da mortalidade dos pacientes, fazendo com que *C. difficile* fosse considerado o principal patógeno de infecção nosocomial já descrito (Kuijper *et al.*, 2006). Na década de 2010, houve redução dos casos nosocomiais nos centros de saúde devido a implementação de medidas de controle como isolamento dos pacientes suspeitos e racionalização no uso de antimicrobianos. Entretanto, os casos de ICD associados a comunidade (CA-ICD), que se referem aos casos em que o paciente não tenha sido admitido em uma unidade de saúde nas 12 semanas que antecederam o caso, aumentaram substancialmente, sendo uma das principais preocupações na atualidade (Eyre *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016; Dingle *et al.*, 2017).

Os primeiros registros relacionando *C. difficile* a doenças acometendo animais domésticos foram realizados em equinos nas décadas de 1970 e 1980 (Dabard *et al.*, 1979; Ehrich *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1987, 1988). Em suínos, houve um espaço de mais de uma década entre o primeiro isolamento (Jones and Hunter, 1983) e a elucidação da participação do agente como patógeno na espécie (Waters *et al.*, 1998). Animais de companhia foram detectados como possíveis reservatórios (Borriello *et al.*, 1983) e, posteriormente, *C. difficile* foi associado a quadros entéricos em cães (Berry and Levett, 1986; Weese *et al.*, 2001a) e suspeito de causar quadros diarreicos em gatos (Weese *et al.*, 2001b). Animais silvestres também podem ser acometidos pela infecção por *C. difficile*, porém os relatos ainda são escassos (Orchard *et al.*, 1983; Bojesen *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013a). Além destes, diversos animais domésticos, silvestres e sinantrópicos podem carrear o patógeno no trato gastrointestinal (Jardine *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016a).

A presença de *C. difficile* em seres humanos e animais fomentou a discussão sobre um possível papel zoonótico do patógeno ainda na década de 1980 (Mulligan, 1984). Ao longo dos anos, diversos estudos discutiram o possível potencial de transmissão do patógeno dos animais para seres humanos, seja por via direta ou por produtos de origem animal (Rupnik, 2007; Indra *et al.*, 2009; Warriner *et al.*, 2017; Brown and Wilson, 2018). Diversos estudos encontraram similaridades genéticas de isolados de humanos e animais, alguns deles demonstrando possíveis associações epidemiológicas (Keessen *et al.*, 2013; Loo *et al.*, 2016). Em adição, os casos de ICD em comunidade aumentaram substancialmente na última década, levando os pesquisadores a acreditarem que os animais tenham uma importância epidemiológica na transmissão da doença, a qual começa a ser tratada pela perspectiva da saúde única (Hensgens *et al.*, 2012; Squire and Riley, 2013). Devido à grande importância em saúde humana e animal, *C. difficile* foi alvo de estudos de diversos grupos de pesquisa nos últimos 50 anos. Diversos aspectos relacionados desde aos fatores de virulência do agente até ao tratamento e prevenção da doença foram elucidados, os quais serão brevemente abordados nas seções a seguir.

2.2. Caracterização do microrganismo

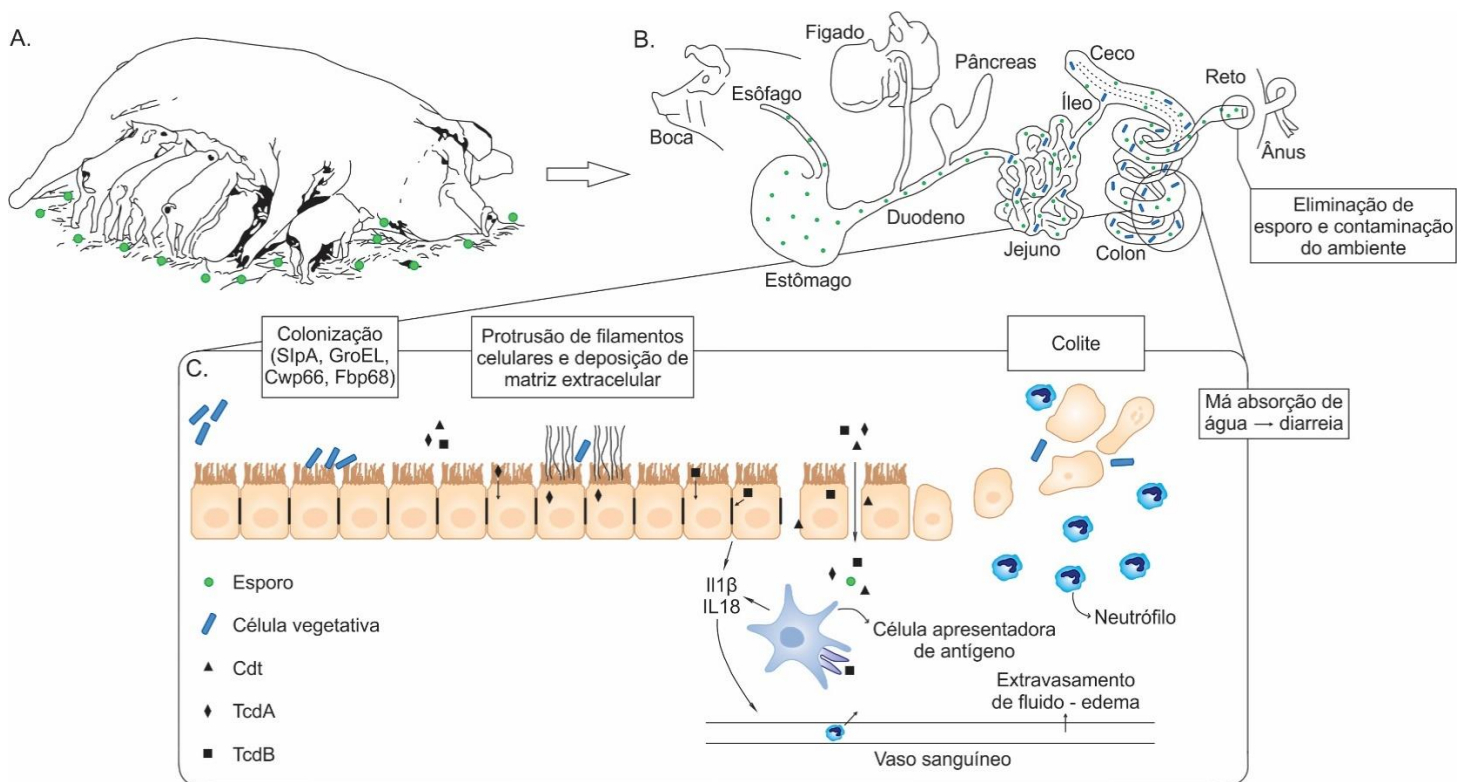
O gênero *Clostridioides*, pertencente ao filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales e família Peptostreptococcaceae, é caracterizado por ser anaeróbio estrito, Gram-positivo e se apresenta na forma de bastonetes pleiomórficos com dimensões variando entre 0,5-1,9 x 3,0 -16,9 µm. As bactérias do gênero são formadoras de esporos, usualmente móveis e produtoras de grande quantidade de gás em caldo peptona, extrato de levedura, glicose (PYG). Diversos ácidos graxos saturados ou insaturados de cadeia linear ou ramificada são produzidos a partir da fermentação do caldo PYG, nomeadamente ácidos acético, isobutírico, valérico, isocapróico, fórmico e láctico (Lawson *et al.*, 2016).

C. difficile é a espécie-tipo do gênero, um quimiorganotrófico que pode usar extrato de levedura como única fonte de carbono e energia e peptona como fonte de nitrogênio. O microrganismo é capaz de fermentar frutose, glicose, levulose, manitol, manose, salicina e usualmente xilose, mas não galactose, glicerol, inulina, lactose, rafinose ou sucrose. *C. difficile* liquefaz gelatina, mas não soro coagulado, leite ou proteínas do leite e é incapaz de reduzir sulfato. É negativo para lecitinase, lipase, oxidase e catalase. Acetato é o principal produto final produzido durante o processo de fermentação, entretanto, butirato, formato, isobutirato, isocaproato, isovalerato, lactato e valerato também podem ser produzidos (Prévot, 1938; Hatheway, 1990; Yutin and Galperin, 2013; Lawson *et al.*, 2016).

Considerando as sequências completas já depositadas no GenBank, o genoma de *C. difficile* possui tamanho médio de 4,17 Mbp, variando de 4,04 a 4,47 Mbp, e conteúdo GC médio de 28,6%, variando de 28,3 a 29,2% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=clostridioides+difficile>). Além disso, estima-se que cerca de 11% do genoma da espécie seja formado por elementos móveis genéticos, indicando uma considerável plasticidade genética (Mullany *et al.*, 2015). Genotipicamente, o microrganismo pode ser dividido em dois grandes grupos, as estirpes toxigênicas e as não toxigênicas. As estirpes toxigênicas possuem uma ilha genômica de 19,6 kb conhecida como locus de patogenicidade (PaLoc), a qual alberga os genes das toxinas A (TcdA) e B (TcdB), e eventualmente, o locus CdtLoc, uma região de 6,2 kb codificadora da toxina binária (CDT) (Gerding *et al.*, 2014). Já as estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) não possuem estes fragmentos genômicos, não sendo capazes de produzir tais toxinas (Natarajan *et al.*, 2013). Quanto às fontes, o microrganismo na forma esporulada pode ser encontrado em diversos ambientes, como solo, sedimentos marinhos, areia, instalações animais, ambiente hospitalar e fezes de humanos ou animais diarreicos ou não (Lawson *et al.*, 2016).

2.3. Fatores de virulência e patogenicia

As próximas seções irão detalhar os fatores de virulência e a sua relação com a patogenicia da doença, a qual se encontra resumida na figura 1.



Adaptado de Arruda, 2014.

Figura 1. Patogenia de *Clostridioides difficile*. Em (A) é demonstrado a maternidade contaminada com esporos que podem ser ingeridos pelos leitões. Uma vez ingeridos (B) os esporos resistem ao pH ácido do estômago e iniciam o processo de germinação no duodeno, com auxílio de alguns ácidos biliares. Ao chegar no cólon (C) as células vegetativas não encontram uma microbiota estabelecida, se aderem e colonizam o epitélio através de suas adesinas (p. ex. SlpA, GroEL, Cwp66, Fbp68). As estirpes toxigênicas produzem, então, as toxinas TcdA, TcdB e, eventualmente, CDT. A toxina CDT é internalizada e causa a protrusão de microtúbulos celulares, que facilita a adesão de outras células toxigênicas. Já as toxinas TcdA e TcdB, quando internalizadas, causam ruptura das junções, arredondamento e apoptose celular. Os enterócitos infectados produzem mediadores inflamatórios (p. ex. IL-1 β , IL-18), os quais são produzidos com maior intensidade por mastócitos e macrófagos após com a ruptura da barreira celular. Dessa forma, há aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de uma grande quantidade de neutrófilos e extravasamento de líquido vascular, intensificado pela presença das toxinas na lâmina própria, causando colite e edema de mesocólon. A diarreia é resultado da má absorção de líquidos causada pelo dano ao epitélio somada ao extravasamento de líquidos para o lúmen. Os animais infectados eliminam grande quantidade de esporos nas fezes (B) os quais aumentam a contaminação do ambiente.

O conhecimento de fatores de virulência dos agentes etiológicos é essencial para o entendimento da patogenia das doenças infecciosas e para a proposição de medidas de prevenção e controle. Relacionado a *C. difficile*, três grandes grupos de fatores de virulência podem ser destacados, sendo eles os esporos, considerados as partículas infecciosas; as adesinas, que permitem a

colonização do hospedeiro; e as toxinas, responsáveis pelas lesões teciduais e quadros clínicos causados durante a infecção (Awad *et al.*, 2014).

2.4. Esporulação e germinação

A formação de esporos é essencial para a sobrevivência da bactéria no ambiente, uma vez que a forma vegetativa de *C. difficile* não tolera oxigênio, mesmo em baixas concentrações (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Assim, o microrganismo em sua forma esporulada pode permanecer viável no ambiente à espera de hospedeiros susceptíveis à colonização ou infecção (Britton and Young, 2014). Em adição, os mecanismos de germinação também são necessários para que a bactéria abandone o estágio de dormência da fase esporulada e possa voltar ao estado vegetativo, no qual o microrganismo possui seu maquinário metabólico funcional, sendo capaz de replicar e produzir as toxinas responsáveis pelas lesões em humanos e animais (Zhu *et al.*, 2018)

O processo de esporulação se inicia com uma divisão celular assimétrica, no qual há a formação de um septo gerando um compartimento menor e a célula mãe (Figura 2). Em um segundo momento, a célula mãe engloba o compartimento menor, que passa a ficar completamente no interior do seu citoplasma, sendo chamado de foresporo. As demais camadas do esporo são depositadas nesse momento, especialmente a cápsula e o córtex. Por fim, há a lise da célula mãe e a liberação do esporo no ambiente (Paredes-Sabja *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018).

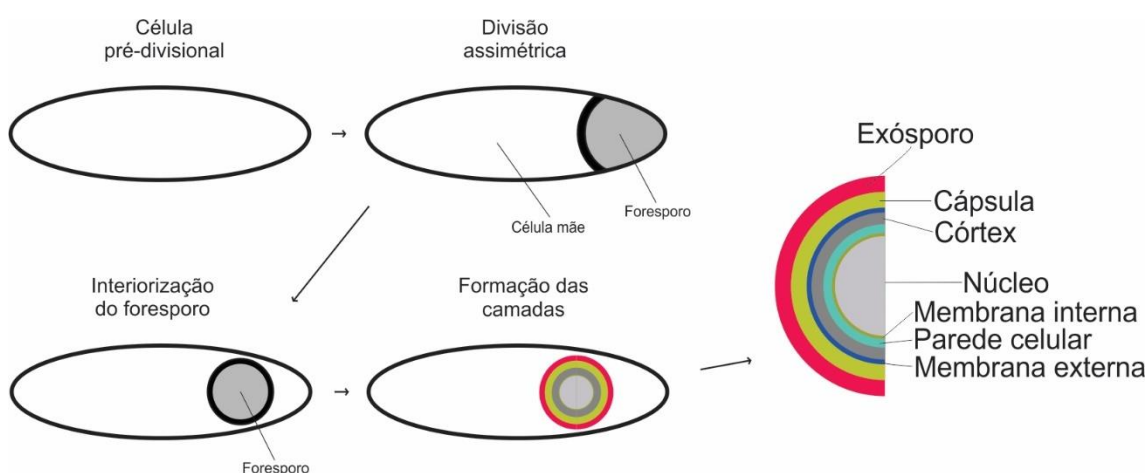


Figura 2. Fluxograma demonstrando as etapas de esporulação de *C. difficile* e as camadas do esporo. Inicialmente, uma célula pré-divisional inicia um processo de divisão assimétrica em resposta a estímulos externos, formando a célula mãe e o forespore. Posteriormente, o forespore é internalizado e inicia-se a deposição das camadas pela célula mãe. Por fim, há o rompimento da célula mãe com a liberação do esporo maduro com todas suas camadas envoltórias.

O esporo maduro possui pelo menos seis camadas, como pode ser observado na figura 2. O núcleo contém o material genômico condensado e o maquinário enzimático essencial para a germinação (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Envolvendo o núcleo encontra-se uma camada de membrana celular contígua com a parede celular bacteriana. Em sequência é localizado o córtex, uma camada de ácido N-acetil murâmico e lactamato δ -murâmico, com função de proteção do esporo e desempenhando papel essencial no processo de germinação. Uma membrana celular externa oriunda da célula mãe envolve o córtex, a qual é seguida de uma cápsula proteica, essencial para

conferir a resistência dos esporos a diversos desinfetantes e interagir com receptores de células do epitélio intestinal (Paredes-Sabja *et al.*, 2012, 2014). Algumas estirpes possuem uma última camada chamada exósporo, composta por proteínas tipo colágeno (Awad *et al.*, 2014). Estirpes que possuem esta camada apresentam maior resistência a desinfetantes e ao calor, porém tem maior dificuldade de germinação e de aderência a linhagens celulares (Escobar-Cortés *et al.*, 2013).

O processo de esporulação de *C. difficile* ainda não foi completamente esclarecido e, em adição, possui particularidades quando comparado com *Bacillus subtilis*, modelo clássico de estudos de esporulação, e com outras espécies do gênero *Clostridium* (Pereira *et al.*, 2013; Dürre, 2014; Paredes-Sabja *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018). Estima-se que 798 genes possam influenciar o processo de esporulação de *C. difficile*, alguns deles também relacionados à produção de toxinas (Dembek *et al.*, 2015; Girinathan *et al.*, 2018). Não existe um consenso sobre os sinais ou moléculas que ativam a esporulação, entretanto, a escassez de nutrientes é considerada um dos principais fatores para o estímulo do processo (Edwards *et al.*, 2014). Nesse contexto, as proteínas sensoras nutricionais de aminoácidos e carboidratos, CcpA e CodY respectivamente, estão envolvidas na regulação de genes essenciais no processo de esporulação, como *spo0A* (Zhu *et al.*, 2018). A fosforilação do regulador transcricional Spo0A por enzimas histidinas quinase geralmente marca o início do processo de esporulação, pois ele é capaz de ativar os quatro principais fatores sigma de RNA polimerase, SigE, SigF, SigG e SigK, os quais orquestram o restante do processo (Saujet *et al.*, 2014; Girinathan *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). Durante as fases finais de formação e maturação do esporo, as proteínas SpoIVA e SpoVM são essenciais para a deposição das proteínas da cápsula, as quais são codificadas pelos genes *cotA*, *cotB*, *cotCB*, *cotD*, *cotE* e *sodA* (Awad *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018).

Os esporos são considerados fatores de virulência por inúmeras razões, a começar pela sua resistência ambiental, decorrente de um baixo teor de água (25 a 60%), alto conteúdo de ácido dipicolínico e condensação do material genético (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Em conjunto, esses fatores minimizam o potencial de dano ao material genético, permitem que os esporos sejam resistentes a dissecação e conferem resistência a diversos métodos físicos e químicos de desinfecção (Lawley *et al.*, 2010; Awad *et al.*, 2014; Paredes-Sabja *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2017). Dessa forma, os esporos têm a capacidade de permanecer viáveis em instalações animais e hospitalares mesmo após procedimentos de desinfecção, e, uma vez ingeridos, também são capazes de resistir a pH ácido do estômago, ao contrário das células vegetativas (Awad *et al.*, 2014; Koenigsknecht *et al.*, 2015). Além disso, proteínas presentes na cápsula dos esporos são capazes de interagir com receptores de macrófagos e células de linhagem intestinal, o que poderia favorecer sua aderência no trato gastrointestinal (Paredes-Sabja *et al.*, 2012; Awad *et al.*, 2014).

Ainda que os esporos tenham alguma capacidade de aderência ao epitélio intestinal, a colonização e posterior produção de toxinas é feita pela célula vegetativa, de forma que é essencial a germinação dos esporos para o estabelecimento da doença (Hong *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2018). A germinação se inicia em resposta a algumas substâncias consideradas germinantes e cogermnantes. Os principais germinantes de *C. difficile* são sais biliares derivados do ácido cólico, como o taurocolato, ao passo que diversos aminoácidos podem atuar como cogermnantes, sendo a glicina, a alanina e a taurina os mais eficientes (Shrestha and Sorg, 2018; Zhu *et al.*, 2018). Apesar de alguns sais biliares serem pobres germinantes ou até mesmo inibirem a germinação, a exemplo do quenodesoxicolato, a proporção de sais germinantes é maior no intestino delgado e no cólon (Sorg and Sonenshein, 2009; Koenigsknecht *et al.*, 2015). Já os ácidos biliares secundários, oriundos do metabolismo dos sais biliares por bactérias da microbiota,

possuem um efeito inibitório na germinação dos esporos. Nesse sentido, o uso de antimicrobianos pode favorecer a germinação dos esporos de *C. difficile*, uma vez que causa redução da microbiota indígena e consequente redução dos ácidos biliares secundários (Thanissery *et al.*, 2017).

As lipoproteínas GerG e GerS possuem importante papel no processo de germinação, de forma que a deleção de seus respectivos genes ocasiona uma menor responsividade aos germinantes e defeitos no processo de germinação (Fimlaid *et al.*, 2015; Donnelly *et al.*, 2017). Já a pseudoprotease CspC é reconhecida como um receptor dos germinantes, dando início a uma cascata proteolítica mediada pelas proteases CspBA e SleC, as quais são responsáveis pela hidrólise do córtex (Paredes-Sabja *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2017). Também foi demonstrado que o cálcio possui um importante papel na germinação, provavelmente atuando como um cofator das proteases citadas anteriormente (Kochan *et al.*, 2018). Já a reidratação da célula está relacionada à liberação do ácido dipicolínico presente no núcleo do esporo, o qual ocorre após a degradação do córtex em *C. difficile* (Francis and Sorg, 2016). Com a germinação, a forma esporulada chega ao estágio de célula vegetativa, podendo colonizar o hospedeiro com o auxílio das adesinas que serão melhor detalhadas no item subsequente (Awad *et al.*, 2014).

2.5. Colonização

Após a germinação, o microrganismo necessita colonizar o trato gastrointestinal para se replicar e, eventualmente, produzir as toxinas responsáveis pelos sinais clínicos (Awad *et al.*, 2014; Janoir, 2016). Para ser efetivo na colonização, o microrganismo deve ser resistente a algumas defesas naturais do hospedeiro como a lisozima, responsável por promover a hidrólise da parede bacteriana, e as defensinas, moléculas antimicrobianas do sistema imune inato (Davis and Weiser, 2011; Zhu and Gao, 2013). *C. difficile* possui uma estrutura de peptidoglicano modificada que confere uma resistência natural à lisozima (Peltier *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2014). Ademais, *C. difficile* possui diversos mecanismos de resistência às defensinas, que possibilitam a sobrevivência da célula vegetativa no processo de adesão ao epitélio (Ho and Ellermeier, 2011; Janoir, 2016).

Dentre as adesinas de *C. difficile*, destacam-se as proteínas de camada de superfície celular ou camada-S (*S-layer*), composta por 29 proteínas cujos domínios estão contidos no locus *slpA* (Merrigan *et al.*, 2013; Awad *et al.*, 2014; Bradshaw *et al.*, 2017a). Estirpes cuja camada-S se encontra ausente são mais susceptíveis às defesas inatas do hospedeiro e não são capazes de causar ICD em hamsters (Kirk *et al.*, 2017). O principal e mais abundante componente da camada-S é o SlpA, o qual é clivado em dois fragmentos, chamados de proteína de camada-S de alto (HMW SLP) e baixo (LMW SLP) peso molecular (Awad *et al.*, 2014). Apesar do mecanismo de adesão celular por estas proteínas não ser completamente esclarecido, o pré-tratamento de estirpes com anticorpos anti-SlpA reduzem drasticamente sua aderência em linhagens celulares de mamíferos (Merrigan *et al.*, 2013). Além disso, a LMW SLP, camada mais externa, é bem variável entre as estirpes, configurando um possível mecanismo de escape do sistema imune e que pode explicar a diferença da capacidade de colonização entre estirpes (Calabi *et al.*, 2001; Bradshaw *et al.*, 2017a; Lynch *et al.*, 2017). Outras proteínas pertencentes à camada-S de *C. difficile* que podem apresentar funções de adesinas são a Cwp66 (Waligora *et al.*, 2001), Cwp2 e Cwp8 (Bradshaw *et al.*, 2017b), estas duas últimas com estruturas similares a porção LMW SLP de SlpA. As proteínas Cwp84 e Cwp13, também estão presentes nesse locus e possuem um domínio cisteína protease responsável pela clivagem da proteína SlpA nas porções HMW SLP e LMW SLP (Awad *et al.*, 2014; Bradshaw *et al.*, 2017a).

Duas outras proteínas que demonstraram atividade de adesinas foram a lipoproteína CD630_08730 e a proteína do choque térmico GroEL (Péchiné *et al.*, 2013; Kovacs-Simon *et al.*, 2014). Mutantes para a lipoproteína CD630_08730 tiveram uma drástica redução na adesão de *C. difficile* em linhagem celular Caco-2 (Kovacs-Simon *et al.*, 2014), ao passo que a imunização de camundongos contra GroEL reduziu a colonização intestinal pelo patógeno nos animais (Péchiné *et al.*, 2013). A proteína ligadora de fibronectina (Fbp68) e a proteína ligadora de colágeno (CbpA) também são reconhecidas como importantes no processo de colonização, entretanto, estudos com mutantes não identificaram impacto na taxa de aderência ao colágeno ou às linhagens celulares, demonstrando que tais adesinas não são as mais importantes no processo de colonização (Barketi-Klai *et al.*, 2011; Tulli *et al.*, 2013; Awad *et al.*, 2014; Janoir, 2016).

Um importante e controverso fator de virulência de *C. difficile* é o flagelo, que além de conferir motilidade para as estirpes, também influencia a produção de toxinas, a adesão celular e a formação de biofilmes, tendo uma participação direta e/ou indireta na patogenia da doença (Awad *et al.*, 2014; Barketi-Klai *et al.*, 2014; Janoir, 2016). O aparato flagelar é produzido por diversos genes presentes em três operons, sendo eles F1, F2 e F3 (Stevenson *et al.*, 2015). Os genes responsáveis pelo filamento da flagelina (*fliC*) e sua capa proteica (*fliD*) se localizam no operon F1 e são os principais focos para o entendimento da importância dessa estrutura na patogenia da doença (Stevenson *et al.*, 2015; Janoir, 2016). Em relação à colonização, o papel do flagelo é estirpe dependente, de forma que algumas estirpes possuem maior capacidade de aderência celular na presença de FliC e FliD, como a estirpe hipervirulenta R20291 (ribotipo 027), enquanto outras tem maior capacidade de colonização quando o flagelo está ausente, a exemplo da estirpe modelo de *C. difficile* para estudos de inserção genética (630 Δ erm) (Tasteyre *et al.*, 2001; Dingle *et al.*, 2011; Baban *et al.*, 2013). Quanto à produção de toxinas, estudos com a estirpe 630 Δ erm mostraram que a depleção de genes do operon F3 diminui a expressão dos genes responsáveis pelas toxinas enquanto a depleção dos genes presentes no operon F1, como *fliC* e *fliD*, aumentam a produção de toxinas (Aubry *et al.*, 2012; Baban *et al.*, 2013). Além disso, as amostras com deleção dos genes *fliC* e *fliD* são, via de regra, mais virulentas que as estirpes selvagens (Dingle *et al.*, 2011; Baban *et al.*, 2013; Stevenson *et al.*, 2015). A ausência da flagelina FliC provoca regulação positiva de inúmeros genes relacionados ao metabolismo, ao crescimento celular e à resistência a antimicrobianos, sugerindo que a expressão desses genes pode estar relacionada com o aumento de virulência das estirpes mutantes (Barketi-Klai *et al.*, 2014). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que estirpes que possuem o flagelo induzem uma resposta inflamatória mais acentuada que as suas mutantes, reacendendo a discussão a respeito da importância das flagelinas como fator de virulência (Batah *et al.*, 2017).

Por fim, especula-se que a formação de biofilmes possa desempenhar um papel na manutenção da infecção e nos quadros de recorrência (Janoir, 2016). Em infecções experimentais já foram encontradas colônias multicelulares de *C. difficile*, similares a biofilmes associados à mucosa (Semenyuk *et al.*, 2015). *In vitro*, os biofilmes são formados por bactérias embebidas em uma matriz contendo DNA extracelular, polissacarídeos, proteínas, como as Cwp's, e toxinas, especialmente a toxina A (Semenyuk *et al.*, 2014). A formação dos biofilmes é regulada pelos genes *spo0A* e *luxS*, tendo participação de outros fatores de virulência, como a protease Cwp84, o flagelo, o pili tipo IV e o segundo mensageiro c-di-GMP (Semenyuk *et al.*, 2014; Janoir, 2016; McKee *et al.*, 2018). Deve-se ressaltar que, em biofilmes, o microrganismo é capaz de resistir a antimicrobianos e ao estresse oxidativo, além de promover a persistência das bactérias na forma esporulada, o que poderia contribuir para a persistência da infecção (Crowther *et al.*, 2014).

2.6. Toxinas

Uma vez estabelecida a colonização, *C. difficile* pode produzir as toxinas como forma de ampliar os nutrientes disponíveis para sua manutenção e replicação (Di Bella *et al.*, 2016; Aktories *et al.*, 2017). O microrganismo produz três toxinas, TcdA e TcdB, ambas da família das grandes toxinas clostridiais glicosilantes, e a CDT, uma toxina de ADP-ribosilação (Popoff and Bouvet, 2009). As toxinas são os principais fatores de virulência de *C. difficile*, tendo sido amplamente estudadas (Voth and Ballard, 2005; Popoff and Bouvet, 2009; Gerding *et al.*, 2014; Carter *et al.*, 2015; Di Bella *et al.*, 2016; Aktories *et al.*, 2017, 2018; Chandrasekaran and Lacy, 2017). Nesta seção, serão abordados brevemente a localização genética destas toxinas e seus mecanismos de ação que culminam nas alterações patofisiológicas.

As toxinas TcdA e TcdB estão localizadas no locus de patogenicidade (PaLoc), uma ilha de patogenicidade de 19,6 kb que codifica os genes *tcdA* e *tcdB*, responsáveis pela produção das toxinas, além dos genes *tcdR*, *tcdE* e *tcdC* (Dingle *et al.*, 2014). O gene *tcdR* codifica um fator sigma de RNA polimerase que funciona como um promotor dos genes *tcdA* e *tcdB*, sendo um regulador positivo da produção de toxinas (Mani and Dupuy, 2001). Em contraponto, uma corrente de pesquisadores defende que o gene *tcdC* é um regulador negativo dos genes *tcdA* e *tcdB*, e a exacerbada produção de toxinas pelas estirpes hipervirulentas (RT027) seria consequência da produção de uma proteína TcdC truncada (Matamouros *et al.*, 2007; Dupuy *et al.*, 2008; Jabbari *et al.*, 2015). Tais resultados não foram confirmados em estudos utilizando mutantes do gene *tcdC*, de forma que mais esclarecimentos são necessários a respeito da função desta proteína (Bakker *et al.*, 2012; Cartman *et al.*, 2012). Já a TcdE, uma proteína semelhante a holina, está relacionada à secreção das toxinas TcdA e TcdB, sobretudo nas estirpes que secretam grandes quantidades desta toxina (Govind *et al.*, 2015; Abt *et al.*, 2016).

In vitro, as toxinas são produzidas no final da fase exponencial (fase log), quando os nutrientes do meio começam a ficar escassos (McKee *et al.*, 2013). Pouco se sabe a respeito da integração entre o metabolismo bacteriano e a indução da produção de toxinas, mas a glicose, assim como alguns aminoácidos, como prolina, glicina e valina inibem a produção de toxinas, ao passo que ácidos graxos voláteis de cadeia curta, como o butirato estimulam a produção das mesmas (Bouillaut *et al.*, 2015; Martin-Verstraete *et al.*, 2016). Estudos *in vivo* comprovaram que a expressão dos genes relacionados à produção de toxinas aumenta numa fase tardia após a infecção, acompanhado de uma mudança no perfil de genes relacionados ao metabolismo, corroborando com a hipótese de escassez de nutrientes como estímulo para a produção de toxinas (Janoir *et al.*, 2013). A amplificação desta produção, ao nível de população, provavelmente está relacionada aos mecanismos de *quorum sensing* mediados por peptídeos de sinalização da família Agr, os quais estão relacionados ao controle de diversos genes associados à produção de toxinas (Darkoh *et al.*, 2015).

Estruturalmente, tanto a TcdA quanto a toxina TcdB seguem o modelo ABCD, onde A é uma glucosil transferase com atividade biológica; a porção B é uma região de oligopeptídeos repetitivos combinados (CROPs) relacionada à ligação aos receptores; a região C é um domínio cisteína protease que promove autoclivagem das toxinas; e a região D é envolvida na translocação das toxinas para o citosol (Di Bella *et al.*, 2016).

A ligação das toxinas em seus receptores é o primeiro passo para que elas possam agir nas células. Carboidratos e lipídeos presentes nas membranas celulares podem fazer o papel de receptores funcionais para ambas as toxinas e essa ligação não é necessariamente mediada pelos CROPs

(Gerhard, 2017). Receptores proteicos específicos para a TcdA ainda não foram identificados, mas alguns estudos apontam que a proteína gp96 possa ter alguma participação no processo de internalização desta toxina (Na *et al.*, 2008; Orrell *et al.*, 2017). Já a TcdB pode se ligar a três diferentes receptores, sendo eles o proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), receptores da família frizada Wnt (FZDs) e receptores de poliovírus 3 (PVRL3) (Gerhard, 2017; Orrell *et al.*, 2017). Uma vez internalizadas, há uma diminuição no pH do endossomo que causa uma mudança conformacional da proteína, permitindo que porções hidrofóbicas da região D fiquem expostas e se liguem na membrana do endossomo, catalisando a formação de poros (Chandrasekaran and Lacy, 2017). As regiões A e C são translocadas para o citosol e, após a ligação do inositol hexafosfato, a região C promove a autocatálise, liberando a enzima glicosil transferase no citosol, a qual é responsável pela função biológica da toxina (Aktories *et al.*, 2017; Chandrasekaran and Lacy, 2017).

Uma vez livre no citosol, a porção glicosil transferase das toxinas TcdA e TcdB promove a glicosilação das proteínas Rho utilizando a UDP-glicose como substrato (Aktories *et al.*, 2017). As proteínas Rho são responsáveis por interagir com diversos efetores fundamentais nas células, participando da manutenção da barreira epitelial, migração celular, fagocitose, produção de citocinas e sinalização celular imune (Chandrasekaran and Lacy, 2017). A glicosilação destas proteínas impede que elas desempenhem seu papel biológico, levando às alterações patofisiológicas observadas nos quadros de ICD (Aktories *et al.*, 2017). Entre estes efeitos, destaca-se a redistribuição dos filamentos de actina do citoesqueleto e a dissociação das ocludinas, as quais promovem efeitos citopáticos que prejudicam a funcionalidade e a integridade epitelial (Di Bella *et al.*, 2016). Em adição, há a ativação de caspases que induzem a apoptose celular, causando uma ruptura na barreira celular (Aktories *et al.*, 2017). As toxinas também induzem uma resposta inflamatória devido à ativação de inflamassomos e consequente piroptose das células epiteliais, mediados pelas citocinas IL-1 β e IL-18 (Aktories *et al.*, 2017). Em conjunto, tais processos ocasionam uma intensa migração de células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, ao local de infecção devido à liberação de interleucinas de perfil inflamatório como a IL-8 e a INF- γ (Aktories *et al.*, 2017; Chandrasekaran and Lacy, 2017). A necrose celular também ocorre devido à intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzidas pela toxina TcdB, as quais alteram a integridade da membrana celular independentemente da produção das caspases (Di Bella *et al.*, 2016; Aktories *et al.*, 2017).

A toxina CDT é encontrada em 6 a 30% das estirpes de *C. difficile*, algumas delas denominadas hipervirulentas, e o seu papel na patogenia da doença ainda não está completamente esclarecido (Smits, 2013; Gerding *et al.*, 2014; Aktories *et al.*, 2018). Os genes responsáveis pela produção desta toxina estão localizados no CdtLoc, uma região de 6,2 kb que, em amostras negativas, são substituídas por uma região de 4,2 kb contendo pseudogenes, ou um fragmento curto de 68 bp (Gerding *et al.*, 2014). O locus é formado pelos genes *cdtA* e *cdtB*, responsáveis por formar a toxina CDT e o gene *cdtR*, que atua como regulador positivo (Smits *et al.*, 2016). O componente CDTa possui a atividade biológica de ADP-ribosiltransferase, ao passo que o componente CDTb é responsável pela ligação ao receptor, inserção na membrana e formação de poros (Aktories *et al.*, 2018).

Resumidamente, o componente CDTb promove uma autoproteólise no lúmen intestinal, se oligomeriza e se liga ao receptor de lipoproteína estimulado por lipólise (LSR). Em um momento subsequente, o componente enzimático CDTa se liga ao complexo CDTb-receptor, sendo endocitado (Aktories *et al.*, 2017). A redução do pH no endossomo permite a inserção da estrutura polimerizada como um canal transmembrana em forma de barril, permitindo a passagem do

componente CDTa para o interior do citosol (Gerding *et al.*, 2014; Aktories *et al.*, 2018). Uma vez no citosol, CTDa promove a ADP-ribosilação da actina monomérica, impedindo que ela se polimerize. Dessa forma, a medida que os filamentos não são repostos, ocorre a completa despolimerização do citoesqueleto de actina (Aktories *et al.*, 2018). Como consequência, há alteração da morfologia celular com perda da barreira epitelial e comprometimento de diversas funções celulares, como migração, endocitose e secreção (Gerding *et al.*, 2014). Outro efeito da despolimerização do citoesqueleto é a protusão de filamentos celulares no lúmen intestinal causada pela polimerização acentuada dos microtúbulos que, em condições normais, são regulados quando entram em contato com a camada cortical de actina (Schwan *et al.*, 2014). Em adição, a toxina reorienta vesículas contendo componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina e fibronectina) das membranas basolaterais para o lúmen, e a exocitose destas faz com que haja a formação de uma rede viscosa mais favorável pra aderência de novos microrganismos, incluindo *C. difficile* (Aktories *et al.*, 2018). Outro possível efeito da CDT na patogenia da ICD é a indução de processo inflamatório via Receptor do tipo Toll 2 (TLR2), suprimindo uma resposta eosinofílica protetora (Cowardin *et al.*, 2016).

Atuando em sinergia ou não, as toxinas TcdA, TcdB e CDT causam comprometimento e/ou destruição do epitélio do cólon, prejudicando a absorção de água e eletrólitos, o que pode causar diarreia por mal absorção nos indivíduos infectados (Smits *et al.*, 2016). Em adição, as toxinas estimulam um intenso processo inflamatório, o qual é amplificado quando as mesmas atingem a lâmina própria devido à perda da barreira celular, levando a liberação de IL-1, IL-8, histamina, prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico por macrófagos, mastócitos e células dendríticas (Chandrasekaran and Lacy, 2017). Com a amplificação destes fatores, há um intenso extravasamento de líquidos vasculares para o local de infecção, causando edema, e acúmulo de células inflamatórias, que contribuem na destruição tecidual e na formação de áreas epiteliais necróticas que podem ser observados em indivíduos infectados (Voth and Ballard, 2005; Di Bella *et al.*, 2016; Aktories *et al.*, 2017). A principal lesão observada em suínos é o edema de mesocólon, que pode ser de leve à intenso (Waters *et al.*, 1998; Cappuccio *et al.*, 2009). Microscopicamente, observa-se leve à intenso edema de mesocólon e de submucosa com exsudação multifocal de muco, fibrina e agregados polimorfonucleares, especialmente neutrófilos (Songer and Anderson, 2006). Também é observada a lesão conhecida como *volcano-like*, caracterizada pela infiltração focal de neutrófilos e macrófagos na lâmina própria e no lúmen como uma erupção vulcânica (Cappuccio *et al.*, 2009). Lesões como dispneia, distensão abdominal, hidrotórax, edema escrotal e ascite também já foram observados (Songer and Anderson, 2006).

2.7. Epidemiologia molecular

Atualmente, a tipificação de microrganismos patogênicos é uma ferramenta essencial para o acompanhamento de surtos e vigilância de doenças infecciosas, sendo primordial para definir a população em risco, direcionar o tratamento e guiar métodos de prevenção e controle (MacCannell, 2013). As primeiras técnicas de tipificação aplicadas a *C. difficile* foram baseadas em características fenotípicas, como padrões de resistência a antibióticos, proteínas solúveis e produção de bacteriocinas (Killgore *et al.*, 2008). Com o desenvolvimento tecnológico, métodos baseados no genoma foram sendo desenvolvidos e aplicados ao estudo de *C. difficile*, gerando informações importantes para serem aplicadas aos surtos causados pelo patógeno (Rodriguez *et al.*, 2016b). Na presente seção, serão descritas brevemente as técnicas mais utilizadas para tipificação de *C. difficile* e, posteriormente, os tipos mais comumente encontrados em seres humanos e suínos. Os leitores que buscam detalhamento das técnicas moleculares e comparação

entre elas podem consultar a vasta bibliografia já publicada acerca do assunto (Killgore *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2010; Janezic and Rupnik, 2010; Rodriguez *et al.*, 2016b; Rupnik and Janezic, 2016; Stojanov *et al.*, 2016; Bletz *et al.*, 2018).

Uma técnica de tipificação utilizada com bastante frequência é a detecção dos genes codificadores das toxinas TcdA e TcdB por reação em cadeia da polimerase (PCR) que, basicamente, permite identificar se os isolados em questão são toxigênicos (*tcdA+tcdB+*, *tcdA+tcdB-*, *tcdA-tcdB+*) ou não toxigênicos (*tcdA-tcdB-*) (Lemee *et al.*, 2004). Apesar de ser uma técnica básica, ela permite identificar se os isolados são ou não capazes de causar a doença devido a presença das toxinas, haja vista que as estirpes não toxigênicas não possuem potencial patogênico (Natarajan *et al.*, 2013). Aprimoramentos desta técnica já foram realizados para identificação dos genes codificadores da toxina binária (*cdtA* e *cdtB*) e do regulador negativo das toxinas TcdA e TcdB (*tcdC*) (Antikainen *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Tais aprimoramentos se justificam uma vez que a estirpe que foi responsável pelo aumento de casos e da gravidade dos mesmos na América do Norte e na Europa nos anos 2000, considerada hipervirulenta, além de ser *tcdA+tcdB+*, possuía os genes *cdtA* e *cdtB* e uma forma truncada do gene *tcdC* (Antikainen *et al.*, 2009).

Dois técnicas de fragmentação de DNA bacteriano bastante utilizadas são a análise por enzimas de restrição (REA) e o gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (Kuijper *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1994). Ambas utilizam enzimas de restrição no DNA bacteriano e possuem bom poder discriminatório, sendo a REA uma das técnicas clássicas de maior poder discriminatório para *C. difficile* (Killgore *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2016b). A principal diferença entre elas é que a REA utiliza enzimas que cortam o DNA com alta frequência, gerando uma grande quantidade de fragmentos, ao passo que o PFGE utiliza enzimas que cortam o DNA com baixa frequência, gerando de 7 a 20 grandes fragmentos que necessitam de uma eletroforese mais longa e com o campo pulsado para serem separados (Killgore *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2016b). Duas desvantagens marcantes destas técnicas são a dificuldade para interpretação de resultados e para comparação entre laboratórios, dificultando seu uso para estudos epidemiológicos de grande escala (Rodriguez *et al.*, 2016b). As estirpes consideradas hipervirulentas são comumente tipificadas como NAP1 pelo PFGE e BI pela REA, sendo que esta última consegue discriminar estirpes oriundas de surtos diferentes (Killgore *et al.*, 2008).

A técnica de tipificação mais utilizada na Europa é a PCR ribotipagem, sendo atualmente o método dominante de tipificação em estudos epidemiológicos de *C. difficile* (Martin *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2016b; van Dorp *et al.*, 2016). A técnica se baseia em amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA seguida da avaliação do padrão de bandas geradas após a amplificação (Janezic and Rupnik, 2010). A nomenclatura é designada por três dígitos e os novos ribotipos são determinados pelo *Health Protection Agency-funded C. difficile Ribotype Network* (CDRN), localizado em Leeds, Reino Unido (Rodriguez *et al.*, 2016b). O poder discriminatório da técnica é satisfatório, sendo similar ao PFGE e um pouco menor que o REA (Killgore *et al.*, 2008; MacCannell, 2013; Kociolek *et al.*, 2018). Entre as adaptações realizadas para a melhoria da técnica, a implementação de eletroforese capilar com posterior disponibilização de uma base de dados *online* para a comparação de padrões eletroforéticos gerados (<https://webribo.ages.at/>) foi um grande avanço, pois possibilitou uma maior homogeneidade na realização da técnica entre laboratórios (Fawley *et al.*, 2015). Também podemos destacar a padronização da PCR ribotipagem a partir de DNA total extraído de fezes, eximindo a necessidade de isolamento prévio do microrganismo (Janezic, 2016). Atualmente, mais de 800 ribotipos já foram descritos e os isolados considerados hipervirulentos nos surtos do início da década de 2000 foram tipificados como ribotipo (RT) 027 por esta técnica (Kuijper *et al.*, 2008).

Entre as técnicas de sequenciamento, o *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) tem sido usado com maior frequência uma vez que permite a identificação de relações filogenéticas e evolutivas entre os isolados e é de fácil comparação interlaboratorial (MacCannell, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016b). A técnica se baseia no sequenciamento de fragmentos internos de sete genes constitutivos onde cada fragmento representa um alelo. As sequências são analisadas em uma plataforma *online* (<https://pubmlst.org/cdifficile/>) e cada alelo recebe um número distinto, sendo o *sequence type* (ST) determinado pela combinação dos sete alelos (Griffiths *et al.*, 2010). Os STs são agrupados filogeneticamente em seis clados diferentes, os quais são importantes no entendimento da evolução do patógeno (Janezic and Rupnik, 2015). Estudos mostram que o poder discriminatório do MLST é similar ao da ribotipagem e uma associação forte entre ST e RT já foi demonstrada (Killgore *et al.*, 2008; Dingle *et al.*, 2011; Janezic and Rupnik, 2015; Li *et al.*, 2018). As estirpes hipervirulentas RT 027 foram as primeiras a serem tipificadas por esta técnica, sendo classificadas como ST1 (Griffiths *et al.*, 2010).

Ao revelar completamente o DNA do microrganismo, o sequenciamento completo do genoma (WGS) é a técnica com maior poder discriminatório e tem sido aplicada para o estudo da dinâmica evolutiva e disseminação global das estirpes hipervirulentas de *C. difficile* (RT 027) (He *et al.*, 2013). A técnica identifica polimorfismos de nucleotídeo único (SNV), permitindo a identificação de clonalidade entre as estirpes, ferramenta que pode auxiliar a esclarecer as rotas de transmissão do patógeno em centros hospitalares ou entre humanos e animais (Eyre *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016b). Devido ao alto custo, a técnica ainda não tem sido utilizada com frequência, entretanto possui potencial para substituir todas as técnicas de tipificação existentes (Rodriguez *et al.*, 2016b).

Como dito anteriormente, *C. difficile* pode ser dividido em seis clados pelo MLST, sendo o clado 1 o maior e mais heterogêneo dentre eles, podendo abrigar estirpes toxigênicas e não toxigênicas (Janezic and Rupnik, 2010; Muñoz *et al.*, 2017). Nesse clado se encontra o RT 014 (comumente ST2, além de ST13, ST14, ST49, ST50, ST132), um dos ribotipos mais comuns no mundo, sendo o predominante em seres humanos na Europa, na Austrália e no Brasil (Balassiano *et al.*, 2009; Janezic and Rupnik, 2010; Bauer *et al.*, 2011; Eyre *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016; Cançado *et al.*, 2018a). Além de ser frequente em seres humanos, RT 014 é comumente isolado em suínos com quadros de ICD na Austrália e no Brasil (Knight *et al.*, 2015a; Silva *et al.*, 2015; Knight *et al.*, 2017). Outros tipos toxigênicos prevalentes pertencentes a esse clado são RT 001 (ST3), RT 002 (ST8, ST35, ST48, ST146), RT 012 (ST54) e RT 106 (ST41, ST42, ST135) (Janezic *et al.*, 2012; Tickler *et al.*, 2014; Janezic and Rupnik, 2015; Martin *et al.*, 2016; Plaza-Garrido *et al.*, 2016; Cançado *et al.*, 2018a). Entre os tipos não toxigênicos pertencentes ao clado, os relatos são escassos, sendo o RT 009 e o RT 010 os mais comumente citados (Janezic *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015).

O clado 2 é conhecido por albergar a estirpe hipervirulenta RT 027 (ST1) e possui a maior diversidade genética entre os clados (Dingle *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2017). Apesar da prevalência do RT 027 ter reduzido nos últimos anos na Europa, o ribotipo ainda é o mais comum na América do Norte e tem sido identificado em diversos países da América do Sul, como Chile, Argentina e, mais recentemente, Brasil (Tickler *et al.*, 2014; Aguayo *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016; Plaza-Garrido *et al.*, 2016; Dingle *et al.*, 2017; Cejas *et al.*, 2018; Pires *et al.*, 2018). Outros tipos que têm emergido desse clado e chamado atenção pelo aumento da prevalência são RT 016 (ST1), RT 176 (ST1), RT 198 (ST1), RT 244 (ST41) e RT 821 (ST41),

este último já identificado em humanos no Brasil (Valiente *et al.*, 2014; Knight *et al.*, 2015b; Costa *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2016; Elliott *et al.*, 2017).

O clado 5 divergiu dos outros clados entre 1,1 e 85 milhões de anos, possuindo uma distância evolutiva considerável dos demais (He *et al.*, 2010). O tipo clássico deste clado é o RT 078 (ST11), também considerado hipervirulento e fortemente associado a animais, especialmente suínos (Rupnik *et al.*, 2008; Janezic *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018). Além disso, RT 078 tem sido relacionado ao aumento de casos de ICD relacionados a comunidade, enfatizando sua importância no contexto de saúde única (Cassir *et al.*, 2017; Suo *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). Outros ribotipos pertencentes ao ST11 já foram descritos em humanos e suínos, como RT 33, RT 126, RT 237, RT 281 e RT 288, demonstrando que este clado é mais variado do que se imaginava anteriormente (Silva *et al.*, 2015; Knight and Riley, 2016; Tsai *et al.*, 2016; Oliveira Junior *et al.*, 2018).

No clado 4, algumas variantes da estirpe RT 017 (ST37, ST86) são responsáveis por surtos de ICD em humanos, sobretudo no continente asiático (van den Berg *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2017). Os demais clados têm sido alvo de estudos recentemente, de forma que ainda não existem dados consistentes a respeito da sua participação em quadros de ICD em humanos e animais (Janezic and Rupnik, 2015; Chen *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2017).

2.8. A doença

A doença causada por *C. difficile* se inicia com a ingestão dos esporos, os quais podem estar presentes no ambiente, em instalações hospitalares ou instalações animais (Figura 1) (Keessen *et al.*, 2011a; Janezic *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2017; Warriner *et al.*, 2017). Após germinação, o microrganismo pode se aderir na parede intestinal, principalmente em condições de disbiose, produzindo as toxinas responsáveis por causar as lesões celulares e teciduais anteriormente descritas (Weese *et al.*, 2010; Koenigsknecht *et al.*, 2015; Janoir, 2016; Battaglioli *et al.*, 2018; Horvat and Rupnik, 2018). Fatores relacionados ao estabelecimento da doença, bem como sintomas e sinais clínicos diferem entre humanos e suínos (Keessen *et al.*, 2011a). Tais particularidades serão brevemente relatadas nas seções a seguir.

2.9. Doença em humanos

Em humanos, *C. difficile* é uma das principais causas de infecção nosocomial, sendo que um estudo recente nos Estados Unidos estimou que ocorram cerca de 453 mil casos anuais, com mais de 6% de mortalidade e gasto de cerca de US\$ 5 bilhões no país (Lessa *et al.*, 2015; Phillips and Hammond, 2017). No Brasil, sabe-se pouco em relação a ocorrência de ICD em humanos, uma vez que grande parte dos hospitais ainda não realizam o diagnóstico laboratorial do agente. Estudos recentes, porém, demonstram que o agente é responsável por pelo menos 8% dos casos de diarreia nosocomial (Pires *et al.*, 2014; Cançado *et al.*, 2018a). A ICD ocorre em indivíduos a partir de um ano de idade, sendo mais comum em adultos, e tem como principal fator de risco a administração prévia de antimicrobianos, principalmente ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas, clindamicina e fluorquinolonas (Honda and Dubberke, 2014; Leffler and Lamont, 2015; McFarland *et al.*, 2016; Dingle *et al.*, 2017). Os antimicrobianos causam uma depleção na microbiota dos pacientes, diminuindo a resistência à colonização e levando ao desenvolvimento de ICD em pacientes que não conseguem desenvolver uma resposta imune humoral efetiva contra as toxinas (Britton and Young, 2014; Leffler and Lamont, 2015; Martin *et al.*, 2016). Outros fatores de risco já descritos são idade avançada, imunossupressão, histórico de cirurgias

intestinais, doenças inflamatórias intestinais e alta severidade de comorbidades associadas (Leffler and Lamont, 2015; Cançado *et al.*, 2018a).

Além das infecções nosocomiais, a CA-ICD tem crescido nos últimos anos, sendo responsável por cerca de 13 a 32% dos casos na atualidade (Leffler and Lamont, 2015; Lessa *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016; Brown and Wilson, 2018). O uso de antimicrobianos também é um fator de risco importante nesses casos, entretanto, outros fatores como doenças cardíacas, doenças renais crônicas e doenças inflamatórias intestinais também são apontados como fatores de risco (Guh *et al.*, 2017). Quanto à fonte de infecção, não há um consenso, mas acredita-se que esses pacientes poderiam já ser carreadores assintomáticos do microrganismo ou terem se infectado em ambientes hospitalares, instalações animais ou até mesmo através da ingestão de esporos via alimentos de origem animal, como carnes oriundas de animais portadores (Martin *et al.*, 2016; Guh *et al.*, 2017; Brown and Wilson, 2018).

Enquanto a taxa de adultos saudáveis carreadores de *C. difficile* se encontra em torno de 5%, em crianças menores de um ano o percentual médio é entre 10 e 30%, podendo chegar a 70% (Lees *et al.*, 2016). A ICD pode ocorrer em indivíduos com idade inferior a 21 anos, sendo considerada ICD pediátrica, entretanto, a prevalência da doença é baixa quando comparada com adultos. Crianças com idade inferior a 12 meses não entram nessa estatística, pois há um consenso que as mesmas não possuem um processo de internalização das toxinas, possivelmente devido à falta de receptores para as mesmas (Adlerberth *et al.*, 2014; Lees *et al.*, 2016; McFarland *et al.*, 2016). Essa é uma diferença marcante interespecies, uma vez que, em suínos, a doença ocorre exclusivamente em neonatos (Weese *et al.*, 2010; Keessen *et al.*, 2011a).

Os sintomas iniciais da ICD em pacientes humanos são diarreia, dores, febre, náuseas e anorexia, que podem se resolver após retirada de antimicrobianos ou implementação de tratamento específico para ICD (Phillips and Hammond, 2017). Em casos mais graves podem ser observados diarreia severa, colite pseudomembranosa, perfuração do cólon, megacólon tóxico e sepse, acompanhado de intensa leucocitose e lesões renais agudas (Honda and Dubberke, 2014; Phillips and Hammond, 2017). A taxa de recorrência de ICD após a descontinuidade do tratamento varia de 20 a 30% e está relacionada a uma microbiota susceptível à infecção e baixo estímulo de resposta humoral (Britton and Young, 2014; Cole and Stahl, 2015; Martin *et al.*, 2016).

Nos hospitais, é extremamente importante que haja uma metodologia eficiente para gestão dos casos de ICD baseado no diagnóstico, tratamento dos doentes e prevenção de novos casos, entretanto, não há um consenso entre os clínicos ou na literatura de quais práticas seguir (Leffler and Lamont, 2015; Martin *et al.*, 2016). Com o intuito de fornecer um guia prático para os profissionais de saúde, associações como a *Infectious Disease Society of America* (IDSA) e a *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) realizam revisões de literatura periódicas abordando os principais tópicos relacionados à doença (Dubberke *et al.*, 2014; McDonald *et al.*, 2018). Após a realização do diagnóstico, que será discutido com mais clareza na seção seguinte, é extremamente indicado que se proceda o isolamento do paciente, de preferência em quartos individuais e por até 48 h após cessarem os sintomas (McDonald *et al.*, 2018). Em adição, para garantir a prevenção de novos casos, é extremamente importante que os profissionais de saúde nos hospitais realizem a troca de luvas e a higienização das mãos após o contato com o paciente, além da desinfecção diária do ambiente com agentes esporocidas (Macleod-Glover and Sadowski, 2010; McDonald *et al.*, 2018). Em relação ao uso de antibióticos, preventivamente, recomenda-se evitar utilizar por longos períodos de tempo antimicrobianos considerados de alto risco para ICD (McDonald *et al.*, 2018). Os antibióticos de escolha para o

tratamento são a vancomicina ou fidaxomicina, sendo que o metronidazol, anteriormente indicado para o tratamento de ICD, ficaria com o uso recomendado apenas para crianças ou em casos leves de adultos na ausência dos outros antimicrobianos (Honda and Dubberke, 2014; McDonald *et al.*, 2018). Em casos de recorrência, indica-se tratamento prolongado com vancomicina, sendo o transplante fecal recomendado apenas para pacientes a partir do segundo episódio de recorrência (Liubakka and Vaughn, 2016; McDonald *et al.*, 2018).

2.10. Doença em suínos

A principal diferença da doença em suínos quando comparada à doença em humanos é o fato de *C. difficile* acometer apenas leitões entre um e sete dias de idade (Songer and Anderson, 2006; Arruda *et al.*, 2013). De forma similar aos neonatos humanos, os leitões recém-nascidos também são mais susceptíveis à colonização que os indivíduos adultos, uma vez que a microbiota está em processo de formação (Weese *et al.*, 2010; Lees *et al.*, 2016; Grześkowiak *et al.*, 2018a). Porém, diferentemente dos humanos, a presença de receptores, especialmente de TcdA, já foi demonstrada em toda extensão do intestino delgado e cólon dos leitões neonatos, fazendo que eles sejam susceptíveis à infecção nos primeiros dias de vida (Keel and Songer, 2007). Em granjas cujo patógeno está presente, a grande maioria dos animais é colonizada pelo agente em um curto período de tempo, e em cerca de dois terços das leitegadas são observados sinais clínicos (Anderson and Songer, 2008; Weese *et al.*, 2010; Hopman *et al.*, 2011; Schneeberg *et al.*, 2013). Acredita-se que a principal fonte de infecção são as instalações contaminadas, entretanto, as porcas também podem eliminar o agente durante o parto e insetos e roedores podem funcionar como carreadores do patógeno (Hopman *et al.*, 2011; Burt *et al.*, 2012; Grześkowiak *et al.*, 2016, 2018a; Oliveira Junior *et al.*, 2018).

A partir da segunda semana de vida, há uma redução drástica do número de animais colonizados, provavelmente devido a sucessão ecológica da microbiota (Weese *et al.*, 2010; Schneeberg *et al.*, 2013; Grześkowiak *et al.*, 2018a). É importante destacar que em animais com idade superior a duas semanas a proporção de estirpes RT 078 aumenta, apontando para uma possível adaptação da estirpe ao hospedeiro (Schneeberg *et al.*, 2013). Apesar da toxina poder ser detectada em pequenas quantidades em fezes de porcas, não há relatos da ocorrência da doença a partir da segunda semana de vida, reforçando a tese de que a ICD afeta apenas suínos neonatos, diferente do que ocorre em humanos (Keessen *et al.*, 2011a; Grześkowiak *et al.*, 2016).

Pouco se sabe sobre os fatores predisponentes que aumentam a susceptibilidade do leitão e/ou da leitegada à infecção (Grześkowiak *et al.*, 2018a). Além da microbiota em formação, sabe-se que alimentação com sucedâneos em substituição ao leite materno aumenta a susceptibilidade à infecção, tanto pela ausência dos fatores protetores presentes no leite quanto pela indução de uma microbiota que oferece uma menor resistência (Grześkowiak *et al.*, 2018b). O fato de algumas leitegadas não apresentarem sinais clínicos possivelmente está relacionado a um menor desafio que tais leitegadas estão submetidas, seja pela adequada lavagem e desinfecção realizada nas baias em questão ou por uma menor liberação de esporos nas fezes das porcas (Moon *et al.*, 2016; Grześkowiak *et al.*, 2018a). Algumas hipóteses para explicar diferenças de susceptibilidade se relacionam à porca, como uma produção mais eficiente de anticorpos protetores, os quais seriam passados via colostro para os leitões e/ou modulação de microbiota, gerando uma população mais resistente à infecção (Grześkowiak *et al.*, 2016, 2018a). Não há evidências concretas que os antimicrobianos, principais indutores de ICD em seres humanos, sejam responsáveis por uma maior susceptibilidade de infecção, mas sua capacidade de interferir na formação da microbiota não pode ser desconsiderada (Arruda *et al.*, 2013; Grześkowiak *et al.*, 2018a).

Grande parte dos animais apresentam a doença na forma subclínica, sendo observada redução de 10 a 15% no ganho de peso e diminuição em índices zootécnicos da granja (Songer and Uzal, 2005). Cerca de 20% dos animais apresentam a doença clínica, sendo que o principal sinal é a diarreia, que pode ser pastosa ou líquida com curso limitante, intermitente ou contínuo (Songer, 2004; Moono *et al.*, 2016). A taxa de mortalidade da doença geralmente é baixa, mas pode alcançar níveis de 15%, sendo colite e edema de mesocólon as principais lesões encontradas nestes animais (Songer and Anderson, 2006; Anderson and Songer, 2008; Squire *et al.*, 2013). Histologicamente, se observa colite fibrinopurulenta multifocal ulcerativa, com perda das células calciformes e intenso infiltrado inflamatório neutrofílico (Yaeger *et al.*, 2007).

Devido às características do sistema de produção e o curso da doença, não é usual o tratamento de animais acometidos (Moono *et al.*, 2016). Além disso, a prevenção e controle da doença é baseada apenas em medidas de limpeza e desinfecção das instalações (Moono *et al.*, 2016). A ausência de medidas efetivas para conter o avanço do patógeno fez com que ele se tornasse uma das principais causas de diarreia neonatal em leitões (Songer, 2004; Cruz Junior *et al.*, 2013). Além de impactar a saúde dos animais, estudos sugerem que existe o risco de transmissão de *C. difficile* por via direta ou através de produtos de origem animal para a população humana, aumentando ainda mais a necessidade de controle desse patógeno em suínos (Keessen *et al.*, 2013; Squire and Riley, 2013; Brown and Wilson, 2018).

Especificamente no Brasil, os estudos envolvendo diarreia por *C. difficile* em suínos ainda são escassos (Silva *et al.*, 2013b). Ademais, dois estudos conduzidos no país encontraram entre 10 e 16% dos animais positivos para as toxinas A/B e cerca de 35 a 53% das granjas visitadas acometidas pelo agente (Lippke *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). A doença também já foi diagnosticada em forma de surto, elevando a incidência de diarreia neonatal em uma granja de 2 para 20% (Silva *et al.*, 2013c). Epidemiologicamente, já foram encontrados diversos ribotipos, com leve predominância das estirpes RT 014/020 (ST2) e RT 126 (ST11) (Silva *et al.*, 2015; Oliveira Júnior *et al.*, 2018). Em um estudo envolvendo os principais enteropatógenos em suínos de uma semana de idade, Cruz Júnior *et al.* (2013) detectaram as toxinas A/B de *C. difficile* e/ou lesões histopatológicas do agente em cerca de 50% dos animais avaliados, sugerindo que *C. difficile* seja um dos agentes infecciosos entéricos mais importantes nessa faixa etária.

2.11. Diagnóstico

O diagnóstico de ICD tem sido um problema recorrente em medicina humana e veterinária e as falhas de diagnóstico são, em parte, responsáveis pela disseminação do agente e aumento dos casos da doença (Knight *et al.*, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Para guiar o diagnóstico em humanos, periodicamente são publicadas diretrizes de práticas clínicas sugerindo os melhores procedimentos para diagnóstico da doença baseadas na eficácia dos testes disponíveis no mercado (Honda and Dubberke, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2018). Em medicina veterinária, a falta de testes específicos e de diretrizes concretas para realizar o diagnóstico faz com que a doença seja subdiagnosticada, dificultando o tratamento dos animais, quando pertinente, e/ou prejudicando o manejo sanitário das propriedades (Knight *et al.*, 2014; Moono *et al.*, 2016). Nesta seção serão citados os principais testes laboratoriais, a atual recomendação para diagnóstico humano e os consensos na literatura para o uso das técnicas para diagnóstico em suínos.

Para realizar o diagnóstico laboratorial de ICD é necessária a identificação do agente ou a detecção das toxinas A/B (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Dos testes de identificação do agente, a cultura direta (DC) é o mais tradicional, sendo o ChromID *C. difficile* ágar (bioMérieux, França), um meio cromogênico lançado recentemente no mercado, o que permite as maiores taxas de isolamento do agente (Knight *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Mesmo com o aumento da sensibilidade dos meios de cultura, a técnica é demorada e não permite a diferenciação de estirpes toxigênicas e não toxigênicas, sendo mais utilizada para obter isolados visando posteriores tipificações (Knight *et al.*, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Já a cultura toxigênica (CT) é um teste de duas etapas que visa identificar se estirpes isoladas são capazes ou não de produzir toxinas (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Por ser um teste de alta sensibilidade, é comumente utilizado como referência para comparação de outros testes, entretanto, é mais demorado que a cultura direta, não sendo usado na prática clínica (Knight *et al.*, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2018).

Os testes de identificação do agente com potencial uso na prática clínica são o teste de imunoenensaio glutamato desidrogenase (GDH) e as técnicas de amplificação de ácido nucleico (NAATs) (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2018). A glutamato desidrogenase é uma enzima conservada de *C. difficile* produzida tanto por estirpes toxigênicas como por não toxigênicas, e comumente encontrada nas fezes de pacientes infectados, o que faz com que o teste baseado na detecção deste antígeno tenha alta sensibilidade (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2018). Como o teste não diferencia o potencial toxigênico das estirpes, alguns kits detectam também as toxinas A e B, porém a sensibilidade é reduzida, especialmente em suínos (Knight *et al.*, 2014; Johansson *et al.*, 2016). Já os NAATs são testes baseados na identificação dos genes das toxinas de *C. difficile* sem a necessidade de isolamento, utilizando técnicas como RT-PCR e microarranjos de DNA de baixa densidade (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Em geral os testes possuem alta sensibilidade, boa especificidade e são rápidos, sendo altamente recomendados para o diagnóstico, entretanto o alto custo pode inviabilizar sua utilização (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2018).

Em relação aos testes que detectam as toxinas, a soroneutralização celular (SNC) é o principal, sendo considerado outro teste de referência para o diagnóstico de ICD (Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). A sensibilidade do teste varia de acordo com as linhagens celulares utilizadas e a padronização de cada laboratório, entretanto, a manutenção de linhagens celulares e a necessidade de pessoal treinado inviabiliza o uso do teste rotineiramente (Carroll and Bartlett, 2011; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Como alternativa prática, diversos kits de ensaios imunoenzimáticos (EIAs) foram desenvolvidos para detecção das toxinas A e B, porém, a sensibilidade é variável entre os diversos fabricantes, fato que devem ser considerado quando opta-se pela utilização desta técnica (Planche *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017). Em suínos, a sensibilidade dos testes EIA é ainda menor, uma vez que todos eles foram padronizados para diagnóstico a partir de fezes humanas (Keessen *et al.*, 2011b).

As atuais diretrizes para diagnóstico de ICD humano recomendam que os testes laboratoriais só sejam realizados em pacientes que apresentaram três ou mais episódios de diarreia em um período de 24 h e, nestes casos, pode se utilizar apenas um teste NAAT. Na ausência do NAAT ou em hospitais onde não há um critério clínico para o teste dos pacientes, recomenda-se que algum teste de detecção de toxinas seja utilizado como parte de um algoritmo de múltiplas etapas (p.ex.: GDH → EIA; GDH → EIA → NAAT ou NAAT → EIA) (McDonald *et al.*, 2018). A combinação dos testes a serem utilizados estão relacionados à sua disponibilidade e a fatores internos das unidades

de saúde, como a prevalência da doença (Honda and Dubberke, 2014; Martínez-Meléndez *et al.*, 2017; Cançado *et al.*, 2018b).

Para o diagnóstico em suínos, não há diretrizes que auxiliem o veterinário. O aumento dos casos de diarreia nos animais sob risco (1 a 7 dias de vida) associado à observação de acentuado edema de mesocólon durante a necropsia de animais desta faixa etária são sugestivos da presença da ICD (Songer and Anderson, 2006). A realização da histopatologia com visualização de colite com infiltrado inflamatório neutrofílico associado com áreas de erosão e ulceração, conhecidas como lesões *volcano-like*, são altamente sugestivas da doença (Yaeger *et al.*, 2007). Laboratorialmente, estudos avaliando diversos métodos diagnósticos encontraram sensibilidades baixas para o diagnóstico individual, mas adequadas para o diagnóstico de rebanho (Keessen *et al.*, 2011b; Knight *et al.*, 2014). Keessen *et al.* (2011b) sugeriram um algoritmo de múltiplas etapas para o diagnóstico, sendo o cenário ideal a utilização de um NAAT (RT-PCR) como método de triagem e CT como confirmatório, o que seria inviável para o uso rotineiro pelos custos e tempo para realização dos mesmos. Já Knight *et al.* (2014) sugeriram a utilização da DC como método único, ponderando que o uso do EIA em sequência poderia aumentar a especificidade do diagnóstico.

2.12. Prevenção e Controle

De forma geral, para a prevenção e controle da ICD, as estratégias devem ser focadas em três frentes: impedir ou minimizar o contato do patógeno com o hospedeiro; evitar a colonização do patógeno; e evitar a ação das toxinas (Moono *et al.*, 2016; Kociolek *et al.*, 2018; Péchiné *et al.*, 2018). O objetivo desta seção é discutir as estratégias de prevenção e controle disponíveis ou em estudo que possuem aplicabilidade na suinocultura. As diretrizes específicas recomendadas para controle e prevenção da doença em humanos não serão foco deste trabalho, podendo ser consultadas em sua integralidade nos trabalhos referenciados (Dubberke *et al.*, 2014; McDonald *et al.*, 2018).

A primeira estratégia para prevenir a ICD seria impedir ou minimizar o contato do patógeno com o hospedeiro (Moono *et al.*, 2016). Por ser esporulado, *C. difficile* é comumente encontrado nas instalações animais, podendo resistir aos processos de compostagem fecal e tratamento de efluentes (Hopman *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2012; Usui *et al.*, 2017). Para minimizar a contaminação das instalações, o uso de desinfetantes à base de cloro ou peróxido de hidrogênio são alternativas indicadas durante o vazio sanitário (Macleod-Glover and Sadowski, 2010; Mosci *et al.*, 2017; Grześkowiak *et al.*, 2018a; Uwamahoro *et al.*, 2018). Devido ao baixo custo, o hipoclorito de sódio é uma boa opção para desinfecção, entretanto, o produto pode corroer as instalações metálicas e antes da sua utilização deve-se realizar a limpeza das instalações, uma vez que sua atividade microbicida é inativada pela matéria orgânica (Gil *et al.*, 2017; Goda *et al.*, 2017). Estudos recentes demonstraram que a susceptibilidade aos desinfetantes depende do ribotipo e esporos submetidos a concentrações subletais de desinfetantes à base de cloro podem ter sua capacidade de aderência em superfícies inorgânicas aumentada, contribuindo para persistência dos mesmos nas instalações (Joshi *et al.*, 2017; Kenters *et al.*, 2017). Outras alternativas seriam a utilização de desinfetantes à base de cloro com maior poder esporocida e maior atividade em matéria orgânica, como o dicloroisocianurato de sódio e ácido cloroso, ou de substâncias germinantes de esporos, como o ácido taurocólico, o qual demonstrou bons efeitos na redução de esporos viáveis na pele e em superfícies (Vohra and Poxton, 2011; Goda *et al.*, 2017; Nerandzic and Donskey, 2017). Entretanto, ainda que se use uma base eficiente e de forma correta, os desinfetantes não eliminarão completamente os esporos, sendo necessárias medidas adicionais (Hopman *et al.*, 2011; Vohra and Poxton, 2011).

A principal estratégia investigada pelos pesquisadores para prevenção da ICD tem como foco as toxinas e se baseia, sobretudo, em estratégias de imunização (Mizrahi *et al.*, 2014; Bruxelle *et al.*, 2018). A utilização de agentes quelantes de toxinas, como resinas de troca aniônica e colesteramina, já foram utilizados como tentativa de tratamento para seres humanos, mas não há relato do uso dos mesmos preventivamente em suínos (McCoy *et al.*, 2016). Diversas metodologias são utilizadas na tentativa de conferir imunidade passiva ou ativa para pacientes infectados e/ou em risco, e o estado de arte pode ser encontrado nas revisões citadas (Mizrahi *et al.*, 2014; Bruxelle *et al.*, 2018).

Em relação às estratégias de imunização passiva, duas delas parecem ter aplicabilidade promissora em suinocultura. A primeira diz respeito ao bezlotoxumab, um anticorpo monoclonal humano que se liga na porção B da TcdB impedindo seu contato com os receptores (Wilcox *et al.*, 2017; Péchiné *et al.*, 2018). Em modelo experimental de suínos gnotobióticos, a utilização de anticorpos monoclonais e policlonais contra a TcdB aplicados por via intraperitoneal impediu a morte dos leitões, preveniu as manifestações sistêmicas da doença e reduziu a severidade dos sintomas gastrointestinais (Steele *et al.*, 2013). A segunda estratégia é relativa à administração de colostro hiperimune bovino (CHB) por via oral (Sponseller *et al.*, 2015; Kociolek and Gerding, 2016). A utilização do CHB em leitões gnotobióticos preveniu lesões macroscópicas e histopatológicas e reduziu a intensidade da diarreia, mesmo com colonização similar ao grupo controle (Sponseller *et al.*, 2015). Em uma estratégia similar utilizando leitões convencionais em modelo experimental, anticorpos do plasma de equinos hiperimunes foram capazes de reduzir os escores das lesões histopatológicas (Ramirez *et al.*, 2014).

No que diz respeito à imunização ativa, vários grupos de pesquisa têm se esforçado ao longo das décadas para a produção de uma vacina eficaz em humanos, com técnicas variando desde a produção de toxóides tradicionais até a utilização de vetores vacinais, com diversas formulações passando por etapas de ensaios clínicos (Mizrahi *et al.*, 2014; Bruxelle *et al.*, 2018). Como a doença em leitões ocorre nos primeiros dias de vida, os imunógenos em suinocultura deveriam ser aplicados nas porcas visando a transferência de imunidade através do colostro (Uzal *et al.*, 2016; Grzeskowiak *et al.*, 2018b). Até o presente momento não há relatos da utilização de imunógenos em suínos e os protocolos aplicados em outras espécies para gerar soro ou colostro hiperimune são inviáveis para uma imunização regular, de forma esse campo ainda pode ser explorado pela ciência (Ramirez *et al.*, 2014; Sponseller *et al.*, 2015). Ainda que sejam descobertas estratégias eficazes para combater a doença com a imunização ativa ou passiva tendo como alvo as toxinas, deve-se pontuar que não se conhece a eficácia desta estratégia em prevenir a colonização, de forma que não é possível prever os possíveis impactos da imunização na circulação patógeno na granja (Sponseller *et al.*, 2015). A manutenção do microrganismo na granja poderia causar doença nos animais eventualmente não cobertos pelo método preventivo, além de continuar representando um possível risco zoonótico (Hensgens *et al.*, 2012; Keessen *et al.*, 2013).

Devido às crescentes evidências do papel zoonótico do agente, as estratégias de prevenção de ICD que objetivam evitar a colonização de *C. difficile* aumentam sua importância (Arruda *et al.*, 2016; Brown and Wilson, 2018; Mills *et al.*, 2018; Péchiné *et al.*, 2018). Para tal, também pode-se lançar mão estratégias de imunização visando antígenos de superfície de esporos e células vegetativas (Péchiné *et al.*, 2018). Dentre as estratégias de imunização ativa, diversos antígenos como Cwp84, GroEL e FliC, administrados por diferentes vias, foram capazes de reduzir a colonização intestinal em hamsters e/ou camundongos e conferir proteção parcial contra ICD

(Ghose *et al.*, 2016; Péchiné *et al.*, 2018). O mesmo foi observado com a administração intraperitoneal de soro hiperimune contra a flagelina FliC em camundongos, uma estratégia de imunização passiva (Ghose *et al.*, 2016). Hutton *et al.* (2017) produziram o CHB imunizando vacas prenhas com moléculas de superfície de esporos e de células vegetativas e observaram que a associação destas com o CHB-TcdB podem prevenir a doença em camundongos e diminuir ligeiramente a eliminação de esporos. Na literatura há relato de imunização de porcas prenhas com PSII, um polissacarídeo presente na membrana de *C. difficile* (Bertolo *et al.*, 2012). A produção de IgM anti-PSII foi detectada no soro desses animais, entretanto, não foi mensurado o efeito na prole das porcas que ingeriram o colostro, de forma que o efeito das imunizações na prevenção da doença em suínos permanece desconhecido (Bertolo *et al.*, 2012).

Outra possibilidade para a prevenção da colonização seria administração de fármacos e/ou substâncias que impeçam a colonização (Roshan *et al.*, 2018a). Como a doença em leitões ocorre nos primeiros dias de vida, é recomendável que a substância seja capaz de diminuir ou impedir a colonização sem causar grandes impactos na formação da microbiota (Grześkowiak *et al.*, 2018a). Neste sentido, a utilização de inibidores de germinação, bacteriocinas de curto espectro e de substâncias naturais já demonstraram resultados positivos *in vitro* e/ou em modelos animais (Howerton *et al.*, 2013; Rea *et al.*, 2014; Roshan *et al.*, 2018a; 2018b). Entretanto, a possibilidade de afetar outros componentes da microbiota e/ou a necessidade de múltiplas administrações são pontos que devem ser considerados para utilização destas substâncias, de forma que mais estudos são necessários para garantir segurança e praticidade na utilização de tais agentes em suinocultura (Howerton *et al.*, 2013; Rea *et al.*, 2014; Roshan *et al.*, 2018; 2018b).

Terapias envolvendo microrganismos também tem sido testadas com frequência para o tratamento de ICD em humanos como alternativas ao uso de antimicrobianos (Fitzpatrick, 2013; Mills *et al.*, 2018). Dentre estas estratégias, encontra-se o uso de bacteriófagos, transplante fecal, probióticos e estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) (Fitzpatrick, 2013; Khanna *et al.*, 2016; Nale *et al.*, 2016; Hudson *et al.*, 2017; Gerding *et al.*, 2018; Mills *et al.*, 2018). Estes dois últimos serão discutidos nesta seção devido ao potencial mais evidente de uso em suinocultura. Os probióticos são definidos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) como microrganismos que, quando administrados em uma dose conhecida, promovem benefícios ao hospedeiro. Entretanto, essa definição ainda é alvo de discussões entre diversos grupos de estudos, de forma que não há um consenso entre pesquisadores a respeito da mesma (Reid, 2016). Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos que auxiliam na prevenção de ICD são competição por nicho ecológico e nutrientes, produção de substâncias antibacterianas, produção de proteases que inativam as toxinas, metabolização de ácidos biliares primários em secundários, que diminuem a germinação dos esporos e imunomodulação (Fitzpatrick, 2013; Mills *et al.*, 2018).

Diversas bactérias e fungos têm sido testados de forma singular ou em combinação com o intuito de tratar ou prevenir recorrência de ICD, destacadamente *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus spp.* (Toothaker and Elmer, 1984; Kaur *et al.*, 2011; Fitzpatrick, 2013). Apesar dos estudos mostrarem efeitos positivos, como diminuição da inflamação, diminuição do grau de toxinas detectadas nas fezes e redução da secreção de fluidos, a eficácia é considerada modesta, não sendo atualmente recomendado pelo IDSA e SHEA (Fitzpatrick, 2013; McDonald *et al.*, 2018; Mills *et al.*, 2018). Há um relato da utilização de *Lactobacillus spp.* em leitões neonatos em modelo experimental visando a prevenção de ICD, entretanto, a administração do probiótico não conferiu nenhum benefício aos animais (Arruda *et al.*, 2016).

Por fim, a utilização de estirpes NTCD se configura como uma interessante estratégia para a prevenção da ICD, uma vez que elas não possuem os genes responsáveis pela produção das toxinas, mas mantêm a mesma capacidade de colonização (Sambol *et al.*, 2002). Em estudos utilizando hamsters, a administração prévia de estirpes NTCD foi capaz de prevenir a colonização por estirpes toxigênicas e, conseqüentemente, a ICD (Borriello and Barclay, 1985; Sambol *et al.*, 2002; Nagaro *et al.*, 2013). A utilização de NTCD tem sido estudada visando a prevenção da recorrência de ICD em humanos e, atualmente, se encontra em estudos clínicos de fase II, sendo que a exclusão competitiva parece ser o principal mecanismo de ação (Villano *et al.*, 2012; Gerding *et al.*, 2015, 2018). Em suínos, estirpes NTCD já foram testadas em duas oportunidades. Na primeira delas, Songer *et al.* (2007) identificaram a redução da detecção de toxinas em um grupo de animais que receberam uma NTCD por via oral. Na segunda oportunidade, Arruda *et al.* (2016) não relataram redução dos sinais clínicos, mas observaram a redução de lesões macro e microscópicas, sem nenhum efeito colateral evidente em animais que receberam a NTCD. No Brasil, um estudo preliminar caracterizou cinco estirpes NTCD isoladas de suínos, equinos e cães quanto ao ribotipo, capacidade de produção de esporos *in vitro* e resistência a antimicrobianos (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Dentre elas, a estirpe denominada Z31, isolada a partir de fezes de um cão saudável, demonstrou maior capacidade de produção de esporos, maior potencial resistência aos antimicrobianos, além de ser identificada como ribotipo 009, o mais comum dentre os não toxigênicos no Brasil. Numa etapa posterior, a estirpe Z31 foi capaz de conferir proteção total contra a ICD em hamsters desafiados com uma estirpe toxigênica (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Apesar dos resultados positivos, mais estudos são necessários para obter uma melhor caracterização genotípica e fenotípica desta estirpe, bem como avaliar sua eficácia na espécie alvo e seu possível uso comercial.

2.13. Considerações finais

A ICD é uma doença importante em seres humanos e animais domésticos, sobretudo em suínos. Apesar de não ser confirmadamente uma zoonose, vários indícios apontam para tal, fazendo com que seja ainda importante estabelecer medidas de prevenção e controle eficazes para conter a doença em animais. Nesse contexto, a utilização de estirpes NTCD parece ser o caminho mais promissor a curto prazo para reduzir a ocorrência da doença em suínos e diminuir a contaminação das instalações animais e produtos de origem animal reduzindo, assim, o risco de contaminação dos seres humanos.

2.14. Referências Bibliográficas

ABT, M. C.; MCKENNEY, P. T.; PAMER, E. G. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 10, p. 609–620, 30 out. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.108>>.

ADLERBERTH, I. *et al.* Toxin-producing *Clostridium difficile* strains as long-term gut colonizers in healthy infants. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 173–9, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24172156>>.

AGUAYO, C. *et al.* Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. *Epidemiology and Infection*, v. 143, n. 14, p. 3069–3073, 2015.

AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; JANK, T. *Clostridium difficile* toxin biology. *Annual Review of Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 281–307, 8 set. 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-090816-093458>>.

AKTORIES, K.; PAPTAEODOROU, P.; SCHWAN, C. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) - A virulence factor disturbing the cytoskeleton. *Anaerobe*, v. 53, p. 21–29, out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>>.

ALTEMEIER, W. A.; HUMMEL, R. P.; HILL, E. O. Staphylococcal enterocolitis following antibiotic therapy. *Annals of Surgery*, v. 157, p. 847–58, jun. 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14012299>>.

ANDERSON, M. A.; SONGER, J. G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in swine. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 1–2, p. 204–6, 1 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006252>>.

ANTIKAINEN, J. *et al.* Detection of virulence genes of *Clostridium difficile* by multiplex PCR. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, v. 117, n. 8, p. 607–13, ago. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02509.x>>.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe*, v. 22, p. 104–10, ago. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.010>>.

ARRUDA, P. H. E. *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets: Pathogenesis, risk factors, and prevention. 2014. 122f. Tese (Graduate Theses and Dissertations) - Iowa State University, Iowa.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 57, n. 2, p. 183–8, fev. 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

AUBRY, A. *et al.* Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 10, p. 3521–3532, out. 2012. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00224-12>>.

AWAD, M. M. *et al.* *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, v. 5, n. 5, p. 579–593, 3 set. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19490976.2014.969632>>.

BABAN, S. T. *et al.* The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e73026, 23 set. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073026>>.

BAKKER, D. *et al.* TcdC Does not significantly repress toxin expression in *Clostridium difficile* 630ΔErm. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. e43247, 17 ago. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043247>>.

BALASSIANO, I. T. *et al.* Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from

immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, v. 15, n. 3, p. 61–64, jun. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107599640900002X>>.

BARKETI-KLAI, A. *et al.* Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, n. 8, p. 1155–1161, 1 ago. 2011. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.029553-0>>.

BARKETI-KLAI, A. *et al.* The flagellin FliC of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during *in vivo* infection. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e96876, 19 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0096876>>.

BARTLETT, J. G. *et al.* Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *The Journal of Infectious Disease*, v. 136, n. 5, p. 701–705, 1977.

BATAH, J. *et al.* *Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 3256, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-03621-z>>.

BATTAGLIOLI, E. J. *et al.* *Clostridioides difficile* uses amino acids associated with gut microbial dysbiosis in a subset of patients with diarrhea. *Science Translational Medicine*, v. 10, n. 464, p. eaam7019, 24 out. 2018. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aam7019>>.

BAUER, M. P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet*, v. 377, n. 9759, p. 63–73, jan. 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61266-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61266-4)>.

BERRY, A. P.; LEVETT, P. N. Chronic diarrhoea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *The Veterinary Record*, v. 118, n. 4, p. 102–3, 25 jan. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3952954>>.

BERTOLO, L. *et al.* *Clostridium difficile* carbohydrates: glucan in spores, PSII common antigen in cells, immunogenicity of PSII in swine and synthesis of a dual *C. difficile*–ETEC conjugate vaccine. *Carbohydrate Research*, v. 354, p. 79–86, jun. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621512001401>>.

BLETZ, S. *et al.* Defining and evaluating a core genome Multilocus Sequence Typing scheme for genome-wide typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 6, 4 abr. 2018. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01987-17>>.

BOJESSEN, A. M.; OLSEN, K. E. P.; BERTELSEN, M. F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Veterinary Microbiology*, v. 116, n. 4, p. 329–335, 2006.

BORRIELLO, S. P. *et al.* Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Pathology*, v. 36, n. 1, p. 84–87, 1983.

BORRIELLO, S. P.; BARCLAY, F. E. Protection of hamsters against *Clostridium difficile*

ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *Journal of Medical Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 339–350, 1 jun. 1985. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-19-3-339>>.

BOUILLAUT, L. *et al.* Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Research in Microbiology*, v. 166, n. 4, p. 375–383, maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.002>>.

BRADSHAW, W. J.; ROBERTS, A. K.; *et al.* The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 12, n. 1, p. 319–331, 23 mar. 2017a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12079-017-0429-z>>.

BRADSHAW, W. J.; KIRBY, J. M.; *et al.* Cwp2 from *Clostridium difficile* exhibits an extended three domain fold and cell adhesion in vitro. *The FEBS Journal*, v. 284, n. 17, p. 2886–2898, set. 2017b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14157>>.

BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, v. 146, n. 6, p. 1547–53, maio 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.059>>.

BROWN, A. W. W.; WILSON, R. B. *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—a narrative review. *Gastroenterology Report*, v. 6, n. 3, p. 157–166, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/gastro/article/6/3/157/5046687>>.

BRUXELLE, J.-F.; PÉCHINÉ, S.; COLLIGNON, A. Immunization strategies against *Clostridium difficile*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1050, n. 4, p. 197–225, abr. 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-72799-8_12>.

BURT, S. A. *et al.* Vermin on pig farms are vectors for *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078 and 045. *Veterinary Microbiology*, v. 160, n. 1–2, p. 256–8, 9 nov. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.014>>.

CALABI, E. *et al.* Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology*, v. 40, n. 5, p. 1187–99, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11401722>>.

CANÇADO, G. G. L. *et al.* Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Anaerobe*, v. 54, p. 65–71, 13 ago. 2018a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996418301495>>.

CANÇADO, G. G. L. *et al.* Impact of simultaneous glutamate dehydrogenase and toxin A/B rapid immunoassay on *Clostridium difficile* diagnosis and treatment in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 33, n. 2, p. 393–396, fev. 2018b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jgh.13901>>.

CAPPUCCIO, J. A. *et al.* Neonatal piglets mesocolon edema and colitis due to *Clostridium difficile* infection: prevalence, clinical disease and pathological studies. *Brazilian Journal of*

Veterinary Pathology, v. 2, n. 1, p. 35–40, 2009. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-pathology/2-\(2009\)-1/neonatal-piglets-mesocolon-edema-and-colitis-due-to-Clostridium-diffic/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-pathology/2-(2009)-1/neonatal-piglets-mesocolon-edema-and-colitis-due-to-Clostridium-diffic/)>.

CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual Review of Microbiology*, v. 65, n. 1, p. 501–21, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-090110-102824>>.

CARTER, G. P. *et al.* Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. *mBio*, v. 6, n. 3, p. 1–10, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00551-15>>.

CARTMAN, S. T. *et al.* Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 13, p. 4683–4690, 1 jul. 2012. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00249-12>>.

CASSIR, N. *et al.* Emergence of *Clostridium difficile tcdC* variant 078 in Marseille, France. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 36, n. 10, p. 1971–1974, 1 out. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10096-017-3022-8>>.

CEJAS, D. *et al.* Detection and molecular characterization of *Clostridium difficile* ST 1 in Buenos Aires, Argentina. *Anaerobe*, v. 49, p. 14–17, fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.007>>.

CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 6, p. 723–750, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article/41/6/723/4557158>>.

CHEN, R. *et al.* Whole genome sequences of three Clade 3 *Clostridium difficile* strains carrying binary toxin genes in China. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 43555, 6 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep43555>>.

COLE, S.; STAHL, T. Persistent and recurrent *Clostridium difficile* colitis. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, v. 28, n. 02, p. 065–069, 25 maio 2015. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1547333>>.

COLLINS, M. D. *et al.* The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, n. 4, p. 812–26, out. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7981107>>.

COSTA, C. L. *et al.* A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. *Anaerobe*, v. 40, p. 76–84, ago. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996416300737>>.

COWARDIN, C. A. *et al.* The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. *Nature Microbiology*, v. 1, n. 8, p. 16108, 11 ago.

2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016108>>.

CROWTHER, G. S. *et al.* Comparison of planktonic and biofilm-associated communities of *Clostridium difficile* and indigenous gut microbiota in a triple-stage chemostat gut model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 8, p. 2137–2147, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dku116>>.

CRUZ JUNIOR, E. C. *et al.* A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 8, p. 963–969, ago. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000800002&lng=en&tlng=en>.

DABARD, J. *et al.* Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infection and Immunity*, v. 24, n. 1, p. 7–11, 1979.

DARKOH, C. *et al.* Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. *mBio*, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2015.

DAVIS, K. M.; WEISER, J. N. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 2, p. 562–570, fev. 2011. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00651-10>>.

DEMBEK, M. *et al.* High-throughput analysis of gene essentiality and sporulation in *Clostridium difficile*. *mBio*, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2015.

DI BELLA, S. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins*, v. 8, n. 5, p. 134, 3 maio 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/8/5/134>>.

DINGLE, T. C.; MULVEY, G. L.; ARMSTRONG, G. D. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 10, p. 4061–4067, out. 2011. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.05305-11>>.

DINGLE, K. E. *et al.* Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. *Genome Biology and Evolution*, v. 6, n. 1, p. 36–52, jan. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/gbe/article-lookup/doi/10.1093/gbe/evt204>>.

DINGLE, K. E. *et al.* Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 4, p. 411–421, abr. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330991630514X>>.

DONNELLY, M. L. *et al.* A *Clostridium difficile*-Specific, Gel-Forming Protein Required for Optimal Spore Germination. *mBio*, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28096487>>.

DUBBERKE, E. R. *et al.* Strategies to Prevent *Clostridium difficile* Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 35, n. 06, p. 628–645, 10

jun. 2014. Disponível em:
<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0195941700027314/type/journal_article>.

DUPUY, B. *et al.* *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, n. 6, p. 685–689, 1 jun. 2008. Disponível em:
<<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47775-0>>.

DÜRRE, P. Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*, p. 315–329, 2014. Disponível em:
<<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819323.chap15>>.

EDWARDS, A. N.; NAWROCKI, K. L.; MCBRIDE, S. M. Conserved oligopeptide permeases modulate sporulation initiation in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 10, p. 4276–4291, 2014.

EHRICH, M. *et al.* Acute diarrhea in horses of the Potomac River area: examination for clostridial toxins. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 185, n. 4, p. 433–5, 15 ago. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6469842>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

ELLIOTT, B. *et al.* *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 49, p. 1–11, abr. 2017. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134816305470>>.

ESCOBAR-CORTÉS, K.; BARRA-CARRASCO, J.; PAREDES-SABJA, D. Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. *Journal of Microbiological Methods*, v. 93, n. 1, p. 25–31, abr. 2013. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384826>>.

EYRE, D. W. *et al.* Diverse sources of *Clostridium difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 13, p. 1195–1205, 26 set. 2013. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1216064>>.

EYRE, D. *et al.* Emergence and spread of predominantly community-onset *Clostridium difficile* PCR ribotype 244 infection in Australia, 2010 to 2012. *Eurosurveillance*, v. 20, n. 10, p. 21059, 12 mar. 2015. Disponível em:
<<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21059>>.

FAWLEY, W. N. *et al.* Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0118150, 13 fev. 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118150>>.

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

FIMLAID, K. A. *et al.* Identification of a novel lipoprotein regulator of *Clostridium difficile* spore germination. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 10, p. e1005239, out. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26496694>>.

FITZPATRICK, L. R. Probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* associated disease. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, v. 4, n. 3, p. 47, 2013. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v4/i3/47.htm>>.

FRANCIS, M. B.; SORG, J. A. Dipicolinic acid release by germinating *Clostridium difficile* spores occurs through a mechanosensing mechanism. *mSphere*, v. 1, n. 6, p. e00306-16, 2016. Disponível em: <<http://msphere.asm.org/content/1/6/e00306-16>>.

GEORGE, R. H. *et al.* Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *British Medical Journal*, v. 1, n. 6114, p. 695, 18 mar. 1978a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/630301>>.

GEORGE, W. L. *et al.* Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. *Lancet (London, England)*, v. 1, n. 8068, p. 802–3, 15 abr. 1978b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/85818>>.

GERDING, D. N. *et al.* *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, v. 5, n. 1, p. 15–27, 31 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.26854>>.

GERDING, D. N. *et al.* Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection. *JAMA*, v. 313, n. 17, p. 1719, 5 maio 2015. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.3725>>.

GERDING, D. N.; SAMBOL, S. P.; JOHNSON, S. Non-toxigenic *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* for prevention of *C. difficile* infection: from bench to bedside back to bench and back to bedside. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–13, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01700/full>>.

GERHARD, R. Receptors and binding structures for *Clostridium difficile* toxins A and B. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 406, n. 3, p. 79–96, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/82_2016_17>.

GHOSE, C. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC. *Emerging Microbes & Infections*, v. 5, n. 2, p. e8–e8, 3 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/emi20168>>.

GIL, F. *et al.* Updates on *Clostridium difficile* spore biology. *Anaerobe*, v. 45, p. 3–9, jun. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996417300392>>.

GIRINATHAN, B. P. *et al.* Pleiotropic roles of *Clostridium difficile* *sin* locus. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 3, p. e10006940, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/29529083/>>.

GODA, H. *et al.* Microbicidal effects of weakly acidified chlorous acid water against feline calicivirus and *Clostridium difficile* spores under proteinrich conditions. *PLoS ONE*, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2017.

GORBACH, S. L.; BARTLETT, J. G. Pseudomembranous enterocolitis: a review of its diverse forms. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 135 Suppl, n. March, p. S89-94, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/321711>>.

GOVIND, R.; FITZWATER, L.; NICHOLS, R. Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion. *Journal of Bacteriology*, v. 197, n. 15, p. 2600–2609, 1 ago. 2015. Disponível em: <<http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.00224-15>>.

GRIFFITHS, D. *et al.* Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 770–778, mar. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01796-09>>.

GRZEŚKOWIAK, Ł.; ZENTEK, J.; VAHJEN, W. Determination of the extent of *Clostridium difficile* colonisation and toxin accumulation in sows and neonatal piglets. *Anaerobe*, v. 40, p. 5–9, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27108595>>.

GRZEŚKOWIAK, Ł. M. *et al.* Impact of early-life events on the susceptibility to *Clostridium difficile* colonisation and infection in the offspring of the pig. *Gut Microbes*, v. 00, n. 00, p. 1–9, 25 set. 2018a. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2018.1518554>>.

GRZESKOWIAK, L. *et al.* Formula feeding predisposes neonatal piglets to *Clostridium difficile* gut infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 217, n. 9, p. 1442–1452, 11 abr. 2018b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29099941>>.

GUH, A. Y. *et al.* Risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection in adults: a case-control study. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 4, n. 4, p. 105–109, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofx171/4460109>>.

GURWITH, M. J.; RABIN, H. R.; LOVE, K. Diarrhea associated with clindamycin and ampicillin therapy: preliminary results of a cooperative study. *Journal of Infectious Diseases*, v. 135, n. Supplement, p. S104–S110, 1977. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/135/Supplement/S104.abstract>>.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infant. *American Journal of Diseases of Children*, v. 49, n. 2, p. 390, 1 fev. 1935. Disponível em: <<http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpedi.1935.01970020105010>>.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 1, p. 66–98, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404569>>.

HE, M. *et al.* Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 16, p. 7527–32, 20 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914322107>>.

HE, M. *et al.* Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature Genetics*, v. 45, n. 1, p. 109–113, 9 jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.2478>>.

HENSGENS, M. P. M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>>.

HO, T. D.; ELLERMEIER, C. D. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function σ factors in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 8, p. 3229–3238, ago. 2011. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00019-11>>.

HO, T. D. *et al.* *Clostridium difficile* extracytoplasmic function factor v regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 6, p. 2345–2355, 1 jun. 2014. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01483-13>>.

HOLDEMAN, L. V.; MOORE, W. E. C.; CATO, E. P. *Anaerobe laboratory manual*. [S.l.]: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300552764>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

HONDA, H.; DUBBERKE, E. R. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 30, n. 1, p. 54–62, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559593>>.

HONG, H. A. *et al.* The spore coat protein cote facilitates host colonization by *Clostridium difficile*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. 11, p. 1452–1459, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968845>>.

HOPMAN, N. E. M. *et al.* Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, v. 149, n. 1–2, p. 186–192, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.013>>.

HORVAT, S.; RUPNIK, M. Interactions between *Clostridioides difficile* and fecal microbiota in vitro batch model: Growth, sporulation, and microbiota changes. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–10, 2018.

HOWERTON, A.; PATRA, M.; ABEL-SANTOS, E. A new strategy for the prevention of *Clostridium difficile* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 207, n. 10, p. 1498–504, 15 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420906>>.

HUDSON, L. E. *et al.* Gleaning insights from fecal microbiota transplantation and probiotic studies for the rational design of combination microbial therapies. *Clinical Microbiology reviews*, v. 30, n. 1, p. 191–231, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27856521>>.

HUTTON, M. L. *et al.* Bovine antibodies targeting primary and recurrent *Clostridium difficile* disease are a potent antibiotic alternative. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 5–9, 2017.

INDRA, A. *et al.* *Clostridium difficile*: A new zoonotic agent? *Wiener Klinische Wochenschrift*, v. 121, n. 3–4, p. 91–95, 2009.

JABBARI, S.; CARTMAN, S. T.; KING, J. R. Mathematical modelling reveals properties of TcdC required for it to be a negative regulator of toxin production in *Clostridium difficile*. *Journal of Mathematical Biology*, v. 70, n. 4, p. 773–804, 1 mar. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00285-014-0780-0>>.

JANEZIC, S.; RUPNIK, M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2010. v. 646. p. 55–65. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-365-7_5>.

JANEZIC, S. *et al.* *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC microbiology*, v. 12, n. 1, p. 48, 27 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/48>>.

JANEZIC, S. *et al.* International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 173, 28 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24972659>>.

JANEZIC, S.; RUPNIK, M. Genomic diversity of *Clostridium difficile* strains. *Research in Microbiology*, v. 166, n. 4, p. 353–360, maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.002>>.

JANEZIC, S. Direct PCR-ribotyping of *Clostridium difficile*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, v. 1476, p. 15–21, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507330>>.

JANOIR, C. *et al.* Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from *in vivo* transcriptomics. *Infection and Immunity*, v. 81, n. 10, p. 3757–3769, out. 2013. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00515-13>>.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, v. 37, p. 13–24, fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>>.

JARDINE, C. M. *et al.* Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild mammals in Southern Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 49, n. 2, p. 418–421, 2013. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/2012-04-120>>.

JOHANSSON, K.; KARLSSON, H.; NORÉN, T. *Clostridium difficile* infection diagnostics - evaluation of the C. DIFF Quik Chek Complete assay, a rapid enzyme immunoassay for detection of toxigenic *C. difficile* in clinical stool samples. *APMIS*, v. 124, n. 11, p. 1016–1020, nov. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12595>>.

JONES, M. A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *The Veterinary Record*, v. 112, n. 11, p. 253, 12 mar. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6845597>>.

JONES, R. L.; ADNEY, W. S.; SHIDELER, R. K. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, n. 7, p. 1225–1227, 1987.

JONES, R. L. *et al.* Hemorrhagic necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium difficile* infection in four foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 193, n. 1, p. 76–9, 1 jul. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262102>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

JOSHI, L. T. *et al.* The effect of hospital biocide sodium dichloroisocyanurate on the viability and properties of *Clostridium difficile* spores. *Letters in Applied Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 199–205, set. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/lam.12768>>.

KATO, H. *et al.* Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 9, p. 2067–70, set. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814526>>.

KAUR, S. *et al.* Effect of *Lactobacillus acidophilus* & epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 133, p. 434–41, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537099>>.

KEEL, M. K.; SONGER, J. G. The distribution and density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs. *Veterinary Pathology*, v. 44, n. 6, p. 814–822, 2007.

KEESSEN, E. C.; GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A. *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, v. 153, n. 3–4, p. 205–17, 15 dez. 2011a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.020>>.

KEESSEN, E. C. *et al.* Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1816–21, maio 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411571>>.

KEESSEN, E. C. *et al.* *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 6, p. 1032–1034, jun. 2013. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/6/12-1645_article.htm>.

KENTERS, N. *et al.* Effectiveness of various cleaning and disinfectant products on *Clostridium difficile* spores of PCR ribotypes 010, 014 and 027. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 6, n. 1, p. 54, 3 dez. 2017. Disponível em: <<http://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0210-3>>.

KHANNA, S. *et al.* A novel microbiome therapeutic increases gut microbial diversity and prevents recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n. 2, p. 173–181, 15 jul. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiv766>>.

KILLGORE, G. *et al.* Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat An. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 431–437, 1 fev. 2008. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01484-07>>.

KIM, H.-Y. *et al.* High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea.

Anaerobe, v. 51, p. 42–46, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996418300568>>.

KIRK, J. A. *et al.* New class of precision antimicrobials redefines role of *Clostridium difficile* S-layer in virulence and viability. *Science Translational Medicine*, v. 9, n. 406, p. eaah6813, 6 set. 2017. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aah6813>>.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 11, p. 3856–62, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122859>>.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Nationwide surveillance study of *Clostridium difficile* in Australian neonatal pigs shows high prevalence and heterogeneity of PCR ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 1, p. 119–123, 1 jan. 2015a. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03032-14>>.

KNIGHT, D. R. *et al.* Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 3, p. 721–41, jul. 2015b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085550>>.

KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* clade 5 in Australia: antimicrobial susceptibility profiling of PCR ribotypes of human and animal origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 8, p. 2213–7, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27130808>>.

KNIGHT, D. R. *et al.* Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. January, 11 jan. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02138/full>>.

KOCHAN, T. J. *et al.* Germinant Synergy Facilitates *Clostridium difficile* Spore Germination under Physiological Conditions. *mSphere*, v. 3, n. 5, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<http://msphere.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSphere.00335-18>>.

KOCIOLEK, L. K.; GERDING, D. N. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, n. 3, p. 150–60, mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.220>>.

KOCIOLEK, L. K. *et al.* Correlation between restriction endonuclease analysis and PCR ribotyping for the identification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* clinical strains. *Anaerobe*, v. 54, p. 1–7, dez. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996418301240>>.

KOENIGSKNECHT, M. J. *et al.* Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 3, p. 934–941, 2015.

KOVACS-SIMON, A. *et al.* Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 2, p. 274–284, 15 jul. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu070>>.

KUIJPER, E. J. *et al.* Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, n. 4, p. 751–3, abr. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3033017>>.

KUIJPER, E. J.; COIGNARD, B.; TÜLL, P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, n. 7079, p. 2–18, maio 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673659913376>>.

KUIJPER, E. J. *et al.* Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 13, n. 31, 31 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18761903>>.

LARSON, H. E.; PRICE, A. B. Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin. *The Lancet*, v. 310, n. 8052, p. 1312–1314, 1977.

LARSON, H. E. *et al.* *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet (London, England)*, v. 1, n. 8073, p. 1063–6, 20 maio 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/77366>>.

LAWLEY, T. D. *et al.* Use of purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 20, p. 6895–6900, 2010.

LAWSON, P. A. *et al.* Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, v. 40, p. 95–99, 2016.

LEES, E. A. *et al.* The role of *Clostridium difficile* in the paediatric and neonatal gut - a narrative review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 7, p. 1047–57, jul. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2639-3>>.

LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 16, p. 1539–48, 16 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875259>>.

LEMEE, L. *et al.* Multiplex PCR Targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (toxin A), and *tcdB* (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5710–5714, 1 dez. 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004>>.

LESSA, F. C. *et al.* Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 9, p. 825–834, 26 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1408913>>.

LI, Z. *et al.* Comparison of a newly developed binary typing with ribotyping and Multilocus Sequence Typing methods for *Clostridium difficile*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 147, n. December 2017, p. 50–55, abr. 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.012>>.

LIPPKE, R. T. *et al.* Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 6, p. 505-510, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000600008>.

LIUBAKKA, A.; VAUGHN, B. P. *Clostridium difficile* infection and fecal microbiota transplant. *AACN Advanced Critical Care*, v. 27, n. 3, p. 324-337, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959316>>.

LOO, V. G.; BRASSARD, P.; MILLER, M. A. Household transmission of *Clostridium difficile* to family members and domestic pets. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 37, n. 11, p. 1342-1348, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27767004>>.

LYNCH, M. *et al.* Surface layer proteins from virulent *Clostridium difficile* ribotypes exhibit signatures of positive selection with consequences for innate immune response. *BMC Evolutionary Biology*, v. 17, n. 1, p. 90, 23 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12862-017-0937-8>>.

MACCANNELL, D. Bacterial strain typing. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 33, n. 3, p. 629-650, set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.005>>.

MACLEOD-GLOVER, N.; SADOWSKI, C. Efficacy of cleaning products for *Clostridium difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien*, v. 56, n. 5, p. 417-23, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463269>>.

MANI, N.; DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 10, p. 5844-5849, 8 maio 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.101126598>>.

MARTIN-VERSTRAETE, I.; PELTIER, J.; DUPUY, B. The Regulatory Networks That Control *Clostridium difficile* Toxin Synthesis. *Toxins*, v. 8, n. 5, p. 153, 14 maio 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/8/5/153>>.

MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, n. 4, p. 206-16, abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>>.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. *et al.* Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *World Journal of Gastroenterology*, v. 23, n. 9, p. 1552-1567, 7 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28321156>>.

MATAMOUROS, S.; ENGLAND, P.; DUPUY, B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Molecular Microbiology*, v. 64, n. 5, p. 1274-1288, 30 maio 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2007.05739.x>>.

MCCOY, R. M. *et al.* Luminal toxin-binding agents for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Pharmacy Practice*, v. 29, n. 4, p. 361–7, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25613056>>.

MCDONALD, L. C. *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 7, p. e1–e48, 19 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307191>>.

MCFARLAND, L. V. *et al.* Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *World Journal of Gastroenterology*, v. 22, n. 11, p. 3078–104, 21 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27003987>>.

MCKEE, R. W. *et al.* The second messenger cyclic di-GMP regulates *Clostridium difficile* toxin production by controlling expression of sigD. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 22, p. 5174–5185, 15 nov. 2013. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00501-13>>.

MCKEE, R. W. *et al.* Type IV pili promote *Clostridium difficile* adherence and persistence in a mouse model of infection. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 5, 26 fev. 2018. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00943-17>>.

MERRIGAN, M. M. *et al.* Surface-Layer Protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

MILLS, J. P.; RAO, K.; YOUNG, V. B. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 34, n. 1, p. 3–10, jan. 2018. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00001574-201801000-00003>>.

MIZRAHI, A.; COLLIGNON, A.; PÉCHINÉ, S. Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: State of the art. *Anaerobe*, v. 30, p. 210–219, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996414000924>>.

MOONO, P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in production animals and avian species: A review. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 13, n. 12, p. 647–655, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2016.2181>>.

MOSCI, D. *et al.* Automatic environmental disinfection with hydrogen peroxide and silver ions versus manual environmental disinfection with sodium hypochlorite: a multicentre randomized before-and-after trial. *Journal of Hospital Infection*, v. 97, n. 2, p. 175–179, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670117303316>>.

MULLANY, P.; ALLAN, E.; ROBERTS, A. P. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Research in Microbiology*, v. 166, n. 4, p. 361–367, maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.005>>.

MULLIGAN, M. E. Epidemiology of *Clostridium difficile*-induced intestinal disease. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 6 Suppl 1, p. S222-8, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6372032>>.

- MUÑOZ, M. *et al.* Determining *Clostridium difficile* intra-taxa diversity by mining multilocus sequence typing databases. *BMC Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 62, 14 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0969-7>>.
- NA, X. *et al.* gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 7, p. 2862–2871, 1 jul. 2008. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00326-08>>.
- NAGARO, K. J. *et al.* Nontoxicogenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 11, p. 5266–5270, nov. 2013. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.
- NALE, J. Y. *et al.* Bacteriophage combinations significantly reduce *Clostridium difficile* growth *in vitro* and proliferation *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 2, p. 968–981, fev. 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01774-15>>.
- NATARAJAN, M. *et al.* A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, v. 22, n. 734, p. 1–5, ago. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996413000863>>.
- NERANDZIC, M. M.; DONSKEY, C. J. Sensitizing *Clostridium difficile* spores with germinants on skin and environmental surfaces represents a new strategy for reducing spores via ambient mechanisms. *Pathogens & Immunity*, v. 2, n. 3, p. 404–421, 30 out. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29167835>>.
- OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain. *Ciência Rural*, v. 46, n. 5, p. 853–859, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000500853&lng=en&tlng=en>.
- OLIVEIRA JUNIOR, C. A. DE *et al.* Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. *Anaerobe*, v. 51, p. 61–63, jun. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29680295>>.
- ORCHARD, J. L.; FEKETY, R.; SMITH, J. R. Antibiotic-associated colitis due to *Clostridium difficile* in a Kodiak bear. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 8, p. 1547–8, ago. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6625306>>.
- OREN, A.; GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 3761–3764, 1 set. 2016. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001321>>.
- ORRELL, K. E. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B: Receptors, pores, and translocation into cells. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 52, n. 4, p. 461–473, 2017.
- PAREDES-SABJA, D. *et al.* *Clostridium difficile* spore-macrophage interactions: spore survival. *PloS one*, v. 7, n. 8, p. e43635, fev. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209938>>.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 7, p. 406–416, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>>.

PÉCHINÉ, S. *et al.* Immunization Using GroEL Decreases *Clostridium difficile* Intestinal Colonization. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e81112, 26 nov. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081112>>.

PÉCHINÉ, S. *et al.* Targeting *Clostridium difficile* Surface Components to Develop Immunotherapeutic Strategies Against *Clostridium difficile* Infection. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. MAY, p. 1009, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29875742>>.

PELTIER, J. *et al.* *Clostridium difficile* has an original peptidoglycan structure with a high level of N -acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 33, p. 29053–29062, 19 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.259150>>.

PEREIRA, F. C. *et al.* The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genetics*, v. 9, n. 10, 2013.

PHILLIPS, J. A.; HAMMOND, S. *Clostridium difficile* Infection. *Workplace Health & Safety*, v. 65, n. 4, p. 180–180, 17 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1408913>>.

PIRES, R. N. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? *American Journal of Infection Control*, v. 42, n. 4, p. 459–60, abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2013.10.012>>.

PIRES, R. N. *et al.* Hypervirulent *Clostridium difficile* strain has arrived in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 39, n. 3, p. 371–373, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29368667>>.

PLANCHE, T. *et al.* Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 8, n. 12, p. 777–84, dez. 2008. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70233-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70233-0)>.

PLAZA-GARRIDO, Á. *et al.* Predominance of *Clostridium difficile* ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, 2012. *Epidemiology and Infection*, v. 144, n. 5, p. 976–9, 22 abr. 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268815002459>.

POPOFF, M. R.; BOUVET, P. Clostridial toxins. *Future Microbiology*, v. 4, n. 8, p. 1021–1064, out. 2009. Disponível em: <<http://search.proquest.com.ezproxy.is.cuni.cz/docview/223072057/fulltextPDF/12B509225109490EPQ/1?accountid=15618>>.

PRÉVOT, A. R. Études de systématique bactérienne. IV. Critique de la conception actuelle du genre *Clostridium*. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 61, p. 72–91, 1938.

- RAMIREZ, A. *et al.* Use of equine-origin antitoxins in piglets prior to exposure to mitigate the effects of *Clostridium difficile* infection - A pilot study. *Journal of Swine Health and Production*, v. 22, p. 29–32, 2014.
- REA, M. C. *et al.* Bioavailability of the anti-clostridial bacteriocin thuricin CD in gastrointestinal tract. *Microbiology (Reading, England)*, v. 160, n. Pt 2, p. 439–45, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287693>>.
- REID, G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 30, n. 1, p. 17–25, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691815001651>>.
- RIFKIN, G. D. *et al.* Antibiotic-induced colitis implication of a toxin neutralised by *Clostridium sordellii* antitoxin. *The Lancet*, v. 310, n. 8048, p. 1103–1106, 1977.
- RILEY, T. V. *Clostridium difficile* : A Pathogen of the Nineties. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 137–141, 2 jun. 1998. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s100960050037>>.
- RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; *et al.* *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 932, n. 1, p. 65–92, 2016a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27350639>>.
- RODRIGUEZ, C.; VAN BROECK, J.; *et al.* *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*, v. 97, p. 59–78, ago. 2016b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401016301000>>.
- ROMANO, V. *et al.* Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes from wastewater treatment plants in southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 18, p. 6643–6646, 15 set. 2012. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01379-12>>.
- ROSHAN, N.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Non-conventional antimicrobial and alternative therapies for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, v. 49, p. 103–111, fev. 2018a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996418300039>>.
- ROSHAN, N.; RILEY, T. V.; HAMMER, K. A. Effects of natural products on several stages of the spore cycle of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, v. 125, n. 3, p. 710–723, set. 2018b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13889>>.
- RUPNIK, M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 5, p. 457–459, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01687.x>>.
- RUPNIK, M. *et al.* *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 6, p. 2146, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417662>>.
- RUPNIK, M.; JANEZIC, S. An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 13–18, jan. 2016. Disponível em:

<<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.02083-15>>.

SAMBOL, S. P. *et al.* Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 12, p. 1781–9, 15 dez. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/345676>>.

SAUJET, L. *et al.* The regulatory network controlling spore formation in *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 358, n. 1, p. 1–10, 2014.

SCHNEEBERG, A. *et al.* *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 11, p. 3796–3803, nov. 2013. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01440-13>>.

SCHWAN, C. *et al.* *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 6, p. 2313–2318, 11 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1311589111>>.

SEMENYUK, E. G. *et al.* Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* Biofilms. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e87757, 30 jan. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0087757>>.

SEMENYUK, E. G. *et al.* Analysis of bacterial communities during *Clostridium difficile* infection in the mouse. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 11, p. 4383–4391, nov. 2015. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00145-15>>.

SHRESTHA, R.; SORG, J. A. Hierarchical recognition of amino acid co-germinants during *Clostridioides difficile* spore germination. *Anaerobe*, v. 49, p. 41–47, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.001>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v. 41, n. 8, p. 1430–1435, 29 jul. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000800021&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v. 20, p. 82–84, abr. 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.007>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, p. 73-80, 2013b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000100013>.

SILVA, R. O. S. *et al.* An outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets in Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 3923-3928, 2013c. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/4457/445744138045/>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 47, n. 4, p. 447–450, ago. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000400447&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 8, p. 1062–1065, 11 dez. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000801062&lng=en&tlng=en>.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 30, n. 1, p. 225–420, 1 jan. 1980. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-30-1-225>>.

SMITH, R. M. *et al.* Antibiotics, staphylococcal enteritis and pseudomembranous enterocolitis. *The New England Journal of Medicine*, v. 249, n. 1, p. 37–40, 2 jul. 1953. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13063680>>.

SMITS, W. K. Hype or hypervirulence. *Virulence*, v. 4, n. 7, p. 592–596, 27 out. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.26297>>.

SMITS, W. K. *et al.* *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, p. 16020, 7 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201620>>.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, v. 5, n. 02, p. 321–326, 28 dez. 2004. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252304000386/type/journal_article>.

SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, v. 17, n. 6, p. 528–36, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475510>>.

SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996405001277>>.

SONGER, J. G. *et al.* Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxic organisms. *Veterinary Microbiology*, v. 124, n. 3–4, p. 358–361, out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507001861>>.

SORG, J. A.; SONENSHEIN, A. L. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 3, p. 1115–1117, 2009.

SPONSELLER, J. K. *et al.* Hyperimmune bovine colostrum as a novel therapy to combat *Clostridium difficile* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 8, p. 1334–41, 15 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25381448>>.

SQUIRE, M. M. *et al.* Novel molecular type of *Clostridium difficile* in neonatal pigs, western Australia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 5, p. 9–12, maio 2013. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/5/12-1062_article.htm>.

SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 365, n. April, p. 299–314, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695920>>.

STEELE, J. *et al.* Antibody against TcdB, but not TcdA, prevents development of gastrointestinal and systemic *Clostridium difficile* disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 207, n. 2, p. 323–330, 15 jan. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jis669>>.

STEVENSON, E.; MINTON, N. P.; KUEHNE, S. A. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. *Trends in Microbiology*, v. 23, n. 5, p. 275–282, maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.004>>.

STOJANOV, M. *et al.* Development and evaluation of double locus sequence typing for molecular epidemiological investigations of *Clostridium difficile*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 35, n. 2, p. 175–181, 18 fev. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10096-015-2525-4>>.

SUO, J. *et al.* *Clostridium difficile* RT 078/ST11: A threat to community population and pigs identified in elder hospitalized patients in Beijing, China. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 38, n. 11, p. 1383–1385, 27 nov. 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0899823X17001921/type/journal_article>

TASTEYRE, A. *et al.* Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 12, p. 7937–7940, 1 dez. 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001>>.

THANISSERY, R.; WINSTON, J. A.; THERIOT, C. M. Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. *Anaerobe*, v. 45, p. 86–100, 2017.

TICKLER, I. A. *et al.* Strain types and antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 4214–8, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752264>>.

TOOTHAKER, R. D.; ELMER, G. W. Prevention of clindamycin-induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 26, n. 4, p. 552–6, out. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6517545>>.

TSAI, B.-Y. *et al.* Zoonotic potential of the *Clostridium difficile* RT078 family in Taiwan. *Anaerobe*, v. 41, p. 125–130, out. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996416300701>>.

TULLI, L. *et al.* CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human

collagen. *Cellular Microbiology*, v. 15, n.10, p.1674-1687, maio 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12139>>.

USUI, M. *et al.* Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe*, v. 43, p. 15–20, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996416301457>>.

UWAMAHORO, M. C. *et al.* Evaluating the sporicidal activity of disinfectants against *Clostridium difficile* and *Bacillus amyloliquefaciens* spores by using the improved methods based on ASTM E2197-11. *Frontiers in Public Health*, v. 6, 5 fev. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2018.00018/full>>.

UZAL, F. A. *et al.* *Clostridial Diseases of Animals*. 1st. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118728291>>.

VALIENTE, E.; CAIRNS, M. D.; WREN, B. W. The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage: A pathogen on the move. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 5, p. 396–404, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12619>>.

VAN DEN BERG, R. J. *et al.* Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1035–41, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004050>>.

VAN DORP, S. M. *et al.* Survey of diagnostic and typing capacity for *Clostridium difficile* infection in Europe, 2011 and 2014. *Eurosurveillance*, v. 21, n. 29, p. 30292, 21 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22537>>.

VILLANO, S. A. *et al.* Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 10, p. 5224–5229, out. 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00913-12>>.

VOHRA, P.; POXTON, I. R. Efficacy of decontaminants and disinfectants against *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, n. 8, p. 1218–1224, 2011.

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 2, p. 247–263, 1 abr. 2005. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>>.

WALIGORA, A.-J. *et al.* Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 4, p. 2144–2153, 1 abr. 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001>>.

WARRINER, K. *et al.* Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *Journal of Applied Microbiology*, v. 122, n. 3, p. 542–553, mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27813268>>.

WATERS, E. H. *et al.* Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, v. 10, n. 1, p. 104–8, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9526873>>.

WEESE, J. S. *et al.* The Roles of *Clostridium difficile* and Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 15, n. 4, p. 374–378, 2001a.

WEESE, J. S. *et al.* Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 218, p. 1436–1439, 1421, 2001b.

WEESE, J. S. *et al.* Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe*, v. 16, n. 5, p. 501–504, out. 2010. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>>.

WILCOX, M. H. *et al.* Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 4, p. 305–317, 26 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602615>>.

WORSLEY, M. A. Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 41 Suppl C, p. 59–66, 1998.

WU, Y. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from a pig slaughterhouse, pork, and humans in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, v. 242, p. 37–44, fev. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.010>>.

YAEGER, M. J.; KINYON, J. M.; GLENN SONGER, J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, v. 19, n. 1, p. 52–9, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459832>>.

YANG, J. J. *et al.* Evaluation of a chromogenic culture medium for the detection of *Clostridium difficile*. *Yonsei Medical Journal*, v. 55, n. 4, p. 994–8, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954329>>.

YUTIN, N.; GALPERIN, M. Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced Clostridia. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 10, p. 2631–2641, ago. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12173>>.

ZHU, S.; GAO, B. Evolutionary origin of β -defensins. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 39, n. 1–2, p. 79–84, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X12000341>>.

ZHU, D.; SORG, J. A.; SUN, X. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, n. February, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00029/full>>.

3. CAPÍTULO 1. SEQUENCIAMENTO GENÔMICO COMPLETO DA ESTIRPE DE *Clostridioides (Clostridium) difficile* Z31

Trabalho publicado em
Gut Pathogens 8(1):11, 2016

Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31

Pereira, F. L.*; Oliveira Júnior, C. A.*; Silva, R. O. S.; Dorella, F. A.; Carvalho, A. F.; Almeida, G. M. F.; Leal, C. A. G.; Lobato, F. C. F.; Figueiredo, H. C. P.

*Contribuição igual como primeiro autor

Anexo 9.1.1

Resumo

Clostridioides (Clostridium) difficile é uma bactéria formadora de esporos responsável por infecção nosocomial em humanos. É reconhecida como um importante agente de diarreia e colite em diversas espécies animais e um possível agente zoonótico. Apesar da importância da infecção por *C. difficile* (ICD) em humanos e animais, nenhuma vacina ou medida de controle para a doença está comercialmente disponível. Uma possível alternativa para o tratamento da ICD é o uso de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) como um agente de exclusão competitiva. Entretanto, um conhecimento mais aprofundado destas estirpes se faz necessário para o desenvolvimento desta proposta. Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar o sequenciamento completo da estirpe NTCD Z31. O genoma foi sequenciado pelo Ion Torrent PGM™, a montagem foi realizada com o auxílio dos programas Mira 4.9.1 software, Newbler 2.9 (Roche, Estados Unidos), SPAdes 3.5.0 e CONTIGuator 2.0. O genoma foi anotado automaticamente pelo programa Prokka 1.10 e depositado no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/302266>). O genoma da estirpe Z31 é um cromossomo circular de 4.298.263 pares de base (bp), com 29,21% de conteúdo GC codificando 4.128 proteínas e contendo 78 pseudogenes. A estirpe pertence ao ST3, clado 1 e possui cinco regiões fágicas em seu genoma. Genes responsáveis por resistência a tetraciclina e eritromicina foram detectados e, mais importante, a estirpe Z31 também contém genes responsáveis por produção e estabilidade dos esporos, adesão celular, aderência intestinal e formação de biofilme. Quando comparado com genomas de outros isolados de *C. difficile* presentes no GenBank, várias regiões únicas foram evidenciadas no genoma da Z31. O presente estudo foi o primeiro a realizar o sequenciamento completo de uma estirpe não toxigênica de *C. difficile* e evidenciou que a estirpe não possui os genes das toxinas causadores da doença, mas codifica diversos fatores de virulência que podem favorecer a colonização no hospedeiro.

Palavras-chave: Esporulação, adesinas, exclusão competitiva, probiótico

3.1. Introdução

Clostridioides (Clostridium) difficile foi reconhecido como enteropatógeno em seres humanos no final da década de 1970, sendo hoje a maior causa de diarreia nosocomial em humanos no mundo e uma crescente causa de diarreia na comunidade em geral (George *et al.*, 1978; Khan and Elzouki, 2014; Ogielska *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016). Em medicina veterinária, *C. difficile* acomete animais domésticos, sinantrópicos e espécies silvestres, sendo uma das mais importantes causas de diarreia neonatal em suínos (Songer and Uzal, 2005; Hopman *et al.*, 2011; Schneeberg *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Em leitões, a infecção por *C. difficile* (ICD) ocorre em animais de 1 a 7 dias de vida, os quais podem apresentar sinais clínicos como desidratação e diarreia (Silva *et al.*, 2013). Entretanto, grande parte dos animais são acometidos pela forma subclínica da

doença, na qual os animais estão aparentemente hígidos, porém, o desenvolvimento corporal é afetado, causando perdas econômicas para o produtor (Songer and Anderson, 2006, Yaeger *et al.*, 2007).

Apesar da reconhecida importância de *C. difficile* em humanos e animais, nenhuma vacina se encontra comercialmente disponível. Estudos têm demonstrado que imunógenos clássicos e recombinantes expressando as toxinas A e B são capazes de prevenir a ocorrência ou diminuir a severidade da ICD em modelos experimentais usando roedores (Bruxelle *et al.*, 2018). Entretanto, estas vacinas não são capazes de prevenir a eliminação fecal do microrganismo, o que é essencial, haja vista que *C. difficile* é um patógeno nosocomial (McDonald *et al.*, 2018). Além disso, a prevenção da colonização de animais domésticos é crucial devido ao potencial risco zoonótico do agente (Hensgens *et al.*, 2012). Entre outras alternativas de prevenção examinadas, o uso de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) tem sido avaliado com o intuito de reduzir a ocorrência da doença em humanos e leitões por meio do mecanismo de exclusão competitiva (Songer *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2016; Gerding *et al.*, 2018). Recentemente, uma estirpe isolada no Brasil, nomeada Z31, foi capaz de prevenir a ICD em hamsters (Oliveira Júnior *et al.*, 2016).

O sequenciamento completo do genoma é um passo importante para a caracterização das estirpes NTCD, uma vez que auxilia na identificação dos fatores de virulência desejáveis para conferir o efeito desejado bem como possíveis riscos na utilização da estirpe. Além disso, é necessário possuir uma impressão digital genética de uma estirpe NTCD visando sua utilização comercial. Entretanto, até o momento do presente estudo nenhum genoma completo de uma estirpe NTCD havia sido reportado. Com isso, o objetivo deste estudo foi realizar o sequenciamento genômico completo da estirpe Z31.

3.2. Material e Métodos

Isolamento e extração de DNA

C. difficile Z31, ribotipo 009, uma estirpe não toxigênica isolada de um cão saudável em 1 de fevereiro de 2009, na cidade de Belo Horizonte (Brasil), foi selecionada para o sequenciamento. A escolha desta estirpe foi embasada na capacidade da mesma em prevenir a ICD no modelo de hamster (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Esta estirpe foi plaqueada em ágar Müeller Hinton (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue e 0,1% de taurocolato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) (AST) a 37 °C sob condições de anaerobiose por 48 a 72 h. A identidade da estirpe foi confirmada através da identificação do gene *tpi* de acordo com PCR previamente descrita (Silva *et al.*, 2011). Uma colônia pura da estirpe foi submetida a uma fotomicrografia eletrônica em microscópio eletrônico de transmissão (JEM-2100, JEOL, Brasil).

O DNA genômico foi extraído com Maxwell 16® Research Instrument (Promega, EUA) combinado com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). Resumidamente, as células bacterianas foram incubadas *overnight* em solução de lisozima (10 mg/mL) a 37 °C. A proteinase K foi adicionada e a mistura foi incubada a 56 °C durante 30 minutos. De acordo com as instruções do fabricante: (I) as amostras foram lisadas na presença de um agente caotrópico e um detergente; (II) os ácidos nucleicos se ligaram a partículas magnéticas de sílica; (III) as partículas ligadas foram lavadas, para isolá-los de outros componentes celulares; e (IV) os ácidos nucleicos foram eluídos para sequenciamento. O DNA extraído foi armazenado a -80 °C até a análise.

Sequenciamento e montagem do genoma

O genoma foi sequenciado pelo Ion Torrent PGM™, utilizando um *kit* de sequenciamento *mate-pair* com um tamanho de inserto de 3 kbp (cobertura aproximada de 144 vezes) e com um sequenciamento de fragmentos de 400 pb (cobertura aproximada de 318 vezes). A qualidade dos dados iniciais foram analisados com o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) e a sequência foi montada com o Mira 4.9.1 software (Chevreux *et al.*, 1999) e o Newbler 2.9 (Roche, EUA) para a biblioteca de fragmentos e com o SPAdes 3.5.0 (Nurk *et al.*, 2013) para a biblioteca de *mate-pair*. Os grandes *contigs* obtidos com o Newbler e Mira foram inseridos, como *trusted-contigs*, no SPAdes. Foram obtidos 20 *scaffolds*, com um valor de N50 de 698.574 pb, e o maior *scaffold* tinha um tamanho de comprimento de 1.691.449 pb. O preenchimento de *gaps* foi realizado com CLC Genomics Workbench 7 (Qiagen, EUA), após a construção de um super *scaffold* com o CONTIGuator 2.0 (Galardini *et al.*, 2011), usando e estirpe de *C. difficile* CD196 (GenBank: NC_013315.1) como referência. Os *gaps* nas regiões do *operon* rRNA foram preenchidas por mapeamento em consenso com a referência, e os intervalos restantes foram mapeados recursivamente, utilizando os dados brutos nos flancos dos *gaps*, repetindo várias vezes até que uma sobreposição fosse encontrada.

Anotação genômica

O genoma foi anotado automaticamente com o Prokka 1.10 software (Rapid Bacterial Genome Annotation) (Seemann, 2014), com os parâmetros padrão e bancos de dados alinhados na ordem: TrEMBL Uniprot contendo apenas proteínas de *Clostridium* spp. seguido de banco de dados RefSeq. O genoma foi submetido a curadoria manual em todas as supostas *frameshifts* utilizando o *software* Artemis (Rutherford *et al.*, 2000), com base na cobertura visualizada com o *software* CLC Genomics Workbench 7, com viés de montagem corrigido. Genes codificadores de peptídeos sinalizadores foram identificados com o *software* SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011), seguido pela identificação de genes de proteínas com hélices transmembrana com Tmhmm 2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998) e genes de proteínas domínios Pfam com PfamScan (Mistry *et al.*, 2007). Estas três ferramentas foram usadas em seus parâmetros padrão.

Controle de qualidade e árvore filogenética

O DNA genômico foi extraído de um isolado bacteriano puro e confirmado com sequenciamento do gene 16S rRNA. Um alinhamento foi construído com regiões da sequência do 16S rRNA nos *scaffolds* montados com auxílio do *software* Barrnap (disponível em <https://github.com/tseemann/barrnap>), e os genes 16S rRNA de genomas disponíveis no GenBank. Uma árvore filogenética foi construída a partir deste alinhamento pelo método *Neighbor-joining*, usando o CLC Genomic Workbench 7.0.

Multilocus Sequence Typing (MLST) e PCR *in silico*

O MLST foi realizado com auxílio do PubMLST (disponível em: <http://pubmlst.org/cdifficile/>) usando a sequência completa do genoma. O *software* jPCR foi utilizado para realização da PCR *in silico* para genes relacionados às toxinas (tabela 1), fatores de virulência (tabela 2) e resistência antimicrobiana (tabela 3).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a pesquisa de toxinas na estirpe Z31 de *C. difficile* pela técnica de PCR *in silico*.

Gene	Atribuição	Iniciadores	Referência
<i>tcdA</i>	Toxina A	tcdA-F3345 - GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA tcdA-R3969 - AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	Persson <i>et al.</i> , 2008
<i>tcdB</i>	Toxina B	tcdB-F5670 CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG tcdB-R6079A GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA tcdB-R6079B - GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	- Persson <i>et al.</i> , 2008
<i>tcdC</i>	Regulador negativo	tcdC-F(-17) - AAAAGGGAGATTGTATTATGTTTTTC tcdC-R(+462) CAATAACTTGAATAACCTTACCTTCA	Persson <i>et al.</i> , 2008
<i>cdtA</i>	Toxina CdtA	cdtA-F739A GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC cdtA-F739B GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC cdtA-R958 - CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	- Persson <i>et al.</i> , 2008
<i>cdtB</i>	Toxina CdtB	cdtB-F617 - TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG cdtB-R878 - CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	Persson <i>et al.</i> , 2008

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a pesquisa de fatores de virulência não-toxinas na estirpe Z31 de *C. difficile* pela técnica de PCR *in silico*.

Gene	Atribuição	Iniciadores	Referência
<i>cotA</i>	Formação do esporo	CotA-clostron-F TTCCTCCTACGATAGACCTTGG CotA-clostron-R - GCAATCATCACAATCGCAGT	- Permpoonpattana <i>et al.</i> , 2013
<i>cotB</i>	Proteínas do esporo	CotB-clostron-F CAGGGATAGAAATAAACAAAAAC CotB-clostron-R GGGGTCTAGTAATCCTCTCATA	- Permpoonpattana <i>et al.</i> , 2013
<i>cotCB</i>	Proteínas do esporo	CotC-clostron-F - TAACATAAGACAAGCAGACC CotC-clostron-R - ATCGCCAAAGACATTA	Permpoonpattana <i>et al.</i> , 2013
<i>cotD</i>	Proteínas do esporo	CotD-clostron-F - CCCGTAACCGATTTACATGA CotD-clostron-R - CCCGTAACCGATTTACATGA	Permpoonpattana <i>et al.</i> , 2013
<i>sodA</i>	Superóxido dismutase	Foward - TATSCWTATGATGCWYTWGARCC Reverse - TARTAAGCATGYTCCCAAACATC	Lemee <i>et al.</i> , 2004
<i>spo0A</i>	Esporulação/ativação de fatores de virulência	CDSpo0A_For TTAATGGGGGAGGATCCATGGAAAAAATCA AA CDSpo0A_Rev TTACTTTTTATGCTCGAGTCATTTAACCATAC T	- Underwood <i>et al.</i> , 2009
<i>slpA</i>	Adesina	slpAF - 5'-ATGTTGGGAGGAATTTAAGAAATG-3' slpAR - 5'-ACCTCCACCAGTTTTTCATCTCTGC-3'	Merrigan <i>et al.</i> , 2013
<i>fbp68</i>	Adesina	Forward - TTAGCATAAGTAGAGTTCGTCAAG Reverse - GTCTATCAAGCTTAACAGATATACTC	Lemee <i>et al.</i> , 2004
<i>cwp66</i>	Adesina	cwp66-1- AGCAGTGGGTGTATTAGC cwp66-R1 - AATCCATCATCTGTAGCG cwp66-NB1 - CTCAAATTGGTGGCTTAGG cwp66-NBR1- ATGGCTCTTCATCTGTGGG	Savariau-Lacomme <i>et al.</i> , 2003

		cwp66-ATG - CGAAAGAATTAGGAGGTAAGA cwp66-TAA - TATGTATGTAATGATTGATTGTC	
<i>cwp84</i>	Cisteína protease	orfE-ATG - GGGGTAAACATGAGAAAAG cwp84-TAA - GGA ACTCCATTTACTACTG	Savariou-Lacomme <i>et al.</i> , 2003
<i>fliC</i>	Flagelina	Forward - ATGAGAGTTAATACAAATGTAAGTGC Reverse - CTATCCTAATAATTGTAAA CTCC	Lemee <i>et al.</i> , 2004
<i>fliD</i>	Flagelina	Forward - ATGTCAAGTATAAGTCCAGTAAG Reverse - TTCAACAAAASCTCTTAAYTCATC	Lemee <i>et al.</i> , 2004
<i>groEL</i>	Adesina	Forward - ATACTGAATTAGATGCTGTTGAAG Reverse - TCTGAAGTAGTTTGCTCTACTG	Lemee <i>et al.</i> , 2004
<i>cwpV</i>	Adesina	NF1096 - CCGGAATTCAAATGGACAAGGGGGAAGAAA ATAAAAATG NF1097 - CGCGGATCCCCAATACTAGTATTATCAAGAA AATTTACATC	Emerson <i>et al.</i> , 2009

Tabela 3. Iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos na estirpe Z31 de *C. difficile* pela técnica de PCR *in silico*.

Gene	Antimicrobiano	Iniciadores	Referência
<i>tetM</i>	Tetraciclina	TETMf - TGGAATTGATTTATCAACGG TETMr - TTCCAACCATAACAATCCTTG	Spigaglia <i>et al.</i> , 2007
<i>tetK</i>	Tetraciclina	tet(K)F - TCGATAGGAACAGCAGTA tet(K) R - GTCGTCTAGGATGAGGAA	Spigaglia <i>et al.</i> , 2006
<i>tetP</i>	Tetraciclina	tetA(P)F - CTTGGATTGCGGAAGAAGAG tet(A)R - TATACGGGTAAATTGGTGCG	Spigaglia <i>et al.</i> , 2006
<i>tetW</i>	Tetraciclina	tet(W)F:AGTCTGTTCGGGATAAGCTCTCC GCCG tet(W)R:GTAGAGACACTAAAAGTCGAAA AGAGAGGG	Spigaglia <i>et al.</i> , 2006
<i>tet(32)</i>	Tetraciclina	tet(32)F - GAACCAGATGCTGCTCTT tet(32)R - GTATCGGTGCGGGTGTACTA	Spigaglia <i>et al.</i> , 2006
<i>tet(36)</i>	Tetraciclina	Tetm(36)F - ATGTCCTGCAACA ACTAGAA Tetm (36)R - GAAGTTATGGTTACGGTATG	Spigaglia <i>et al.</i> , 2006
<i>ermB</i>	Eritromicina	E5 - CTCAA AACTTTTTAACGAGTG E6 - CCTCCCGTTAAATAATAGATA	Spigaglia <i>et al.</i> , 2007
<i>ermA</i>	Eritromicina	F - GAAAAACCCTAAAGACACGCAAAA R - AGTGACATTTGCATGCTTCAAAG	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermC</i>	Eritromicina	F- TATTAAATAATTTATAGCTATTGAAAA R- TGAACATGATAATATCTTTGAAAT	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermD</i>	Eritromicina	F- GCTTTGACA ACTGTGCTAAGTCAAAA R- GGCCATTTGTGATGCATTACATA	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermE</i>	Eritromicina	F- GCAGCACCCCAACCAGAA R- GGTACTTGCGCAGAAGCGA	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermF</i>	Eritromicina	F- TCGTTTTACGGGTCAGCACTT R- AACTTCCAGCATTTCCAAAAACA	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermG</i>	Eritromicina	F:TCACATAGAAAAAATAATGAATTGCAT AAG R:CGATACAAATTGTTGAACTAATATT GT	Patterson <i>et al.</i> , 2007

<i>ermQ</i>	Eritromicina	F- AAGTTATTGGGTTACAGCTA R- CACCTCCTAATTTAAATCTACTA	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermV</i>	Eritromicina	F- CGCCGGACAGCTCGC R- TCCCCACCAGGACGTC	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>ermX</i>	Eritromicina	F- CGTCACGAGCATGGCCA R- CGAGCGCAACCATGATTATGT	Patterson <i>et al.</i> , 2007
<i>erm-ram</i>	Eritromicina	F:ACGCGTTATATTGATAAAAATAATAAT AGTGGG R:ACGCGTGCGACTCATAGAATTATTTCC TCCCG	Peltier <i>et al.</i> , 2013
<i>bcrA</i>	Bacitracina	<i>bcrA</i> _CP-F- GGCAATACCAAGCCGTTGCTTCAT <i>bcrA</i> _CP-R- TTACGAAGCGATACGGAACAGCCA	Charlebois <i>et al.</i> , 2012
<i>bcrB</i>	Bacitracina	<i>bcrB</i> _CP-F- ATAGGTGGCTGTCCACGGATACAA <i>bcrB</i> _CP-R- CGTTTGTGGGCTATATGACGCTGT	Charlebois <i>et al.</i> , 2012
<i>bcrD</i>	Bacitracina	<i>bcrD</i> _CP-F- TGCTGCCACTCGTGAAACTCCTAT <i>bcrD</i> _CP-R- TTCTCGTTGTGGTTCAAGGTTGCG	Charlebois <i>et al.</i> , 2012
<i>bcrR</i>	Bacitracina	<i>bcrR</i> _CP-F- AAGGGCGGTTACATAGGGTTGTCT <i>bcrR</i> _CP-R- ATGTCTGCTATCGGGCGAAGAACT	Charlebois <i>et al.</i> , 2012
<i>gyrA</i>	Fluorquinolona	Cdga- V TTTAAAGCCAGTTCATAG CdgaR- GAACCAAAGTTACCATG	Spigaglia <i>et al.</i> , 2010
<i>gyrB</i>	Fluorquinolona	<i>gyrB</i> f- AGTTGATGAACTGGGGTCTT <i>gyrB</i> r- TCAAAATCTTCTCCAATACCA	Spigaglia <i>et al.</i> , 2010
<i>Codon 82 of gyrA</i>	Fluorquinolona	<i>gyrA</i> -FL1- CTCATGGAGATACTGCTGTT <i>gyrA</i> -LC1 LCRed705- ATTATGCTATGGTAAGAATGGCP	Spigaglia <i>et al.</i> , 2010
<i>Codon 426 of gyrB</i>	Fluorquinolona	<i>gyrB</i> -FL1- TTAGTCGAAGGGGATTCAGFL <i>gyrB</i> -LC1LCRed640 - GGAGGTTTCAGCTAAACAAGGTP	Spigaglia <i>et al.</i> , 2010
<i>cfr</i>	Linezolid	<i>cfr</i> -Cd-ex-F- -TCCTCTACGGCAAACAAACC <i>cfr</i> -Cd-ex-R-GCTCCACTTGAGTGATGCCTA	Marín <i>et al.</i> , 2015
<i>cfr</i>	Linezolid	<i>cfr</i> -Cd-F- TGAAATATAAAGCTGGTTGGGAGTCA <i>cfr</i> -Cd-R- TCCATACAATTGACCGCAAGCAGC	Marín <i>et al.</i> , 2015
<i>rplC</i>	Linezolid	L3-CdF- AAAAGTTGGTATGACTCAAATATTCAC L3-CdR- AGTTACTACTGAACCTTTAGCTCCTG	Marín <i>et al.</i> , 2015
<i>rplD</i>	Linezolid	L4-CdF-GGAGGAATAACAATGCCAAAA L4-CdR-ATGCGTACACCTCCTCCACT	Marín <i>et al.</i> , 2015
<i>vanT</i>	Vancomicina	F- CTATTGGCTATGCCGATGGT R- CGACCCACTATTGCTGCTCTAC	Peltier <i>et al.</i> , 2013
<i>vanXY</i>	Vancomicina	F- CTCTGCGTGACAAATGGAAAA R- AGCAAGCCCTGTCTGATGTT	Peltier <i>et al.</i> , 2013

<i>vanG</i>	Vancomicina	F- TGTGCGTGCAGGTTTCATCATT R- TGCACACCCTACCTCAAACCA	Peltier <i>et al.</i> , 2013
<i>vanG mut</i>	Vancomicina	F- GATGGAACAGTGCAGGGG R- GGTACTTTAATACCTTCTGAATGAAC	Peltier <i>et al.</i> , 2013
<i>vanS</i>	Vancomicina	F- TGGATAAGGCAGAGCGTCTTG R- CGCTCAAGTTTTTCCTCTGGA	Ammam <i>et al.</i> , 2013

Análise de similaridade e árvore filogenômica

O genoma da estirpe Z31 bem como os demais 11 genomas completos de *C. difficile* disponíveis no GenBank foram selecionados para realizar uma análise de similaridade com o *software* GENE (Agren *et al.*, 2012) com fragmentação de sequência com 500 nucleotídeos de comprimento e um limiar de 30%. Além disso, dois genomas completos de espécies do gênero *Clostridium* foram incluídos como um grupo externo. Uma matriz de similaridade foi utilizada para gerar o *heatmap* e um formato “.nexus” para análise filogenômica.

3.3. Resultados e discussão

Os cultivos foram confirmados como não toxigênicos através de uma PCR previamente padronizada (Silva *et al.*, 2011) e uma fotomicrografia eletrônica de um dos cultivos pode ser encontrada na figura 3. Todos os dados de sequenciamento bruto foram mapeados no genoma final e a ausência de contaminação com outros genomas foi confirmada pela cobertura e pelo baixo número de *reads* não mapeados. Na árvore filogenética de sequências de 16S rRNA, a linhagem Z31 foi posicionada entre outras estirpes de *C. difficile* (Figura 4).

O genoma da estirpe Z31 é composto por um cromossomo circular de 4.298.263 pb, comprimento similar aos demais genomas descritos de *C. difficile*, os quais possuem entre 4,0 e 4,4 Mpb (He *et al.*, 2010). O conteúdo do GC é de 29,21% e o genoma possui 4128 regiões de codificação (*Coding Sequence* - CDSs) e 78 pseudogenes, sendo a estirpe de maior percentual GC e maior número de proteínas codificadas dentre as sequenciadas. Este vasto potencial de produção de proteínas pode fornecer uma versatilidade metabólica para a estirpe em relação às demais (Riedel *et al.*, 2017). Em adição, o genoma codifica 29 RNA mensageiros (rRNA), um RNA transferência-mensageiro (tmRNA) e 58 RNA transportadores tRNA. A tabela 4 resume os 3.809 genes em que foi possível realizar a predição de funções, as quais estão descritas de acordo com as categorias funcionais definidas pelo agrupamento de grupos ortólogos (COG). Um total de 3.324 genes foram preditos para codificar proteínas com domínios Pfam, enquanto 166 codificam peptídeos sinalizadores, ao passo que 1.011 podem produzir proteínas com hélices transmembrana. Não foram encontradas Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – CRISPR).

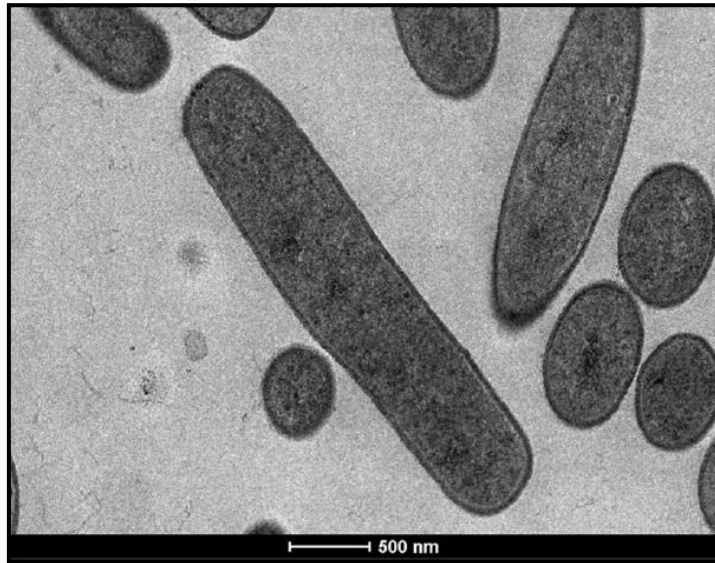


Figura 3. Fotomicrografia eletrônica de transmissão da estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31.

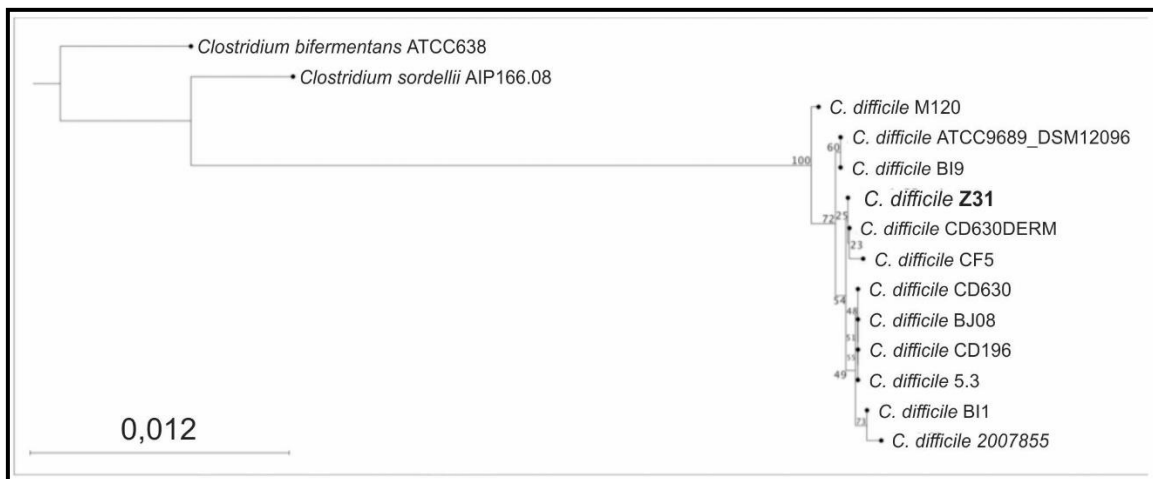


Figura 4. Árvore filogenética da estirpe Z31 de *C. difficile* representando sua posição relativa no gênero *Clostridioides* baseado em sequências de 16S rRNA. O método estatístico utilizado foi a *maximum likelihood* e o número de *bootstrap* foi de 1000. Assim, os valores próximos aos nós representam a percentagem do número de vezes, em 1000 repetições, em que esse clado foi formado.

Tabela 4. Número de genes associados às categorias funcionais gerais de acordo com o agrupamento de grupos ortólogos (COG)

Código	Número de genes ¹	Proporção de genes (%) ²	Descrição
Processos celulares e sinalização			
D	68	1,62	Controle do ciclo celular, divisão celular, partição dos cromossomos
M	208	4,95	Parede celular, biogênese da membrana
N	79	1,88	Motilidade celular
O	111	2,64	Modificação pós-translacional, renovação proteica, chaperonas
T	327	7,77	Mecanismos sinalizadores de transdução
V	134	3,18	Mecanismos de defesa
Armazenamento e processamento de informações			
A	0	0,00	Processamento e modificação de RNA
B	1	0,02	Replicação, recombinação e reparo
J	238	5,66	Translação, biogênese e estrutura ribossomal
K	479	11,39	Transcrição
L	184	4,37	Replicação, recombinação e reparo
Metabolismo			
C	219	5,21	Produção de energia e conversão
E	321	7,63	Transporte e metabolismo de aminoácidos
F	93	2,21	Transporte e metabolismo de nucleotídeos
G	310	7,37	Transporte e metabolismo de carboidratos
H	147	3,50	Transporte e metabolismo de coenzimas
I	89	2,11	Transporte e metabolismo de lipídeos
P	168	3,99	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
Q	57	1,36	Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo
Pouco caracterizada			
R	345	8,20	Apenas previsão geral de função
S	251	5,97	Função desconhecida
-	2	0,05	Não presente no COG.

¹: O número total não corresponde a quantidade final de CDSs para cada genoma, pois alguns genes são associados a mais de uma categoria funcional.

²: A porcentagem é baseada na quantidade final de genes codificadores de proteínas no genoma anotado.

Quando o genoma da estirpe Z31 foi comparado com o genoma de onze estirpes de *C. difficile* depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) foi demonstrada alta semelhança entre eles ($95,50 \pm 2,68\%$), sendo a maior semelhança encontrada com a estirpe *C. difficile* 5.3 (97,45%), a única não toxigênica entre as demais (Figura 5). Apesar disso, a estirpe Z31 possui 12 ilhas genômicas únicas (Figura 6). *C. difficile* é considerado um microrganismo com baixas taxas de conservação genética e essas regiões únicas podem ser responsáveis pela codificação de proteínas exclusivas desta estirpe, o que poderia garantir vantagens para a estirpe Z31 em termos de colonização (Scaria *et al.*, 2010; Cabal *et al.*, 2018).

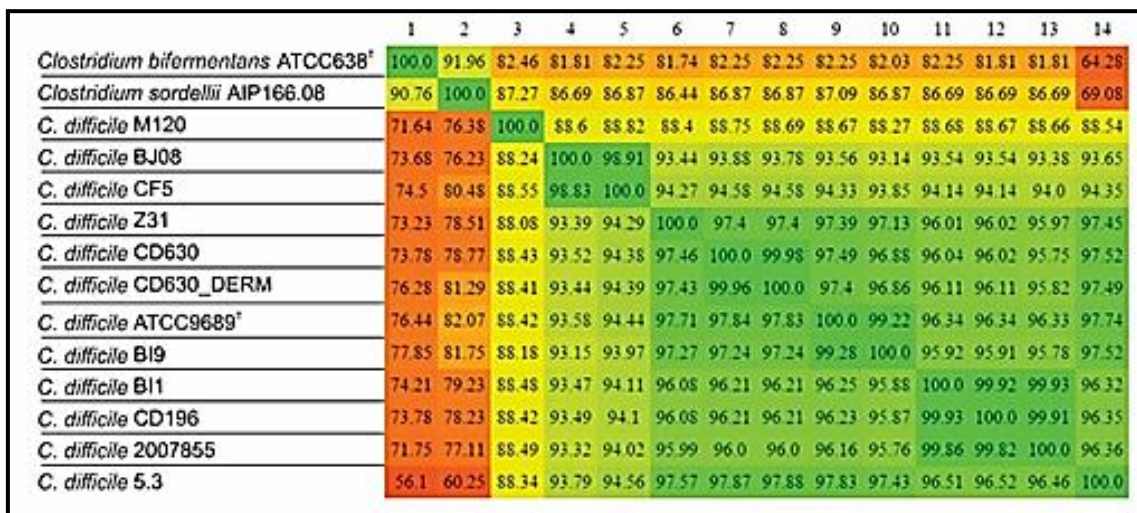


Figura 5. Heatplot de similaridade entre a estirpe Z31 de *C. difficile* e as demais estirpes depositadas no GenBank realizada pelo programa Gegenees (Agren et al., 2012).

Quatro destas ilhas foram identificadas como possíveis regiões fágicas pelo PHAST (Zhou *et al.*, 2011) e uma breve descrição destes fagos é dada na tabela 5. *C. difficile* é infectado por diversos fagos, entre eles o Φ CD119 e o ϕ C2, encontrados na estirpe Z31, ambos lisogênicos da família *Myoviridae* (Hargreaves and Clokie, 2014). O fago ϕ C2 já foi relacionado a transferência do gene de resistência a antibióticos *ermB* (Mullany *et al.*, 2015). Já Φ CD119 codifica a proteína RepR, a qual reduz a produção das toxinas TcdA e TcdB ao se ligar e bloquear a região promotora *tcdR* (Govind *et al.*, 2009).

Tabela 5. Sumário de fagos preditos pelo PHAST em relação a comprimento, componentes e conteúdo GC.

Número	Comprimento (kpb)	Situação	Nome comum	Componentes	Conteúdo GC (%)
Fago 1	93,6	Intacto	Clostr_phi_CD119	Integrase, terminase, proteína de entrada, cabeça, capsídeo, cauda, lisina, base e protease.	28,9
Fago 2	24,1	Incompleto	Clostr_phi_CD119	Cauda, lisina e base.	27,9
Fago 3	63,6	Intacto	Clostr_phiC2	Integrase, terminase, proteína de entrada, cabeça, capsídeo, cauda, lisina.	28,6
Fago 4	138,1	Intacto	Bacill_G	Protease, recombinase, cauda, transposase, integrase, cabeça, capsídeo, proteína de entrada e terminase.	35,7

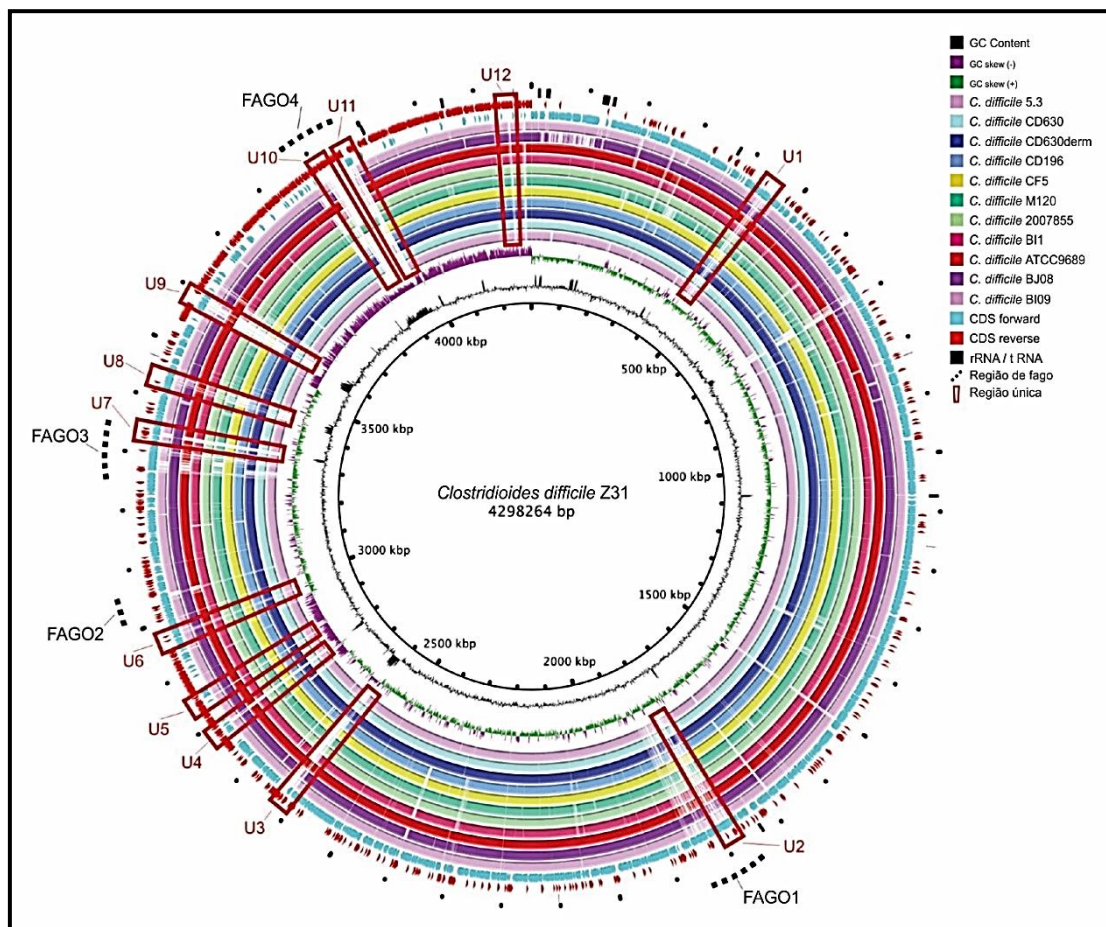


Figura 6. Mapa circular gráfico do genoma de *Clostridioides difficile* Z31. De fora para o dentro: regiões de fagos previstas pelo PHAST; RNAs; CDS na cadeia *reverse*; CDSs na cadeia *forward*; Blastn com as estirpes BI9, BJ08, ATCC9689/DSM1296, BI1, 2007855, M120, CF5, CD196, CD630DERM, CD630, Cd5.3; variação de GC (GC *skew*); conteúdo do GC (GC *Content*) e genoma da estirpe Z31. As regiões destacadas em vermelho representam as regiões únicas encontradas no genoma da estirpe Z31 em relação às demais.

A partir do sequenciamento completo do genoma, foi possível tipificar a estirpe pela técnica de MLST (Griffiths *et al.*, 2010). Os *loci* da estirpe Z31 foram tipificados pelo MLST como *adh* 1, *atpA* 1, *dxr* 2, *glyA* 1, *recA* 1, *sodA* 1, e *tpi* 1, que a classificaram como ST3, no clado 1. Esse resultado corrobora um trabalho anterior que relatou que as estirpes do ribotipo 009 são comumente classificadas como ST3 (Dingle *et al.*, 2011). Além da Z31, apenas as estirpes *C. difficile* ATCC9689/DSM1296 e *C. difficile* BI9, foram identificadas como ST3 dentre aquelas que possuem genoma completo ou quase completo (p. ex. um *scaffold*) e ambas são toxigênicas, ao contrário da estirpe Z31. Já a estirpe *C. difficile* 5.3, ribotipo 010, descrita como não toxigênica por Darling *et al.*, (2014) pertence ao ST15, clade 1, de forma que nenhuma estirpe com genoma depositado no GenBank possuía similaridade com a Z31.

Embora a estirpe Z31 seja não toxigênica, a figura 7 demonstra que ela se encontra num clado parafilético com a estirpe ATCC9689, uma reconhecida estirpe toxigênica, sugerindo uma derivação evolutiva de um mesmo organismo. Há de se ressaltar que durante o processo evolutivo,

ocorreram eventos de mobilização do PaLoc através de recombinação homóloga, o que torna razoável supor que o comportamento não toxigênico da estirpe Z31 seja ocasionado pela perda dos genes das toxinas (Dingle *et al.*, 2014).

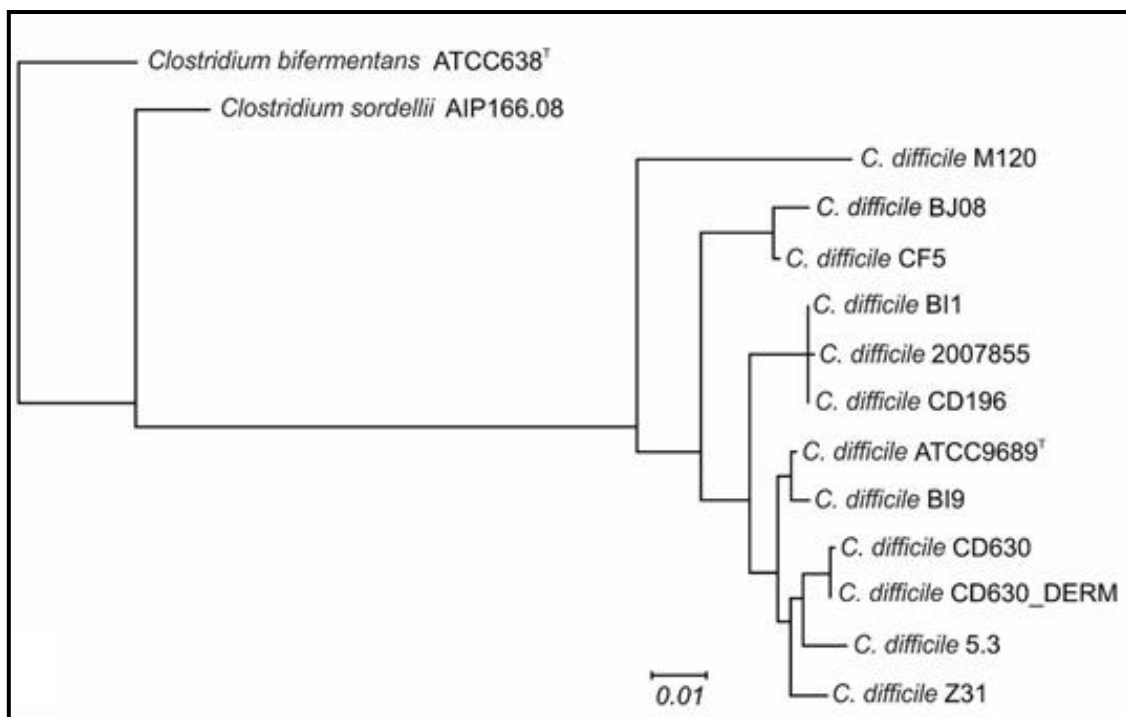


Figura 7. Análise filogenômica entre a estirpe Z31 e as demais estirpes depositadas no GenBank realizada pelo programa Gegenees a partir de fragmentação de sequência com comprimento de 500 nucleotídeos.

Após a montagem do genoma, preenchimento dos *gaps* e anotação, foi realizada uma PCR *in silico* para pesquisa de genes relacionados aos fatores de virulência e resistência a antimicrobianos. Considerando a perspectiva de usar a estirpe Z31 para prevenir a ICD por exclusão competitiva, alguns fatores de virulência não-toxina são desejáveis, predominantemente os fatores responsáveis pela produção e estabilidade de esporos e aqueles que promovem fixação celular e colonização do hospedeiro. A estirpe Z31 é positiva para a proteína de camada superficial (SlpA) e para Cwp84. A proteína SlpA é considerada a principal responsável pela aderência intestinal de *C. difficile* e a Cwp84, uma cisteína protease, promove a clivagem desta proteína, o que permite sua funcionalidade (Merrigan *et al.*, 2013; Awad *et al.*, 2014). Outras proteínas descritas como importantes no processo de aderência também foram encontradas, nomeadamente GroEL, Cwp66 e a proteína ligadora de fibronectina (Fbp68) (Hennequin *et al.*, 2001; Waligora *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2011; Merrigan *et al.*, 2013; Awad *et al.*, 2014). A estirpe Z31 também foi positiva para genes que codificam as proteínas flagelares FliC e FliD, que desempenham papéis na colonização e adesão da Z31 *in vivo* e são essenciais em estágios posteriores da formação de biofilme (Dingle *et al.*, 2011b; Baban *et al.*, 2013; Đapa *et al.*, 2013). Estes fatores encontrados na estirpe Z31 envolvidos com o processo de adesão celular são extremamente importantes, já que as estirpes NTCD precisam colonizar os sítios disponíveis e competir com as estirpes toxigênicas.

O gene que codifica o principal regulador da esporulação em *C. difficile*, *spo0A*, foi detectado na estirpe Z31. A ausência ou deficiência de Spo0A pode comprometer ou prejudicar o processo de esporulação (Mackin *et al.*, 2013; Awad *et al.*, 2014). Genes codificadores de cinco proteínas de revestimento de esporos (*cotA*, *cotB*, *cotC*, *cotD* e *sodA*) também foram detectados. A proteína *cotA* é a mais importante proteína na estabilização do revestimento de esporos e garante a integridade desta estrutura (Permpoonpattana *et al.*, 2013). A formação de esporos estáveis também é uma característica importante para uma estirpe NTCD candidata à prevenção da doença, uma vez que bactérias precisam passar pelo estômago para poder colonizar o cólon (Sambol *et al.*, 2002). As células vegetativas são sensíveis ao baixo pH, por outro lado, os esporos resistem a essas condições, permitindo que um grande número de partículas viáveis alcance o cólon (Jump *et al.*, 2007).

Genes responsáveis pela resistência à tetraciclina (*tetM*) e eritromicina (*ermG*) também foram detectados na Z31, os quais são relativamente comuns em estirpes *C. difficile*, sobretudo em isolados de suínos (Patterson *et al.*, 2007; Spigaglia *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2012; Spigaglia, 2016). Considerando que a estirpe Z31 terá que competir com estirpes resistentes a antimicrobianos e que o uso de drogas principalmente a base de tetraciclina são comuns suinocultura, a presença destes genes pode auxiliar na competição com estirpes toxigênicas (Fry *et al.*, 2012). Em contraste, nenhum dos genes que codificam proteínas diretamente ligados à produção de toxinas foram detectados (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA* ou *cdtB*) (Persson *et al.*, 2008), confirmando a ausência do locus de patogenicidade (PaLoc), que é essencial para o estabelecimento da ICD (Dingle *et al.*, 2014).

3.4. Conclusão

O sequenciamento completo do genoma da estirpe Z31 demonstrou ausência dos genes responsáveis pelas toxinas e presença de genes importantes para colonização e produção de esporos, o que favoreceria sua utilização como possível método preventivo de ICD.

3.5. Referências Bibliográficas

AGREN, J. *et al.* Gegenees: fragmented alignment of multiple genomes for determining phylogenomic distances and genetic signatures unique for specified target groups. *PLoS one*, v. 7, n. 6, p. e39107, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22723939>>.

AMMAM, F. *et al.* The functional vanGCd cluster of *Clostridium difficile* does not confer vancomycin resistance. *Molecular Microbiology*, v. 89, n. 4, p. 612–625, 2013.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *The Canadian veterinary journal*, v. 57, n. 2, p. 183–8, fev. 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

AWAD, M. M. *et al.* *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, v. 5, n. 5, p. 579–593, 3 set. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19490976.2014.969632>>.

BABAN, S. T. *et al.* The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e73026, 23 set. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073026>>.

BRUXELLE, J.-F.; PÉCHINÉ, S.; COLLIGNON, A. Immunization strategies against *Clostridium difficile*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1050, n. 4, p. 197–225, abr. 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-72799-8_12>.

CABAL, A. *et al.* Genome-based comparison of *Clostridioides difficile*: average amino acid identity analysis of core genomes. *Microbial Ecology*, v. 76, p. 801–813, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445826>>.

CHARLEBOIS, A. *et al.* Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PloS one*, v. 7, n. 9, p. e44449, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970221>>.

CHEVREUX, B.; WETTER, T.; SUHAI, S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, v. 99, p. 45–56, 1999.

DAPA, T. *et al.* Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 3, p. 545–55, 1 fev. 2013. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01980-12>>.

DARLING, A. E. *et al.* The genome of *Clostridium difficile* 5.3. *Gut Pathogens*, v. 6, n. 1, p. 4, 2014. Disponível em: <<http://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-4749-6-4>>.

DINGLE, K. E. *et al.* Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity. *PLoS One*, v. 6, n. 5, p. e19993, 2011a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625511>>.

DINGLE, K. E. *et al.* Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. *Genome Biology and Evolution*, v. 6, n. 1, p. 36–52, jan. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/gbe/article-lookup/doi/10.1093/gbe/evt204>>.

DINGLE, T. C.; MULVEY, G. L.; ARMSTRONG, G. D. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 10, p. 4061–7, out. 2011b. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.05305-11>>.

EMERSON, J. E. *et al.* A novel genetic switch controls phase variable expression of CwpV, a *Clostridium difficile* cell wall protein. *Molecular Microbiology*, v. 74, n. 3, p. 541–556, 2009.

FRY, P. R. *et al.* Antimicrobial resistance, toxinotype, and genotypic profiling of *Clostridium difficile* isolates of swine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 7, p. 2366–72, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518873>>.

GALARDINI, M. *et al.* CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code for Biology and Medicine*, v. 6, n. 1, p. 11, 2011. Disponível em: <<http://scfbm.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0473-6-11>>.

GEORGE, R. H. *et al.* Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous

colitis. *British Medical Journal*, v. 1, n. 6114, p. 695, 18 mar. 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/630301>>.

GERDING, D. N.; SAMBOL, S. P.; JOHNSON, S. Non-toxicogenic *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* for prevention of *C. difficile* infection: from bench to bedside back to bench and back to bedside. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–13, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01700/full>>.

GOVIND R. et al. Bacteriophage-mediated toxin gene regulation in *Clostridium difficile*. *Journal of Virology*, v.83, n.23, p.12037-12045, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776116>>.

GRIFFITHS, D. et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 770–778, mar. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01796-09>>.

HARGREAVES, K. R.; CLOKIE, R. J. *Clostridium difficile* phages: still difficult? *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 184, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00184/full>>.

HE, M. et al. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 16, p. 7527–32, 20 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914322107>>.

HENNEQUIN, C. et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology (Reading, England)*, v. 147, n. Pt 1, p. 87–96, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160803>>.

HENSGENS, M. P. M. et al. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>>.

HOPMAN, N. E. M. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, v. 149, n. 1–2, p. 186–192, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.013>>.

JUMP, R. L. P.; PULTZ, M. J.; DONSKEY, C. J. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 8, p. 2883–7, 1 ago. 2007. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01443-06>>.

KHAN, F. Y.; ELZOUKI, A.-N. *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, p. S6–S13, set. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764514601978>>.

LEMEE, L. et al. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 2609–2617,

2004.

LIN, Y.-P. *et al.* Manganese binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and is essential for fibronectin binding. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 5, p. 3957–3969, 4 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.184523>>.

MACKIN, K. E. *et al.* Spo0A differentially regulates toxin production in evolutionarily diverse strains of *Clostridium difficile*. *PLoS one*, v. 8, n. 11, p. e79666, 13 nov. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0079666>>.

MARÍN, M. *et al.* *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene cfr. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 1, p. 586–9, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385106>>.

MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, n. 4, p. 206–16, abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>>.

MCDONALD, L. C. *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 7, p. e1–e48, 19 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307191>>.

MERRIGAN, M. M. *et al.* Surface-Layer Protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

MISTRY, J.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. Predicting active site residue annotations in the Pfam database. *BMC Bioinformatics*, v. 8, n. 1, p. 298, 2007. Disponível em: <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-298>>.

MULLANY, P.; ALLAN, E.; ROBERTS, A. P. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Research in Microbiology*, v. 166, n. 4, p. 361–367, maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.005>>.

NURK, S. *et al.* Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA Products. *Journal of Computational Biology*, v. 20, n. 10, p. 714–737, out. 2013. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cmb.2013.0084>>.

OGIELSKA, M. *et al.* Emergence of community-acquired *Clostridium difficile* infection: the experience of a French hospital and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 37, p. 36–41, ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971215001411>>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain. *Ciência Rural*, v. 46, n. 5, p. 853–859, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000500853&lng=en&tlng=en>.

PATTERSON, A. J. *et al.* Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by macroarray detection. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 703–715, mar. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2006.01190.x>>.

PELTIER, J. *et al.* Genomic and expression analysis of the vanG-like gene cluster of *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, England)*, v. 159, n. Pt 7, p. 1510–20, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676437>>.

PERMPOONPATTANA, P. *et al.* Functional characterization of *Clostridium difficile* spore coat proteins. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 7, p. 1492–503, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.02104-12>>.

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. *Clinical Microbiology and Infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 14, n. 11, p. 1057–64, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19040478>>.

PETERSEN, T. N. *et al.* SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, v. 8, n. 10, p. 785–786, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmeth.1701>>.

RIEDEL, T. *et al.* High metabolic versatility of different toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 307, p. 311–320, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28619474>>.

RUTHERFORD, K. *et al.* Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 16, n. 10, p. 944–5, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120685>>.

SAVARIAU-LACOMME, M. P. *et al.* Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 15, p. 4461–4470, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867455>>.

SCARIA, J. *et al.* Analysis of ultra low genome conservation in *Clostridium difficile*. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. e15147, 2010. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015147>>.

SCHNEEBERG, A. *et al.* *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 11, p. 3796–3803, nov. 2013. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01440-13>>.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu153>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium*

difficile in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v. 41, n. 8, p. 1430–1435, 29 jul. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000800021&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, p. 73–80, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000100013>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe*, v. 28, p. 207–211, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24979683>>.

SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, v. 17, n. 6, p. 528–36, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475510>>.

SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996405001277>>.

SONGER, J. G. *et al.* Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Veterinary Microbiology*, v. 124, n. 3–4, p. 358–361, out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507001861>>.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, v. 6, p. 175–82, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783223>>.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. Detection of a genetic linkage between genes coding for resistance to tetracycline and erythromycin in *Clostridium difficile*. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, v. 13, n. 2, p. 90–5, 2007. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/mdr.2007.723>>.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. Tetracycline resistance gene *tet(W)* in the pathogenic bacterium *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 2, p. 770–773, 2008.

SPIGAGLIA, P. *et al.* Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in *Clostridium difficile* isolates by real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 24, n. 2, p. 61–7, abr. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2009.10.002>>.

SPIGAGLIA, P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 3, n. 1, p. 23–42, 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2049936115622891>>.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. New variants of the *tet(M)* gene in

Clostridium difficile clinical isolates harbouring Tn916-like elements. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, n. 6, p. 1205–9, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565156>>.

UNDERWOOD, S. *et al.* Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 23, p. 7296–7305, 2009.

WALIGORA, A.-J. *et al.* Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 4, p. 2144–2153, 1 abr. 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001>>.

YAEGER, M. J.; KINYON, J. M.; GLENN SONGER, J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, v. 19, n. 1, p. 52–9, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459832>>.

ZHOU, Y. *et al.* PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Research*, v. 39, n. Web Server issue, p. W347-52, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr485>>.

4. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA DE *Clostridioides (Clostridium) difficile* Z31 PARA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *C. difficile* (ICD) EM MODELO EXPERIMENTAL SUÍNO

Trabalho publicado em
Anaerobe 55:24-28, 2019

The non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets
Oliveira Júnior, C. A.; Silva, R. O. S.; Cruz, D. S. G.; Pires, I. H.; Guedes, R. M. C.; Lobato, F. C. F.
Anexo 9.1.2

Resumo

A infecção por *Clostridioides (Clostridium) difficile* (ICD) é uma importante causa de infecção nosocomial em humanos e de diarreia neonatal em suínos. A falta de uma medida preventiva eficaz é um grande desafio atual para o controle da doença em humanos e animais. Uma estratégia preventiva que tem demonstrado resultados promissores é a administração oral de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD), que conferem proteção contra estirpes toxigênicas provavelmente pelo mecanismo de exclusão competitiva. Recentemente, a Z31, uma estirpe NTCD isolada de um cão saudável, mostrou resultados promissores para prevenir o ICD em hamsters. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da estirpe Z31 em prevenir a ICD em leitões utilizando um modelo experimental. Vinte leitões neonatos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: G1 (tratado) – 1×10^6 esporos de Z31 seguidos por 1×10^7 esporos de uma estirpe toxigênica de *C. difficile* ($n = 7$), G2 (controle positivo) – 1×10^7 esporos de uma estirpe toxigênica de *C. difficile* ($n = 7$) e G3 (controle negativo) - sem inóculo biológico ($n = 6$). Todos os animais foram mantidos em isoladores individuais e observados por 60 horas. Dados referentes a sinais clínicos, lesões macro e microscópicas, cultura toxigênica de *C. difficile* e detecção de toxinas A/B nas fezes foram avaliados. Todos os parâmetros avaliados foram significativamente menores nos animais que receberam a Z31 em comparação ao controle positivo. Dessa forma, conclui-se que a administração oral de Z31 foi capaz de prevenir a ICD em leitões em um modelo experimental.

Palavras-chave: diarreia neonatal, *Clostridium difficile*, probiótico

4.1. Introdução

Clostridioides (anteriormente *Clostridium*) *difficile* é o principal agente infeccioso responsável por diarreia nosocomial associada a antibióticos em humanos (Curry, 2017). Em animais, *C. difficile* é reconhecido como enteropatógeno de diversas espécies, incluindo suínos, em que é conhecido como uma importante causa de diarreia neonatal em todo o mundo (Songer and Anderson, 2006; Cruz Junior *et al.*, 2013). Além disso, estudos recentes mostraram semelhanças substanciais entre isolados de *C. difficile* humano e suíno, sugerindo possível transmissão zoonótica e tornando a prevenção desta doença em animais uma prioridade (Hensgens *et al.*, 2012; Squire and Riley, 2013).

Apesar da importância de *C. difficile* como enteropatógeno suíno e do seu possível caráter zoonótico, o controle da infecção por *C. difficile* (ICD) em suinocultura baseia-se principalmente

em medidas de biossegurança e manejo geral (Alvarez-Perez *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2013a; Moono *et al.*, 2016). Para mudar esse cenário, estudos têm focado em possíveis estratégias preventivas, incluindo anticorpos monoclonais, vacinas e probióticos (Steele *et al.*, 2013; Arruda *et al.*, 2016; Kociolek and Gerding, 2016; Bruxelle *et al.*, 2018). No entanto, ainda não há um método comercial específico para a prevenção da ICD em suínos. Entre as estratégias estudadas, a administração de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) está emergindo como um método promissor para a prevenção da colonização intestinal por estirpes toxigênicas de *C. difficile* e, conseqüentemente, da doença (Songer *et al.*, 2007; Gerding *et al.*, 2018). Nos últimos anos, a Z31, uma estirpe NTCD isolada de um cão saudável, tem sido avaliada visando à sua possível utilização como produto para prevenir a ICD em suínos. O sequenciamento completo do genoma da estirpe Z31 demonstrou que ela possui atributos genéticos para colonizar o trato gastrointestinal (Pereira *et al.*, 2016) e a sua utilização em hamsters foi eficiente para prevenir a ICD (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da estirpe Z31 em prevenir a ICD em leitões utilizando um modelo experimental suíno.

4.2. Material e métodos

Estirpes

A estirpe Z31 foi isolada de um cão saudável em Belo Horizonte (Brasil), em fevereiro de 2009 (Silva *et al.*, 2013b). Ela foi previamente classificada como ribotipo (RT) 009 e *sequence type* (ST) 3 por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Griffiths *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016). O sequenciamento completo do genoma demonstrou que a Z31 não possui os genes das toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* e *cdtB*) e alberga genes de virulência relacionados à colonização intestinal (*slpA*, *cwp84*, *groEL* e *cwp66*), formação de biofilme (*fliC* e *fliD*) e esporulação (*spo0A*, *cotA*, *cotB*, *cotC* e *cotD*) (Pereira *et al.*, 2016). Em um modelo de hamster, a Z31 preveniu a ICD em 100% dos animais expostos (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). A estirpe toxigênica usada no desafio de leitões no presente estudo, denominada 283, é positiva para *tcdA* e *tcdB*, mas negativa para genes codificadores de toxina binária (*cdtA* e *cdtB*). Esta estirpe foi isolada em 2014 de um leitão com ICD em Belo Horizonte (Brasil) e foi classificada como RT 014/020 (ST 14).

A solução de esporos de *C. difficile* foi produzida em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid, Reino Unido) de acordo com um método previamente descrito com algumas adaptações (Yang *et al.*, 2009). Resumidamente, foram realizados dois passos de pré-inoculação; cada etapa continha 10% do volume total do inóculo seguinte e foi incubada por 24 h sob condições anaeróbicas. O cultivo final foi realizado em frascos contendo 50 mL de BHI, os quais foram incubados em condições de anaerobiose por 120 h, e em seguida, em aerobiose por 120 h. Após este período, a solução foi centrifugada (3000 x G, 30 min, 4 °C) (Hettich, Alemanha), o sedimento foi diluído em solução salina (0,9%) (1:2) e o procedimento foi repetido oito vezes. A solução foi então submetida a um tratamento térmico (20 min, 70 °C) para eliminar as células vegetativas (Zidaric and Rupnik, 2016). Para a quantificação de esporos viáveis, os lotes foram homogeneizados, realizou-se diluição seriada em solução salina, plaqueamento em ágar Müeller Hinton (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue equino e 0,1% de taurocolato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) (AST), seguido de incubação sob condições de anaerobiose durante 48 h. Após determinação da concentração de esporos, as soluções foram diluídas em solução salina até alcançarem as concentrações de uso, alíquotadas e mantidas resfriadas até o momento do uso. As alíquotas foram submetidas a teste de pureza, de forma que 50 µL foram inoculados em caldo BHI e 10 µL foram plaqueados em agar Müeller Hinton (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue equino (AS), ambos foram mantidos em aerobiose, a 37 °C, por

15 dias. Em adição, 10 µL da solução foram estriados em ágar Sabouraud (Oxoid, Reino Unido) mantido em aerobiose, a 24 °C, por 15 dias. Outros 10 µL foram estriados uma placa de AS, a qual foi mantida em anaerobiose, a 37 °C. A morfologia das colônias crescidas em anaerobiose foi observada, três a cinco colônias foram coletadas e submetidas a PCR *multiplex* para *C. difficile* conforme previamente descrito (Silva *et al.*, 2011).

Animais, instalações e manejo geral

Os métodos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética institucional (CEUA-UFGM), protocolo 013/2014 (Anexo 9.4.). O modelo experimental com leitões utilizado no presente estudo foi baseado em um modelo previamente padronizado, com algumas modificações para adaptá-lo ao desenho experimental e às instalações disponíveis (Arruda *et al.*, 2013; Lizer *et al.*, 2013). Resumidamente, os leitões neonatais foram obtidos de duas porcas da granja da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, Igarapé, Brasil. As porcas foram mantidas nas gaiolas de parto e, quando os sinais de parto foram observados, os animais foram lavados com água e sabão, secos e a antissepsia da vulva e do quarto traseiro destas porcas foi realizada com uma solução de álcool iodado (1,0%) com glicerina (2,0%) a cada hora. O parto procedeu de forma natural e os leitões da ordem de nascimento dois até 11 de cada porca foram incluídos neste estudo, totalizando vinte leitões neonatos. Imediatamente após o nascimento, os leitões foram secos e os cordões umbilicais foram amarrados, cortados e tratados com solução de iodo (5,0%). Cada leitão recebeu 15 mL de um *pool* de colostro previamente coletado de porcas da mesma fazenda antes de serem separados randomicamente em três grupos diferentes: G1 (grupo tratado; n = 7), G2 (grupo controle positivo; n = 7) e G3 (grupo controle negativo; n = 6) (Figura 8).

Os leitões foram alojados individualmente em isoladores elevados (0.9 x 0.7 x 0.5 m) feitos de alumínio cobertos com uma fina tela para permitir a entrada de ar. Os isoladores foram mantidos em duas salas diferentes previamente submetidas a fumigação. A temperatura das duas salas foi mantida entre 27 e 30 °C e lâmpadas de aquecimento foram suspensas sobre os isoladores para manter a temperatura interna dos isoladores entre 31 e 35 °C (Lizer *et al.*, 2013). Para evitar a contaminação cruzada, três equipes separadas foram designadas para trabalhar em cada grupo. Todos os participantes possuíam um conjunto específico de equipamentos de proteção individual composto por macacões, aventais e botas. Os leitões foram manuseados um a um com um par de luvas de procedimento descartáveis para cada animal. Cada grupo tinha um conjunto de instrumentos específicos, esterilizados por calor úmido ou desinfetados em clorexidina 2%. Durante o experimento, os leitões foram alimentados cinco vezes ao dia em intervalos regulares com 40 mL de sucedâneo de leite comercial BabySuin, preparado com água esterilizada, conforme recomendações do fabricante (NutriSuin, Holanda). Água esterilizada foi fornecida à vontade durante o experimento.

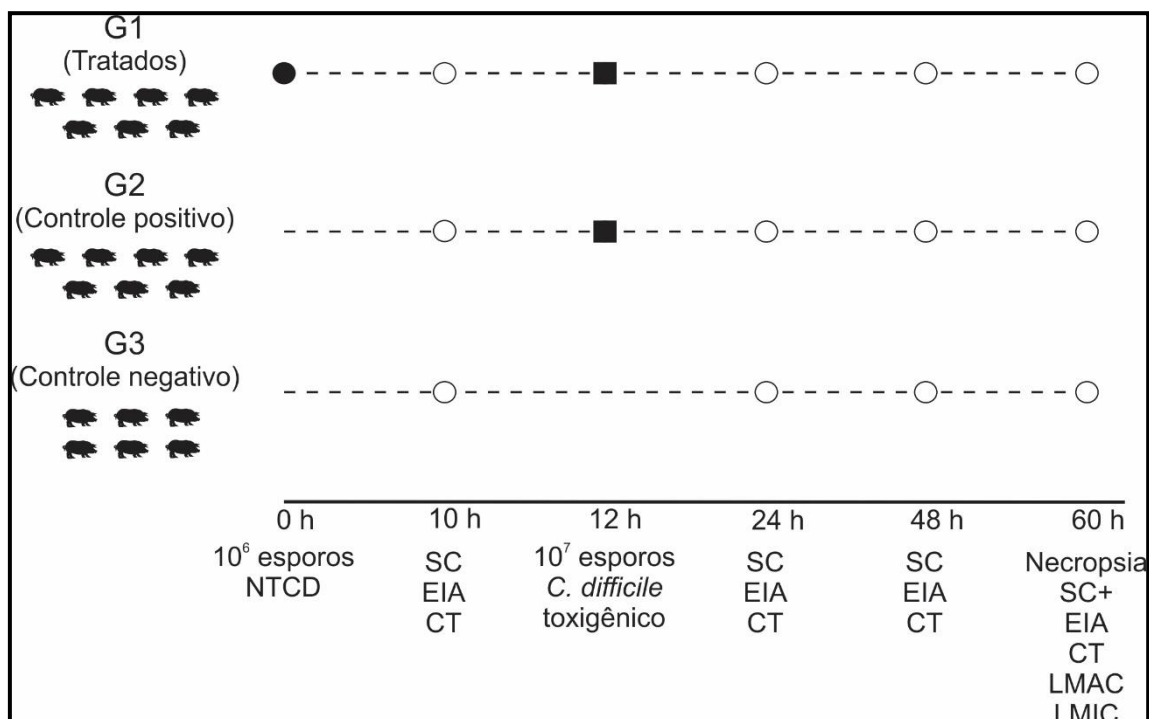


Figura 8. Desenho experimental utilizado para avaliar o efeito protetor da estirpe não toxigênica de *C. difficile* (NTCD) Z31 contra o desafio com uma estirpe toxigênica de *C. difficile* em leitões neonatos. SC: sinais clínicos, incluindo estado de hidratação e consistência das fezes; SC+: sinais clínicos, incluindo estado de hidratação, consistência de fezes, condição corporal e presença de fezes no períneo; EIA: ensaio imunoenzimático para detecção de toxinas A/B; LMAC: lesões macroscópicas, incluindo edema de mesocólon e necrose luminal; LMIC: lesões microscópicas; NTCD: estirpe não toxigênica de *C. difficile*; CT: cultura toxigênica de *C. difficile*; círculo preto: inóculo de NTCD; círculos brancos: avaliações; quadrados pretos: desafio com a estirpe toxigênica de *C. difficile*.

Desenho experimental e inoculações

Imediatamente após a administração do colostro, os animais do grupo G1 receberam 1,0 mL de uma solução contendo 1×10^6 esporos da estirpe Z31 por via oral, com o auxílio de uma seringa estéril. Doze horas após o nascimento, os animais dos grupos G1 e G2 receberam 1,0 mL de uma solução contendo 1×10^7 esporos da estirpe toxigênica (desafio) por via oral, utilizando uma seringa estéril. Animais não tratados ou não desafiados receberam 1,0 mL de solução salina esterilizada (0,9%) por via oral nos momentos em que os demais estavam sendo inoculados (Figura 8).

Avaliação clínica, necropsia e coleta de amostras

Uma avaliação clínica considerando o estado de hidratação e a consistência fecal dos animais foi realizada em quatro momentos: 10, 24, 48 e 60 h após o nascimento (Figura 8). Às 60 h, a condição corporal e a presença de fezes no períneo também foram incluídas na avaliação clínica de acordo com estudos previamente descritos (Yaeger *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2013). Após a

última avaliação, às 60 h, todos os animais foram eutanasiados por dessensibilização elétrica seguida de exsanguinação. Durante a necropsia, os leitões foram avaliados quanto à ocorrência de edema de mesocólon e necrose luminal do cólon, que são as principais alterações macroscópicas em leitões com ICD (Yaeger *et al.*, 2007; Lizer *et al.*, 2013). Amostras fecais foram coletadas de todos os animais às 10, 24, 48 e 60 h após o nascimento. Além disso, durante a avaliação *post-mortem*, cinco amostras do cólon foram coletadas de cada animal para análise histopatológica por um patologista veterinário experiente em avaliação *blinded*.

Cultura bacteriana e detecção das toxinas A/B

As amostras de fezes foram submetidas ao isolamento de *C. difficile* de acordo com o descrito previamente (Silva *et al.*, 2013c). Resumidamente, volumes iguais de amostras fecais e álcool etílico 96% (v/v) foram misturados e, após incubação por 30 min a 37 °C, alíquotas de 10 µl foram estriadas em placas contendo agar cicloserina, cefoxitina, frutose (CCFA) (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 7% de sangue de equino e 0,1% de taurocolato de sódio (CCFAT). Após incubação em anaerobiose, a 37 °C por 72 h, todas as colônias com morfologia sugestiva foram submetidas previamente a PCR *multiplex* para o agente contendo um gene constitutivo (*tpi*) e genes das toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *cdtB*) (Silva *et al.*, 2011). Os isolados considerados NTCD foram submetidos à ribotipagem por PCR de acordo com o método descrito por Janezic & Rupnik (2010). Para a detecção das toxinas A/B, as amostras fecais foram submetidas a um teste de ensaio imunoenzimático comercial (EIA) (*C. difficile* Tox A/B II; Techlab Inc., EUA) utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Escore

Cinco parâmetros foram avaliados em escores para a comparação dos grupos de tratamento no presente estudo: 1) sinais clínicos, 2) lesões macroscópicas 3) lesões microscópicas, 4) cultura toxigênica de *C. difficile* e 5) detecção de toxinas A/B. Os escores dos sinais clínicos foram obtidos pela avaliação da hidratação (normal, leve, moderada ou grave) e consistência fecal (normal, pastosa ou aquosa) às 10, 24, 48 e 60 h após o nascimento. Às 60 h, a condição corporal (normal, emaciação leve, emaciação moderada, emaciação severa) e a presença de fezes no períneo (ausência, leve, moderada, intensa) também foram incluídas na análise dos sinais clínicos (Arruda *et al.*, 2013). As lesões macroscópicas avaliadas foram o edema de mesocólon, que foi determinado pela distância entre alças (ausente, leve, moderada ou grave) e necrose luminal visível (ausente, leve, moderada ou grave) (Yaeger *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2013). Para as lesões microscópicas foram avaliados a perda de células caliciformes, infiltrado de neutrófilos na lâmina própria e alterações epiteliais da mucosa do cólon com descrito por Lizer *et al.* (2013). Além disso, o edema de mesocólon e o edema submucoso foram classificados por microscopia de acordo com sua intensidade (ausente, discreto, leve, moderado ou grave). A cultura toxigênica e os resultados de detecção de toxinas A / B foram considerados dicotômicos, com resultados positivos e negativos em cada momento do estudo.

Todos os parâmetros foram avaliados 60 h após o nascimento. Os parâmetros 1, 4 e 5 também foram avaliados em 10, 24 e 48 h. Os escores para avaliação após o desafio foram obtidos da seguinte forma: 1) soma dos escores das características avaliadas em 24, 48 e 60 h; 4) soma dos resultados referentes a detecção de isolados toxigênicos de *C. difficile* em cada animal às 24, 48 e 60 horas, considerando 1 quando houve isolamento e 0 para quando não houve isolamento; 5) soma dos resultados de detecção de toxina A/B de cada animal realizados às 24, 48 e 60 horas, considerando 1 para amostras fecais onde a toxina foi encontrada e 0 para resultados negativos.

Análises estatísticas

Os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para analisar os escores dos sinais clínicos, lesões macroscópicas, lesões microscópicas, cultura toxigênica e detecção de toxinas A/B por EIA. Os resultados do EIA e a detecção de *C. difficile* toxigênico em cada momento foram analisados pelo teste exato de Fisher. Correlações entre sinais clínicos, lesões macroscópicas, lesões microscópicas, cultura toxigênica e resultados de detecção de toxinas A/B foram avaliados pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os testes foram realizados no GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA). Comparações entre G2 e G3 foram utilizadas para avaliar a eficiência do modelo experimental em reproduzir a doença, enquanto comparações entre G1 e os demais grupos foram realizadas para avaliar a eficácia da estirpe Z31 na prevenção da ICD.

4.3. Resultados

Sinais Clínicos

Antes do desafio com a estirpe toxigênica de *C. difficile* (10 h), todos os animais estavam hidratados e quase todos apresentavam consistência fecal normal, sem diferenças estatísticas entre os grupos. Às 24 e 48 h após o nascimento, todos os animais do G2 (controle positivo) apresentavam diarreia com consistência fecal variando de pastosa a aquosa. Cinco dos sete animais também se apresentaram levemente desidratados, enquanto os animais do G1 (tratado) e do G3 (controle negativo) apresentaram fezes de normais a pastosas e não apresentavam sinais de desidratação. Leitões do G2 apresentaram maiores escores de sinais clínicos que animais de G1 e G3 às 24 h ($P = 0,028$, G1; $P = 0,009$, G3) e 48 h ($P = 0,041$, G1; $P = 0,009$, G3). Por outro lado, esses escores foram semelhantes entre animais de G1 e G3 em ambos os momentos ($P = 0,825$, 24 h; $P = 0,592$, 48 h).

No momento 60 h, os escores de todos os parâmetros avaliados foram maiores nos animais do G2 em relação a G1 e G3; entretanto, diferenças estatísticas foram encontradas apenas entre G2 e G3 ($P = 0,032$). Considerando os resultados após o desafio (somatório dos escores de 24, 48 e 60 h), os animais do G2 apresentaram mais sinais clínicos em comparação aos demais grupos ($P = 0,005$, G1; $P = 0,006$, G3), enquanto G1 e G3 não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($P = 0,999$) (Figura 9).

Alterações patológicas

Foi observado edema de mesocólon em um animal do G1 e em cinco animais do G2 durante a necropsia, variando de leve a moderado (Figura 10). Embora o edema de mesocólon tenha sido encontrado em um animal do G1, esse grupo diferiu do G2 ($P = 0,037$), mas foi semelhante ao G3 ($P = 0,998$) (Figura 11A). Necrose luminal visível não foi encontrada em nenhum animal.

Na análise histopatológica, cinco animais apresentaram edema de mesocólon em pelo menos um fragmento do cólon, variando de discreto a moderado (Figura 11B). Um discreto edema de submucosa também foi observado em dois dos cinco animais. Todos os animais com lesões microscópicas pertenciam ao G2, sendo mais proeminentes em comparação aos do G1 ($P = 0,021$). Não foram encontradas outras lesões histológicas indicativas da ICD, como infiltrado inflamatório neutrofílico e lesões “*volcano like*”.

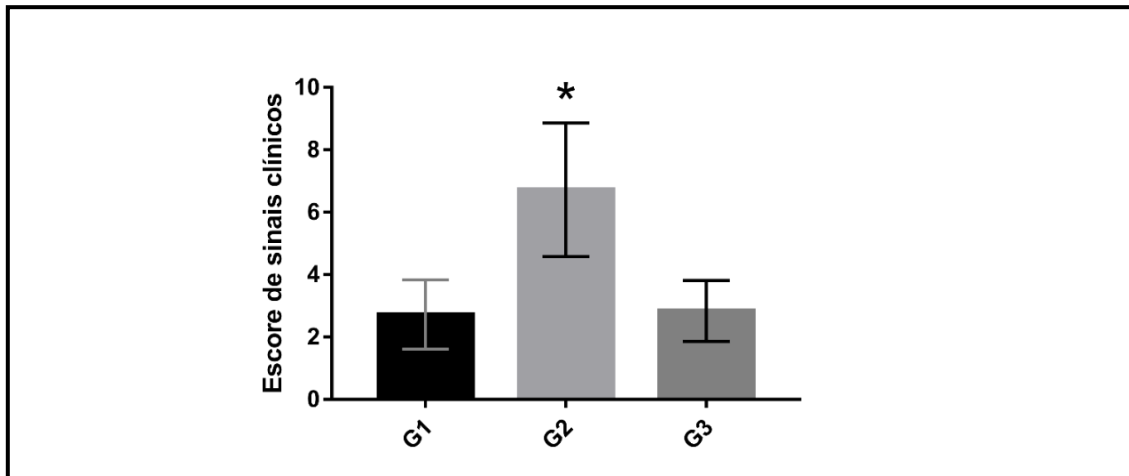


Figura 9. Escores dos sinais clínicos em leitões após o desafio (soma dos momentos 24, 48 e 60 h). Foram considerados consistência fecal, estado de hidratação, condição corporal e presença de fezes no períneo. O asterisco indica diferença estatística entre os grupos determinada pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).

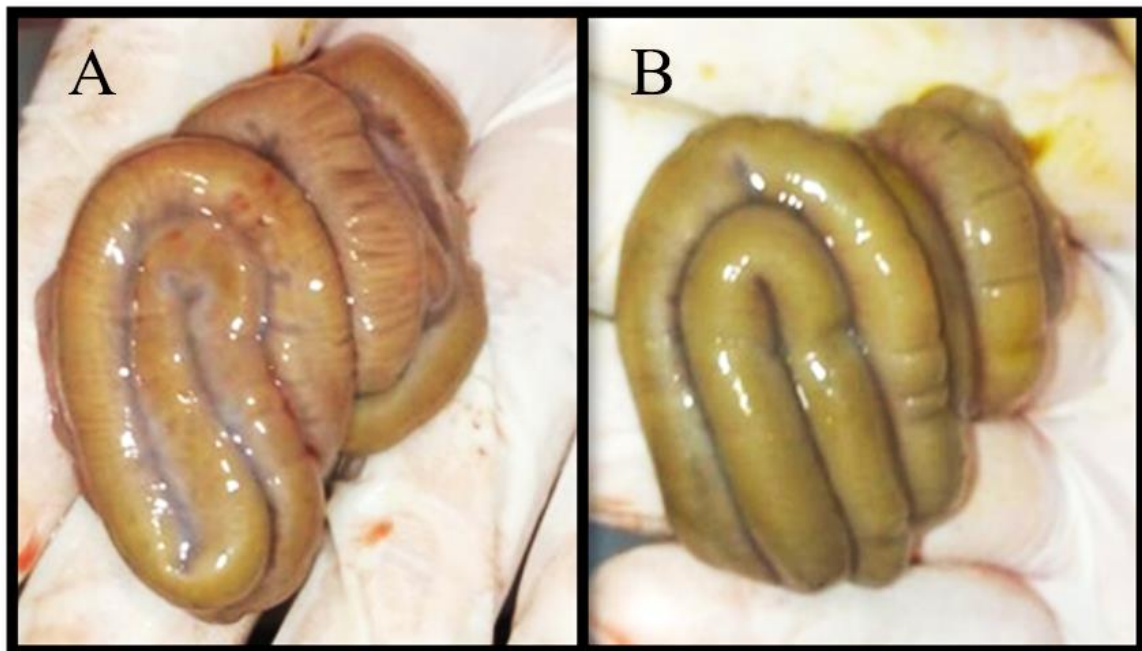


Figura 10. Mesocólon dos animais experimentais após a necropsia. Em (A) observa-se leve congestão e leve edema de mesocólon em um animal do G2. Em (B) observa-se o mesocólon de um animal do grupo G1 sem alterações aparentes.

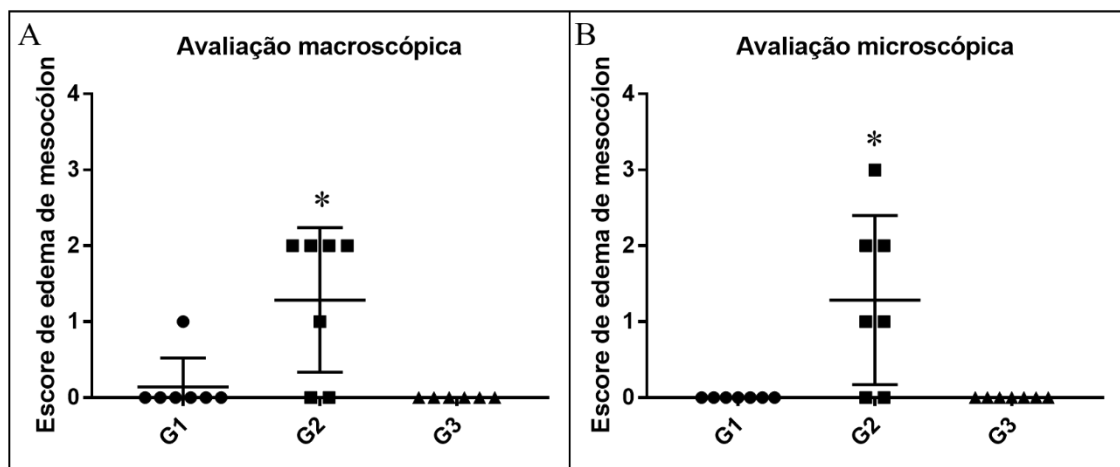


Figura 11. Escores de edema de mesocólon observados durante a necropsia (A) e através da histopatologia (B). O asterisco indica diferença estatística entre os grupos determinada pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Detecção das toxinas A/B de *C. difficile*

Antes do desafio (10 h) nenhuma amostra fecal foi positiva para toxinas de *C. difficile*. A partir do momento 24 h até o final do experimento, dez amostras foram positivas para toxinas de *C. difficile*, todas provenientes de animais do G2. As toxinas foram detectadas nas fezes de todos os animais do G2 em pelo menos um momento experimental. Foi possível identificar diferenças estatísticas entre G1 e G2 no momento 48 h ($P = 0,020$) e nos resultados após o desafio ($P = 0,001$) (tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de detecção das toxinas A/B de *C. difficile* em leitões dos grupos G1, G2 e G3 nos diferentes momentos experimentais. Letras diferentes significam diferença estatística na detecção das toxinas A/B entre os diferentes grupos experimentais no momento determinada pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Momento	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)
10 h	0,0	0,0	0,0
24 h	0,0	14,3	0,0
48 h	0,0 ^b	71,4 ^a	0,0 ^b
60 h	0,0	57,1	0,0
Após o desafio*	0,0 ^b	100,0 ^a	0,0 ^b

*Os dados dessa categoria são oriundos das observações realizadas nos momentos 24, 48 e 60 h.

Isolamento de *C. difficile*

C. difficile não toxigênico foi isolado em 16 amostras de 24 h até o final do experimento, todas do G1, as quais foram classificadas como ribotipo 009. *C. difficile* toxigênico foi isolado em 13 amostras de oito animais (G1, $n = 1$; G2, $n = 7$) de 24 h até o final do experimento. Nenhuma estirpe de *C. difficile* foi isolada do G3. A figura 12 resume os resultados da cultura de *C. difficile* no G1 e G2 de acordo com o momento experimental. Os animais do G2 foram mais propensos a

serem positivos para *C. difficile* toxigênico em 48 h (P = 0,002), 60 h (P <0,001) e após o desafio (soma de 24, 48 e 60 h) (P = 0,009).

Correlação entre os parâmetros testados

As correlações entre os parâmetros testados estão resumidas na tabela 7. Com base nos coeficientes de Spearman, a detecção de toxinas e a cultura toxigênica mostraram a melhor correlação neste estudo, enquanto as lesões macroscópicas e microscópicas também foram altamente correlacionadas. Todos os demais parâmetros avaliados também se correlacionaram positivamente (p < 0,05).

Tabela 7. Correlação entre detecção de toxinas (EIA), cultura toxigênica de *C. difficile* (CT), sinais clínicos (SC), lesões macroscópicas (LMAC) e lesões microscópicas (LMIC) observadas nos leitões. P: valor P; CS: coeficiente de Spearman.

Parâmetros	EIA		CT		SC		LMIC	
	P	CS	P	CS	P	CS	P	CS
LMAC	0.010	0.562	0.020	0.515	0.011	0.555	<0.001	0.888
LMIC	0.001	0.671	0.007	0.588	<0.001	0.746		
SC	<0.001	0.694	0.005	0.599				
CT	<0.001	0.903						

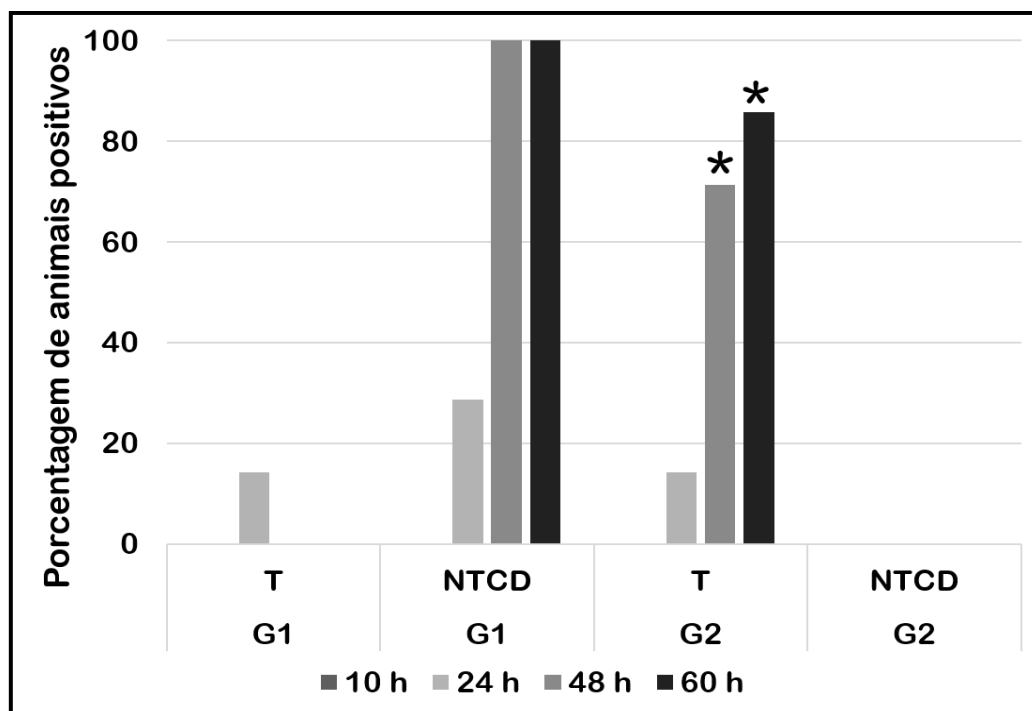


Figura 12. Detecção de isolados de *C. difficile* toxigênicos e não toxigênicos em G1 e G2 nos diferentes momentos experimentais. O asterisco indica diferença estatística entre o isolamento de estirpes toxigênicas nos grupos, determinada pelo teste exato de Fisher (p < 0,05). G1 - animais que receberam e estirpe Z31; G2 - controle positivo; T: estirpes toxigênicas de *C. difficile*; NTCD: estirpes não toxigênicas de *C. difficile*.

4.4. Discussão

C. difficile é um importante enteropatógeno em leitões neonatos e a inexistência de um método eficaz para prevenir a ICD dificulta seu controle (Cruz Junior *et al.*, 2013; Moono *et al.*, 2016). Além das perdas diretas associadas à ICD em suínos, adiciona-se a preocupação crescente com relação à transmissão zoonótica de *C. difficile* dos animais para os humanos (Hensgens *et al.*, 2012; Squire and Riley, 2013). A partir dos últimos avanços na prevenção da ICD, a administração de estirpes NTCD se destaca como um dos métodos mais promissores para a prevenção da doença e da colonização intestinal por estirpe toxigênicas (Kociolek and Gerding, 2016; Gerding *et al.*, 2018). No presente estudo, a estirpe Z31, geneticamente e fenotipicamente caracterizada e previamente testada em um modelo de hamster (Oliveira Júnior *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016), foi avaliada em um modelo experimental de leitões (Steele *et al.*, 2010; Arruda *et al.*, 2013; Lizer *et al.*, 2013).

O modelo experimental empregado utilizando leitões foi adaptado de outros estudos (Steele *et al.*, 2010; Arruda *et al.*, 2013; Lizer *et al.*, 2013). Apesar de alguns leitões do grupo controle negativo (G3) apresentarem alguns dos sinais clínicos avaliados, os escores clínicos permaneceram estatisticamente inferiores aos do controle positivo (G2) em todos os momentos mensurados. Além disso, todos os animais do G3 foram negativos para edema de mesocólon, detecção de toxinas A/B e isolamento de *C. difficile* toxigênico e não toxigênico, demonstrando ausência de contaminação cruzada. Curiosamente, em estudos anteriores, leitões de grupos controle negativo foram eventualmente positivos para toxinas A/B e mostraram algumas lesões características da ICD, fato que foi atribuído à contaminação cruzada entre grupos durante o experimento ou a infecções prévias por *C. difficile* nas granjas de origem (Arruda *et al.*, 2013; Lizer *et al.*, 2013). No presente estudo, os grupos controle foram mantidos em salas separadas, semelhante ao relatado por Arruda *et al.* (2013). Além disso, equipes e equipamentos separados foram designados para esses animais, medidas que auxiliaram a evitar a contaminação cruzada. Também deve ser destacado que os leitões foram obtidos a partir de uma granja que não possuía histórico de ICD. A obtenção de leitões livres de *C. difficile* é uma limitação deste modelo, uma vez que a prevalência da doença entre as granjas é alta e a realização de procedimentos cirúrgicos a exemplo da cesariana para evitar a contaminação prévia leitões, como utilizado por Lizer *et al.* (2013), nem sempre são possíveis.

A dose de Z31 utilizada (1×10^6 esporos por animal) bem como a via de administração oral foram baseados em estudos publicados anteriormente (Songer *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2016; Oliveira Júnior *et al.*, 2016) e estão de acordo com a dose sugerida por Gerding (2003), que varia entre 1×10^4 e 1×10^8 esporos por kg. Já a dosagem da estirpe toxigênica de *C. difficile* usada no desafio (1×10^7 esporos por animal) foi baseada em estudos com suínos que induziram ICD com sucesso usando doses de desafio variando de 2×10^3 a $2,5 \times 10^9$ (Steele *et al.*, 2010; Arruda *et al.*, 2013, 2016; Lizer *et al.*, 2013). Não existem dados na literatura acerca de dose mínima infectante, mas acredita-se que dosagens maiores são capazes de induzir lesões mais severas e sinais clínicos mais acentuados de ICD (Arruda *et al.*, 2013); no entanto, devido ao uso de diferentes estirpes toxigênicas e variações no protocolo de desafio, incluindo o uso de animais gnotobióticos em alguns estudos, a comparação de dosagens entre os estudos pode não ser fidedigna. O grupo controle positivo (G2), que recebeu apenas esporos toxigênicos de *C. difficile*, apresentou escores estatisticamente maiores em todos os parâmetros avaliados quando comparado ao grupo controle negativo (G3), confirmando que a dose de desafio foi eficiente na reprodução da ICD nesses animais.

No presente estudo, os sinais clínicos associados à ICD também foram avaliados para melhor compreender a capacidade da estirpe Z31 em prevenir a doença. Conforme hipotetizado, os animais tratados apresentaram escores de sinais clínicos similares ao grupo controle negativo e menores que o grupo controle positivo, demonstrando que a administração oral da Z31 foi capaz de reduzir efetivamente os sinais clínicos da ICD em leitões. *C. difficile* é uma causa conhecida de diarreia neonatal em leitões, de forma que a redução de sinais clínicos nesses animais seria um fator importante para melhorar a saúde e a produção animal (Songer, 2004; Silva *et al.*, 2013a). Curiosamente, estudos anteriores sobre a ICD usando leitões convencionais relataram dificuldades em encontrar diferenças nos sinais clínicos entre animais infectados e não infectados, devido ao caráter subclínico da doença (Yaeger *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2013). Por outro lado, Steele *et al.* (2010) relataram o desenvolvimento de sinais clínicos severos e, por vezes, fatais em leitões gnotobióticos desafiados com uma estirpe hipervirulenta de *C. difficile* (ribotipo 027). Usando uma estirpe NTCD visando a proteção de leitões contra a ICD, Arruda *et al.* (2016) encontraram um leve decréscimo na condição de hidratação de animais não protegidos. Esse resultado também foi observado em nosso estudo; no entanto, todos os animais não tratados apresentaram condição corporal e consistência fecal alterada, diferente do que foi observado por Arruda *et al.* (2016). Há de se ressaltar que a dose de desafio utilizada no presente estudo foi cinco vezes superior que aquela utilizada por Arruda *et al.* (2016) e os animais não eram das mesmas linhagens genéticas, o que pode explicar a diferença na indução de sinais clínicos.

Além da redução dos sinais clínicos relacionados a ICD, a administração da estirpe Z31 também reduziu a ocorrência de edema de mesocólon nos leitões, semelhante aos achados de Arruda *et al.* (2016). Embora o edema de mesocólon não seja patognomônico da ICD, é a lesão macroscópica mais comum associada a essa doença em leitões (Yaeger *et al.*, 2007; Cappuccio *et al.*, 2009). Curiosamente, nenhuma outra lesão microscópica foi encontrada no presente estudo, em contraste com estudos anteriores utilizando leitões convencionais (Arruda *et al.*, 2013, 2016; Lizer *et al.*, 2013). Em um experimento anterior, Lizer *et al.*, 2013 determinaram que o melhor momento para observar as lesões microscópicas em leitões seria 48 h pós desafio, a exemplo da metodologia utilizada no presente estudo. Entretanto, no presente estudo foram observados apenas fenômenos exsudativos de líquidos, ao passo que nos demais também foram observados fenômenos exsudativos celulares, evidenciados pela presença de neutrófilos na lâmina própria (Arruda *et al.*, 2013, 2016; Lizer *et al.*, 2013). Notavelmente, nos estudos citados foi usada uma estirpe ribotipo 078, a qual produz a toxina CDT, diferentemente da estirpe usada em nosso estudo (Lizer *et al.*, 2013). O papel da toxina CDT na ICD não é completamente esclarecido, no entanto, a CDT age em sinergia com as toxinas A e B e, em humanos, os isolados *cdt+* são responsáveis por casos mais graves de ICD (Gerding *et al.*, 2014). Dessa forma, podemos hipotetizar que a toxina CDT tenha acelerado a indução das lesões nos animais utilizados nos estudos prévios. Também é possível supor que isolados *cdt+* sejam capazes de produzir lesões mais acentuadas em suínos a exemplo do que ocorre em humanos, mas até o presente momento não há estudos que confirmem tal hipótese.

As toxinas A/B de *C. difficile* não foram detectadas em nenhum leitão que recebeu a estirpe Z31. Considerando que o diagnóstico de ICD em suínos é baseado na detecção de toxinas A/B (Songer and Anderson, 2006; Knight *et al.*, 2014), o presente estudo confirma que a administração da estirpe Z31 é capaz de prevenir a ocorrência de ICD no modelo avaliado. Este resultado está de acordo com estudos anteriores que relataram que a administração de uma linhagem NTCD em leitões foi responsável por uma redução na ocorrência e/ou na gravidade da ICD (Songer *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2016).

Outra observação interessante no presente estudo foi a redução da excreção fecal de estirpes toxigênicas de *C. difficile* em todos os animais que receberam a Z31. Em adição, a estirpe Z31 foi isolada de todos os animais, sugerindo que a mesma tenha colonizado os leitões, a exemplo do que ocorreu em hamsters (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Estes achados, em consonância com estudos anteriores, sugere que a exclusão competitiva é o mecanismo mais importante envolvido na proteção conferida pelas estirpes NTCD (Songer *et al.*, 2007). Outras hipóteses para explicar a proteção conferida incluem uma possível modulação imunológica e influência nos mecanismos de *quorum-sensing* (Merrigan *et al.*, 2010; Fitzpatrick, 2013; Arruda *et al.*, 2016; Gerding *et al.*, 2018). Os resultados encontrados no presente estudo são promissores, pois, considerando a possível transmissão zoonótica de *C. difficile*, é desejável evitar não apenas a ocorrência de sinais clínicos e lesões intestinais em suínos, mas também a colonização e a eliminação fecal de estirpes toxigênicas do patógeno (Squire and Riley, 2013; Brown and Wilson, 2018).

Deve-se ressaltar que todos os parâmetros avaliados no presente estudo, nomeadamente detecção de toxinas A/B, presença de estirpes toxigênicas de *C. difficile*, sinais clínicos, lesões macroscópicas e lesões microscópicas, foram positivamente correlacionados. Em um estudo anterior, Arruda *et al.* (2016) encontraram uma correlação entre o edema de mesocólon, lesões histológicas e detecção de toxinas A/B por EIA. Estes resultados mostraram que os parâmetros variaram em conjunto, sugerindo que eles são alterados na presença da ICD, sendo adequados para avaliação da proteção conferida por uma estirpe NTCD em leitões. Entre estes parâmetros, a detecção de toxinas A/B e a cultura toxigênica podem ser avaliados em ambiente laboratorial com espécimes clínicos oriundos de animais vivos. Em adição, estudos mostraram que tanto a cultura direta quanto um algoritmo de duas etapas associando uma etapa de detecção de toxinas e a cultura toxigênica são adequados para proceder o diagnóstico laboratorial da ICD em leitões (Keessen *et al.*, 2011; Knight *et al.*, 2014). Dessa forma, a associação entre a detecção de toxinas A/B e a cultura toxigênica pode ser uma ferramenta importante para avaliar a eficácia preventiva da estirpe Z31 em granjas comerciais.

4.5. Conclusão

A administração da estirpe Z31 em modelo experimental utilizando leitões convencionais reduziu a colonização dos animais pelas estirpes toxigênicas, levando as toxinas A/B nas fezes para níveis indetectáveis. Com isso, foi observada redução nos sinais clínicos e nas lesões causadas pelo patógeno, sugerindo que a estirpe seja adequada para prevenir a ICD em granjas comerciais.

4.6. Referências Bibliográficas

ALVAREZ-PEREZ, S. *et al.* Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology*, v. 137, n. 3–4, p. 302–305, 2009.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe*, v. 22, p. 104–110, ago. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.010>>.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 57, n. 2, p. 183–8, fev. 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

BROWN, A. W. W.; WILSON, R. B. *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—a narrative review. *Gastroenterology Report*, v. 6, n. 3, p. 157–166, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/gastro/article/6/3/157/5046687>>.

BRUXELLE, J.-F.; PÉCHINÉ, S.; COLLIGNON, A. immunization strategies against *Clostridium difficile*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1050, n. 4, p. 197–225, abr. 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-72799-8_12>.

CAPPUCCIO, J. A. *et al.* Neonatal piglets mesocolon edema and colitis due to *Clostridium difficile* infection: prevalence, clinical disease and pathological studies. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 2, n. 1, p. 35–40, 2009. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-pathology/2-\(2009\)-1/neonatal-piglets-mesocolon-edema-and-colitis-due-to-Clostridium-diffic/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-pathology/2-(2009)-1/neonatal-piglets-mesocolon-edema-and-colitis-due-to-Clostridium-diffic/)>.

CRUZ JUNIOR, E. C. *et al.* A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 8, p. 963–969, ago. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000800002&lng=en&tlng=en>.

CURRY, S. R. *Clostridium difficile*. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 37, n. 2, p. 341–369, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28457354>>.

FITZPATRICK, L. R. Probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* associated disease. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, v. 4, n. 3, p. 47, 2013. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v4/i3/47.htm>>.

GERDING, D.N. 680 N. Lakeshore Dr., Chicago, IL (US) 60611. *Methods and compositions for prevention and treatment of Clostridium difficile-associated diseases*. In. Cl.⁷ US 6,635,260 B1. Oct. 21, 2003. United States Patent.

GERDING, D. N. *et al.* *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, v. 5, n. 1, p. 15–27, 31 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.26854>>.

GERDING, D. N.; SAMBOL, S. P.; JOHNSON, S. Non-toxigenic *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* for prevention of *C. difficile* infection: from bench to bedside back to bench and back to bedside. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–13, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01700/full>>.

GRIFFITHS, D. *et al.* Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 770–778, mar. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01796-09>>.

HENSGENS, M. P. M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>>.

KEESSEN, E. C. *et al.* Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1816–21, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411571>>.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 11, p. 3856–62, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122859>>.

KOCIOLEK, L. K.; GERDING, D. N. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 13, n. 3, p. 150–60, mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.220>>.

LIZER, J.; MADSON, D.; SCHWARTZ, K. Experimental infection of conventional neonatal pigs with *Clostridium difficile*: A new model. *Journal of Swine Health and Production*, v. 21, n. February, p. 22–29, 2013. Disponível em: <<http://www.aasv.org/shap/abstracts/abstract.php?v21n1p22>>.

MERRIGAN, M. *et al.* Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 19, p. 4904–11, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675495>>.

MOONO, P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in production animals and avian species: A review. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 13, n. 12, p. 647–655, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2016.2181>>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxigenic strain. *Ciência Rural*, v. 46, n. 5, p. 853–859, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000500853&lng=en&tlng=en>.

PEREIRA, F. L. *et al.* Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. *Gut Pathogens*, v. 8, n. 1, p. 11, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.gutpathogens.com/content/8/1/11>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v. 41, n. 8, p. 1430–1435, 29 jul. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000800021&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. DE C.; LOBATO, F. C. F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, p. 73–80, 22 nov. 2013a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000100013&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 133–137, 2013b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000100019&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Veterinary Journal*, v. 45, n. 6, p. 671–5, nov. 2013c. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/evj.12046>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 8, p. 1062–1065, 11 dez. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000801062&lng=en&tlng=en>.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, v. 5, n. 02, p. 321–326, 28 dez. 2004. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252304000386/type/journal_article>.

SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996405001277>>.

SONGER, J. G. *et al.* Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxic organisms. *Veterinary Microbiology*, v. 124, n. 3–4, p. 358–361, out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507001861>>.

SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 365, n. April, p. 299–314, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695920>>.

STEELE, J. *et al.* Piglet models of acute or chronic *Clostridium difficile* illness. *The Journal of infectious diseases*, v. 201, n. 3, p. 428–34, 1 fev. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/649799>>.

STEELE, J. *et al.* Antibody against TcdB, but Not TcdA, prevents development of gastrointestinal and systemic *Clostridium difficile* disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 207, n. 2, p. 323–330, 15 jan. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jis669>>.

YAEGER, M. J.; KINYON, J. M.; GLENN SONGER, J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, v. 19, n. 1, p. 52–9, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459832>>.

YANG, W.-W.; CROW-WILLARD, E. N.; PONCE, A. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 1, p. 27–33, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120612>>.

ZIDARIC, V.; RUPNIK, M. Sporulation properties and antimicrobial susceptibility in endemic and rare *Clostridium difficile* PCR ribotypes. *Anaerobe*, v. 39, p. 183–188, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.010>>.

5. CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA DE *Clostridioides (Clostridium) difficile* Z31 PARA A PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *C. difficile* (ICD) EM UMA GRANJA COMERCIAL

Trabalho publicado em

Veterinary Microbiology 231:1-6, 2019

Non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm

Oliveira Júnior, C. A.; Silva, R. O. S.; Lage, A. P.; Coura, F. M.; Ramos, C. P.; Alfieri, A. A. Guedes, R. M. C.; Lobato, F. C. F.

Anexo 9.1.3

Resumo

A diarreia neonatal suína (DNS) é atualmente um problema recorrente nas granjas de suínos, podendo ser causada por diversos enteropatógenos. Dentre eles, *Clostridioides (Clostridium) difficile* destaca-se pela sua importância em leitões e seu potencial zoonótico, entretanto, não existem métodos preventivos disponíveis no mercado. A estirpe não toxigênica de *C. difficile* (NTCD) Z31 foi previamente testada em modelos experimentais de hamster e suínos como estratégia para prevenir a infecção por *C. difficile* (ICD), demonstrando resultados promissores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da estirpe Z31 de prevenir ICD e reduzir DNS em leitões com um dia de idade em uma granja comercial. Para tal, 90 leitões de 16 leitegadas receberam 1×10^6 esporos de Z31, enquanto 84 animais das mesmas leitegadas foram usados como controles. Os animais foram mantidos sob o manejo preconizado pela granja, e tiveram amostras fecais coletadas 24 h após a administração da estirpe Z31. As amostras foram submetidas à detecção da toxina A/B, isolamento de *C. difficile*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* e detecção de Rotavírus. A administração da Z31 reduziu a incidência da ICD nos animais tratados (7,8%) quando comparado ao grupo controle (25,0%; $P = 0,003$). Nos animais que desenvolveram ICD, a intensidade da diarreia foi menor naqueles que receberam a Z31 do que no grupo controle. A DNS foi reduzida nos animais tratados quando comparados aos animais não tratados ($P < 0,001$). O presente estudo sugere que a estirpe Z31 tem potencial de ser utilizada para prevenir a ICD em leitões neonatos em granjas comerciais.

Palavras-chave: clostridiose, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, diarreia neonatal suína, probiótico.

5.1. Introdução

A diarreia neonatal suína (DNS) representa um grande desafio em granjas de suínos, causando perdas de produção significativas (Larsson *et al.*, 2016). Muitos agentes infecciosos podem ser responsáveis por esse problema como Rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Clostridium perfringens* e *Clostridioides* (prev. *Clostridium*) *difficile* (Lippke *et al.*, 2011; Cruz Junior *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013a; Malik *et al.*, 2014; Luppi, 2017). Além da importância de *C. difficile* como causa de DNS em todo o mundo, evidências do potencial zoonótico deste agente foram relatadas em anos anteriores, com alguns estudos sugerindo que os suínos são potenciais reservatórios dessa bactéria para seres humanos (Hensgens *et al.*, 2012; Keessen *et al.*, 2013; Moono *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2017; Brown and Wilson, 2018).

Apesar do conhecido impacto da infecção por *C. difficile* (ICD) em leitões, não existem produtos comerciais específicos para prevenir a doença em suínos (Mizrahi *et al.*, 2014; Moono *et al.*, 2016; Mills *et al.*, 2018). Uma alternativa promissora é o uso de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD), que demonstraram eficiência na prevenção ou redução dos sinais clínicos de ICD em roedores, leitões e também em humanos (Borriello and Barclay, 1985; Sambol *et al.*, 2002; Songer *et al.*, 2007; Villano *et al.*, 2012; Nagaro *et al.*, 2013; Gerding *et al.*, 2015, 2018; Arruda *et al.*, 2016). Embora os isolados NTCD não produzam toxinas A e B, os principais fatores de virulência responsáveis pela ICD, elas são capazes de colonizar o trato intestinal, inibindo a instalação das estirpes toxigênicas de *C. difficile* e prevenindo a ocorrência da doença (Mills *et al.*, 2018). Recentemente, utilizando uma linhagem NTCD caracterizada genotipo e fenotipicamente denominada Z31, foi possível prevenir a ICD em modelos experimentais de hamsters e leitões (Oliveira Júnior *et al.*, 2016, 2019; Pereira *et al.*, 2016). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi estudar a capacidade da estirpe Z31 de prevenir a ICD e a DNS em uma granja comercial de suínos com um histórico conhecido de DNS e ICD.

5.2. Material e métodos

Estirpes e produção de esporos

O genoma completo da estirpe Z31 está disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/302266> e algumas características fenotípicas importantes também foram descritas anteriormente (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Para produção de esporos, um protocolo previamente descrito foi utilizado com algumas modificações (Yang *et al.*, 2009). Resumidamente, *C. difficile* Z31 foi plaqueado em ágar Müeller Hinton (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue equino e 0,1% de taurocolato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) e incubado por dois dias sob anaerobiose a 37 °C. As colônias resultantes foram coletadas e diluídas em tampão salina fosfato (PBS – 1x, pH 7.4) até turbidez 1 da escala de McFarland (equivalente a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, 500 µL dessa solução foram transferidos para 4,5 mL de um caldo Infusão Cérebro Coração (BHI; Oxoid, Reino Unido) pré-reduzido e incubados em câmara de anaerobiose (Oxoid, Reino Unido) por 24 h. O volume total deste primeiro pré-inóculo foi, então, inoculado em 45 mL de BHI pré-reduzido e mantido em anaerobiose. Após 24 h, este cultivo foi reinoculado para volume final de 500 mL de BHI, permanecendo sob anaerobiose por cinco dias, seguido por um período de cinco dias em aerobiose. O caldo foi então centrifugado a $3.000 \times g$, durante 30 min, a 4 °C (Hettich, Alemanha) e os esporos foram ressuscitados em 5 mL de solução salina a 0,9%. Este passo foi repetido oito vezes e a solução foi então submetida a um tratamento térmico (20 min, 70 °C) para eliminar as células vegetativas.

A porcentagem de esporos foi avaliada pela técnica de coloração de Wirtz-Conklin (Hamouda *et al.*, 2002) e observada em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão). Foi realizada a contagem dos esporos em placas, como descrito anteriormente (Silva *et al.*, 2014). Para teste de pureza a amostra foi semeada nos seguintes meios: caldo BHI e agar Müeller Hinton suplementado com 5% de sangue equino (AS), ambos mantidos em aerobiose, a 37 °C, por 15 dias; ágar Sabouraud (Oxoid, Reino Unido), mantida em aerobiose, a 24 °C, por 15 dias; AS, mantida em anaerobiose, a 37 °C, por 15 dias. As colônias crescidas em anaerobiose foram submetidas a PCR *multiplex* para *C. difficile* conforme previamente descrito (Silva *et al.*, 2011). As soluções foram armazenadas sob refrigeração e um dia antes da administração, a solução de esporos foi diluída com solução salina a 0,9% para atingir uma concentração de 1×10^6 esporos/mL (Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

Manejo da fazenda e ocorrência prévia de infecção por *C. difficile*

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram previamente aprovados pelo comitê de ética institucional (CEUA-UFMG) sob o protocolo 013/2014. O experimento foi conduzido em uma fazenda contendo 600 matrizes, com sistema de produção de ciclo completo, com manejo tipo todos dentro – todos fora, localizada no município de Pará de Minas, Minas Gerais, Brasil. Ao nascimento, os leitões usualmente são secos com toalhas de papel, seus cordões umbilicais são cortados, o umbigo é tratado com iodo a 6,0% e os animais são cobertos com pó de Vidasec® (Bayer, São Paulo, Brasil) antes de amamentar o colostro materno. O veterinário responsável por essa fazenda descreveu uma alta ocorrência de diarreia em leitões, principalmente em animais com idade entre 1 e 3 dias, e relatou um diagnóstico anterior de ICD na propriedade há aproximadamente um ano. Em adição, o veterinário informou que utilizava uma vacina comercial em porcas gestantes contendo Rotavirus, *E. coli* (K88, K99, F41 e 987P) e *C. perfringens* tipo C para reduzir a ocorrência de diarreia neonatal conforme instruções do fabricante. Para investigar a ocorrência da ICD na granja, 49 amostras fecais de leitões de um dia de idade, provenientes de 12 leitegadas diferentes, foram coletadas aleatoriamente em três dos quatro galpões maternidade. A coleta foi realizada uma semana e um dia antes do início do experimento. Todas as amostras fecais foram classificadas como diarreicas ou não diarreicas, submetidas à detecção das toxinas A/B, isolamento de *C. difficile*, *C. perfringens* e ETEC, e detecção de Rotavirus (Figura 13).

Dias experimentais	Etapa	Número de animais	Testes laboratoriais	Dados adicionais	Observação
-7	Ocorrência prévia Amostras fecais (1 semana antes)	32	ICD (toxinas A/B) <i>C. difficile</i> <i>E. coli</i> <i>C. perfringens</i> Rotavirus	Diarreia (ausência ou presença)	Dados das 49 amostras analisados em conjunto
-1	Ocorrência prévia Amostras fecais (1 dia antes)	17	ICD (toxinas A/B) <i>C. difficile</i> <i>E. coli</i> <i>C. perfringens</i> Rotavirus	Diarreia (ausência ou presença)	
0	Administração oral de NTCD Z31 – 1×10^6 esporos/animal	90 – Tratados 84 – Controle			Tratados e controle das mesmas leitegadas
1	Ocorrência pós-administração Amostras fecais	90 – Tratados 84 – Controle	ICD (toxinas A/B) <i>C. difficile</i> <i>E. coli</i> <i>C. perfringens</i> Rotavirus	Diarreia (escores)	

Figura 13. Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados na granja antes e após a administração da estirpe não toxigênica de *Clostridioides difficile* Z31 nos leitões neonatos.

Detecção de toxinas A/B e isolamento de *C. difficile*

Um teste de ensaio imunoenzimático comercial (*C. difficile* Tox A/B II, Techlab Inc, EUA) foi usado para detectar as toxinas A/B nas amostras de fezes. A presença das toxinas A/B foi usada para determinar a ocorrência de ICD. Para o isolamento de *C. difficile*, as fezes foram diluídas em

volumes iguais de álcool etílico (96%), mantidas a 37 °C por 30 min e depois plaqueadas em Agar de Frutose Cefoxitina Cicloserina (CCFA, Himedia) suplementado com sangue equino a 7% e 0,1% taurocolato de sódio (CCFAT). Após incubação sob condições de anaerobiose (37 °C por 72 h), três colônias irregulares e acinzentadas de cada placa foram submetidas à extração térmica de DNA (98 °C por 20 min) e a um protocolo de PCR *multiplex* para detectar o gene constitutivo *tpi* e os genes da toxina *tcdA*, *tcdB* e *cdtB* (Silva *et al.*, 2011). Uma estirpe toxigênica por leitegada também foi submetida à tipificação por meio da técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST), como relatado anteriormente (Griffiths *et al.*, 2010). Em adição, as estirpes não toxigênicas de *C. difficile* foram submetidas à ribotipagem como previamente descrito (Janezic and Rupnik, 2010).

Isolamento de *C. perfringens* e *E. coli*, e detecção de Rotavírus

Para o cultivo de *C. perfringens*, as fezes foram plaqueadas em ágar Sulfito de Polimixina Sulfadiazina (SPS; Difco, EUA) e incubadas sob condições anaeróbias (37 °C por 24 h). Três colônias arredondadas sulfito redutoras de cada placa foram submetidas à PCR (Keyburn *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013b). Para a identificação de *E. coli*, as amostras fecais foram plaqueadas em ágar MacConkey (Prodimol Biotechnology, Brasil) e incubadas a 37 °C por 24 h sob condições aeróbias. Três colônias fermentadoras de lactose foram coletadas e submetidas a testes bioquímicos empregando o teste de identificação *EPM-MILI-Simmons Citrato Enterobacteriaceae* (Starr, 1986). A seguir, isolados confirmados como *E. coli* foram submetidos a uma PCR previamente descrita para investigar os fatores de virulência de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) associados à DNS, ou seja, as adesinas fimbriais F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 e as toxinas STaP, STb e LT (Macêdo *et al.*, 2007). As estirpes foram classificadas como ETEC se identificado pelo menos um gene codificador de toxina, independentemente da presença de genes fimbriais (Dubreuil *et al.*, 2016). A presença de Rotavírus A, B e C foi testada usando um método de PCR em tempo real relatado anteriormente (Almeida *et al.*, 2018).

Desenho experimental

Após a confirmação de ICD na fazenda, 16 leitegadas de três salas de maternidade diferentes e individualizadas (S1, S2, S3) foram utilizadas para avaliar a capacidade da estirpe Z31 de prevenir a ICD em leitões neonatos. Na granja (somatória dos animais das três salas de maternidade), um total de 90 leitões recebeu a estirpe Z31, enquanto 84 animais foram utilizados como controle (Tabela 8).

Tabela 8. Desenho experimental utilizado para avaliação da estirpe não toxigênica de *C. difficile* (isolado Z31, ST 3, ribotipo 009) contra a infecção natural por *C. difficile* (ICD) em leitões localizados em três salas de maternidade (S1, S2 e S3) em uma granja comercial com diagnóstico prévio de ICD.

Grupos	S1		S2		S3		Granja ²	
	Leitões	Porcas ¹	Leitões	Porcas ¹	Leitões	Porcas ¹	Leitões	Porcas ¹
Tratados*	30	5	30	5	30	6	90	16
Controle	24		32		28		84	
Total	54		62		58		174	

*Os animais receberam por via oral 1×10^6 esporos da estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31

¹ As porcas não receberam inóculos. Os leitões de ordem de nascimento ímpar (1, 3, etc.) foram tratados, enquanto os de ordem de nascimento par (2, 4, etc.) não receberam o inóculo e foram utilizados como controle. Todos animais permaneceram nas leitegadas originais após o tratamento.

² Somatório dos animais das salas de maternidade S1, S2 e S3.

Depois da execução de todos os procedimentos normais de nascimento (anteriormente descritos) e antes da sucção do colostro, metade dos leitões recém-nascidos de cada leitegada foi inoculada por via oral com 1,0 mL de uma solução contendo 1×10^6 esporos da estirpe Z31, usando uma seringa descartável. Para cada porca, leitões de ordem de nascimento ímpar (1, 3, 5, e assim por diante) receberam a estirpe Z31, enquanto leitões de ordem de nascimento par não receberam a estirpe e foram usados como grupo controle. Este protocolo de inoculação da estirpe Z31 de forma alternada foi escolhido para reduzir o possível efeito da porca ou do ambiente na ocorrência de ICD. Os animais foram mantidos nas leitegadas de origem, não sendo necessárias alterações no manejo da granja. A quantidade de esporos administrada foi a mesma utilizada nos leitões em modelo experimental anterior (Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

Vinte e quatro horas após o procedimento, amostras fecais de todos os animais foram coletadas por estimulação retal e classificadas quanto ao aspecto (0 - normal, 1 - amolecido, 2 - pastoso, 3 - aquoso). Todas as amostras foram submetidas à detecção de toxinas A/B, isolamento de *C. difficile*, *C. perfringens* e *E. coli*, e detecção de Rotavírus como descrito anteriormente (Figura 13).

Análises estatísticas

O teste Mann-Whitney foi usado para analisar dados envolvendo escores de diarreia. A ocorrência de patógenos em ambos os grupos e a associação entre a presença dos patógenos e a diarreia foram analisadas pelo teste exato de Fisher. A correlação entre a detecção de toxinas A/B e a cultura toxigênica de *C. difficile* foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os testes foram realizados utilizando o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA) com um nível de significância de 0,05.

5.3. Resultados

Produção de esporos

A produção total de esporos de Z31 em cada frasco de 500 mL variou de $8,2 \times 10^7$ a $5,9 \times 10^8$, com um valor médio de $1,3 \times 10^8$ esporos e uma concentração média de $2,6 \times 10^5$ esporos/mL. A porcentagem de esporos variou de 80 a 90% usando a técnica de coloração Wirtz-Conklin e mais de 95% por contagem bacteriana em AST.

Ocorrência prévia de ICD e DNS na fazenda

As amostras fecais coletadas antes do experimento revelaram que 83,7% dos animais apresentavam diarreia e três potenciais enteropatógenos foram encontrados, nomeadamente *C. difficile*, *C. perfringens* tipo A β 2-positivo e ETEC. Rotavírus não foi detectado em nenhum animal. As toxinas A/B de *C. difficile* foram encontrados nas fezes de 59,2% dos animais, 93,1% dos quais também foram positivos para estirpes toxigênicas de *C. difficile*. Tanto a detecção das toxinas A/B quanto a cultura toxigênica de *C. difficile* foram associadas à diarreia ($P = 0,004$). Nenhuma estirpe NTCO foi isolada na avaliação prévia. *C. perfringens* tipo A e ETEC foram encontrados nas fezes de 22,4% e 18,4% dos animais amostrados respectivamente; no entanto, não foi encontrada associação estatística entre estes patógenos e a ocorrência de diarreia nesse momento ($P = 0,999$).

Ocorrência de ICD e DNS após a administração da estirpe Z31

Nas amostras fecais coletadas um dia após a administração da Z31, 56,3% dos animais apresentavam algum nível de DNS, com uma ocorrência de 46,6% no grupo tratado contra 66,6% no grupo controle (P = 0,009). A ocorrência de diarreia encontrada em ambos os grupos neste momento (dia 1) foi menor do que a ocorrência prévia, mensurada antes da administração da Z31 ($p < 0,05$). Além disso, os escores de diarreia nos animais controle foram maiores que nos animais tratados (Figura 14).

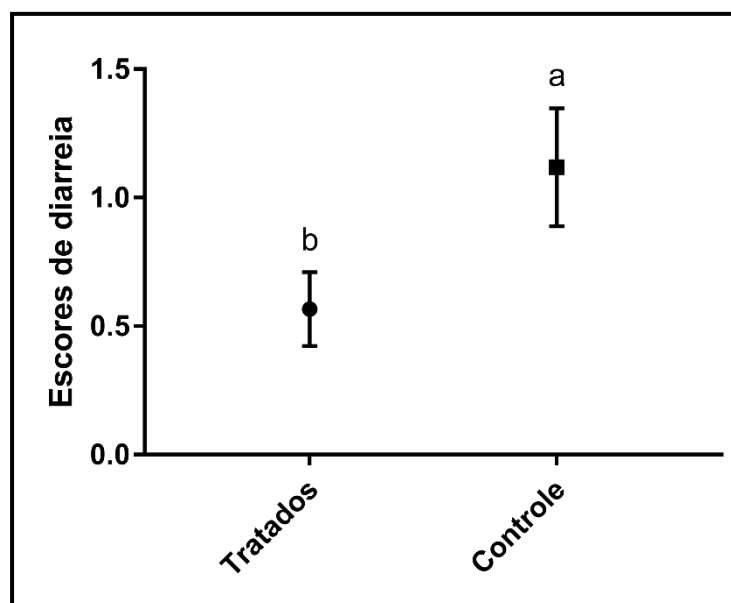


Figura 14. Escores de diarreia em leitões do grupo tratado com a estirpe não toxigênica de *Clostridioides difficile* Z31 e do grupo controle. Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os enteropatógenos *C. difficile*, *C. perfringens* tipo A β 2-positivo e ETEC foram novamente encontrados um dia após a administração da estirpe Z31. A tabela 9 sumariza a taxa de isolamento dos enteropatógenos em cada uma das salas de maternidade e na granja como um todo 24 h após a administração da estirpe Z31.

Tabela 9. Taxa de isolamento de *C. difficile* toxigênico (CD), *Clostridium perfringens* tipo A β 2-positivo (CP) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (EC) em animais tratados com a estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31 e animais controle de três salas de maternidade diferentes (S1, S2 e S3) em uma granja de suínos. Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças estatísticas entre as taxas de isolamento nos animais tratados e controle pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Grupo	S1 (%)			S2 (%)			S3 (%)			Granja (%)		
	CD	CP	EC	CD	CP	EC	CD	CP	EC	CD	CP	EC
Tratados	20.0 ^b	30.0	0.0	3.3	10.0	10.0	0.0 ^b	10.0 ^b	20.0	7.8 ^b	16.7 ^b	10.0
Controle	54.2 ^a	16.7	12.5	18.8	31.3	9.4	17.9 ^a	42.9 ^a	14.3	28.6 ^a	31.0 ^a	11.9
Total	35.2	24.1	5.6	11.3	21.0	9.7	8.6	25.9	17.2	17.8	23.6	10.9

Os maiores escores de diarreia foram encontrados em animais com ICD e, curiosamente, animais positivos para ETEC e *C. perfringens* tipo A tiveram escores de diarreia menores que animais com ICD, porém maiores que animais nos quais não foi isolado nenhum patógeno ($p < 0,05$; Figura 15).

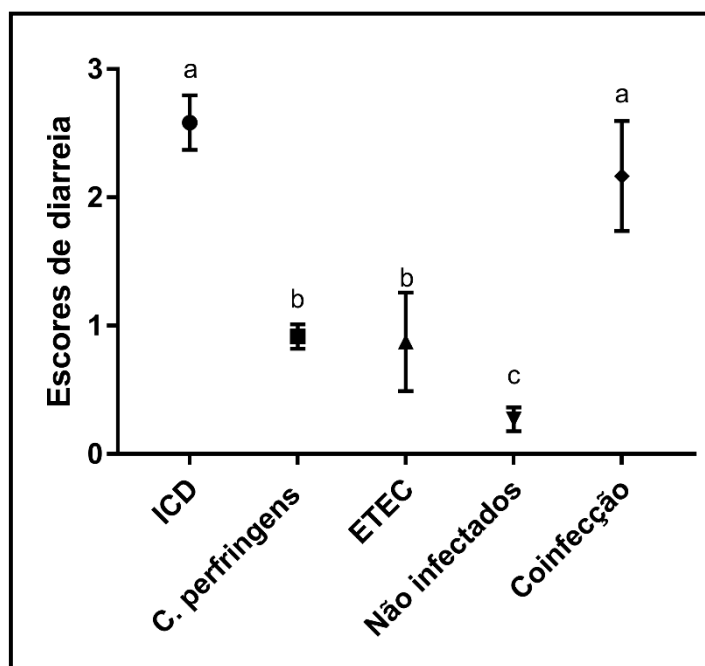


Figura 15. Escores de diarreia em leitões com um dia de idade de acordo com o agente infeccioso. ICD: infecção por *Clostridium difficile*; ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica. Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os resultados da ICD de cada uma das salas de maternidade (S1, S2 e S3) e da granja como um todo após a administração da estirpe Z31, estão resumidos na tabela 10. A ocorrência da ICD nos animais tratados foi de 7,8% versus 25,0% no grupo controle ($P = 0,003$). Os resultados de ambos os grupos são significativamente menores do que a incidência anterior ($p < 0,05$).

Tabela 10. Ocorrência da infecção por *C. difficile* (ICD) determinada pela detecção de toxinas A/B em fezes de leitões tratados com a estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31 e animais controle alocados em três diferentes galpões maternidade (S1, S2 e S3) em uma granja de suínos. Letras diferentes em colunas significam diferenças estatísticas entre o grupo tratado e o grupo controle pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Grupos	S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	Granja (%)
Tratado	23.3 ^b	0.0	0.0 ^b	7.8 ^b
Controle	54.2 ^a	12.5	14.3 ^a	25.0 ^a
Total	37.0	6.5	6.9	16.1

Considerando os galpões individualmente, houve redução significativa da ICD nos animais que receberam a estirpe Z31 em S1 ($P = 0,026$) e S3 ($P = 0,048$). Além disso, a administração da estirpe Z31 foi capaz de prevenir a doença em todos os animais em S2 e S3, nas quais a ocorrência no grupo controle foi inferior a 15,0%. Em S1, as fezes coletadas de alguns animais tratados foram positivas para as toxinas A/B, entretanto, além da ocorrência ter sido significativamente reduzida, a diarreia foi mais leve quando comparada ao grupo controle correspondente (Figura 16).

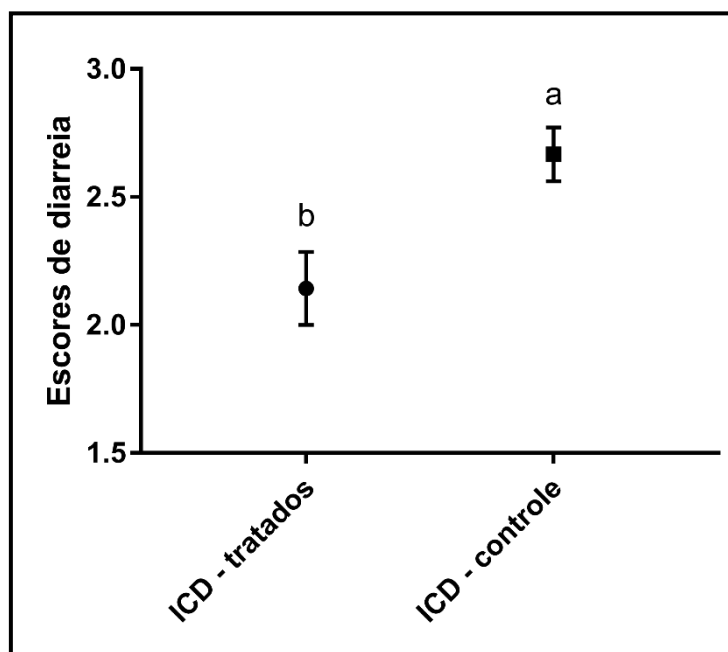


Figura 16. Escores de diarreia em leitões dos grupos tratados e controle que desenvolveram infecção por *C. difficile* (ICD). Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os dados microbiológicos após a administração da estirpe Z31 são mostrados na tabela 9. Todos os isolados toxigênicos de *C. difficile* foram considerados *sequence type* (ST) 11 e uma redução foi observada na disseminação fecal de *C. difficile* toxigênico no grupo tratado ($P = 0,003$), especialmente em S1 e S3. Notavelmente, uma correlação positiva entre a detecção de toxinas A/B e cultura toxigênica foi encontrada (Spearman $\rho = 0,859$, $P < 0,001$).

A estirpe Z31 foi isolada em 73,3% dos animais tratados e em 20,2% dos animais controle ($P < 0,001$) e todas as estirpes ribotipadas foram consideradas ribotipo (RT) 009. Tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, o escore de diarreia dos animais em que foi detectada eliminação fecal da estirpe Z31 foi estatisticamente inferior quando comparado aos animais negativos para a estirpe Z31, como pode ser observado na figura 17.

A ocorrência de *C. perfringens* tipo A $\beta 2$ -positivo (23,6%) e ETEC (10,9%), após a administração de Z31, foi semelhante à ocorrência calculada antes da administração de Z31. Por outro lado, a ocorrência de *C. perfringens* tipo A $\beta 2$ -positivo foi maior no grupo controle quando comparado aos animais tratados ($P = 0,032$; tabela 9). A coinfeção de dois ou mais patógenos foi encontrada

em seis casos (Tabela 11). Os escores de diarreia nesses animais foram semelhantes àqueles com ICD e *C. difficile* toxigênico esteve presente em cinco dos seis casos.

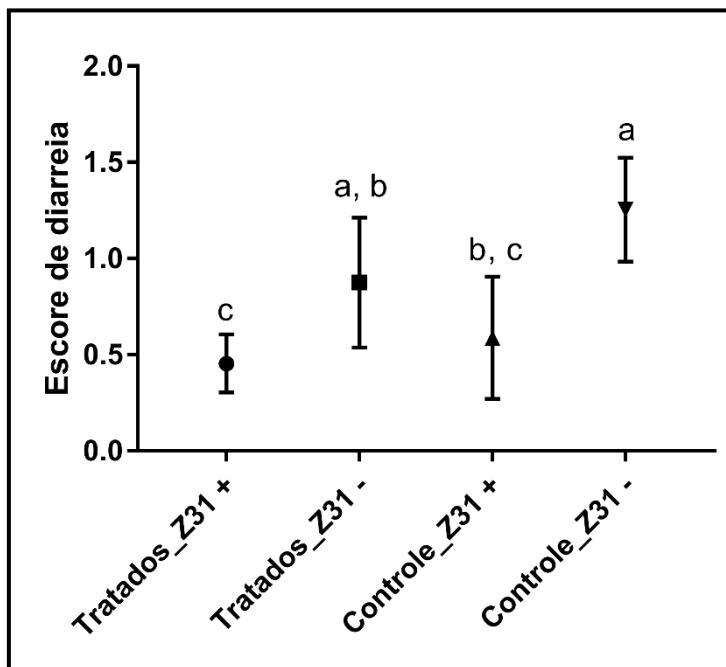


Figura 17. Escores de diarreia em leitões dos grupos tratado e controle de acordo com o isolamento fecal da estirpe Z31. Letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Tabela 11. Coinfecções e escore de diarreia em leitões de um dia de vida do grupo tratado com a estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31 e do grupo controle nas três salas de maternidade diferentes (S1, S2 e S3) em uma granja de suínos.

Galpão	Grupo	Toxinas A/B	<i>C. difficile</i> toxigênico	<i>E. coli</i> enterotoxigênica	<i>C. perfringens</i> tipo A $\beta 2 +$	Escore de diarreia
S1	Tratado	+	+	-	+	2
S1	Controle	+	+	+	-	3
S3	Controle	+	+	+	+	2
S3	Controle	+	+	-	+	2
S3	Controle	-	-	+	+	2
S3	Controle	+	+	+	+	2

5.4. Discussão

Produção de esporos

Em um estudo anterior, a dosagem de 1×10^6 esporos por animal foi utilizada com sucesso para prevenir a ICD em modelo experimental utilizando leitões (Oliveira Júnior *et al.*, 2019) e, portanto, foi definida como a dose a ser utilizada no presente estudo. Assim, o número de esporos produzidos em cada frasco de cultura de 500 mL neste estudo seria suficiente para ser utilizado

em 100 leitões neonatos (Oliveira Júnior *et al.*, 2018). As técnicas usadas para estimar a porcentagem de esporos exibiram resultados diferentes, muito provavelmente devido ao fato da técnica de Wirtz-Conklin ser mais subjetiva e ser da possibilidade de corar de alguns bastonetes não viáveis (Hamouda *et al.*, 2002). No entanto, os percentuais de esporos acima de 90%, encontrados na contagem bacteriana, foram semelhantes aos estudos anteriores com a Z31, revelando sua boa capacidade de esporulação sem etapas adicionais (Oliveira Júnior *et al.*, 2016, 2019). A alta produção de esporos é uma característica altamente desejável caso a estirpe Z31 venha a ser produzida em larga escala para fins comerciais (Songer *et al.*, 2007).

Ocorrência prévia de ICD e DNS na fazenda

A amostragem de fezes antes da administração da estirpe Z31 demonstrou que mais de 50% dos leitões com um dia de idade estavam colonizados com *C. difficile* toxigênico. Esse achado está de acordo com estudos prévios que encontraram esse patógeno como comumente associado a essa faixa etária (Songer, 2004; Weese *et al.*, 2010; Hopman *et al.*, 2011). Além disso, a detecção de *C. difficile* toxigênico foi altamente correlacionada com a detecção de toxinas A/B. Em adição, todos os animais em que foram detectadas toxinas A/B apresentaram algum nível de diarreia, apontando para uma alta ocorrência de ICD (Songer, 2004; Knight *et al.*, 2014; Oliveira Júnior *et al.*, 2019). A morbidade da ICD em granjas de suínos é comumente em torno de 20%, mas pode ser superior a 50% com casos de diarreia também mais evidentes, como foi observado no presente estudo (Songer, 2004; Lippke *et al.*, 2011; Cruz Junior *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013c). A ausência de Rotavírus foi inesperada, uma vez que o patógeno é bem disseminado entre as granjas e uma causa comum de diarreia neonatal (Vlasova *et al.*, 2017). Especula-se que a vacinação das porcas contra o patógeno associada a uma adequada colostragem tenha protegido os animais nos primeiros dias de vida. Embora *C. perfringens* tipo A e ETEC tenham sido detectados, tais patógenos não foram associados a diarreia durante a avaliação prévia. Provavelmente a alta ocorrência de *C. difficile* tenha mascarado a ação dos demais patógenos. Dessa forma, *C. difficile* foi considerado o principal enteropatógeno em leitões de um dia de idade nesta granja.

Ocorrência da ICD após administração da estirpe Z31

A administração oral da estirpe Z31 em leitões reduziu a ocorrência da ICD na granja avaliada, e estes resultados estão de acordo com estudos anteriores nos quais a Z31 preveniu a ocorrência de ICD em modelos experimentais utilizando hamster e leitões (Oliveira Júnior *et al.*, 2016, 2019). O único relato do uso de uma estirpe NTCD em uma granja comercial encontrou uma ligeira redução na detecção de toxinas A/B em leitões, sugerindo que esta estratégia poderia trazer benefícios para os animais sob risco (Songer *et al.*, 2007). A exclusão competitiva, baseada na capacidade de adesão de cada estirpe, é hipotetizada como o principal mecanismo de ação das estirpes NTCD na prevenção da ICD (Songer *et al.*, 2007; Natarajan *et al.*, 2013; Gerding *et al.*, 2018). Esse mecanismo pode explicar a redução na intensidade da diarreia dos poucos leitões que desenvolveram ICD após receberem a estirpe Z31 no presente estudo.

A Z31 também reduziu a eliminação fecal de estirpes toxigênicas de *C. difficile* nos animais tratados. As estirpes toxigênicas isoladas no presente estudo foram classificadas pelo MLST como ST11, tipo comumente identificado como RT 078 e RT 126, os quais são considerados os mais comuns em suínos (Keel *et al.*, 2007; Schneeberg *et al.*, 2013; Knight and Riley, 2016; Oliveira Junior *et al.*, 2019). Estudos recentes têm sugerido que estirpes pertencentes ao ST11 estão relacionadas com o aumento da ICD associada à comunidade em humanos (Suo *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). É importante lembrar que, na etapa anterior, a estirpe Z31 foi usada para prevenir a

ICD em leitões experimentalmente infectados com estirpes toxigênicas ribotipo 014/020 (ST2), outro tipo encontrado com frequência em leitões e humanos (Knight *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016; Oliveira Júnior *et al.*, 2019). Em conjunto, esses resultados sugerem que a Z31 é capaz de prevenir o ICD em leitões desafiados contra dois tipos de estirpes que figuram entre as mais frequentemente associadas à doença em humanos e leitões. Portanto, o uso da Z31 como estratégia preventiva está em consonância com o conceito de Saúde Única (Squire and Riley, 2013).

É digno de nota que a ocorrência de ICD nos animais do grupo controle após a administração da estirpe Z31 foi menor que a ocorrência testada antes do experimento. A principal hipótese para explicar tal fato é que alguns leitões não inoculados tenham sido colonizados pela estirpe Z31 após ingerir esporos eliminados no ambiente, uma vez que os animais de diferentes grupos compartilharam as mesmas instalações. Deve-se ressaltar que a estirpe Z31 foi isolada nas fezes de cerca de 20% dos animais do grupo controle, os quais apresentaram escores de diarreia similares aos animais tratados. Esse possível benefício indireto é importante, uma vez que nem sempre é possível atingir uma cobertura de 100% dos animais com um produto neonatal administrado por via oral. Em contraponto, Songer *et al.* (2007) não observaram efeito positivo ao aspergir estirpes NTCD nas tetas e períneo de porcas no pré-parto. Nesse sentido, novos estudos podem ser feitos para avaliar os efeitos da administração da estirpe Z31 a curto, médio e longo prazo em granjas comerciais.

Ocorrência da DNS após a administração da estirpe Z31

Os leitões com ICD, principalmente aqueles que não receberam a estirpe Z31, apresentaram os maiores escores de diarreia, e os resultados estão de acordo com alguns estudos que sugerem que *C. difficile* é uma das principais causas de DNS (Songer and Anderson, 2006; Cruz Junior *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013a, 2013c; McElroy *et al.*, 2016). Apesar dos demais agentes não terem sido associados à diarreia no levantamento prévio, após a redução da ICD com a utilização da estirpe Z31, tanto *E. coli* como *C. perfringens* foram associados a uma diarreia branda. Nos isolados de *E. coli* os fatores de virulência encontrados com mais frequência foram o STaP e a adesina F5 (anteriormente K99), que são comumente relatados em isolados de ETEC em fezes de leitões com diarreia causada por esse agente (Gyles and Fairbrother, 2010). Por outro lado, a associação de *C. perfringens* tipo A com diarreia foi surpreendente. Embora o gene *cpb2* (codificador da toxina beta2) tenha sido encontrado em todos os isolados, não há consenso sobre seu papel ou sobre qualquer fator de virulência na indução de diarreia em suínos, dificultando a diferenciação entre isolados de *C. perfringens* comensais e patogênicos (Cruz Junior *et al.*, 2013; Farzan *et al.*, 2013; Allaart *et al.*, 2014). Curiosamente, todos os leitões com coinfeções apresentaram diarreia moderada a grave, resultado similar a outros relatos que sugerem que a associação entre patógenos pode agravar os sinais clínicos (de la Fé Rodríguez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

A redução no isolamento de *C. perfringens* em animais que receberam a estirpe Z31 merece atenção. Os estudos mostram que os dois microrganismos possuem diferentes tipos de adesinas e ocupam diferentes nichos ecológicos, de forma que não é provável que tal redução também seja por exclusão competitiva (Brüggemann and Gottschalk, 2008). Apesar disso, a coinfeção de *C. difficile* e *C. perfringens* tipo A ou C já foi descrita em cães e potros (Uzal *et al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2018). Em ambos os casos, os autores levantaram a hipótese de um possível sinergismo entre estas espécies. Neste cenário, hipotetiza-se que a redução na incidência da ICD, conferida pela estirpe Z31, possa ter diminuído a colonização por *C. perfringens* indiretamente.

Como discutido anteriormente, *C. difficile* foi a principal causa de DNS nesta granja. Dessa forma, a administração da estirpe Z31 foi capaz de reduzir a diarreia causada por esse agente e, conseqüentemente, foi observada uma redução geral da DNS na granja em animais de um dia de vida. Até onde sabemos, este é o primeiro relato em que uma estirpe NTCD reduziu de forma eficiente e significativa a ICD, produzindo um impacto positivo na DNS em uma granja comercial de suínos (Songer *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2016). Dado que a DNS é um dos principais problemas que afetam essa categoria suína, o uso de estratégias preventivas para reduzir a diarreia é essencial e tem impactos práticos na cadeia produtiva (Larsson *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2016; Oliveira Júnior *et al.*, 2019). Futuros estudos avaliando a DNS durante o período crítico da ICD (sete dias), o desempenho dos animais e a influência da administração na microbiota intestinal podem ser importantes para uma caracterização mais aprofundada dessa estratégia preventiva.

5.5. Conclusão

A estirpe não toxigênica de *C. difficile* Z31 foi capaz de reduzir a ocorrência de infecção por *C. difficile* e diarreia neonatal suína em leitões com um dia de idade em uma granja comercial. O presente trabalho confirma o potencial uso da estirpe Z31 como método preventivo contra a ICD em leitões convencionais.

5.6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, P. R. *et al.* Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical characterization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 30, n. 3, p. 370–376, 19 maio 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638718756050>>.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 57, n. 2, p. 183–8, fev. 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

BORRIELLO, S. P.; BARCLAY, F. E. Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *Journal of Medical Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 339–350, 1 jun. 1985. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-19-3-339>>.

BROWN, A. W. W.; WILSON, R. B. *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—a narrative review. *Gastroenterology Report*, v. 6, n. 3, p. 157–166, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/gastro/article/6/3/157/5046687>>.

BRÜGGEMANN, H.; GOTTSCHALK, G. Comparative genomics of clostridia: Link between the ecological niche and cell surface properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1125, p. 73–81, 2008.

CRUZ JUNIOR, E. C. *et al.* A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 8, p. 963–969, ago. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000800002&lng=en&tlng=en>.

DE LA FÉ RODRÍGUEZ, P. Y. *et al.* Several enteropathogens are circulating in suckling and

newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara, Cuba. *Tropical Animal Health and Production*, v. 45, n. 1, p. 435–440, 2012.

DINIZ, A. N. *et al.* The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF - positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe*, v. 49, p. 58–62, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996417302263>>.

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, v. 7, n. 1, p. 1–26, 13 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>>.

GERDING, D. N. *et al.* Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection. *JAMA*, v. 313, n. 17, p. 1719, 5 maio 2015. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.3725>>.

GERDING, D. N.; SAMBOL, S. P.; JOHNSON, S. Non-toxigenic *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* for prevention of *C. difficile* Infection: from bench to bedside back to bench and back to bedside. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–13, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01700/full>>.

GRIFFITHS, D. *et al.* Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 770–778, mar. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01796-09>>.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9780470958209>>.

HAMOUDA, T.; SHIH, A. Y.; BAKER, J. R. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 86–90, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849500>>.

HENSGENS, M. P. M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>>.

HOPMAN, N. E. M. *et al.* Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, v. 149, n. 1–2, p. 186–192, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.013>>.

JANEZIC, S.; RUPNIK, M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2010. v. 646. p. 55–65. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-365-7_5>.

KEEL, K. *et al.* Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 1963–1964, 1 jun. 2007. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00224-07>>.

KEESSEN, E. C. *et al.* *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 6, p. 1032–1034, jun. 2013. Disponível em:

<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/6/12-1645_article.htm>.

KEYBURN, A. L. *et al.* NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 2, p. e26, 2008. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0040026>>.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 11, p. 3856–62, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122859>>.

KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* clade 5 in Australia: antimicrobial susceptibility profiling of PCR ribotypes of human and animal origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 8, p. 2213–7, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27130808>>.

KNIGHT, D. R. *et al.* Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 014 lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. January, 11 jan. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02138/full>>.

LARSSON, J. *et al.* Farm characteristics and management routines related to neonatal porcine diarrhoea: a survey among Swedish piglet producers. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 58, n. 1, p. 77, 10 dez. 2016. Disponível em: <<http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-016-0261-0>>.

LIPPKE, R. T. *et al.* Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 6, p. 505–510, jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000600008&lng=en&tlng=en>.

LUPPI, A. Swine enteric colibacillosis: Diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, v. 3, p. 1–18, 2017.

MACÊDO, N. R. *et al.* Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 5, p. 1117–1123, out. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000500005&lng=pt&tlng=pt>.

MALIK, Y. S. *et al.* Rotavirus diarrhea in piglets: A review on epidemiology, genetic diversity and zoonotic risks. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 84, n. 10, p. 1035–1042, 2014.

MCELROY, M. C. *et al.* Typhlocolitis associated with *Clostridium difficile* ribotypes 078 and 110 in neonatal piglets from a commercial Irish pig herd. *Irish Veterinary Journal*, v. 69, n. 1, p. 4–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13620-016-0070-9>>.

MILLS, J. P.; RAO, K.; YOUNG, V. B. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 34, n. 1, p. 3–10, jan. 2018. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00001574-201801000-00003>>.

MIZRAHI, A.; COLLIGNON, A.; PÉCHINÉ, S. Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: State of the art. *Anaerobe*, v. 30, p. 210–219, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996414000924>>.

MOONO, P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in production animals and avian species: A review. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 13, n. 12, p. 647–655, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2016.2181>>.

NAGARO, K. J. *et al.* Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 11, p. 5266–5270, nov. 2013. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

NATARAJAN, M. *et al.* A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, v. 22, n. 734, p. 1–5, ago. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996413000863>>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxigenic strain. *Ciência Rural*, v. 46, n. 5, p. 853–859, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000500853&lng=en&tlng=en>.

OLIVEIRA JUNIOR, C. A. *et al.* Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. *Anaerobe*, v. 51, p. 61–63, jun. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29680295>>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* The non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets. *Anaerobe*, v. 55, p. 24–28, fev. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30292822>>.

PEREIRA, F. L. *et al.* Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. *Gut Pathogens*, v. 8, n. 1, p. 11, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.gutpathogens.com/content/8/1/11>>.

RUIZ, V. L. A. *et al.* Case – control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *BMC Research Notes*, p. 1–7, 2016.

SAMBOL, S. P. *et al.* Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 12, p. 1781–9, 15 dez. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/345676>>.

SCHNEEBERG, A. *et al.* *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 11, p. 3796–3803, nov. 2013. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01440-13>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v. 41, n. 8, p. 1430–1435, 29 jul. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000800021&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. DE C.; LOBATO, F. C. F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, p. 73–80, 22 nov. 2013a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000100013&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Veterinary Journal*, v. 45, n. 6, p. 671–5, nov. 2013b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/evj.12046>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* An outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets in Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6Supl2, p. 3923, 17 dez. 2013c. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/14442>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Padronização de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*. *Ciência Rural*, v. 44, n. 8, p. 1415–1421, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000801415&lng=pt&tlng=pt>.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, v. 5, n. 02, p. 321–326, 28 dez. 2004. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252304000386/type/journal_article>.

SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996405001277>>.

SONGER, J. G. *et al.* Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Veterinary Microbiology*, v. 124, n. 3–4, p. 358–361, out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507001861>>.

SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 365, n. April, p. 299–314, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695920>>.

STARR, M. P. Edwards and Ewing’s Identification of Enterobacteriaceae.: Fourth Edition. By William H. Ewing. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York. 1986. 536 pages. ISBN 0-444-00981-7. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 36, n. 4, p. 581–582, 1 out. 1986. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-36-4-581>>.

SUO, J. *et al.* *Clostridium difficile* RT 078/ST11: a threat to community population and pigs identified in elder hospitalized patients in Beijing, China. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 38, n. 11, p. 1383–1385, 27 nov. 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0899823X17001921/type/journal_article>

UZAL, F. A. *et al.* *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. *Veterinary Microbiology*, v. 156, n. 3–4, p. 395–402, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.023>>.

VILLANO, S. A. *et al.* Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 10, p. 5224–5229, out. 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00913-12>>.

VLASOVA, A. N.; AMINO, J. O.; SAIF, L. J. Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses*, v. 9, n. 3, p. 48, mar. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371803/>>.

WANG, X. *et al.* A novel watery diarrhoea caused by the co-infection of neonatal piglets with *Clostridium perfringens* type A and *Escherichia coli* (K88 , 987P). *The Veterinary Journal*, v. 197, n. 3, p. 812–816, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.023>>.

WEESE, J. S. *et al.* Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe*, v. 16, n. 5, p. 501–504, out. 2010. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>>.

WU, Y. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from a pig slaughterhouse, pork, and humans in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, v. 242, p. 37–44, fev. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.010>>.

YANG, W.-W.; CROW-WILLARD, E. N.; PONCE, A. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 1, p. 27–33, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120612>>.

6. CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA DE *Clostridioides (Clostridium) difficile* Z31 E SUA VIABILIDADE A LONGO PRAZO

Trabalho publicado em

Brazilian Journal of Microbiology 50(1):263-269

Evaluation of growth and sporulation of a non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* (Z31) and its shelf viability

Oliveira Júnior, C. A.; Silva, R. O. S.; Cruz, D. S. G.; Pires, I. H.; Alves, G. G.; Lobato, F. C. F.

Anexo 9.1.4

Resumo

A administração oral da estirpe não toxigênica de *Clostridioides (Clostridium) difficile* (NTCD) Z31 demonstrou resultados promissores na prevenção da infecção por *C. difficile* (ICD) em hamsters e em suínos, tanto em modelo experimental quanto numa granja comercial, apontando para seu grande potencial de ser usado como método preventivo da doença em leitões. O objetivo deste trabalho foi avaliar cinco meios de cultura para o crescimento e esporulação da estirpe Z31 e avaliar a viabilidade de soluções de esporos liofilizados da Z31 armazenados a 4 °C ou a 25 °C por dois anos. O Meio Clostridial Reforçado (RCM) e o Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) proporcionaram a maior produção de esporos de Z31 entre os meios testados. Nos primeiros seis meses de armazenamento das soluções liofilizadas, foi observada uma redução na contagem de esporos cultiváveis de aproximadamente 0,3 Log₁₀ UFC/mL (cerca de 50% da carga total) em ambas temperaturas de armazenamento, no entanto, a partir desta data nenhuma redução significativa na contagem de esporos foi observada. Nenhuma diferença estatística na concentração de esporos foi encontrada entre as duas temperaturas de armazenamento de 6 a 24 meses. O presente trabalho mostrou que o BHI e o RCM são as melhores escolhas para o crescimento e esporulação da estirpe Z31, e que a liofilização mantém aproximadamente 40% da carga total estável por até dois anos refrigerado e à temperatura ambiente.

Palavras-chave: probiótico; meios de cultura; viabilidade a longo prazo; esporos.

6.1. Introdução

Clostridioides (anteriormente *Clostridium*) *difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, esporulado e as estirpes podem ser classificadas como toxigênicas ou não toxigênicas baseado na produção de toxinas A, B e binária (Natarajan *et al.*, 2013; Lawson *et al.*, 2016). *C. difficile* é responsável por colite pseudomembranosa em humanos, bem como diarreia em animais, como suínos, equinos e cães (Silva *et al.*, 2013a; Martin *et al.*, 2016). Apesar deste patógeno ser considerado uma das causas mais importantes de diarreia neonatal em leitões e uma possível zoonose, não há nenhuma medida preventiva comercialmente disponível (Songer and Anderson, 2006; Hensgens *et al.*, 2012; Moono *et al.*, 2016; Grześkowiak *et al.*, 2018).

O primeiro relato sugerindo um potencial protetivo de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) contra a infecção por *C. difficile* (ICD) data de 1983 (Wilson and Sheagren, 1983). Desde então, essa estratégia foi testada em diversos modelos animais visando a prevenção da doença em humanos, obtendo resultados promissores (Sambol *et al.*, 2002; Steele *et al.*, 2010; Nagaro *et al.*,

2013) A utilização das estirpes NTCD têm sido alvo de estudos mais recentes, demonstrando bons resultados na prevenção da recorrência da doença (Villano *et al.*, 2012; Gerding *et al.*, 2015, 2018). Em suínos, estirpes NTCD foram capazes de reduzir a detecção de toxinas A/B e de lesões microscópicas nos animais (Songer *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2016).

Baseando-se nestes estudos, desenvolveu-se um trabalho avaliando estirpes NTCD no Brasil visando a prevenção da doença em suínos (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). O sequenciamento genômico completo de uma destas estirpes, denominada Z31, demonstrou a presença de importantes genes relacionados à colonização do hospedeiro (Pereira *et al.*, 2016). Em sequência, foi demonstrada a capacidade da Z31 de prevenir a ICD em hamsters (Oliveira Júnior *et al.*, 2016), em leitões em modelo experimental (Oliveira Júnior *et al.*, 2019a) e em leitões de um dia de vida em uma granja comercial (Oliveira Júnior *et al.*, 2019b), como relatado nos capítulos anteriores. Apesar destes resultados, dados como uma boa produção *in vitro* e manutenção de uma viabilidade de esporos a longo prazo são cruciais para a utilização comercial de uma estirpe NTCD visando a prevenção da ICD. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar cinco meios de cultura para o crescimento e esporulação da estirpe Z31 e avaliar a viabilidade temporal de uma solução de esporos liofilizada de Z31 mantida em duas temperaturas diferentes por dois anos.

6.2. Material e métodos

Estirpe

A estirpe Z31 foi isolada de um cão saudável, em fevereiro de 2009, na cidade de Belo Horizonte (MG) e tipificada como PCR ribotipo (RT) 009, e *sequence-type* (ST) 3 (Silva *et al.*, 2013b, 2015; Pereira *et al.*, 2016). A estirpe possui os genes de resistência *tetM* e *ermB* e apresentou resistência a clindamicina e lincomicina *in vitro* (Oliveira Júnior *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016). Experimentalmente, a Z31 apresentou maior potencial de crescimento *in vitro* quando comparada com outras NTCD (Oliveira Júnior *et al.*, 2016), preveniu a doença em hamster em modelo experimental (Oliveira Júnior *et al.*, 2016) e em leitões em modelo experimental e a campo (Oliveira Júnior *et al.*, 2019a, 2019b).

Meios de cultura

Cinco meios de cultura diferentes foram utilizados. Dois deles foram produzidos de acordo com as recomendações dos fabricantes: Caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid, Reino Unido) e Meio Clostridial Reforçado (RCM, Difco, EUA). O terceiro meio foi o BHI suplementado com 0,1% de L-cisteína (Merck, EUA) e 0,5% de Extrato de Levedura (Difco, EUA) (BHIS) (Zidaric and Rupnik, 2016). O quarto era composto por 1,5% de Triptose (Difco, EUA) e 1,0% de Extrato de Levedura. (Difco, EUA) (TY) (Atlas, 1946). Finalmente, foi utilizado um caldo de esporulação que continha 1,5% de Triptose (Difco, EUA), 1,1% de Hidrogenofosfato de Sódio (Na₂HPO₄, Synth, Brasil), 0,3% de Amido (Merck, EUA), 0,3% de Extrato de Levedura (Difco, EUA), 0,1% de Tioglicolato de Sódio (Synth, Brasil) e 0,01% de Sulfato de Magnésio (MgSO₄, Synth, Brasil) (SB) (Atlas, 1946).

Crescimento e produção de esporos da estirpe Z31

A estirpe Z31 foi primeiramente cultivada em ágar Mueller Hinton (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue equino e 0,1% de taurocolato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) (AST) em câmara de anaerobiose (Thermo Fisher Scientific, EUA) (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂)

durante 48 h. Colônias oriundas desse plaqueamento foram diluídas em tampão fosfato salina (PBS - 1x, pH 7,4), até a solução atingir a 1 da escala de McFarland (~ 3,0 x 10⁸ UFC/mL). Posteriormente, 5,0 µL desta solução foram inoculados em 5,0 mL de cada um dos meios de cultura previamente descritos (proporção 1: 1000) e incubados sob condições anaeróbias, a 37 °C por 5 dias (Zidaric and Rupnik, 2016). Após esse período, as culturas foram mantidas em aerobiose a 25 °C ± 2 °C até ao dia 30. As contagens foram realizadas nos dias 3, 5, 10, 15 e 30. Os ensaios foram realizados em sextuplicatas para cada meio em cada momento experimental.

Para determinar o crescimento da Z31, a solução de cada tubo foi homogeneizada, diluída seriadamente em PBS, estriada em AST e incubada sob condições de anaerobiose durante 2 dias. Para mensurar a produção de esporos, o mesmo procedimento foi realizado, com a adição de um tratamento térmico (20 min, 70 °C) para eliminar as células vegetativas antes da diluição seriada (Oliveira Júnior *et al.*, 2016; Zidaric and Rupnik, 2016). Placas contendo 30 a 300 colônias foram utilizadas para quantificar as unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). A frequência de esporulação foi calculada dividindo a contagem de esporos pela contagem total (esporos mais células vegetativas).

Liofilização e viabilidade a longo prazo

Para a liofilização, a solução de esporos de *C. difficile* foi produzida em BHI de acordo com um método previamente descrito com algumas adaptações (Yang *et al.*, 2009). Resumidamente, foram realizados dois passos de pré-inoculação em que cada etapa continha 10% do volume total do inóculo seguinte e foi incubada por 24 h sob condições de anaerobiose. *C. difficile* foi cultivado em frascos contendo 500 mL de BHI, os quais foram incubados em anaerobiose por 120 h, seguido de aerobiose por 120 h. Após este período, a solução foi centrifugada (3000 x g, 30 min, 4 °C) (Hettich, Alemanha) e o sedimento foi submetido a um choque com álcool etílico 96° (1:2 v/v), a 37 °C, durante 30 min. A solução foi novamente centrifugada e o sedimento foi ressuspenso com o mesmo volume de PBS. Este procedimento foi repetido oito vezes. A solução foi então submetida a um tratamento térmico (20 min, 70 °C) para eliminar as células vegetativas. Três alíquotas de cada solução foram testadas usando a técnica de coloração de Wirtz-Conklin (Hamouda *et al.*, 2002) para determinar a proporção de esporos usando microscopia óptica (Nikon, Japão).

As soluções de esporos foram submetidas ao teste de pureza, o qual teve duração total de 15 dias. Para avaliação de contaminação por bactérias aeróbias, foi usado caldo BHI e ágar Müeller Hinton suplementado com 5% de sangue equino (AS), mantidos em aerobiose, a 37 °C. Para contaminação fúngica, foi utilizado ágar Sabouraud (Oxoid, Reino Unido) em aerobiose, a 24 °C. A contaminação com outros anaeróbios foi avaliada pelo plaqueamento AS seguido de PCR *multiplex* para identificação de *C. difficile*, conforme previamente descrito (Silva *et al.*, 2011).

As soluções puras foram reunidas e a solução final foi usada para contagem de esporos conforme mencionado anteriormente. Em seguida, a solução foi diluída para uma concentração final de 1 x 10⁸ esporos/mL e 1 mL desta solução foi alíquotado em tubos de penicilina, os quais foram congelados (24 h, -80 °C), liofilizados em um liofilizador de bancada (Enterprise, Terroni, Brasil), e mantidos em duas temperaturas diferentes (4 °C e 25 °C) por dois anos. As contagens subsequentes seguiram o mesmo protocolo descrito, e foram realizadas após ressuspensão das alíquotas com 1 mL de PBS. As análises foram feitas em triplicata um dia após o procedimento de contagem, mensalmente por 12 meses e novamente aos 18 e 24 meses pós-liofilização.

Análise estatística

As contagens de esporos foram transformadas através do logaritmo de base 10 e analisadas por ANOVA e pelo teste t de Student. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foram construídas regressões lineares e não lineares para os dados relacionados à viabilidade a longo prazo. As análises foram realizadas no GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA).

6.3. Resultados

Crescimento e esporulação

O crescimento da estirpe Z31 variou de $3,86 \times 10^4$ UFC/mL (TY, 3 dias) e $7,15 \times 10^6$ UFC/mL (RCM, 5 dias). A produção de esporos da Z31 variou de $2,24 \times 10^4$ UFC/mL (TY, 3 dias) para $6,57 \times 10^6$ UFC/mL (BHI, 5 dias). No dia 3, foi observado maior crescimento bacteriano e produção de esporos no RCM. A partir do dia 5 em diante, tanto o RCM quanto o BHI demonstraram resultados semelhantes, seguidos pelos meios SB, BHIS e TY (Figura 18).

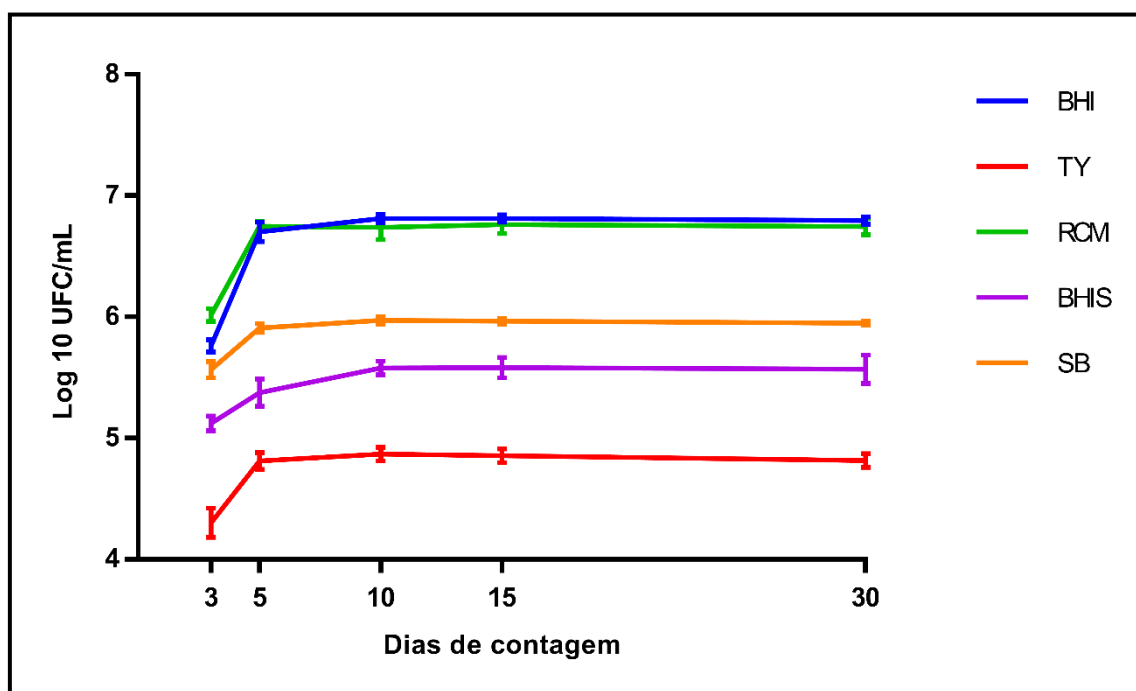


Figura 18. Contagem de esporos (Log_{10}) da estirpe Z31 em cinco diferentes meios de cultura. Os meios foram incubados em condições anaeróbicas a 37°C até o dia 5, posteriormente foram mantidos em condições aeróbicas a 25°C até o final da experimentação.

A frequência de esporulação nos momentos 3 e 5 dias variou entre 68% e 80% para todos os meios de cultura testados, exceto no BHIS, que apresentou taxa de esporulação abaixo de 50% em ambos os momentos. Após armazenamento em aerobiose, todos os meios de cultura apresentaram taxas de esporulação acima de 98% nos dias 10, 15 e 30 (Figura 19).

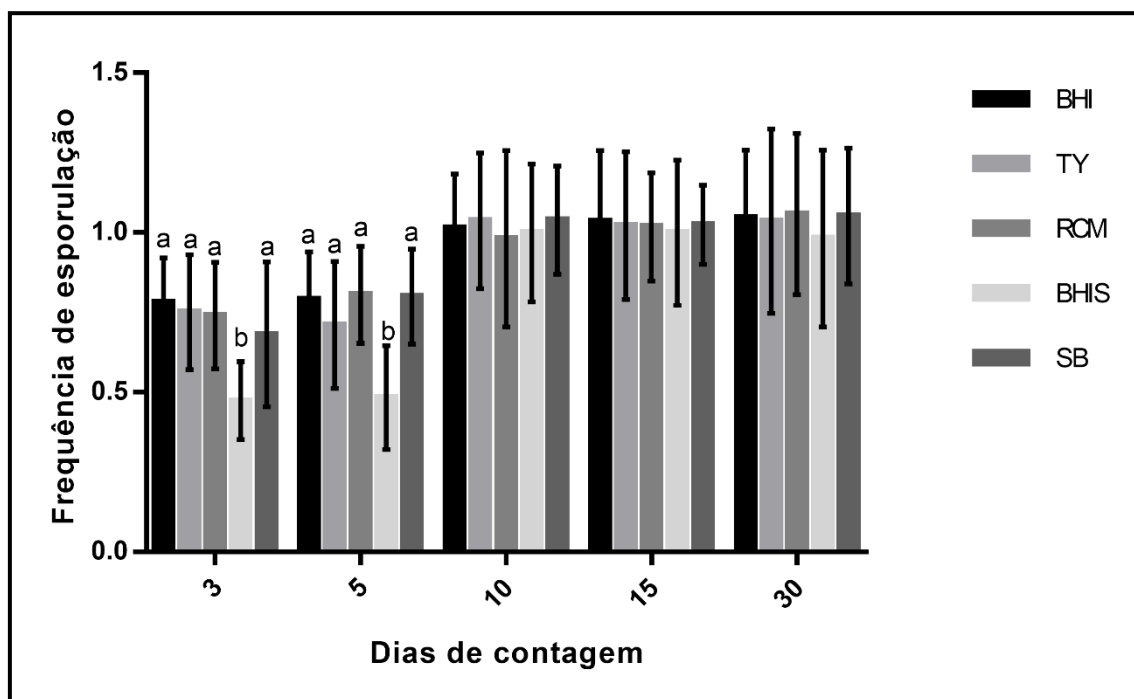


Figura 19. Frequência de esporulação da estirpe Z31 para os cinco meios testados. Letras diferentes no mesmo momento de avaliação indicam diferenças estatísticas entre as taxas de esporulação de Z31 induzidas pelos meios de cultura naquele momento ($p < 0,05$).

Viabilidade a longo prazo

Após a produção de esporos, soluções de 1 mL contendo 1×10^8 esporos da Z31 foram liofilizadas, armazenadas a 4°C (resfriadas) ou a 25°C (temperatura ambiente) e testadas quanto à sua viabilidade a longo prazo durante o período de 24 meses. Nos primeiros seis meses, em ambas temperaturas de armazenamento, houve uma redução de cerca de 50% da carga total de esporos liofilizados; no entanto, essa diminuição foi seguida pela manutenção da contagem de esporos (Figura 20A). Diferenças estatísticas entre as duas temperaturas de armazenamento foram observadas apenas no quarto e quinto meses, com maiores concentrações de esporos nas amostras mantidas à temperatura ambiente. Não foram encontradas diferenças estatísticas do mês 6 até o final do experimento.

Uma regressão linear realizada com os dados dos primeiros 12 meses de contagem e estimou que as concentrações de esporos da Z31 obtidas após 24 meses de armazenamento seriam de $1,66 \times 10^7$ UFC/mL para as amostras resfriadas e $1,55 \times 10^7$ UFC/mL para as amostras à temperatura ambiente, com valores de R^2 de 81,0% e 94,4%, respectivamente (dados não demonstrados). Também foi realizada uma regressão não linear utilizando todos os dados obtidos neste experimento (Figura 20B), pois a concentração de esporos mostrou relativa estabilidade nos últimos meses de mensuração. A concentração estimada de esporos da Z31 deste modelo durante o período estável foi de $4,16 \times 10^7$ UFC/mL para o armazenamento resfriado e $3,85 \times 10^7$ UFC/mL para armazenamento à temperatura ambiente (R^2 de 90,58% e 90,67%, respectivamente). Estes resultados foram estatisticamente semelhantes às concentrações reais encontradas na última

contagem do experimento ($4,17 \times 10^7$ UFC/mL para amostras resfriadas e $3,92 \times 10^7$ UFC/mL amostras à temperatura ambiente).

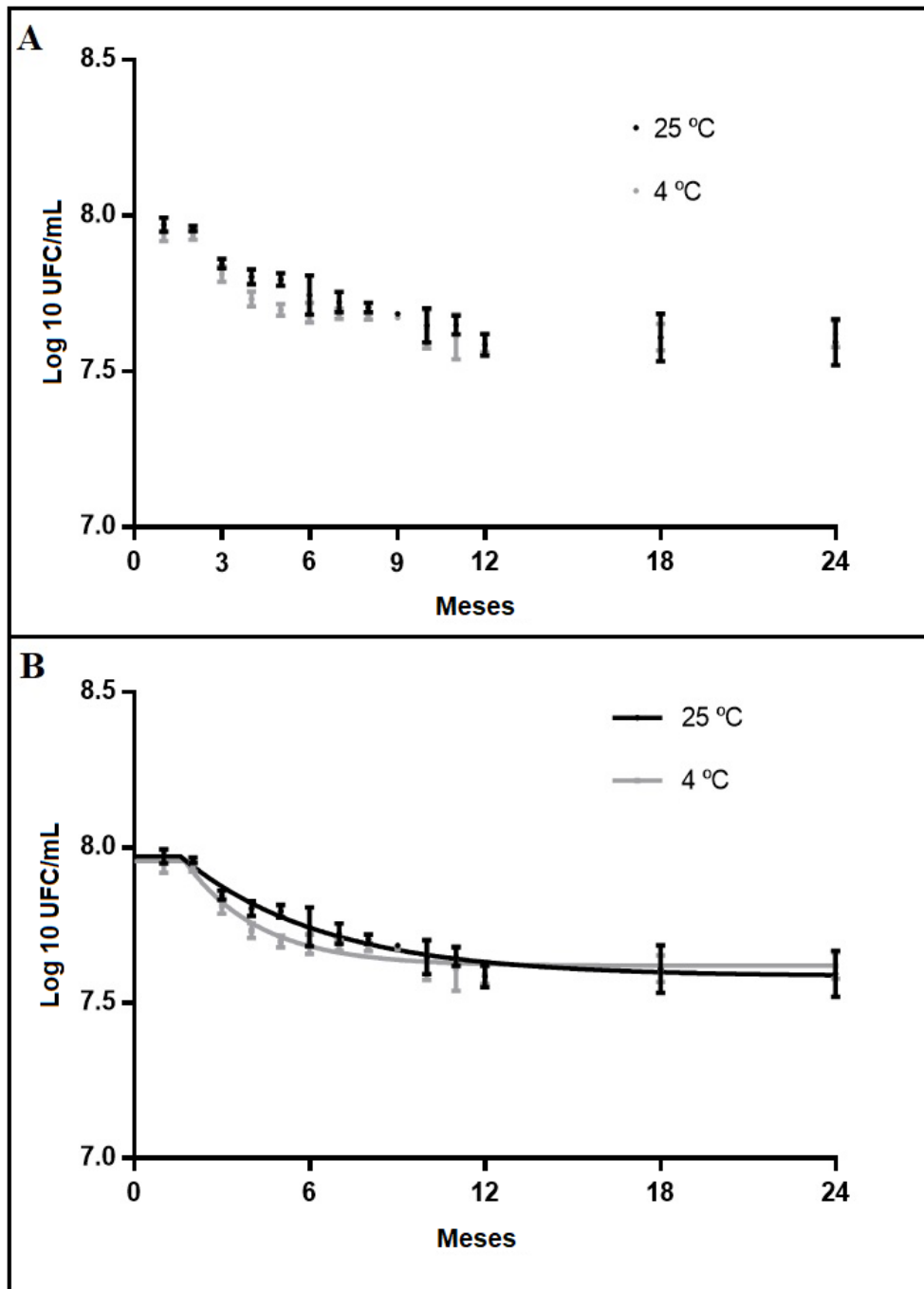


Figura 20. Contagens de alíquotas liofilizadas de esporos da estirpe Z31 armazenadas durante um período de 24 meses a 4 °C ou 25 °C. (A) Contagem de esporos e o desvio padrão das amostras a em cada um dos momentos analisados. (B) Modelo de regressão não linear dos dados originais.

6.4. Discussão

Crescimento e esporulação da estirpe Z31

A ICD é uma doença importante tanto em humanos quanto em animais domésticos e o uso de terapias baseada em microrganismos pode ser uma alternativa viável para prevenir essa doença (Arruda *et al.*, 2016; Mills *et al.*, 2018). A estirpe Z31 é uma possível candidata a ser utilizada na prevenção de ICD, devido aos resultados promissores obtidos em etapas anteriores (Oliveira Júnior *et al.*, 2016, 2019a, 2019b; Pereira *et al.*, 2016). Apesar desses resultados, é essencial entender as características de crescimento e esporulação *in vitro* da estirpe Z31 para avaliar a viabilidade de seu uso comercial. A quantificação de células totais e esporos no presente estudo foi realizada com base em unidades formadoras de colônias (UFC), semelhante a outros trabalhos (Akerlund *et al.*, 2008; Merrigan *et al.*, 2010; Zidaric and Rupnik, 2016). Experimentos com estirpes toxigênicas de *C. difficile* encontraram concentrações de esporos entre 1×10^6 e 1×10^7 UFC/mL após 2 dias de incubação e acima de 1×10^7 UFC/mL após 3 e 5 dias de incubação (Merrigan *et al.*, 2010; Zidaric and Rupnik, 2016). Embora esses valores sejam superiores aos encontrados no presente estudo, as comparações entre os diferentes estudos devem ser feitas com cautela, pois mesmo pequenas diferenças nos métodos podem causar alterações significativas no crescimento e esporulação das estirpes (Burns and Minton, 2011). Apesar disso, a média das concentrações de esporos encontradas nos dois meios de cultura com melhor performance no presente estudo (RCM e BHI) foram cerca de 6 vezes maiores que a concentração sugerida para prevenir CDI em suínos (1×10^6 esporos/mL), o que poderia representar uma produtividade viável caso esse valor seja mantido em larga escala (Oliveira Júnior *et al.*, 2019a).

Como dito anteriormente, os meios com melhores performances para o crescimento e esporulação da estirpe Z31 no presente estudo foram o RCM e o BHI. O RCM, um meio específico para o gênero *Clostridium* possui os componentes e nutrientes necessários para o crescimento de *C. difficile* e outras bactérias anaeróbicas (Hafiz and Oakley, 1976). Embora este meio tenha fornecido condições adequadas para o crescimento e produção de esporos durante este experimento, a adição de ágar em sua fórmula dificulta a separação dos esporos, o que poderia ser uma limitação para a produção em larga escala. Nesse sentido, o cultivo em BHI parece ser a melhor opção entre os meios testados, já que demonstrou resultados semelhantes ao RCM e é um meio de cultura mais prático e com custo mais acessível.

Alguns estudos que avaliaram o crescimento e esporulação de *C. difficile* utilizaram o meio BHIS (Burns *et al.*, 2010; Zidaric and Rupnik, 2016); entretanto, no presente estudo, os cultivos neste meio produziram uma concentração de esporos dez vezes menor que a produzida na cultura com BHI. A adição de L-cisteína no BHIS é a principal diferença deste caldo em comparação ao BHI. Embora não seja essencial para o crescimento, a cisteína é uma das principais fontes de carbono e energia de *C. difficile* quando adicionada a um meio de cultura e é consumida no início da fase de crescimento (Neumann-Schaal *et al.*, 2015). A cisteína também leva a alterações no metabolismo do *C. difficile*, como redução na produção de toxinas, ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e enzimas, incluindo a 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (Karlsson *et al.*, 2000). Essa enzima é responsável pela conversão de AGCCs em cetonas e álcoois em *Clostridium acetobutyricum*. Esse processo está ligado à esporulação em *C. acetobutyricum*, de forma que os mutantes incapazes de converter ácido butírico em butanol possuem uma esporulação deficiente (Mattsson and Rogers, 1994). Caso *C. difficile* possua vias metabólicas semelhantes, esse processo pode ter levado à uma baixa taxa de esporulação da estirpe Z31 quando cultivada em BHIS (Figura 19). Vale ressaltar que a inclusão de cisteína em meios de cultura anaeróbios é

bastante comum, pois é um agente redutor que melhora o crescimento de bactérias anaeróbias quando as condições não são ótimas (Edwards *et al.*, 2013; Cadnum *et al.*, 2014). Curiosamente, alguns meios de cultura indicados para esporulação utilizam cisteína, mesmo em concentrações mais altas quando comparadas ao presente estudo (Edwards and McBride, 2016). No entanto, existem muitas diferenças entre os padrões de esporulação de cada estirpe, o que dificulta as generalizações e reforça a importância de estudos específicos para avaliar o crescimento e esporulação de uma estirpe em particular (Zidaric and Rupnik, 2016).

Com exceção do BHIS, a taxa de esporulação no presente estudo foi superior a 68% após três e/ou cinco dias de cultivo. Estudos prévios avaliando diferentes estirpes de *C. difficile* encontraram taxas de esporulação entre 1% e 60% após dois ou três dias de cultura, com algumas evidências de que estirpes endêmicas e hipervirulentas estão associadas a maiores taxas de esporulação (Akerlund *et al.*, 2008; Underwood *et al.*, 2009; Burns *et al.*, 2010; Merrigan *et al.*, 2010). Sabe-se que a produção de esporos aumenta com o tempo de incubação, e estudos recentes mostraram que mesmo estirpes não endêmicas podem esporular em altas taxas (Burns *et al.*, 2010; Vohra and Poxton, 2011; Zidaric and Rupnik, 2016). Neste contexto, a Z31 parece ser uma estirpe com uma taxa de esporulação relativamente alta, confirmando um estudo anterior em que a Z31 foi a estirpe mais eficiente na produção de esporos quando comparado a outras quatro NTCD isoladas de diferentes animais (Oliveira Júnior *et al.*, 2016). Essa é uma característica importante a ser considerada visando a utilização da estirpe como método preventivo, uma vez que a administração de esporos, e não células vegetativas, é capaz de conferir proteção contra a doença (Songer *et al.*, 2007; Oliveira Júnior *et al.*, 2019a).

Vale ressaltar que a taxa de esporulação encontrada no presente estudo foi superior a 98% após o armazenamento em aerobiose, e a concentração de esporos foi mantida do dia 5 até o final do experimento em todos os meios de cultura. O oxigênio presente na atmosfera é tóxico para microrganismos anaeróbios, como *C. difficile*. Em condições aeróbias, as células vegetativas sofrem apoptose ou iniciam o processo de esporulação (Cadnum *et al.*, 2014). Apesar disso, a obtenção de uma solução com alta proporção de esporos é difícil em culturas de *Clostridium*, levando à exigência de etapas adicionais como tratamento térmico, choque com álcool, sonicação, tratamento enzimático, centrifugação ou uma combinação desses métodos (Grecz *et al.*, 1962; Yang *et al.*, 2009; Paredes-Sabja *et al.*, 2012). A estirpe Z31 apresentou uma alta taxa de esporulação sem etapas adicionais, o que é uma característica promissora para seu potencial uso em escala comercial.

Viabilidade temporal

Os esporos de *C. difficile* são comumente armazenados resfriados ou congelados e a concentração de esporos nessa condição de armazenamento é geralmente mantida ou levemente reduzida entre 30 e 56 dias de armazenamento (Weese *et al.*, 2000; Freeman and Wilcox, 2003; Mah *et al.*, 2009). Na primeira etapa do presente estudo, a concentração de esporos manteve-se estável em soluções mantidas a 4 e 25 °C por 30 dias. A escolha das duas temperaturas de armazenamento neste estudo foi feita considerando os resultados anteriores e a dificuldade de se manter uma cadeia de frio para entrega comercial de produtos em muitas regiões do país. Além disso, embora estudos prévios tenham armazenado esporos em forma de solução de esporos, a opção de liofilização foi selecionada porque este método é um dos mais eficientes para conservação bacteriana a longo prazo e é frequentemente aplicado para uso biotecnológico ou comercial (Gitaitis, 1987; Milosevic *et al.*, 2007; Hoefman *et al.*, 2012).

Nos primeiros seis a 12 meses de armazenamento, houve uma queda substancial na concentração de esporos em ambas as temperaturas. Sabe-se que alguns esporos são capazes de germinar em condições adversas devido a defeitos no exósporo ou ativação espontânea de fatores genéticos ligados à germinação (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Nesse caso, a diminuição na contagem de esporos poderia ser explicada por apoptose de células vegetativas oriundas destes esporos. Outra explicação possível está ligada à superdormência dos esporos. Estes esporos se tornam não cultiváveis em plaqueamento direto em resposta a algum fator externo, porém se demonstram viáveis após passagem em meios líquidos ou *in vivo* (Rodríguez-Palacios and LeJeune, 2011). Dessa forma, as contagens de esporos obtidas no presente estudo provavelmente foram subestimadas devido à superdormência. Os resultados obtidos nos últimos 12 meses de experimentação demonstraram que a contagem de esporos se manteve estável, sugerindo que os processos de germinação espontânea e superdormência tenham diminuído ou cessado (Rodríguez-Palacios and LeJeune, 2011; Paredes-Sabja *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que as formas de armazenamento proporcionaram a mesma concentração final de esporos. Dessa forma, a manutenção da cadeia de frio, que aumenta os custos e não é prática em muitas situações, não seria necessária para o armazenamento das amostras liofilizadas da estirpe Z31 (Lloyd and Cheyne, 2017). Além disso, as etapas anteriores usando a estirpe Z31 na prevenção de ICD em leitões utilizaram a dosagem de 10^6 esporos por animal (Oliveira Júnior *et al.*, 2019a, 2019b). Seguindo estas recomendações, o número de esporos cultiváveis de Z31 encontrados em uma única alíquota após dois anos de armazenamento (em torno de $4,0 \times 10^7$ UFC/mL) poderia ser utilizado em 40 animais, demonstrando um alto rendimento, o que poderia diminuir os custos do uso comercial desta estratégia.

6.5. Conclusão

A estirpe Z31 apresentou alta taxa de esporulação quando cultivada em BHI e RCM, e estes esporos foram relativamente estáveis após dois anos de armazenamento sob condições de temperatura ambiente e resfriadas, demonstrando um bom potencial de uso comercial.

6.6. Referências Bibliográficas

AKERLUND, T. *et al.* Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027/NAP1. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1530–3, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287318>>.

ARRUDA, P. H. E. *et al.* Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 57, n. 2, p. 183–8, fev. 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

ATLAS, R. M. *Handbook of microbiological media*. 4th. ed. Miami: CRC Press, 1946.

BURNS, D. A.; HEAP, J. T.; MINTON, N. P. The diverse sporulation characteristics of *Clostridium difficile* clinical isolates are not associated with type. *Anaerobe*, v. 16, n. 6, p. 618–22, dez. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.001>>.

BURNS, D. A.; MINTON, N. P. Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 87, n. 2, p. 133–8, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864584>>.

CADNUM, J. L. *et al.* Sensitive and selective culture medium for detection of environmental *Clostridium difficile* isolates without requirement for anaerobic culture conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 9, p. 3259–63, set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958803>>.

EDWARDS, A. N.; SUÁREZ, J. M.; MCBRIDE, S. M. Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n. 79, p. e50787, 14 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084491>>.

EDWARDS, A. N.; MCBRIDE, S. M. Isolating and purifying *Clostridium difficile* spores. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, v. 1476, p. 117–28, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507337>>.

FREEMAN, J.; WILCOX, M. H. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *Journal of Clinical Pathology*, v. 56, n. 2, p. 126–8, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560391>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

GERDING, D. N. *et al.* Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection. *JAMA*, v. 313, n. 17, p. 1719, 5 maio 2015. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.3725>>.

GERDING, D. N.; SAMBOL, S. P.; JOHNSON, S. Non-toxigenic *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* for prevention of *C. difficile* infection: from bench to bedside back to bench and back to bedside. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–13, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01700/full>>.

GITAITIS, R. D. *Refinement of lyophilization methodology for storage of large numbers of bacterial strains. Plant Disease*. [S.l.: s.n.], 1987

GRECZ, N.; ANELLIS, A.; SCHNEIDER, M. D. Procedure for cleaning of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Bacteriology*, v. 84, p. 552–8, set. 1962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13950051>>.

GRZEŚKOWIAK, Ł. M. *et al.* Impact of early-life events on the susceptibility to *Clostridium difficile* colonisation and infection in the offspring of the pig. *Gut Microbes*, v. 00, n. 00, p. 1–9, 25 set. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2018.1518554>>.

HAFIZ, S.; OAKLEY, C. L. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *Journal of Medical Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 129–36, maio 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/933146>>.

HAMOUDA, T.; SHIH, A. Y.; BAKER, J. R. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 86–90, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849500>>.

HENSGENS, M. P. M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>>.

HOEFMAN, S. *et al.* Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. e34196, 23 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034196>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

KARLSSON, S. *et al.* Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 10, p. 5881–8, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992498>>.

LAWSON, P. A. *et al.* Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, v. 40, p. 95–99, 2016.

LLOYD, J.; CHEYNE, J. The origins of the vaccine cold chain and a glimpse of the future. *Vaccine*, v. 35, n. 17, p. 2115–2120, 19 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X17300476>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

MAH, J.-H.; KANG, D.-H.; TANG, J. Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperatures. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 1, p. M23–M27, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200102>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, n. 4, p. 206–16, abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>>.

MATTSSON, D. M.; ROGERS, P. Analysis of Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* altered in solventogenesis and sporulation. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 13, n. 4, p. 258–68, jul. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765050>>.

MERRIGAN, M. *et al.* Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 19, p. 4904–11, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675495>>.

MILLS, J. P.; RAO, K.; YOUNG, V. B. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 34, n. 1, p. 3–10, jan. 2018. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00001574-201801000-00003>>.

MILOSEVIC, M. *et al.* Lyophilization as a method for pathogens long term preservation. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, v. 113, p. 203–210, 2007.

MOONO, P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in production animals and avian species: A review. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 13, n. 12, p. 647–655, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2016.2181>>.

NAGARO, K. J. *et al.* Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy, v. 57, n. 11, p. 5266–5270, nov. 2013. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00580-13>>.

NATARAJAN, M. *et al.* A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, v. 22, n. 734, p. 1–5, ago. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996413000863>>.

NEUMANN-SCHAAL, M. *et al.* Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630 Δ erm and concomitant fermentation product and toxin formation. *BMC Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 281, 18 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/281>>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain. *Ciência Rural*, v. 46, n. 5, p. 853–859, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000500853&lng=en&tlng=en>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* The non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets. *Anaerobe*, v. 55, p. 24–28, fev. 2019a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30292822>>.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduce the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm. *Veterinary Microbiology*, v. 231, p. 1–6, abr. 2019b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113518313646>>.

PAREDES-SABJA, D. *et al.* *Clostridium difficile* spore-macrophage interactions: spore survival. *PloS one*, v. 7, n. 8, p. e43635, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209938>>.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 7, p. 406–416, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>>.

PEREIRA, F. L. *et al.* Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. *Gut Pathogens*, v. 8, n. 1, p. 11, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.gutpathogens.com/content/8/1/11>>.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; LEJEUNE, J. T. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 9, p. 3085–3091, 1 maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398481>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

SAMBOL, S. P. *et al.* Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 12, p. 1781–9, 15 dez. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/345676>>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v. 41, n. 8, p. 1430–1435, 29 jul. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

84782011000800021&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. DE C.; LOBATO, F. C. F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, p. 73–80, 22 nov. 2013a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000100013&lng=en&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 133–137, 2013b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000100019&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 8, p. 1062–1065, 11 dez. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000801062&lng=en&tlng=en>.

SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996405001277>>.

SONGER, J. G. *et al.* Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Veterinary Microbiology*, v. 124, n. 3–4, p. 358–361, out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507001861>>.

STEELE, J. *et al.* Piglet models of acute or chronic *Clostridium difficile* illness. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, n. 3, p. 428–34, 1 fev. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/649799>>.

UNDERWOOD, S. *et al.* Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 23, p. 7296–7305, 2009.

VILLANO, S. A. *et al.* Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 10, p. 5224–5229, out. 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00913-12>>.

VOHRA, P.; POXTON, I. R. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, England)*, v. 157, n. Pt 5, p. 1343–53, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330434>>.

WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, n. 4, p. 332–336, 25 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907862>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

WILSON, K. H.; SHEAGREN, J. N. Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 147, n. 4, p. 733–6, abr. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6842009>>.

YANG, W.-W.; CROW-WILLARD, E. N.; PONCE, A. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 1, p. 27–33, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120612>>.

ZIDARIC, V.; RUPNIK, M. Sporulation properties and antimicrobial susceptibility in endemic and rare *Clostridium difficile* PCR ribotypes. *Anaerobe*, v. 39, p. 183–188, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.010>>.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pontuado ao longo deste documento, *C. difficile* é um dos principais causadores de diarreia neonatal suína e a falta de uma medida preventiva contra a ICD é um dos principais desafios para o controle deste problema. Ao longo dos anos, os suinocultores têm acumulado perdas produtivas e os suínos tem funcionado como uma máquina amplificadora do patógeno, gerando um risco iminente de contaminação para os seres humanos. Este cenário requer a implantação de medidas eficientes e urgentes para controlar o problema, o que motivou o estudo a respeito das estirpes não toxigênicas de *C. difficile* (NTCD) pela equipe do Laboratório de Anaeróbios.

As estirpes NTCD já estavam sendo estudadas por outros grupos científicos objetivando a prevenção da doença em humanos e apresentaram resultados promissores em modelos animais. Nesse contexto, a equipe do Laboratório de Anaeróbios realizou uma triagem entre cinco estirpes NTCD previamente isoladas de animais domésticos, selecionando a estirpe Z31 para teste em hamsters. Nesta etapa, a Z31 foi capaz de proteger todos os animais contra a ICD; resultado que estimulou o presente estudo.

Este estudo demonstrou que a estirpe Z31 possui um aparato genético adequado para a proposição de prevenir a doença pelo mecanismo de exclusão competitiva, o que foi confirmado em modelo experimental suíno e em uma granja comercial. Além disso, a estirpe demonstrou boa produção de esporos *in vitro*, os quais se mantem adequadamente viáveis por dois anos quando liofilizados. Vale ressaltar que os dados do sequenciamento propiciaram a rastreabilidade da estirpe, importante para fins científicos e comerciais. Acreditamos que a função da ciência vá além da produção de teses e artigos científicos, de forma que é importante atingir o limite do conhecimento da humanidade, tentar ampliá-lo e fazer com que a sociedade se aproprie desse conhecimento gerado. Nesse contexto, após a demonstração que a estirpe Z31 é capaz de prevenir a doença em suínos, foi realizado o depósito de *Know-how* na UFMG (Anexo 9.5) e as negociações já estão abertas com empresas interessadas em produzir tal tecnologia e disponibilizar para aqueles que foram a motivação do presente estudo.

Em um futuro breve, esperamos que esta tecnologia esteja acessível para os suinocultores e que possamos ampliar os estudos da estirpe Z31 visando a sua utilização para a prevenção da ICD em outros animais domésticos e em seres humanos. Dessa forma finalizaremos um trabalho que contou com a colaboração de diversas pessoas em prol da ciência, dos animais e da sociedade.

8. ANEXOS

8.1. Artigos publicados

8.1.1. Artigo publicado referente ao capítulo 1

PEREIRA, F. L. *et al.* Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. *Gut Pathogens*, v. 8, n. 1, p. 11, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.gutpathogens.com/content/8/1/11>>.

GENOME REPORT

Open Access



Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31

Felipe L. Pereira¹, Carlos A. Oliveira Júnior², Rodrigo O. S. Silva², Fernanda A. Dorella¹, Alex F. Carvalho¹, Gabriel M. F. Almeida¹, Carlos A. G. Leal¹, Francisco C. F. Lobato^{2†} and Henrique C. P. Figueiredo^{1,3*†}

Abstract

Background: *Peptoclostridium* (*Clostridium*) *difficile* is a spore-forming bacterium responsible for nosocomial infections in humans. It is recognized as an important agent of diarrhea and colitis in several animal species and a possible zoonotic agent. Despite the known importance of *P. difficile* infection in humans and animals, no vaccine or other effective measure to control the disease is commercially available. A possible alternative treatment for *P. difficile* infection is the use of a nontoxigenic strain of *P. difficile* as a competitive exclusion agent. However, a thorough knowledge of this strain is necessary for this purpose. We selected *P. difficile* Z31, a nontoxigenic strain (PCR ribotype 009), for investigation because it prevents *P. difficile* infection in a hamster model.

Results: The genome sequence of *P. difficile* Z31 is a circular chromosome of 4298,263 bp, with a 29.21 % GC content, encoding 4128 proteins, and containing 78 pseudogenes. This strain belongs to ST 3, clade 1, and has five phage regions in its genome. Genes responsible for resistance to tetracycline and erythromycin were detected and more importantly, Z31 also contains genes that promote spore production and stability, cell attachment, intestinal adherence, and biofilm formation.

Conclusion: In this study, we present the first complete genome sequence of nontoxigenic *P. difficile* strain Z31. When the Z31 genome was compared with those of other isolates available in GenBank, including a draft genome of a nontoxigenic strain, several unique regions were evident. Z31 contains no toxin genes, but encodes several non-toxin virulence factors, which may favor host colonization.

Keywords: *Peptoclostridium* (*Clostridium*) *difficile*, Live vaccine, Genome sequencing, Competitive exclusion

Background

Peptoclostridium difficile, initially called *Bacillus difficilis*, was first isolated from the meconium of newborns by Hall and O'Toole in 1935 [1]. The name '*Clostridium difficile*' was made official in 1980 in the Approved Lists of Bacterial Names [2] based on a phenotypic study by Prevôt [3]. Recently, in a study based on 16S rRNA and ribosomal protein sequences, Yutin and Galperin [4] proposed the reallocation of some *Clostridium* species into

six new genera, renaming *C. difficile* '*Peptoclostridium difficile*'.

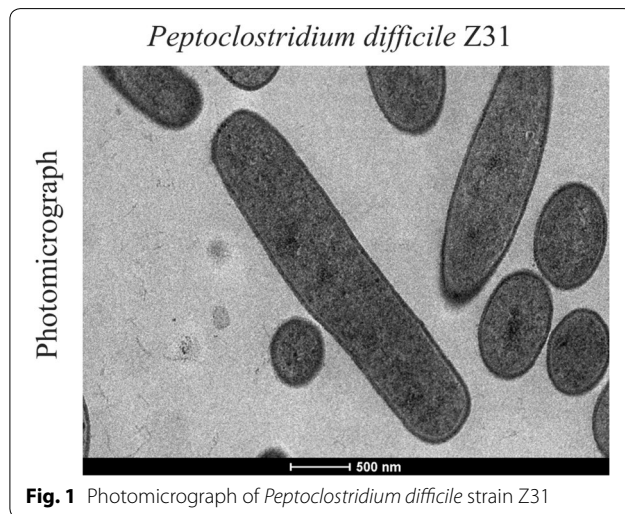
The genus *Peptoclostridium*, in the phylum Firmicutes, class Clostridia, order Clostridiales, and family Peptostreptococcaceae [4], is characterized by strictly anaerobic, motile, pleomorphic Gram-positive bacteria, with dimensions of 0.5–1.9 × 3.0–16.9 μm, which form oval subterminal spores (Fig. 1) with a bacillus cell shape. The bacteria are spore-forming and mesophilic (20–37 °C), with an optimal pH range of neutral to alkaline. They ferment fructose, glucose, levulose, mannitol, mannose, salicin, and usually xylose, but not galactose, glycerol, inulin, lactose, raffinose, or sucrose. They are chemoorganotrophs and can use yeast extract as their sole carbon and energy source and peptone as their nitrogen source. *Peptoclostridium difficile* liquefies gelatin, but does not attack

*Correspondence: figueiredoh@yahoo.com

[†]Francisco C. F. Lobato and Henrique C. P. Figueiredo contributed equally to this work

³ Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



coagulated serum, milk, or meat proteins and is unable to reduce sulfate. It is negative for lecithinase, lipase, oxidase, and catalase. Acetate is produced as a major end product, but it also produces butyrate, formate, isobutyrate, isocaproate, isovalerate, lactate, and valerate [3–5].

Until the late 1970s, *P. difficile* was not recognized as pathogenic bacteria. However, in this decade, *P. difficile* and its toxins were related in fecal contents of human patients with pseudomembranous colitis [6] and the disease was reproduced in hamsters [7], confirming the importance of this microorganism as an enteropathogen. Today, this bacterium is known to be the cause of *P. difficile* infection (PDI), the main cause of nosocomial diarrhea in humans worldwide and a possible cause of diarrhea in general community [8, 9].

In veterinary medicine, *P. difficile* is the most important uncontrolled cause of neonatal diarrhea in piglets in the USA and Europe, and also occurs in other domestic animals and some wild species [10, 11]. In piglets, CDI affects animals to 1–7 days of life, and it was demonstrated that until 1 day of life, 68–100 % of the animals are infected by the microorganism [12, 13]. The disease is subclinical, and just few animals show diarrhea, however, the infection can affect the development of the animals causing economic losses to the farmer [14].

The pathogeny of PDI involves the colonization of colon by some toxigenic strain of *P. difficile* and production of its toxins, the toxin A, an enterotoxin, and toxin B, a cytotoxin, that act synergistically causing cytoskeleton damages, cell rounding, disruption of tight junctions and cell death [15]. The genes responsible to produce toxins, the main difference between toxigenic and nontoxigenic strains, are localized in a pathogenicity locus of 19 kb, called PaLoc [16].

Despite the known importance of *P. difficile* in humans and animals, no vaccine is yet commercially

available. Studies have shown that recombinant and classical immunogens expressing toxins A and B can prevent the occurrence of diarrhea or reduce the severity of *P. difficile* infection (PDI) in a rodent model [17]. These vaccines might limit, but cannot prevent, the fecal shedding of the microorganism, which is essential because *P. difficile* is a nosocomial pathogen. Because this bacterium is also a potential zoonotic agent, preventing its colonization of domestic animals should be a priority [10]. Among other alternative preventive strategies examined, the use of nontoxigenic *P. difficile* strains to prevent PDI has been shown to reduce the occurrence of the disease in humans and piglets by preventing their colonization by toxigenic strains [18–21].

There has been no report of the complete genome sequence of a nontoxigenic *P. difficile* strain, a necessary step in understanding this candidate live vaccine. Therefore, in this study, we determined the complete genome sequence of *P. difficile* nontoxigenic strain Z31.

Methods

Growth conditions and DNA isolation

Peptoclostridium difficile Z31, ribotype 009, a nontoxigenic strain isolated from a healthy dog on February 1, 2009, in the city of Belo Horizonte (state of Minas Gerais, Brazil), was selected for sequencing because it prevented PDI in hamster model [22], similar to some strains previously reported [23]. This strain was grown in Mueller–Hinton agar supplemented with 5 % blood and 0.1 % taurocholate at 37 °C under anaerobic conditions for 48–72 h. Its genomic DNA was extracted with the Maxwell 16[®] Research Instrument (Promega, USA) combined with lysozyme (10 mg/mL) and proteinase K (20 mg/mL). Briefly, cells were incubated overnight in lysozyme solution (10 mg/mL) at 37 °C. Proteinase K was added and the mixture was incubated at 56 °C for 30 min. According to the kit instructions: (i) the samples were lysed in the presence of a chaotropic agent and a detergent; (ii) the nucleic acids were bound to silica magnetic particles; (iii) the bound particles were washed, to isolate them from other cell components; and (iv) the nucleic acids were eluted into a formulation for sequencing. The extracted DNA was stored at –80 °C until analysis.

Genome sequencing and assembly

The genome was sequenced with the Ion Torrent PGM[™], in a mate-pair sequencing kit with an insert size of 3 kbp (~144-fold coverage) and with a fragment sequencing 400 bp kit (~318-fold coverage). The quality of the raw data was analyzed with FastQC [24] and the sequence was assembled with the Mira 4.9.1 software [25] and Newbler 2.9 (Roche, USA) for the fragment library, and

with SPAdes 3.5.0 [26] for the mate-pair library (the parameters for all the assembler software are shown in Additional file 1). This was the ab initio strategy applied to all libraries. The largest contigs obtained with Newbler and Mira were used as input, as trusted-contigs, in SPAdes. We obtained 20 scaffolds, with an N50 value of 698,574 bp, and the largest scaffold had a length size of 1691,449 bp. Gap filling was conducted with CLC Genomics Workbench 7 (Qiagen, USA), after the construction of a super scaffold with the CONTIGuator 2.0 software [27], using the default parameters and *P. difficile* strain CD196 (GenBank: NC_013315.1) as the reference. The gaps in the rRNA operon regions were filled by consensus mapping to the reference, and the remaining gaps were mapped recursively to the raw data on the gap flanks, and it was repeated several times until an overlap was found.

Genome annotation

The genome was annotated automatically with the Prokka 1.10 software (Rapid Bacterial Genome Annotation) [28], with the default parameters and nested databases in the order: TrEMBL Uniprot containing only (*Pepto*) *Clostridium* spp. proteins and RefSeq database. The genome was also curated manually in all putative frameshifts using the Artemis software [29], based on the coverage visualized with the CLC Genomics Workbench 7 software, with corrected indel assembly bias. Genes encoding signal peptides were identified with the SignalP 4.0 software [30] on a local installation, followed by the identification of transmembrane helices with Tmhmm 2.0 [31] and a Pfam domain search with PfamScan [32]. These three tools were used with their default parameters.

Multilocus sequence typing (MLST) and in silico PCR

MLST was performed with PubMLST (available at <http://pubmlst.org/cdifficile/>) using the complete genome sequence. An in silico PCR search for genes related to virulence factors and antimicrobial resistance was performed with the jPCR software [33], with the default parameters and the primer sets shown in Additional file 2.

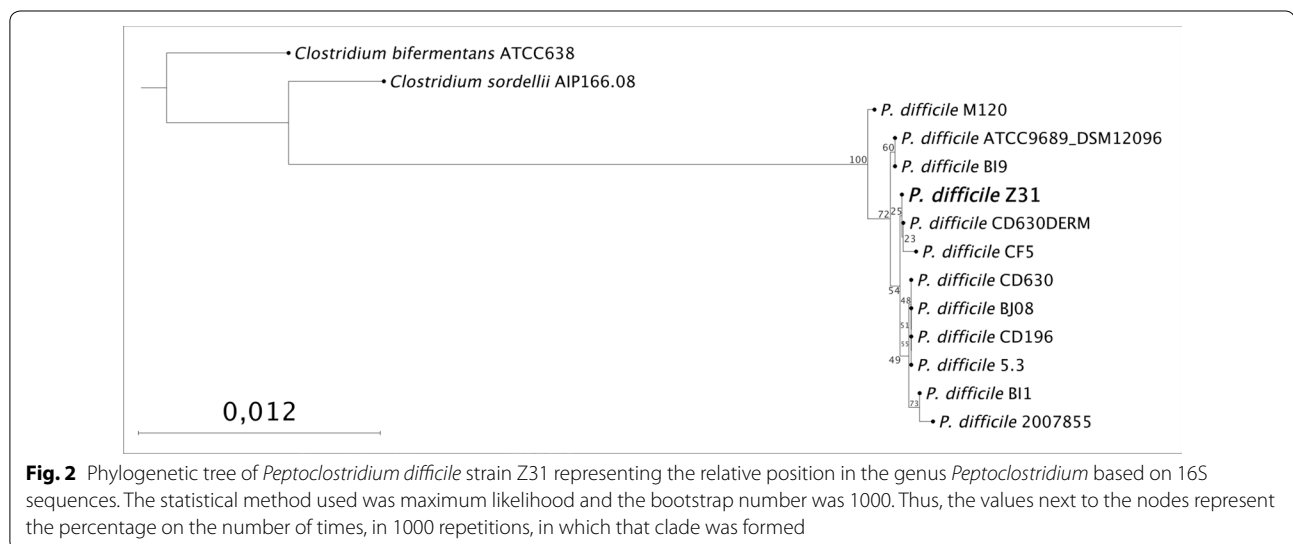
Quality assurance

Genomic DNA was isolated from a pure bacterial isolate and confirmed with 16S rRNA gene sequencing. All the raw sequencing data were mapped onto the final genome and the lack of contamination with other genomes was confirmed by the coverage and the low number of unmapped reads.

An alignment was constructed with the 16S rRNA sequence regions on the assembled scaffolds, predicted with the Barrnap software (available at <https://github.com/tseemann/barrnap>), and the 16S rRNA genes of genomes available in GenBank. A phylogenetic tree was constructed from this alignment with the neighbor-joining method based on 1000 randomly selected bootstrap replicates, using the CLC Genomic Workbench 7.0 software. On the tree, strain Z31 was positioned among other *P. difficile* strains (Fig. 2).

Results and discussion

After the genome assembly, gap filling, and annotation process, an in silico PCR was performed through searching for genes related to virulence factor, antibiotic resistance, and other known toxins. Considering the perspective of using the nontoxic strain Z31 to prevent PDI by competitive exclusion, some non-toxin virulence factors



are desirable, predominantly those factors responsible for spore production and stability and those that promote cell attachment and host colonization. Z31 is positive for Cwp84 and surface-layer protein A (SlpA). SlpA is considered the major factor responsible for bacterial intestinal adherence, and Cwp84 is essential for the formation of that protein [34, 35]. GroEL, Cwp66, and a fibronectin-binding protein (Fbp68), which are also important in host-cell adherence, were also found [34–38]. Strain Z31 was also positive for genes encoding the flagellar proteins FliC and FliD, which play roles in the colonization and adherence of Z31 in vivo and are essential in later stages of biofilm formation [39–41]. These factors found in Z31 related to cell attachment are extremely important, because non-toxicogenic strains have to be able to compete with toxicogenic strains by the colonization sites to prevent the disease [23].

The gene encoding the major regulator of sporulation in *P. difficile*, *Spo0A*, was detected in this strain. An absence or deficiency of *Spo0A* can cripple or impair the sporulation process [35, 42]. Genes encoding five spore coat proteins (*cotA*, *cotB*, *cotC*, *cotD*, and *sodA*) were also detected. The *cotA* protein is the most important protein in stabilizing the spore coat and ensures the integrity of this structure [43]. The formation of stable spores is also important for a nontoxicogenic strain candidate to prevent the disease, because the bacteria need to pass through the stomach and be able to colonize the colon [23]. Vegetative cells are sensible to low pH, on the other hand, the spores resist to this conditions, allowing a great number of viable particles reaches the colon [44]. Genes responsible for resistance to tetracycline (*tetM*) and erythromycin (*ermG*) were also detected with previously described PCR primers [45, 46]. In contrast, none of the genes encoding proteins directly linked to toxin production were detected (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, or *cdtB*) [47] confirming the absence of the pathogenicity locus (PaLoc), which is essential for *P. difficile* infection [48].

Furthermore, the complete genomes of this species available at GenBank were selected to perform a similarity analysis with Gegenees software [49] with sequence fragmentation length of 500 nucleotides and a threshold of 30 %. Also, two complete genomes of species of the *Clostridium* genus were included as an outgroup. The similarity matrix was used to generate a heatmap and a “nexus” format for phylogenomic analysis (Additional file 3). Although the Z31 strain is a nontoxicogenic strain, the Additional file 3 shows that clade of this strain is paraphyletic with the type strain ATCC9689, a known as toxicogenic strain, suggesting an evolutionary derivation of a same organism. Thereby, the nontoxicogenic behavior of the Z31 strain seems to be occasioned by the losses of the toxin genes.

Initial findings

The *P. difficile* genome is composed of a circular chromosome of 4298,263 bp. The GC content is 29.21 % and the genome contains 78 pseudogenes. Briefly, the genome has 4206 CDSs, and encodes 29 rRNAs, one transfer-messenger RNA (tmRNA), and 58 tRNAs. Table 1 summarizes the subset of the 3809 genes with predicted functions that are associated with each COG functional categories. In summary, 3324 genes were predicted to have Pfam domains, 166 to have signal peptides, and 1011 to have transmembrane helices. No CRISPR repeats were found. Figure 3 shows the disposition of RNAs and CDSs coding sequences on the forward and reverse strands, the GC content, and the GC skew.

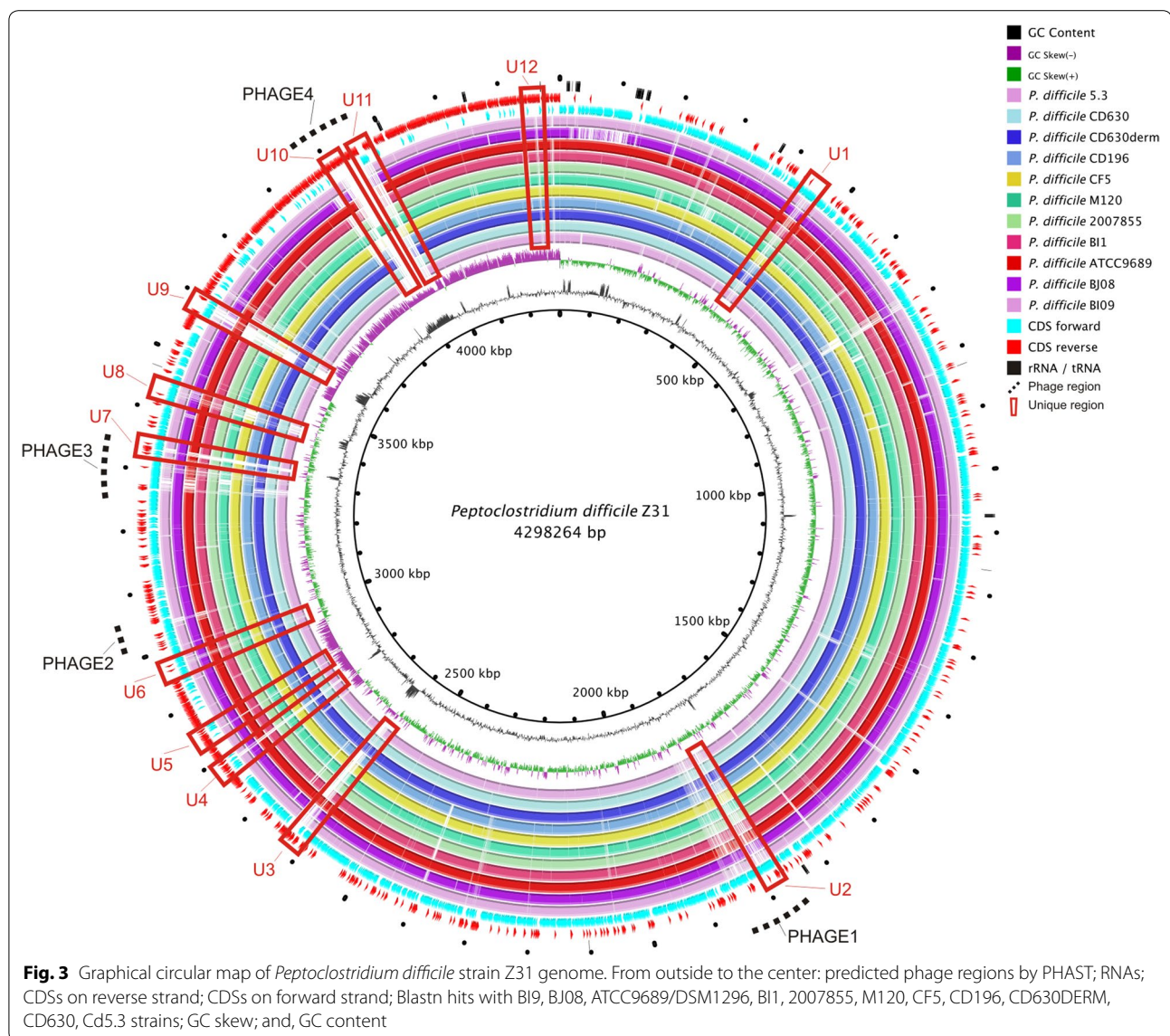
When the genome of Z31 was compared with those of other *P. difficile* strains deposited in GenBank [50], it showed high similarity to them

Table 1 Number of genes associated with general COG functional categories [55]

Code	Value ^b	%age ^a	Description
J	238	5.6585	Translation, ribosomal structure and biogenesis
A	0	0	RNA processing and modification
K	479	11.3884	Transcription
L	184	4.3747	Replication, recombination and repair
B	1	0.0237	Chromatin structure and dynamics
D	68	1.6167	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
V	134	3.1859	Defense mechanisms
T	327	7.7746	Signal transduction mechanisms
M	208	4.9453	Cell wall/membrane biogenesis
N	79	1.8782	Cell motility
U	40	0.9510	Intracellular trafficking and secretion
O	111	2.6390	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
C	219	5.2068	Energy production and conversion
G	310	7.3704	Carbohydrate transport and metabolism
E	321	7.6319	Amino acid transport and metabolism
F	93	2.2111	Nucleotide transport and metabolism
H	147	3.4950	Coenzyme transport and metabolism
I	89	2.1160	Lipid transport and metabolism
P	168	3.9942	Inorganic ion transport and metabolism
Q	57	1.3552	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	345	8.2025	General function prediction only
S	251	5.9676	Function unknown
–	2	0.0475	Not in COGs

^a The percentage is based on the total number of protein coding genes in the annotated genome

^b The total not correspond to the final quantity of CDSs for each genome, because some genes are associated with more than one COG functional categories



(95.50 ± 2.68 %—Additional file 3), with the exception of some genomic islands (Fig. 3), four of which were predicted with PHAST [51] to be phage regions. A brief description of these phages is given in Table 2.

A robust high-throughput MLST scheme for *P. difficile* was developed and validated [52], and allowed this species to be genotyped directly. Z31 was typed with MLST at loci *adk 1*, *atpA 1*, *dxr 2*, *glyA 1*, *recA 1*, *sodA 1*, and *tpi 1*, which classified this strain as ST3 in MLST clade 1. This result corroborates previous work, which reported that strains from PCR ribotype 009 are commonly classified as ST3 [53]. Strain Z31, *P. difficile* ATCC9689/DSM1296, and *P. difficile* BI9 were the only three ST3

strains identified among the strains whose complete genomes or near-complete genomes (e.g., one scaffold) are deposited in GenBank. However, Z31 contain some unique regions, as shown in Fig. 3 (U1–U12). In contrast, *P. difficile* 5.3, described as nontoxicogenic by Darling et al. [54], belongs to ST15, clade 1, a common classification for strains of PCR ribotype 010.

Future directions

Further analysis of the *P. difficile* Z31 genome will provide new information about the adaptation of this strain to the gastrointestinal tract, and new insights into its inhibition of toxigenic *P. difficile* strains.

Table 2 Phage summary predicted by PHAST

Number	Length (kbp)	Completeness	First common name	Keyword	GC content
Phage 1	96.3	Intact	Clostr_phi_CD119	Integrase, terminase, portal, head, capsid, tail, lysin, plate, and protease	28.9
Phage 2	24.1	Incomplete	Clostr_phi_CD119	Tail, lysin, and plate	27.9
Phage 3	63.6	Intact	Clostr_phiC2	Integrase, terminase, portal, head, capsid, tail, and lysin	28.6
Phage 4	138.1	Intact	Bacill_G	Protease, recombinase, tail, transposase, integrase, head, capsid, portal, and terminase	35.7

Availability of supporting data

This whole-genome shotgun sequence has been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number CP013196. The version described in this paper is the first version CP013196.1.

Additional files

Additional file 1. Assembler software (Mira, Newbler and SPAdes) parameters.

Additional file 2. Primer sets used on in silico PCR for genes related to virulence factor, antibiotic resistance, and other known toxins.

Additional file 3. Phylogenomic analysis performed using Gegenees.

Abbreviations

GC content: number of G and C nucleotides; rRNA: ribosomal RNA; PDI: *Peptoclostridium difficile* infection; PGM: Personal Genome Machine; tmRNA: transport-messenger RNA; tRNA: transport RNA; MLST: multilocus sequence typing.

Authors' contributions

FLP, HCPF, FAD, ROSS, and CAOJ drafted the manuscript. FAD, AFC, and GMFA performed the laboratory experiments. FLP, FAD, and AFC sequenced, assembled, and annotated the genome. FLP performed the bioinformatics analyses. HCPF and FCFI designed and coordinated all the experiments. All authors have read and approved the final manuscript.

Author details

¹ National Reference Laboratory for Aquatic Animal Diseases (AQUACEN), Ministry of Fisheries and Aquaculture, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ² Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³ Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Pesca e Aquicultura and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). We also acknowledge support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 20 November 2015 Accepted: 3 March 2016

Published online: 01 April 2016

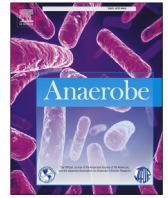
References

- Hall IC, O'toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficile*. Am J Dis Child. 1935. doi:10.1001/archpedi.1935.01970020105010.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved Lists of Bacterial Names. Int J Syst Bacteriol. 1980;30:225–420.
- Prévot AR. Études de systématique bactérienne IV. Critique de la conception actuelle du genre *Clostridium*. In: Cato EP, Hash DE, Holdeman LV et al, editors. Electrophoretic study of *Clostridium* species. J Clin Microbiol. 1982;15:668–702.
- Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. Environ Microbiol. 2013. doi:10.1111/1462-2920.12173.
- Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. Clin Microbiol Rev. 1990;3(1):66–98.
- George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y, Shinagawa N, Keighley MR, Alexander-Williams J, Burdon DW. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. Br Med J. 1978;1:695.
- Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet. 1978;1:1063–6.
- Khan FY, Elzouki AN. *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. Asian Pac J Trop Med. 2014. doi:10.1016/S1995-7645(14)60197-8.
- Ogielska M, Lanotte P, Le Brun C, Valentin AS, Garot D, Tellier AC, Halimi JM, Colombat P, Guilleminault L, Lioger B, Vegas H, De Toffol B, Constans T, Bernard L. Emergence of community-acquired *Clostridium difficile* infection: the experience of a French hospital and review of the literature. Int J Infect Dis. 2015. doi:10.1016/j.ijid.2015.06.007.
- Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. Vet Microbiol. 2010. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.003.
- Silva RO, D'Elia ML, Teixeira ÉP, Pereira PL, de Magalhães Soares DF, Cavalcanti ÁR, Kocuvan A, Rupnik M, Santos AL, Junior CA, Lobato FC. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. Anaerobe. 2014;31(28):207–11.
- Hopman NE, Keessen EC, Harmanus C, Sanders IM, van Leengoed LA, Kuijper EJ, Lipman LJ. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. Vet Microbiol. 2011. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.013.
- Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, Baier S, Harlizius J, Nienhoff H, Brase K, Zimmermann S, Seyboldt C. *Clostridium difficile* genotypes in piglet population in Germany. J Clin Microbiol. 2013. doi:10.1128/JCM.01440-13.
- Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. Anaerobe. 2006;12(1):1–4.
- Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease. Gut Microbes. 2010. doi:10.4161/gmic.1.1.10768.
- Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev. 2005. doi:10.1128/CMR.18.2.247-263.2005.
- Leuzzi R, Adamo R, Scarselli M. Vaccines against *Clostridium difficile*. Hum Vaccines Immunother. 2014. doi:10.4161/hv.28428.
- Songer JG, Jones R, Anderson MA, Barbara AJ, Post KW, Trinha HT. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive

- exclusion with nontoxicogenic organisms. *Vet Microbiol*. 2007. doi:[10.1016/j.vetmic.2007.04.019](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.019).
19. Merrigan MM, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. New approach to the management of *Clostridium difficile* infection: colonisation with non-toxicogenic *C. difficile* during daily ampicillin or ceftriaxone administration. *Int J Antimicrob Agents*. 2009. doi:[10.1016/S0924-8579\(09\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70017-2).
 20. Villano SA, Seiberling M, Tatarowicz W, Monnot-Chase E, Gerding DN. Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxicogenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. doi:[10.1128/AAC.00913-12](https://doi.org/10.1128/AAC.00913-12).
 21. Nagaro KJ, Phillips ST, Cheknis AK, Sambol SP, Zukowski WE, Johnson S, Gerding DN. Nontoxicogenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. doi:[10.1128/AAC.00580-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00580-13).
 22. Oliveira CA, Silva ROS, Diniz NA, Pires PS, Lobato FCF, Assis RA. Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain. *Cienc Rural*. 2016. doi:[10.1590/0103-8478cr20150454](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150454).
 23. Sambol SP, Merrigan MM, Tang JK, Johnson S, Gerding DN. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in Hamsters. *J Infect Dis*. 2002. doi:[10.1086/345676](https://doi.org/10.1086/345676).
 24. FastQC. Babraham Bioinformatics. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 2015. Accessed 07 Sept 2015.
 25. Chevreux B, Wetter T, Suhai S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Comput Sci Biol Proc Ger Conf Bioinform*. 1999;99:45–56.
 26. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, et al. Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. *Res Comput Mol Biol*. 2013;7821:158–70.
 27. Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med*. 2011. doi:[10.1186/1751-0473-6-11](https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11).
 28. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014. doi:[10.1093/bioinformatics/btu153](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153).
 29. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000;16:944–5.
 30. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011. doi:[10.1038/nmeth.1701](https://doi.org/10.1038/nmeth.1701).
 31. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1998;6:175–82.
 32. Mistry J, Bateman A, Finn RD. Predicting active site residue annotations in the Pfam database. *BMC Bioinform*. 2007. doi:[10.1186/1471-2105-8-298](https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-298).
 33. Kalendar R, Lee D, Schulman AH. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*. 2011. doi:[10.1016/j.ygeno.2011.04.009](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009).
 34. Merrigan MM, Venugopal A, Roxas JL, Anwar F, Mallozzi MJ, Roxas BAP, et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS One*. 2013. doi:[10.1371/journal.pone.0078404](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078404).
 35. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. *Clostridium difficile* virulence factors: insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*. 2014. doi:[10.4161/19490976.2014.969632](https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632).
 36. Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A, Collignon A, Barc M, Bourlioux P, Karjalainen T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology*. 2001;147(Pt 1):87–96.
 37. Waligora A, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun*. 2001. doi:[10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001).
 38. Lin Y, Kuo C, Koleci X, McDonough SP, Chang Y. Manganese binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and is essential for fibronectin binding. *J Biol Chem*. 2011. doi:[10.1074/jbc.M110.184523](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184523).
 39. Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, Kansau I, Collignon A, Minton NP. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS One*. 2013. doi:[10.1371/journal.pone.0073026](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026).
 40. Dapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehna SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*. 2013. doi:[10.1128/JB.01980-12](https://doi.org/10.1128/JB.01980-12).
 41. Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun*. 2011. doi:[10.1128/IAI.05305-11](https://doi.org/10.1128/IAI.05305-11).
 42. Mackin KE, Carter G, Howarth P, Rood JJ, Lyras D. Spo0A differentially regulates toxin production in evolutionarily diverse strains of *Clostridium difficile*. *PLoS One*. 2013. doi:[10.1371/journal.pone.0079666](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079666).
 43. Permpoonpattana P, Phetcharaburanin J, Mikelsone A, Dembek M, Tan S, Brisson MC, Ragione R, Brisson AR, Fairweather N, Hong HA, Cutting SM. Functional characterization of *Clostridium difficile* spore coat proteins. *J Bacteriol*. 2013. doi:[10.1128/JB.02104-12](https://doi.org/10.1128/JB.02104-12).
 44. Jump RLP, Pultz MJ, Donskey CJ. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. doi:[10.1128/AAC.01443-06](https://doi.org/10.1128/AAC.01443-06).
 45. Patterson AJ, Colangeli R, Spigaglia P, Scott KP. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by microarray detection. *Environ Microbiol*. 2007. doi:[10.1111/j.1462-2920.2006.01190.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01190.x).
 46. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. Detection of a genetic linkage between genes coding for resistance to tetracycline and erythromycin in *Clostridium difficile*. *Microb Drug Resist*. 2007. doi:[10.1089/mdr.2007.723](https://doi.org/10.1089/mdr.2007.723).
 47. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP. 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*. 2008. doi:[10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x).
 48. Dingle KE, Elliot B, Robinson E, Griffiths D, Eyre DW, Stoesser N, Vaughan A, Golubchik T, Fawley WN, Wilcox MH, Peto TE, Walker AS, Riley TV, Crook DW, Didelot X. Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. *Genome Biol Evol*. 2014. doi:[10.1093/gbe/evt204](https://doi.org/10.1093/gbe/evt204).
 49. Agren J, Sundström A, Häfström T, Segerman B. Gegenees: fragmented alignment of multiple genomes for determining phylogenomic distances and genetic signatures unique for specified target groups. *PLoS One*. 2012;7:e39107.
 50. GenBank. NCBI, USA. 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Accessed 22 Sept 2015.
 51. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucl Acids Res*. 2011. doi:[10.1093/nar/gkr485](https://doi.org/10.1093/nar/gkr485).
 52. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2010. doi:[10.1128/JCM.01796-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01796-09).
 53. Kurka H, Ehrenreich A, Ludwig W, Monot M, Rupnik M, Barbut F, Indra A, Dupuy B, Lieb W. Sequence similarity of *Clostridium difficile* strains by analysis of conserved genes and genome content is reflected by their ribotype affiliation. *PLoS One*. 2014. doi:[10.1371/journal.pone.0086535](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086535).
 54. Darling AE, Worden P, Chapman TA, Chowdhury PR, Charles IG, Djordjevic SP. The genome of *Clostridium difficile* 5.3. *Gut Pathogens*. 2014. doi:[10.1186/1757-4749-6-4](https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-4).
 55. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EVA. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucl Acids Res*. 2015. doi:[10.1093/nar/gku1223](https://doi.org/10.1093/nar/gku1223).

9.1.2. Artigo publicado referente ao capítulo 2

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* The non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets. *Anaerobe*, v. 55, p. 24-28, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30292822>>.



Anaerobes in animal disease

The non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets

Carlos Augusto Oliveira Júnior, Rodrigo Otávio Silveira Silva*,
Diogo Soares Gonçalves Cruz, Isadora Honorato Pires, Roberto Maurício Carvalho Guedes,
Francisco Carlos Faria Lobato

Veterinary School, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Antônio Carlos Avenue, 6627, 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2018
Received in revised form
3 October 2018
Accepted 3 October 2018
Available online 4 October 2018

Handling Editor: Christine Coursodon
Boydiddle

Keywords:

Neonatal diarrhea
Clostridium difficile
Probiotic

ABSTRACT

One of the main challenges associated with *Clostridioides difficile* infection (CDI) in humans and domestic animals is the lack of an effective preventive strategy. One strategy with promising results is the oral administration of non-toxigenic strains of *C. difficile* (NTCD). Recently, Z31, a NTCD strain isolated from a healthy dog, showed promising results to prevent CDI in hamsters. Thus, the present study aimed to evaluate the capacity of Z31 to prevent CDI in piglets using an experimental model. Twenty neonatal piglets were randomly distributed in three groups: G1 - 10^6 spores of Z31 followed by 10^7 spores of a toxigenic *C. difficile* strain ($n = 7$), G2 (positive control) - 10^7 spores of a toxigenic *C. difficile* strain ($n = 7$), and G3 (negative control) - no biological inoculum ($n = 6$). All animals were kept in individual insulators and observed for 60 h. Data regarding clinical signs, macro and microscopic lesions, toxigenic culture of *C. difficile*, and detection of A/B toxins in the feces were evaluated. All evaluated parameters were significantly lower in animals that received Z31 compared to the positive control. Thus, oral administration of Z31 was able to prevent CDI in piglets in an experimental model.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Clostridioides (previously *Clostridium*) *difficile* is the main infectious agent associated with antibiotic-associated diarrhea in humans [6]. In animals, *C. difficile* is recognized as enteropathogen of several species including swine, in which it is known as an important cause of neonatal diarrhea worldwide [30]; [5]. In addition, recent studies have shown substantial similarities between human and swine *C. difficile* isolates, suggesting possible zoonotic transmission and making the prevention of this disease in animals a priority [11,32].

Despite the importance of *C. difficile* as a swine enteropathogen and its zoonotic potential, the control of *C. difficile* infection (CDI) in pigs is based mostly on biosecurity and general management measures [1,21,25]. Thus, studies have focused on possible preventive strategies, including monoclonal antibodies, vaccines, and probiotics [3,16,20,31,34]; however, there has been no specific commercial method available for preventing CDI in swine. Among

the preventive strategies, the administration of non-toxigenic strains of *C. difficile* (NTCD) is emerging as a promising method for prevention of intestinal colonization of toxigenic strains of *C. difficile* [9,31]. In the last few years, Z31, a NTCD isolated from a healthy dog, has been evaluated for its possible use as a product to prevent CDI in swine. Z31 has been characterized by whole genome sequencing, which revealed the presence of several important genes related to colonization and sporulation [23]. In addition, the ability of Z31 to prevent CDI was demonstrated in a hamster experimental model [22]. Thus, the aim of this work was to evaluate the capacity of Z31 to prevent CDI in piglets using an experimental model.

2. Material and methods

2.1. Strains

The NTCD strain Z31 was isolated from a healthy dog in Belo Horizonte (Brazil), in February 2009 [26]. NTCD Z31 was previously classified as ribotype (RT) 009 and strain type (ST) 3 by multilocus sequence typing (MLST) [10,23,28]. The complete sequence of NTCD Z31 lacked toxin genes (*tcdA*, *tcdB*, *cdtB*, and *cdtA*) and had

* Corresponding author.

E-mail address: rodrigo.otaviosilva@gmail.com (R.O.S. Silva).

virulence genes related to intestinal colonization (*slpA*, *cwp84*, *groEL*, and *cwp66*), biofilm formation (*fliC* and *fliD*), and sporulation (*Spo0A*, *cotA*, *cotB*, *cotC*, and *cotD*) [23]. In a hamster model, Z31 prevented CDI in 100% of the exposed animals [22]. The toxigenic strain used in the challenge of piglets in the present study, named 283, is positive for *tcdA* and *tcdB* but negative for binary toxin-encoding genes. This strain was isolated in 2014 from a piglet with confirmed CDI in Belo Horizonte (Brazil) and was classified as RT014/020 (ST 14). Spore suspension of both strains were prepared as previously described [22].

2.2. Animals, housing, and manipulation

Experimental methods were approved by the institutional ethics committee (CEUA-UFGM), protocol 013/2014. The piglet model used in the present study was based on previous reports with some modifications to adapt it to our experimental design and available facilities [2,17]. Briefly, neonatal piglets were obtained from two cross-bred sows from the University farm (Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, Igarapé, Brazil). Sows were kept in farrowing crates and when the signs of parturition were observed, the animals were washed with water and soap, dried, and antisepsis was performed with iodinated alcohol (1.0%) and glycerin (2.0%) hourly. Piglets of birth order two until 11 from each sow were enrolled in this study, summing up to a total of twenty neonatal piglets. Immediately after birth, piglets were dried and umbilical cords were clamped, cut, and treated with iodine solution (5.0%). Each piglet then received 15 mL of a pool of colostrum previously collected from sows of the same farm before being randomized into three different groups: G1 (treated; n = 7), G2 (positive control; n = 7), and G3 (negative control; n = 6) (Fig. 1). During the experiment, piglets were fed five times a day in regular intervals with 40 mL of commercial puppy milk replacer BabySuin (NutriSuin, Netherlands). Sterilized water was provided *ad libitum* during the experiment. Piglets were housed individually in raised decks (0.9 × 0.7 × 0.5 m) made of aluminum covered with a thin fine screen to allow for air to enter. The decks were maintained in two different rooms previously subjected to fumigation. The temperature of both rooms was maintained between 27 and 30 °C and heat lamps were suspended over insulators to keep the internal

temperature of insulators between 31 and 35 °C [17]. To avoid cross-contamination, three separate teams were designated to work in each group. All participants had a specific set of personal protective equipment composed of clothes and boots. Piglets were handled one by one with a pair of disposable procedure gloves for each animal. Each group had a set of specific instruments, all of which were sterilized by autoclaving [17].

2.3. Experimental design and inoculation

Immediately after administration of colostrum, animals from G1 received 1.0 mL of a solution containing 10^6 spores of NTCD Z31 orally. Twelve hours after birth, animals from G1 and G2 received 1.0 mL of a solution containing 10^7 spores of the toxigenic strain (challenge) orally. Non-treated or non-challenged animals received 1.0 mL of sterilized saline solution (0.9%) orally when applicable (Fig. 1).

2.4. Clinical evaluation, necropsy, and sample collection

Hydration status and consistency of feces were evaluated at four timepoints: 10, 24, 48, and 60 h after birth (Fig. 1). At 60 h, body condition and perineal fecal staining were also evaluated according to previously described studies [2,35]. After the last evaluation at 60 h, all animals were euthanized by electrical desensitization followed by exsanguination. During necropsy, piglets were evaluated for the occurrence of visible mesocolonic edema and luminal colonic necrosis, which are the main gross signs in piglets with CDI [17,35]. Fecal samples were collected from all animals at 10, 24, 48, and 60 h after birth. In addition, during *postmortem* evaluation, five samples from the colon were collected from each animal for histopathological analysis by a veterinary pathologist blind to the treatment groups.

2.5. Bacterial culture and A/B toxin detection

Stool samples were submitted for isolation of *C. difficile* [27] and A/B toxin detection by a commercial enzyme immunoassay (EIA) (*C. difficile* Tox A/B II; Techlab Inc., USA). All isolates were subjected to a multiplex PCR for a housekeeping gene (*tpi*), toxin A- (*tcdA*), toxin B- (*tcdB*), and a binary toxin-encoding gene (*cdtB*) [24]. NTCD isolates were submitted for PCR ribotyping according to the method by Ref. [12].

2.6. Scoring

Five parameters were evaluated for scoring and comparing treatment groups in the present study: 1) clinical signs, 2) gross lesions 3) microscopic lesions, 4) toxigenic culture of *C. difficile*, and 5) detection of A/B toxins. Scores of clinical signs were obtained by evaluating hydration (normal, mild, moderate, or severe) and fecal consistency (normal, pudding-like, or watery) at 10, 24, 48, and 60 h after birth. At 60 h, body condition and perineal fecal staining were also included in the analysis of clinical signs, as previously described [2]. The gross lesions evaluated were mesocolonic edema, which was determined by the distance between loops (absent, mild, moderate, or severe), and visible luminal necrosis (absent, mild, moderate, or severe) [2,35]. For microscopic lesions, goblet cell loss, polymorphonuclear neutrophil (PMN) infiltration in the lamina propria, colonic mucosal epithelial alterations, and mesenteritis were evaluated following the criteria established by Lizer et al. [17]. In addition, mesocolonic and submucosal edema were classified by microscopy according to its intensity (absent, discreet, mild, moderate, or severe). Toxigenic culture and A/B toxin detection results were considered dichotomic, with positive and

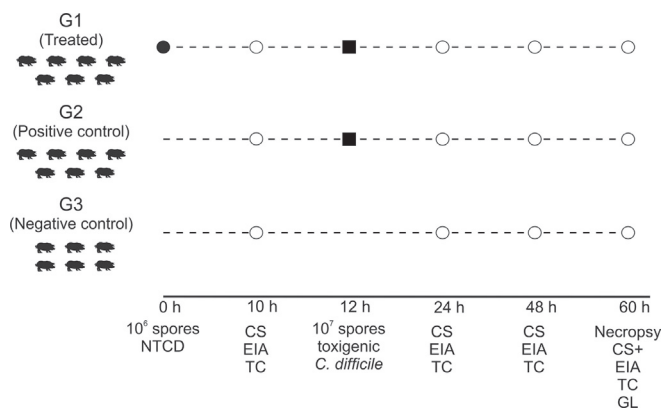


Fig. 1. Experimental design used to evaluate the protective effect of the non-toxicogenic strain of *C. difficile* (NTCD) Z31 against challenge with a toxigenic strain of *C. difficile* in neonatal piglets. CS: clinical signs, including hydration status and consistency of feces; CS+: clinical signs, including hydration status, consistency of feces, body condition, and perineal fecal staining; EIA: enzyme immunoassay for A/B toxin detection; GL: gross lesions, including mesocolonic edema and visible necrosis of lumen; NTCD: non-toxicogenic strain of *C. difficile*; TC: toxigenic culture of *C. difficile*; dark circles: NTCD inoculum; white circles: evaluations, dark squares: challenge with toxigenic strain of *C. difficile*.

negative results in each timepoint of the study.

All parameters were evaluated 60 h after birth. Parameters 1, 4, and 5 were also evaluated at 10, 24, and 48 h. Scores for evaluation after challenge were obtained by 1) summing of scores of evaluated characteristics at 24, 48, and 60 h, 4) summing the detection of toxigenic *C. difficile* isolates from each animal at 24, 48, and 60 h, considering 1 for positive and 0 for negative results, and 5) summing all A/B toxin detection results performed at 24, 48, and 60 h, considering 1 for positive and 0 for negative results.

2.7. Statistical analysis

Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* test were used to analyze scores of clinical signs, gross lesions, microscopic lesions, toxigenic culture and detection of A/B toxins by EIA. EIA results and detection of toxigenic *C. difficile* at each timepoint were analyzed by Fisher's exact test. Correlations among clinical signs, gross lesions, microscopic lesions, toxigenic culture, and A/B toxin detection results were assessed by Spearman's rank correlation coefficient. Tests were performed in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA). Comparisons between G2 and G3 were used to evaluate the experimental models, while comparisons between G1 and the other groups were performed to evaluate the efficacy of strain NTCZ31 to prevent CDI.

3. Results

3.1. Clinical signs

Before the challenge with the toxigenic *C. difficile* strain (10 h), all animals were hydrated and almost all showed normal fecal consistency without significant statistical differences among groups. At 24 and 48 h after birth, all animals from G2 had diarrhea varying from pudding-like to watery fecal consistency. Five out of seven animals were also mildly dehydrated, while animals from G1 and G3 presented feces that were normal to pudding-like and had no signs of dehydration. Piglets from G2 had higher scores of clinical signs than G1 and G3 at 24 h ($P = 0.028$, G1; $P = 0.009$, G3) and 48 h ($P = 0.041$, G1; $P = 0.009$, G3). On the other hand, these scores were similar between G1 and G3 in both timepoints ($P = 0.825$, 24 h; $P = 0.592$, 48 h).

At 60 h, scores of all evaluated parameters were higher in animals from G2 compared to those in G1 and G3; however, statistical differences were found only between G2 and G3 ($P = 0.032$). Considering the results after challenge (summing of scores from 24, 48, and 60 h), animals of G2 had more clinical signs compared to the other groups ($P = 0.005$, G1; $P = 0.006$, G3), while G1 and G3 did not have statistical differences ($P = 0.999$) (Fig. 2).

3.2. Pathology

Mesocolonic edema varying from mild to moderate was observed in six animals during necropsy, one from G1 and five from G2. Although mesocolonic edema was found in one animal from G1, this group differed from G2 ($P = 0.037$) but was similar to G3 ($P = 0.998$) (Fig. 3). Visible luminal necrosis was not found in any animal.

Upon histological analysis, five animals had mesocolonic edema in at least one fragment of the colon, varying from discrete to moderate (Fig. 3). Discrete submucosal edema was also observed in two out of five animals. All animals with microscopic lesions belonged to G2, being more prominent compared to those in G1 ($P = 0.021$).

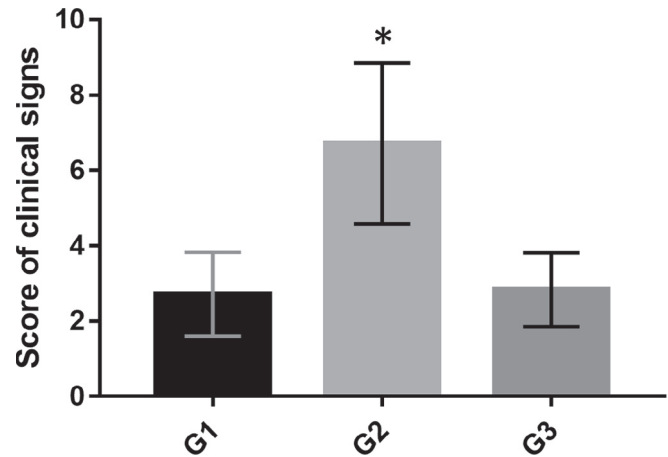


Fig. 2. Clinical signs scores of piglets measured after challenge (summing of timepoints 24, 48, and 60 h). Fecal consistency, hydration status, body condition, and fecal staining of perineum were considered. Asterisk indicates statistical difference determined by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* test ($p < 0.05$).

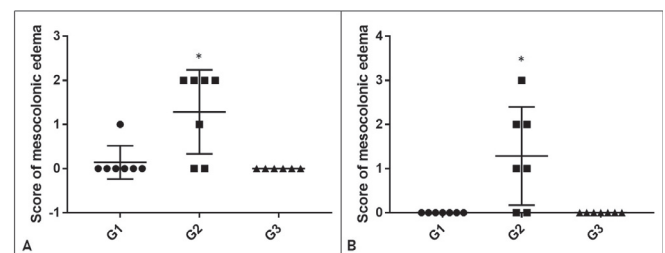


Fig. 3. Scores of mesocolonic edema observed during necropsy (A) and through histopathology (B). Asterisk indicates statistical difference determined by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* test ($p < 0.05$).

3.3. A/B toxin detection

Before challenge (10 h) no fecal sample was positive for *C. difficile* toxins. From 24 h after birth until the end of experiment, ten samples were positive for *C. difficile* toxins, all of which were from animals of G2. It was possible to identify differences between G1 and G2 at 48 h ($P = 0.020$). Considering the results after challenge (24, 48, and 60 h), toxins detected in animals from G2 were higher compared to those in G1 ($P = 0.001$).

3.4. Bacterial culture

Non-toxigenic *C. difficile* were isolated in 16 samples from 24 h until the end of the experiment, all of which were from G1 and were classified as ribotype 009. Toxigenic *C. difficile* was isolated in 13 samples from eight animals (G1 $n = 1$, G2 $n = 7$) from 24 h until the end of experiment. No *C. difficile* was isolated from G3. Fig. 4 summarizes the results of culture of *C. difficile* in each timepoint. Animals from G2 were more likely to be positive for toxigenic *C. difficile* at 48 h ($P = 0.002$), 60 h ($P < 0.001$), and after challenge ($P = 0.009$).

3.5. Correlations among tested parameters

Correlations among tested parameters are summarized in Table 1. Based on Spearman coefficients, toxin detection and toxigenic culture showed the best correlation in this study, while gross and microscopic lesions were also highly correlated. All the other

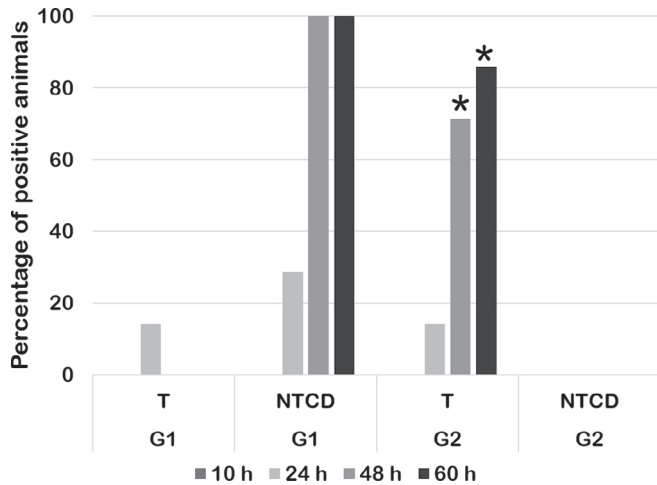


Fig. 4. Detection of toxigenic and non-toxicogenic *C. difficile* isolates in G1 and G2 at different timepoints in the experiment. Asterisk indicates statistical difference between groups determined by Fisher's exact test ($p < 0.05$). G1 – animals that received NTCD Z31; G2 – positive control; T: toxigenic *C. difficile* strains; NTCD: non-toxicogenic *C. difficile* strain.

Table 1

Correlations among toxin detection (EIA), toxigenic *C. difficile* (TC), clinical signs (CS), gross lesions (GL) and microscopic lesions (ML) observed in piglets. P: P value; SC: Spearman coefficient.

Parameters	EIA		TC		CS		ML	
	P	SC	P	SC	P	SC	P	SC
GL	0.010	0.562	0.020	0.515	0.011	0.555	<0.001	0.888
ML	0.001	0.671	0.007	0.588	<0.001	0.746		
CS	<0.001	0.694	0.005	0.599				
TC	<0.001	0.903						

parameters evaluated were also positively correlated ($p < 0.05$).

4. Discussion

C. difficile is an important enteropathogen in neonatal piglets and the lack of an effective method to prevent CDI hinders its control [5]; [21]. In addition to the direct losses associated with CDI in swine, there is also an increasing concern regarding the zoonotic transmission of toxigenic *C. difficile* from these animals to humans [11,32]. From the latest advances in the prevention of CDI, the administration of NTCD strains stands out as one of the most promising methods for the prevention of intestinal colonization by toxigenic strains [16]. In the present study, a NTCD (Z31) genetically and phenotypically characterized and previously tested in a hamster model [22] [23]; was evaluated in a piglet model based on previous studies [2,17,33].

The piglet model used in the present work was adapted from other studies [2,17]. Even though some piglets from the negative control group (G3) showed some of the clinical signs evaluated, the clinical scores remained statistically lower than those from the positive control (G2) in all timepoints. In addition, all animals from G3 were negative for mesocolonic edema, A/B toxin, and toxigenic *C. difficile*. Interestingly, in previous studies, piglets from negative control groups were positive for A/B toxins and showed some characteristic lesions of CDI, which were attributed to cross-contamination between groups during the experiment or to previous *C. difficile* infections of piglets in origin farms [2,17]. In the present study, control groups were kept in separate rooms, similar to that reported by Ref. [2]. In addition, separate teams and

equipment were designated to these animals; together, these measures helped avoid cross-contamination. It should also be highlighted that the piglets were obtained from the university farm, which had no history of CDI. Obtaining piglets free of *C. difficile* is a known limitation of this model, since the prevalence of disease among farms is high and surgical procedures, as used by Ref. [17]; are not always possible.

Dosage of NTCD (10^6 spores orally per animal) was based on previously published studies [3,31] [22]; and was in accordance with the dose suggested by Gerding [7]; which was between 10^4 and 10^8 spores per kg. On the other hand, the dosage of toxigenic *C. difficile* strain used in challenge (10^7 spores per animal) was based on studies with swine that successfully developed CDI using challenge doses varying from 2×10^3 to 2.5×10^9 [2,3,17,33]. It is believed that higher dosages would induce more lesions and clinical signs of CDI [2]; however, due to the use of different toxigenic strains and variations on the challenge protocol, including the use of conventional or gnotobiotic animals in some studies, the present study could not be comparable to previous works. G2, which received only toxigenic spores of *C. difficile*, had statistically higher scores in all evaluated parameters when compared to the negative control group (G3), suggesting that the challenge dose was efficient in reproducing CDI in these animals.

In the present study, typical clinical signs associated with CDI were also evaluated to better understand the ability of Z31 to prevent the disease. Interestingly, oral administration of Z31 effectively reduced CDI clinical signs in piglets, with G1 and the negative control (G3) groups having similar but lower scores compared to the positive control (G2) group in all timepoints. *C. difficile* is a known cause of neonatal diarrhea in piglets, and a reduction of clinical signs in these animals would be an important factor to improve animal health and production in these farms [25,29]. Notably, previous studies on CDI using conventional piglets reported difficulties finding differences in clinical signs between infected and non-infected animals [2,35]. On the other hand [33], reported the development of severe clinical signs which sometimes turned out fatal in gnotobiotic piglets challenged with an epidemic *C. difficile* strain (ribotype 027). Using a NTCD to protect against CDI in piglets, Arruda et al. [3] found a slight decrease in the hydration condition of non-protected animals. This result was also observed in our study; however, all non-treated animals showed a loss of body condition and altered fecal consistency, different from what was observed by Arruda et al. [3]. These differences can be attributed to the challenge dose used, which was 5 times higher than the previous study, or to the differences in susceptibility of the animals used.

In addition to the reduction of clinical signs related to CDI, Z31 also reduced the occurrence of mesocolonic edema in piglets, similar to the findings of Arruda et al. [3]. Even though mesocolonic edema is not pathognomonic of CDI, it is the most common lesion associated with this disease in piglets [4,35]. Interestingly, no other microscopic lesion was found in the present study, in contrast with previous studies using conventional piglets [2,3,17]. Notably, the strain used in previous studies was ribotype 078, which is *cdt+*, unlike the strain used in our study [17]. The role of CDT toxin in CDI is currently unclear; however, in humans, *cdt+* strains are responsible for more severe cases of CDI [8]. There have been no studies comparing CDI lesions caused by different strains in piglets.

C. difficile A/B toxins were not detected after challenge in any piglet that received Z31. Considering that diagnosis of CDI in swine is based on A/B toxin detection [30], the present study confirms that the administration of Z31 prevents the occurrence of CDI in a piglet model. This result is in accordance with previous studies that reported that the administration of a NTCD strain in piglets was responsible for a reduction in the occurrence of CDI [3,31]. Another interesting observation in the present study was the reduction of

fecal shedding of toxigenic *C. difficile* in all animals that received Z31. This finding is in accordance with previous studies suggesting that competitive exclusion is the most important mechanism involved in the protection conferred by NTCD strains [31]. Other hypotheses for this effect include immune modulation and quorum sensing [3,9,19]. These results are promising because, considering the possible zoonotic transmission of *C. difficile* strains, it is desirable to prevent not only the occurrence of clinical signs and intestinal lesions in swine, but also the colonization and fecal shedding of toxigenic isolates [11,32].

Notably, all parameters evaluated in the present study, including toxin detection, presence of toxigenic *C. difficile*, clinical signs, gross lesions, and microscopic lesions, were positively correlated. In a previous study, Arruda et al. [3] found a correlation between mesocolonic edema, histologic lesions, and A/B toxin detection by EIA. These results showed that the parameters varied together, suggesting that they can be adequate for evaluating the protection conferred by a NTCD strain in piglets. Among these parameters, A/B toxin detection and toxigenic culture are practical and can be performed in live animals. In addition, studies have shown that either direct culture or a two-step algorithm, such as association of toxin detection and toxigenic culture, are suggested for laboratory-based diagnostic methods for CDI in piglets [13,14]. In line with this, these two parameters can be used together to evaluate the efficacy of Z31 to prevent CDI in farms with infected animals.

5. Conclusion

Administration of strain Z31 in conventional piglets in an experimental model of CDI prevented the detection of A/B toxin detection in these animals. In addition, it reduced the fecal shedding of toxigenic *C. difficile* and the occurrence of clinical signs and *postmortem* alterations associated with CDI in piglets.

Funding

This work was supported by PRPQ, UFMG, FAPEMIG, Capes/Proex and CNPq.

Acknowledgments

The authors thank UNESP-Botucatu for giving away the isolators for the experiment.

References

- [1] S. Alvarez-Perez, J.L. Blanco, E. Bouza, P. Alba, X. Gibert, J. Maldonado, M.E. Garcia, Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets, *Vet. Microbiol.* 137 (2009) 302–305.
- [2] P.H. Arruda, D.M. Madson, A. Ramirez, E. Rowe, J.T. Lizer, J.G. Songer, Effect of age, dose and antibiotic therapy on development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets, *Anaerobe* 22 (2013) 104–110.
- [3] P.H. Arruda, D.M. Madson, A. Ramirez, E.W. Rowe, J.G. Songer, Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs, *Can. Vet. J.* 57 (2016) 183–188.
- [4] J.A. Cappuccio, M.A. Quiroga, F.A. Moredo, L.F. Canigia, M. Machuca, O. Capponi, A. Bianchini, G. Zielinski, J. Sarradell, M. Ibar, G.B. Vigo, G. Giacoboni, C.J. Perfumo, Neonatal piglets mesocolon edema and colitis due to *Clostridium difficile* infection: prevalence, clinical disease and pathological studies, *BJVP* 2 (1) (2009) 35–40.
- [5] E.C. Cruz Júnior, F.M. Salvarani, R.O.S. Silva, M.X. Silva, F.C.F. Lobato, R.M.C. Guedes, A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil, *Pesqui. Vet. Bras.* 33 (8) (2013) 963–969.
- [6] S.R. Curry, *Clostridium difficile*, *Clin. Lab. Med.* 37 (2) (2017) 341–369.
- [7] D.N. Gerding, 680 N. Lakeshore Dr., Chicago, IL (US) 60611. Methods and Compositions for Prevention and Treatment of *Clostridium difficile*-associated Diseases. In: Cl. 7 US 6,635,260 B1. Oct. 21, 2003. (United States Patent).
- [8] D.N. Gerding, S. Johnson, M. Rupnik, K. Aktories, *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance, *Gut* 53 (1) (2014) 15–27.
- [9] D.N. Gerding, T. Meyer, C. Lee, S.H. Cohen, U.K. Murthy, A. Poirier, T.C. Van Schooneveld, D.S. Pardi, A. Ramos, M.A. Barron, H. Chen, S. Villano, Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: a randomized clinical trial, *J. Am. Med. Assoc.* 313 (17) (2015) 1719–1727.
- [10] D. Griffiths, W. Fawley, M. Kachrimanidou, R. Bowden, D.W. Crook, R. Fung, T. Golubchik, R.M. Harding, K.J.M. Jeffery, K.A. Jolley, R. Kirton, T.E. Peto, G. Rees, N. Stroesser, A. Vaughan, A.S. Walker, B.C. Young, M. Wilcox, K.E. Dingle, Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 770–778.
- [11] M.P.M. Hensgens, E.C. Keessen, M.M. Squire, T.V. Riley, M.G.J. Koene, E. De Boer, L.J.A. Lipman, E.J. Kuijper, *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) 635–645.
- [12] S. Janezic, M. Rupnik, Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping, in: P. Mullany, A.P. Roberts (Eds.), *Clostridium difficile*, Methods and Protocols, Springer Protocols - Methods in Molecular Biology, Ed., in: J.M. Walker (Ed.) vol. 646, Humana Press, London, 2010, pp. 55–66. Series.
- [13] E.C. Keessen, N.E. Hopman, L.A. van Leengoed, A.J. van Asten, C. Hermanus, E.J. Kuijper, L.J. Lipman, Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets, *J. Clin. Microbiol.* 49 (5) (2011) 1816–1821.
- [14] D.R. Knight, M. Squire, T.V. Riley, Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia, *J. Clin. Microbiol.* 52 (11) (2014) 3856–3862.
- [16] L.K. Kocielek, D.N. Gerding, Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (3) (2016) 150–160.
- [17] J.T. Lizer, D.M. Madson, K.J. Schwartz, D.L. Hank Harris, B.T. Bosworth, J.M. Kinyon, A. Ramirez, Experimental infection of conventional neonatal pigs with *Clostridium difficile*: a new model, *JSHAP* 21 (1) (2013) 22–29.
- [19] M. Merrigan, A. Venugopal, M. Mallozzi, B. Roxas, V.K. Viswanathan, S. Johnson, D.N. Gerding, G. Vedantam, Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production, *J. Bacteriol.* 192 (19) (2010) 4904–4911.
- [20] A. Mizrahi, A. Collignon, S. Péchiné, Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: state of the art, *Anaerobe* 30 (2014) 210–219.
- [21] P. Moono, N.F. Foster, D.J. Hampson, D.R. Knight, L.E. Bloomfield, T.V. Riley, *Clostridium difficile* in production animals and avian species: a review, *Foodb. Pathog. Dis.* 13 (12) (2016) 647–655.
- [22] C.A. Oliveira Júnior, R.O.S. Silva, A.N. Diniz, P.S. Pires, F.C.F. Lobato, R.A. Assis, Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain, *Ciência Rural*. 46 (5) (2016) 853–859.
- [23] F.L. Pereira, C.A. Oliveira Júnior, R.O.S. Silva, F.A. Dorella, A.F. Carvalho, G.M.F. Almeida, C.A.G. Leal, F.C.F. Lobato, H.C.P. Figueiredo, Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31, *Gut Pathog.* 8 (2016) 11.
- [24] R.O.S. Silva, F.M. Salvarani, E.C.C. Cruz Junior, P.S. Pires, R.L.R. Santos, R.A. Assis, R.M.C. Guedes, F.C.F. Lobato, Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil, *Ciência Rural*. 41 (8) (2011) 1130–1135.
- [25] R.O.S. Silva, R.M.C. Guedes, F.C.F. Lobato, *Clostridium difficile*: main features and occurrence in domestic species in Brazil, *Cienc. Rural Times* 43 (1) (2013a) 73–80.
- [26] R.O.S. Silva, R.L.R. Santos, P.S. Pires, L.C. Pereira, S.T. Pereira, M.C. Duarte, R.A. Assis, F.C.F. Lobato, Detection of toxins A/and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in minas gerais, Brazil, *Braz. J. Microbiol.* 44 (1) (2013b) 133–137.
- [27] R.O. Silva, M.G. Ribeiro, M.S. Palhares, A.S. Borges, R.P. Maranhão, M.X. Silva, T.M. Lucas, G. Olivo, F.C. Lobato, Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals, *Equine Vet. J.* 45 (6) (2013c) 671–675.
- [28] R.O.S. Silva, M. Rupnik, A.N. Diniz, E.G. Vilela, F.C.F. Lobato, *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110 (8) (2015) 1062–1065.
- [29] J.G. Songer, The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals, *Anim. Health Res. Rev.* 5 (2) (2004) 321–326.
- [30] J.G. Songer, M.A. Anderson, *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals, *Anaerobe* 12 (1) (2006) 1–4.
- [31] J.G. Songer, R. Jones, M.A. Anderson, A.J. Barbara, K.W. Post, H.T. Trinh, Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms, *Vet. Microbiol.* 124 (3–4) (2007) 358–361.
- [32] M.M. Squire, T.V. Riley, *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a 'One Health' opportunity, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 365 (2013) 299–314.
- [33] J. Steele, H. Feng, N. Parry, S. Tzipori, Piglet models for acute or chronic *Clostridium difficile* illness CDI, *J. Infect. Dis.* 201 (3) (2010) 428–434.
- [34] J. Steele, J. Mukherjee, N. Parry, S. Tzipori, Antibody against TcdB, but not TcdA, prevents development of gastrointestinal and systemic *Clostridium difficile* disease, *J. Infect. Dis.* 207 (2) (2013) 323–330.
- [35] M.J. Yaeger, J.M. Kinyon, J.G. 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.* 19 (1) (2007) 52–59.

9.1.3. Artigo publicado referente ao capítulo 3

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm. *Veterinary Microbiology*, v. 231, p. 1-6, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113518313646>>.



Non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm

C.A. Oliveira Júnior^a, R.O.S. Silva^{a,*}, A.P. Lage^a, F.M. Coura^a, C.P. Ramos^a, A.A. Alfieri^b, R.M.C. Guedes^a, F.C.F. Lobato^a

^a Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, CEP 31.270-901, Brazil

^b Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Londrina, PR, CEP 86.057-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Clostridium difficile
Clostridium perfringens
Escherichia coli
 Neonatal porcine diarrhea
 Probiotic

ABSTRACT

Neonatal porcine diarrhea (NPD) is a current problem on pig farms and is caused by several enteropathogens. Among them, *Clostridioides difficile* stands out due to its importance in piglets and zoonotic potential. A non-toxicogenic strain of *C. difficile* (NTCD), named Z31, was previously tested in hamster and piglet experimental models as a strategy to prevent *C. difficile* infection (CDI). To evaluate the capacity of the strain Z31 to prevent CDI and NPD in one-day-old piglets on a commercial farm, 90 piglets from 16 litters received 1×10^6 spores of Z31 while 84 animals from the same litters served as controls. Animals were clinically evaluated, and fecal samples were collected 24 h after administration and submitted to A/B toxin detection and isolation of *C. difficile*. Stool samples were also submitted to rotavirus, *Escherichia coli*, and *Clostridium perfringens* detection. Administration of Z31 reduced the incidence of CDI in treated animals (7.8%) when compared to the control group (25.0%; $P = 0.003$). In animals that developed CDI, the intensity of diarrhea was lower in those that received Z31 than in the control group. Neonatal porcine diarrhea was reduced in treated animals when compared to untreated animals ($P < 0.001$). The present study suggests that Z31 can potentially be used to prevent CDI in piglets on commercial farms.

1. Introduction

Neonatal porcine diarrhea (NPD) is a recognized challenge on pig farms, causing several production losses (Larsson et al., 2016). Many agents, such as rotavirus, enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), *Clostridium perfringens*, and *Clostridioides* (prev. *Clostridium*) *difficile* can cause this problem (Lippke et al., 2011; Cruz Junior et al., 2013; Silva et al., 2013a; Malik et al., 2014; Luppi, 2017). In addition to the importance of *C. difficile* as a cause of NPD worldwide, evidence of the zoonotic potential of this agent has been reported in previous years, with some studies claiming pigs as potential reservoirs of this bacterium (Hensgens et al., 2012; Keessen et al., 2013; Moono et al., 2016; Knight et al., 2017).

Despite the known impact of *C. difficile* infection (CDI) in piglets, there are no specific commercial products to prevent the disease in swine (Mizrahi et al., 2014; Mills et al., 2018). A promising alternative is the use of non-toxicogenic strains of *C. difficile* (NTCD), which have already been reported to prevent or reduce clinical signs of CDI in laboratory rodents, piglets, and also humans (Borriello and Barclay, 1985; Sambol et al., 2002; Songer et al., 2007; Villano et al., 2012;

Nagaro et al., 2013; Gerding et al., 2015, 2018; Arruda et al., 2016). Although NTCD strains do not produce A and B toxins, the main virulence factors responsible for CDI, these strains are able to colonize the intestinal tract, inhibiting the colonization of toxigenic *C. difficile* strains, thereby preventing the occurrence of the disease (Mills et al., 2018). Recently, using a fully characterized (phenotype and genotype) NTCD strain, named Z31, we were able to prevent CDI in experimental models of hamsters and piglets (Oliveira Júnior et al., 2016, 2018a, 2018b; Pereira et al., 2016). In order to understand the impact of Z31 on pig farms, the present work studied the efficacy of Z31 in preventing CDI on a commercial pig farm with a known history of NPD.

2. Material and methods

2.1. Strain and spore production

The complete genome of NTCD strain Z31 is available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/302266> and a few important phenotypic characteristics have also been described elsewhere (Oliveira Júnior et al., 2016, 2018a). For spore production, a previously

* Corresponding author.

E-mail address: rodrigo.otaviosilva@gmail.com (R.O.S. Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.026>

Received 21 November 2018; Received in revised form 11 February 2019; Accepted 19 February 2019

0378-1135/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

described protocol was used with some modifications (Oliveira Júnior et al., 2018a). Briefly, *C. difficile* Z31 was plated onto Mueller Hinton agar (Thermo Fisher Scientific Oxoid™, Waltham, MA, USA) supplemented with 5% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (HiMedia, Mumbai, India), and incubated for two days under anaerobic conditions at 37 °C. Colonies were harvested and diluted in phosphate-buffered saline and the turbidity was adjusted to McFarland scale 1 (approximately 3.0×10^8 CFU/mL). Next, 500 µL of this solution was transferred to 4.5 mL of a pre-reduced Brain Heart Infusion broth (BHI; Thermo Fisher Scientific Oxoid™, USA) and incubated in an anaerobic chamber (Thermo Fisher Scientific Oxoid™, USA) for 24 h. The entire volume of this first pre-inoculum was then inoculated into 45 mL of pre-reduced BHI and kept under anaerobic conditions. After 24 h, the entire culture was then transferred to 450 mL pre-reduced BHI, which was kept under anaerobic conditions for five days, followed by a five-day-period under aerobic conditions at room temperature ($25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$). The broth was then centrifuged at $3000 \times g$ for 30 min at 4 °C (Hettich ROTINA 420R, Tuttlingen, Germany) followed by resuspension of spores in 5 mL of 0.9% saline solution. This step was repeated five times. The percentage of spores was evaluated using the Wirtz-Conklin staining technique (Hamouda et al., 2002) and observing them under an optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan), as well as counting the spores on plates, as previously described (Oliveira Júnior et al., 2018a). One day prior to animal administration, the spore solution was diluted with 0.9% saline solution to achieve a concentration of 1×10^6 spores/mL (Oliveira Júnior et al., 2018b).

2.2. Farm management and previous occurrence of *C. difficile* infection

The experimental methods were approved by the institutional ethics committee (CEUA-UFMG) under the protocol 013/2014. The experiment was performed in a 600 sow-farm, with a one-site, all-in, all-out per barn swine production system, located in the municipality of Pará de Minas, Minas Gerais state, Brazil. At birth, piglets were dried with paper towels, their umbilical cords cut, navel treated with 6.0% iodine, and covered with Vidasec® powder (Bayer, São Paulo, Brazil) before suckling maternal colostrum. The veterinarian responsible for this farm described a high occurrence of diarrhea in piglets, mostly in animals aged 1–3 days, and also reported a CDI diagnosis in the farm in the previous year. To investigate the occurrence of CDI in the farm, 49 fecal samples of one-day-old piglets from 12 different litters were randomly collected from three out of four farrowing rooms a week before the beginning of the experiment. All fecal samples were classified as diarrheic or non-diarrheic, submitted to A/B toxin detection, isolation of *C. difficile*, *C. perfringens*, and ETEC, and rotavirus detection (Fig. 1).

2.3. A/B toxin detection and *C. difficile* isolation

A commercial enzyme immunoassay (Tox A/B II, Techlab, Blacksburg, VA, USA) was used to detect A/B toxins in the stool samples. The presence or absence of A/B toxins was used to determine the occurrence of CDI. For *C. difficile* isolation, feces were diluted in equal volumes of ethyl alcohol (96%), kept at 37 °C for 30 min and then plated onto Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (CCFA, Himedia) supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate. After incubation under anaerobic conditions (37 °C for 72 h), three flat, irregular and with ground-glass appearance colonies from each plate were subjected to thermal extraction of DNA (98 °C for 20 min) and a previously described protocol of Multiplex polymerase chain reaction (PCR) to detect the housekeeping gene *tpi* and toxin genes *tcdA*, *tcdB*, and *cdtB* (Silva et al., 2011). One toxigenic strain per litter was also subjected to Multilocus Sequence Typing (MLST) as previously reported (Griffiths et al., 2010).

2.4. Isolation of *C. perfringens* and *E. coli*, and rotavirus detection

For *C. perfringens* culture, feces were plated onto Sulfite Polymyxin Sulfadiazine agar (SPS; Thermo Fisher Scientific Oxoid™) and incubated under anaerobic conditions (37 °C for 24 h). Three rounded sulfite-reducing colonies from each plate were submitted to PCR (Keyburn et al., 2008; Silva et al., 2013b). For *E. coli* identification, fecal samples were plated onto MacConkey agar (Prodimol Biotechnology, Belo Horizonte, Brazil) and incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions. Three lactose-fermenting colonies were collected and submitted to biochemical tests employing the EPM-MILI-Simmons Citrate Enterobacteriaceae identification test (Starr, 1986). Next, isolates confirmed as *E. coli* were submitted to a PCR method that was previously described to investigate the ETEC virulence factors associated with NPD, i.e., fimbrial adhesins F4 (K88), F5 (K99), F6 (987 P), F41, and the toxins STaP, STb, and LT (Macêdo et al., 2007). Strains were classified as ETEC if positive for the presence of at least one toxin gene, regardless of the presence or absence of fimbrial genes (Dubreuil et al., 2016). The presence of rotavirus A, B, and C was tested using a previously reported real-time-PCR method (Almeida et al., 2018).

2.5. Experimental design

After confirmation of CDI in the farm, 16 litters from three different farrowing rooms (F1, F2, F3) were used in an experiment to evaluate the capacity of Z31 to prevent CDI in one-day-old piglets. A total of 90 piglets received Z31, while 84 animals were used as controls (Table 1). After all farm standard birth procedures (previously described) were followed and before the suckling of colostrum, half of the newborn piglets from each litter were inoculated orally with 1.0 mL of a solution containing 1×10^6 spores of strain Z31, using a disposable syringe without a needle. For each sow, piglets of odd birth order (1, 3, 5, and so on) received Z31, while piglets of an even birth order did not receive Z31 and were used as negative controls. This protocol of alternating inoculation of Z31 was chosen in order to reduce the possible litter effect on the occurrence of CDI in a naturally-infected farm. All animals from the same litter were kept together, but no further alterations of farm management were necessary. The dosage in UFC/mL was the same as used in piglets in a previous trial experimental model (Oliveira Júnior et al., 2018b). Twenty-four hours following this procedure, fecal samples of all animals were collected by rectal stimulation and scored according to aspect (0 – normal, 1 – softened, 2 – pudding-like, 3 – watery). All samples were submitted to A/B toxin detection, isolation of *C. difficile*, *C. perfringens*, and *E. coli*, and rotavirus detection as previously described (Fig. 1).

2.6. Statistical analysis

The Mann-Whitney U test was used to analyze data involving diarrhea scores. Occurrence of pathogens in both groups and association to diarrhea were analyzed by Fisher exact test. Correlation between toxin detection and toxigenic culture of *C. difficile* was assessed by Spearman's rank correlation coefficient. Tests were performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) with a significance level of 0.05.

3. Results

The total spore production of Z31 in each 500 mL bottle ranged from 8.2×10^7 – 5.9×10^8 , with a median value of 1.3×10^8 spores and a median concentration of 2.6×10^6 spores/mL. The spore percentage varied from 80 to 90% using the Wirtz-Conklin staining technique and more than 95% by bacterial counting in blood agar.

Stool samples collected before the experiment revealed that 83.7% of the animals exhibited diarrhea and the presence of three enteropathogens, *C. difficile*, *C. perfringens* type A beta2-positive, and

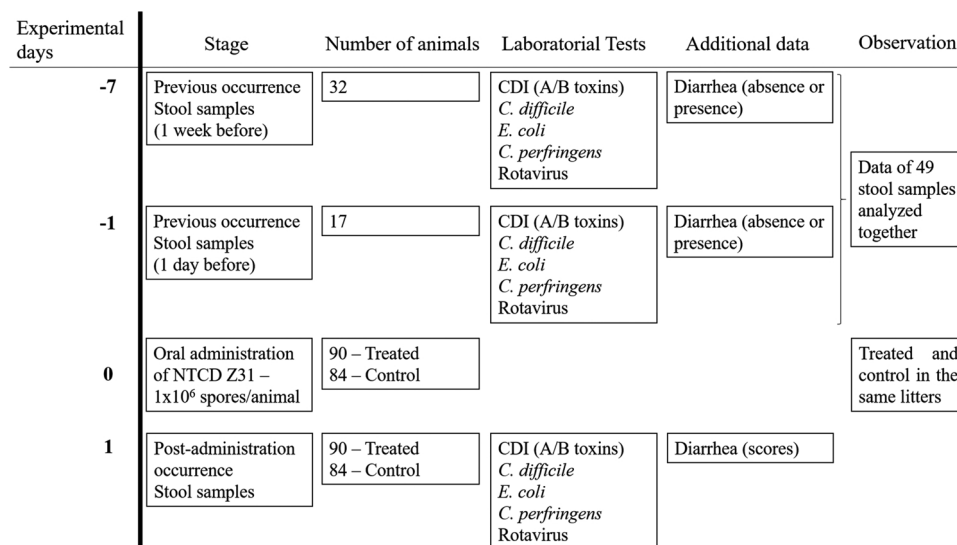


Fig. 1. Flow chart of experimental procedures performed in the farm before and after the administration of the non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* (NTCD) Z31 in the piglets 1 day-old.

EPEC. NTCD strains were not detected. *C. difficile* A/B toxins were found in the feces of 59.2% animals, 93.1% of which were also positive for toxigenic *C. difficile*. Both A/B toxins and toxigenic *C. difficile* were associated with diarrhea ($P = 0.004$). On the other hand, *C. perfringens* type A and EPEC were found in the feces of 22.4% and 18.4% of sampled animals, respectively; however, they were not associated with diarrhea ($P = 0.999$).

Fecal samples collected one day after administration of Z31 indicated that 56.3% of animals had some level of NPD, with an occurrence of 46.6% in treated versus 66.6% in control groups ($P = 0.009$). The occurrence of diarrhea found in both groups at this time point (after experimental procedures) was lower than the previous occurrence ($P < 0.05$). In addition, diarrhea scores in control animals were higher than in treated animals (Fig. 2). At this time point, *C. difficile*, *C. perfringens* type A beta2-positive, and EPEC were also found as enteropathogens (Table 2). The highest diarrhea scores were found in animals with CDI and, interestingly, animals positive for EPEC and *C. perfringens* type A had diarrhea scores higher than uninfected animals, but lower than animals with CDI ($P < 0.05$; Fig. 2).

The CDI results of the farm and each farrowing room, after administration of Z31, are summarized in Table 3. The occurrence of CDI in treated animals was 7.8% versus 25.0% in the control group ($P = 0.003$). The results of both groups are significantly lower than the previous incidence ($P < 0.05$). In farrowing rooms, the occurrence of CDI was significantly lower in control groups of F1 ($P = 0.026$) and F3 ($P = 0.048$). In addition, administration of NTCD strain Z31 was able to prevent the disease in all animals in rooms F2 and F3, in which the occurrence in the control group was up to 15.0%. In F1, feces collected from some treated animals were positive for A/B toxins, but the occurrence was significantly reduced, and diarrhea was milder when

compared to the corresponding control group (Fig. 3).

The microbiological data after administration of NTCD strain Z31 is shown in Table 2. All toxigenic *C. difficile* isolates were considered sequence type (ST) 11 and a reduction was observed in the fecal spreading of toxigenic *C. difficile* in the treated group ($P = 0.003$), especially in F1 and F3. Interestingly, a positive correlation between detection of A/B toxins and toxigenic culture was found (Spearman $\rho = 0.859$, $P < 0.001$). The occurrence of *C. perfringens* type A beta2-positive (23.6%) and EPEC (10.9%), after administration of Z31, was similar to the occurrence calculated before administration of Z31. On the other hand, occurrence of *C. perfringens* type A was higher in the control group when compared to treated animals ($P = 0.032$; Table 2). Coinfection of two or more pathogens were found in six cases (Supplemental Material 1). The diarrhea scores in these animals were similar to those with CDI and toxigenic *C. difficile* was present in five out of six cases. NTCD strains were isolated in 73.3% of the piglets from treated group and in 20.2% of the piglets from control group.

4. Discussion

4.1. Spore production

In a previous study, the dosage of 1×10^6 spores per animal was successfully used to prevent CDI in an experimental model using piglets (Oliveira Júnior et al., 2018b), and therefore was defined as the standard dose in the present study. As such, the number of spores produced in each 500 mL culture bottle in this study was sufficient for use in 100 newborn piglets (Oliveira Júnior et al., 2018a, 2018b). The techniques used to estimate the spore percentage exhibited different outcomes, most likely due to the Wirtz-Conklin technique being more subjective

Table 1

Experimental design used to test a non-toxicogenic strain of *C. difficile* (isolate Z31, strain type 3, ribotype 009) against natural *C. difficile* infection (CDI) in piglets located in three farrowing rooms (F1, F2, and F3) on a commercial farm previously diagnosed with CDI. An alternating inoculation of Z31 was applied such that piglets of odd birth order (1, 3, 5, and so on) received Z31, while piglets of even birth order did not receive the strain (negative controls).

Groups	F1		F2		F3		Farm	
	Animals	Litters	Animals	Litters	Animals	Litters	Animals	Litters
Treated*	30	5	30	5	30	6	90	16
Control	24		32		28		84	
Total	54		62		58		174	

* Animals received 10^6 spores of non-toxicogenic strain of *C. difficile* (NTCD) Z31 orally.

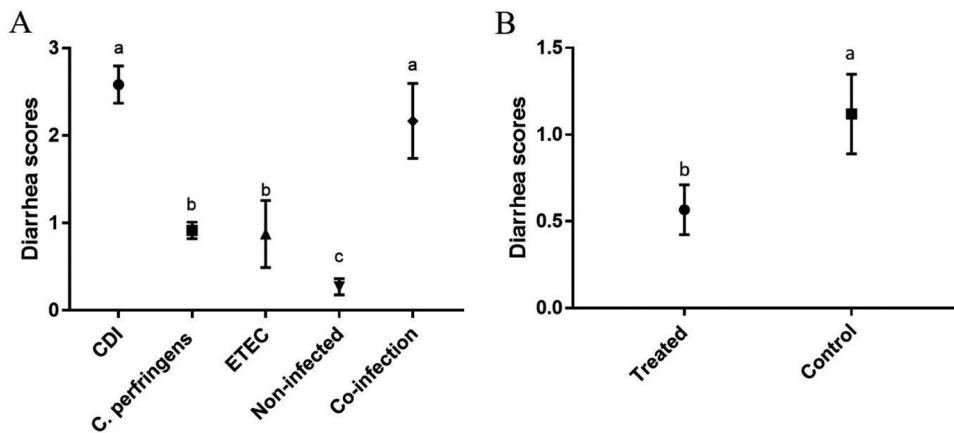


Fig. 2. Scores of diarrhea in 1-day old piglets one day after administration of Z31. In (A) the scores are represented according to infectious agent. In (B) are represented scores of diarrhea of the group treated with non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* (NTCD) Z31 versus control. Different letters means statistical differences by Mann-Whitney test ($p < 0.05$). CDI: *C. difficile* infection (positive for A/B toxins); ETEC: enterotoxigenic *Escherichia coli*.

and the possibility of staining non-viable cells (Hamouda et al., 2002). Nonetheless, spore percentages higher than 90%, found in bacterial counting, were similar to previous studies with Z31, revealing its ability to sporulate without additional steps (Oliveira Júnior et al., 2016, 2018a, 2018b). This high spore production is in agreement with previous results using strain Z31 and would be a highly desirable feature of the strain if it became a commercial product (Songer et al., 2007; Oliveira Júnior et al., 2018a).

4.2. Previous occurrence of NPD and CDI in the farm

Stool sampling a week before the administration of Z31 demonstrated that more than 50% of one-day-old piglets were colonized with *C. difficile*. This finding is in agreement with previous studies that found this pathogen to be commonly associated with this age group (Songer, 2004; Weese et al., 2010). In addition, detection of toxigenic *C. difficile* was highly correlated with A/B toxin detection and all animals in which A/B toxins were detected showed some level of diarrhea, pointing to a high occurrence of CDI (Songer, 2004; Oliveira Júnior et al., 2018b). The morbidity of CDI in pig farms is commonly around 20%, but it can be higher than 50% with cases of diarrhea also being more evident, as was observed in the present study (Songer, 2004; Lippke et al., 2011; Cruz Junior et al., 2013; Silva et al., 2013c). Although *C. perfringens* type A and ETEC were also detected in the present study, only toxigenic *C. difficile* and its toxins were associated to diarrhea, thereby making it the main enteropathogen in one-day-old piglets on this farm.

4.3. *Clostridium difficile* infection after administration of Z31

The oral administration of Z31 in piglets reduced the occurrence of CDI in this commercial farm, and these results are in agreement with previous studies in which Z31 prevented the occurrence of CDI in hamster and piglet experimental models (Oliveira Júnior et al., 2016, 2018b). The only other report of the use of an NTCD in a commercial farm found a slight reduction in A/B toxin detection in piglets, suggesting a benefit of this strategy in reducing CDI occurrence (Songer

Table 3

Occurrence of *C. difficile* infection (CDI) accessed by detection of A/B toxins in feces of animals which received the non-toxicogenic strain of *C. difficile* Z31 and control animals housed in three different farrowing rooms (F1, F2 and F3) on a pig farm. Different letters in columns means statistical differences by Fisher exact test ($P < 0.05$).

Groups	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	Farm (%)
Treated*	23.3 ^b	0.0	0.0 ^b	7.8 ^b
Control	54.2 ^a	12.5	14.3 ^a	25.0 ^a
Total	37.0	6.5	6.9	16.1

* Received 10^6 spores of non-toxicogenic strain of *C. difficile* (NTCD) Z31 orally.

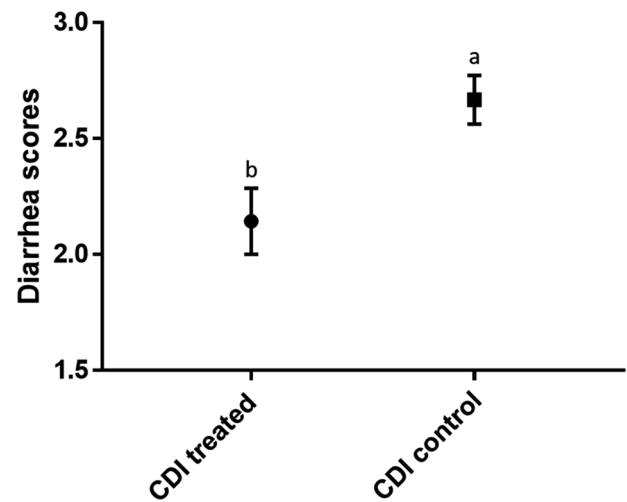


Fig. 3. Scores of diarrhea in piglets from treated and control groups that developed *C. difficile* infection (CDI). Different letters mean statistical differences by Mann-Whitney test ($p < 0.05$).

Table 2

Occurrence of toxigenic *C. difficile* (TCD), *C. perfringens* type A (CP), and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in animals treated with the *C. difficile* non-toxicogenic strain Z31 and control animals from three different farrowing rooms (F1, F2, and F3) on a pig farm. Different letters in columns means statistical differences by Fisher exact test ($p < 0.05$).

Groups	F1			F2			F3			Farm		
	TCD	CP	ETEC	TCD	CP	ETEC	TCD	CP	ETEC	TCD	CP	ETEC
Treated*	20.0 ^b	30.0	0.0	3.3	10.0	10.0	0.0 ^b	10.0 ^b	20.0	7.8 ^b	16.7 ^b	10.0
Control	54.2 ^a	16.7	12.5	18.8	31.3	9.4	17.9 ^a	42.9 ^a	14.3	28.6 ^a	31.0 ^a	11.9
Total	35.2	24.1	5.6	11.3	21.0	9.7	8.6	25.9	17.2	17.8	23.6	10.9

* Received 10^6 spores of non-toxicogenic strain of *C. difficile* (NTCD) Z31 orally.

et al., 2007). The competitive exclusion, based on the adherence ability of each strain, is hypothesized to be the main mechanism of action of NTCD in the prevention of CDI (Songer et al., 2007; Natarajan et al., 2013; Gerding et al., 2018). This mechanism may explain the reduction in diarrhea intensity of piglets that developed CDI after receiving Z31 in the present study.

The administration of Z31 also reduced the fecal shedding of toxigenic *C. difficile* in treated animals. It is also important to note that all *C. difficile* toxigenic strains isolated in the present study were classified as ST11, which is commonly related to ribotypes 078 and 126, and highly reported in swine worldwide (Keel et al., 2007; Schneeberg et al., 2013; Oliveira Junior et al., 2018c). Sequence type 11 has also been suggested as the zoonotic strain responsible for increasing community-associated CDI in humans (Suo et al., 2017; Wu et al., 2017). It is also important to remember that, in previous studies, Z31 was used to prevent CDI in piglets challenged with a *C. difficile* infection from ribotype 014/020 (ST2), another very common toxigenic type in piglets and humans (Knight et al., 2015; Martin et al., 2016; Oliveira Júnior et al., 2018b). Taken together, these results suggest that Z31 is capable of preventing CDI in piglets challenged with the most common sequence types associated with the disease in humans and piglets. Therefore, the use of NTCD strains might be an interesting preventive strategy considering the One Health concept (Squire and Riley, 2013).

Of note, the incidence of CDI in control animals was lower than the incidence tested before the experiment. Considering the isolation of NTCD in some animals from control group, it could be hypothesized that non-inoculated piglets receive some indirect benefit due to ingestion of spores eliminated into the environment by treated animals once they were all bred together. This indirect benefit of an NTCD was not observed by Songer et al. (2007), who spread NTCD spores on the perineum and teats of sows before delivery, but did not observe differences in A/B toxin detection in newborn piglets. Although it is not a consensus, this indirect benefit should be considered, and further studies should evaluate the direct and indirect long-term effect of continuous NTCD administration in a commercial farm.

4.4. Neonatal porcine diarrhea after administration of Z31

The piglets with CDI, mainly those that did not receive Z31, showed the highest scores of diarrhea, and the results are in accordance with some studies suggesting that *C. difficile* is one of the main causes of NPD (Songer and Anderson, 2006; Cruz Junior et al., 2013; Silva et al., 2013a, 2013c; McElroy et al., 2016). In ETEC isolates, the most common virulence genes found were STaP and adhesin F5 (previously K99), which are commonly reported in ETEC isolates from feces of piglets with diarrhea caused by this agent (Gyles and Fairbrother, 2010). On the other hand, the association of *C. perfringens* type A with diarrhea was surprising. Although the *cpb2* gene (encoding beta2 toxin) was found in all isolates, there is no consensus of its role or of any virulence factor in inducing diarrhea in swine, making it impossible to differentiate commensal *C. perfringens* strains from pathogenic isolates (Cruz Junior et al., 2013; Farzan et al., 2013; Allaart et al., 2014). Interestingly, all piglets with coinfections showed moderate to severe diarrhea, in agreement with other reports, showing that association among pathogens can worsen the clinical signs (de la Fé Rodríguez et al., 2012; Wang et al., 2013).

The reduction in isolation of *C. perfringens* in animals that received Z31 deserves attention. Coinfection of *C. difficile* and *C. perfringens* type A or C has already been described in dogs and foals (Uzal et al., 2012; Diniz et al., 2018). In both cases, the authors hypothesized a possible synergism between these species. In this scenario, it is possible that the reduction in the incidence of CDI conferred by Z31 might have directly or indirectly diminished the colonization by *C. perfringens*.

As previously reported, *C. difficile* was the main cause of NPD in this farm. However, administration of Z31 was able to reduce diarrhea caused by this agent and, consequently, demonstrate a general

reduction of NPD in the farm. To the best of our knowledge, this is the first report that an NTCD efficiently and significantly reduced CDI, producing a positive impact on NPD in a commercial establishment (Songer et al., 2007; Arruda et al., 2016). Given that NPD is one of the major problems affecting this swine category, the use of preventive strategies to reduce diarrhea is essential and has potential impacts in the productive chain (Larsson et al., 2016; Ruiz et al., 2016; Oliveira Júnior et al., 2018b).

5. Conclusion

The non-toxigenic strain of *C. difficile* Z31 was able to reduce the occurrence of CDI and NPD in one-day-old piglets on a commercial farm. The present work confirms the potential use of NTCD strains as a preventive method against CDI.

Funding sources

This work was supported by PRPq-UFMG, Fapemig, Capes/Proex and CNPq.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

José Eustáquio for the support in the pig farm. FCFL and RMCG have a research fellowship from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.026>.

References

- Allaart, J.G., Van Asten, A.J.A.M., Vernooij, J.C.M., Gröne, A., 2014. Beta2 toxin is not involved in in vitro cell cytotoxicity caused by human and porcine *cpb2*-harbouring *Clostridium perfringens*. *Vet. Microbiol.* 171, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.020>.
- Almeida, P.R., Lorenzetti, E., Cruz, R.S., Watanabe, T.T., Zlotowski, P., Alfieri, A.A., Driemeier, D., 2018. Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical characterization. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 30, 370–376. <https://doi.org/10.1177/1040638718756050>.
- Arruda, P.H.E., Madson, D.M., Ramirez, A., Rowe, E.W., Songer, J.G., 2016. Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *Can. Vet. J.* 57, 183–188.
- Borriello, S.P., Barclay, F.E., 1985. Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *J. Med. Microbiol.* 19, 339–350. <https://doi.org/10.1099/00222615-19-3-339>.
- Cruz Junior, E.C., Salvarani, F.M., Silva, R.O.S., Silva, M.X., Lobato, F.C.F., Guedes, R.M.C., 2013. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesqui. Veterinária Bras.* 33, 963–969. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000800002>.
- de la Fé Rodríguez, P.Y., Martin, L.O.M., Muñoz, E.C., Imberechts, H., Butaye, P., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2012. Several enteropathogens are circulating in suckling and newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara. *Cuba. Trop. Anim. Health Prod.* 45, 435–440. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0236-8>.
- Diniz, A.N., Coura, F.M., Rupnik, M., Adams, V., Stent, T.L., Rood, J.I., de Oliveira, C.A., Lobato, F.C.F., Silva, R.O.S., 2018. The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe* 49, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.003>.
- Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., Schifferli, D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic Escherichia coli. *EcoSal Plus* 7, 1–26. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>.
- Farzan, A., Kircanski, J., DeLay, J., Soltes, G., Songer, J.G., Friendship, R., Prescott, J.F., 2013. An investigation into the association between *cpb2*-encoding *Clostridium perfringens* type A and diarrhea in neonatal piglets. *Can. J. Vet. Res.* 77, 45–53.
- Gerding, D.N., Meyer, T., Lee, C., Cohen, S.H., Murthy, U.K., Poirier, A., Van Schooneveld, T.C., Pardi, D.S., Ramos, A., Barron, M.A., Chen, H., Villano, S., 2015. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection. *JAMA* 313, 1719. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3725>.

- Gerding, D.N., Sambol, S.P., Johnson, S., 2018. Non-toxicogenic *Clostridioides* (Formerly *Clostridium*) difficile for prevention of *C. difficile* Infection: from bench to bedside back to bench and Back to bedside. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01700>.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D.W., Fung, R., Golubchik, T., Harding, R.M., Jeffery, K.J.M., Jolley, K.A., Kirton, R., Peto, T.E., Rees, G., Stoesser, N., Vaughan, A., Walker, A.S., Young, B.C., Wilcox, M., Dingle, K.E., 2010. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 770–778. <https://doi.org/10.1128/JCM.01796-09>.
- Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470958209>.
- Hamouda, T., Shih, A.Y., Baker, J.R., 2002. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 86–90.
- Hensgens, M.P.M., Keessen, E.C., Squire, M.M., Riley, T.V., Koene, M.G.J., de Boer, E., Lipman, L.J.A., Kuijper, E.J., 2012. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 635–645. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>.
- Keel, K., Brazier, J.S., Post, K.W., Weese, S., Songer, J.G., 2007. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1963–1964. <https://doi.org/10.1128/JCM.00224-07>.
- Keessen, E.C., Harmanus, C., Dohmen, W., Lipman, L.J.A., 2013. *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1032–1034. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121645>.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4, e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>.
- Knight, D.R., Squire, M.M., Riley, T.V., 2015. Nationwide surveillance study of *Clostridium difficile* in Australian neonatal piglets shows high prevalence and heterogeneity of PCR ribotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 119–123. <https://doi.org/10.1128/AEM.03032-14>.
- Knight, D.R., Squire, M.M., Collins, D.A., Riley, T.V., 2017. Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 lineage in Australian Pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02138>.
- Larsson, J., Fall, N., Lindberg, M., Jacobson, M., 2016. Farm characteristics and management routines related to neonatal porcine diarrhoea: a survey among Swedish piglet producers. *Acta Vet. Scand.* 58, 77. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0261-0>.
- Lippke, R.T., Borowski, S.M., Marques, S.M.T., Paesi, S.O., Almeida, L.L., Moreno, A.M., Corbellini, L.G., Barcellos, D.E.S.N., 2011. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesqui. Veterinária Bras.* 31, 505–510. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000600008>.
- Luppi, A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porc. Heal. Manag.* 3, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4>.
- Macêdo, N.R., Menezes, C.P.L., Lage, A.P., Ristow, L.E., Reis, A., Guedes, R.M.C., 2007. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 59, 1117–1123. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000500005>.
- Malik, Y.S., Kumar, N., Sharma, K., Sircar, S., Dhama, K., Bora, D.P., Dutta, T.K., Prasad, M., Tiwari, A.K., 2014. Rotavirus diarrhea in piglets: a review on epidemiology, genetic diversity and zoonotic risks. *Indian J. Anim. Sci.* 84, 1035–1042.
- Martin, J.S.H., Monaghan, T.M., Wilcox, M.H., 2016. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 206–216. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>.
- McElroy, M.C., Hill, M., Moloney, G., Mac Aogáin, M., McGettrick, S., O'Doherty, Á., Rogers, T.R., 2016. Typhlocolitis associated with *Clostridium difficile* ribotypes 078 and 110 in neonatal piglets from a commercial Irish pig herd. *Ir. Vet. J.* 69, 4–7. <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0070-9>.
- Mills, J.P., Rao, K., Young, V.B., 2018. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 34, 3–10. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000410>.
- Mizrahi, A., Collignon, A., Péchiné, S., 2014. Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: state of the art. *Anaerobe* 30, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.07.006>.
- Moono, P., Foster, N.F., Hampson, D.J., Knight, D.R., Bloomfield, L.E., Riley, T.V., 2016. *Clostridium difficile* infection in production animals and avian species: a review. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 647–655. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2181>.
- Nagaro, K.J., Phillips, S.T., Cheknis, A.K., Sambol, S.P., Zukowski, W.E., Johnson, S., Gerding, D.N., 2013. Nontoxicogenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5266–5270. <https://doi.org/10.1128/AAC.00580-13>.
- Natarajan, M., Walk, S.T., Young, V.B., Aronoff, D.M., 2013. A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 22, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.005>.
- Oliveira Júnior, C.Ade, Silva, R.O.S., Diniz, A.N., Pires, P.S., Lobato, F.C.F., Assis, R.Ade, 2016. Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain. *Ciência Rural* 46, 853–859. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150454>.
- Oliveira Júnior, C.A., Silva, R.O.S., Cruz, D.S.G., Pires, I.H., Alves, G.G., Lobato, F.C.F., 2018a. Evaluation of growth and sporulation of a non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* (Z31) and its shelf viability. *Braz. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0023-4>.
- Oliveira Júnior, C.A., Silveira Silva, R.O., Gonçalves Cruz, D.S., Pires, I.H., Carvalho Guedes, R.M., Faria Lobato, F.C., 2018b. The non-toxicogenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets. *Anaerobe*. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.002>.
- Oliveira Junior, C.Ade, de Paula Gabardo, M., Guedes, R.M.C., Poncet, F., Blanc, D.S., Lobato, F.C.F., Silva, R.O.S., 2018c. Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. *Anaerobe* 51, 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.006>.
- Pereira, F.L., Oliveira Júnior, C.A., Silva, R.O.S., Dorella, F.A., Carvalho, A.F., Almeida, G.M.F., Leal, C.A.G., Lobato, F.C.F., Figueiredo, H.C.P., 2016. Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. *Gut Pathog.* 8, 11. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0095-3>.
- Ruiz, V.L.A., Bersano, J.G., Carvalho, A.F., Catroxo, M.H.B., Chiebao, D.P., Gregori, F., Miyashiro, S., Nassar, A.F.C., Oliveira, T.M.F.S., Ogata, R.A., Scarcelli, E.P., Toniatti, P.O., 2016. Case – control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *BMC Res. Notes* 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1751-2>.
- Sambol, S.P., Merrigan, M.M., Tang, J.K., Johnson, S., Gerding, D.N., 2002. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *J. Infect. Dis.* 186, 1781–1789. <https://doi.org/10.1086/345676>.
- Schneeberg, A., Neubauer, H., Schmoock, G., Baier, S., Harlizius, J., Nienhoff, H., Brase, K., Zimmermann, S., Seyboldt, C., 2013. *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3796–3803. <https://doi.org/10.1128/JCM.01440-13>.
- Silva, R.O.S., Salvarani, F.M., Cruz Júnior, E.Cda C., Pires, P.S., Santos, R.L.R., Assis, R.Ade, Guedes, R.M., de, C., Lobato, F.C.F., 2011. Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural* 41, 1430–1435. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000100>.
- Silva, R.O.S., Guedes, R.M., de, C., Lobato, F.C.F., 2013a. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural* 43, 73–80. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000137>.
- Silva, R.O.S., Ribeiro, M.G., Palhares, M.S., Borges, A.S., Maranhão, R.P.A., Silva, M.X., Lucas, T.M., Olivo, G., Lobato, F.C.F., 2013b. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet. J.* 45, 671–675. <https://doi.org/10.1111/evj.12046>.
- Silva, R.O.S., Oliveira Junior, C.A., Costa, A.T.R., Diniz, A.N., Neves, M.S., Lobato, F.C.F., 2013c. An outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in piglets in Brazil. *Semin. Ciências Agrárias* 34, 3923. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3923>.
- Songer, J.G., 2004. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim. Heal. Res. Rev.* 5, 321–326. <https://doi.org/10.1079/AHR200492>.
- Songer, J.G., Anderson, M.A., 2006. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.09.001>.
- Songer, J.G., Jones, R., Anderson, M.A., Barbara, A.J., Post, K.W., Trinh, H.T., 2007. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxicogenic organisms. *Vet. Microbiol.* 124, 358–361. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.019>.
- Squire, M.M., Riley, T.V., 2013. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 365, 299–314. https://doi.org/10.1007/82_2012_237.
- Starr, M.P., 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. By William H. Ewing, fourth edition. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp. 536. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-4-581>. pages. \$65.00. ISBN 0-444-00981-7. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 581–536582.
- Suo, J., Yan, Z., Wu, Y., Li, W.G., Zhang, W.Z., Liu, X.S., Liu, Y., Lu, J., 2017. *Clostridium difficile* RT 078/ST11: a threat to Community population and pigs identified in elder hospitalized patients in Beijing, China. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 38, 1383–1385. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.206>.
- Uzal, F.A., Diab, S.S., Blanchard, P., Moore, J., Anthenill, L., Shahriar, F., Garcia, J.P., Songer, J.G., 2012. *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. *Vet. Microbiol.* 156, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.023>.
- Villano, S.A., Seiberling, M., Tatarowicz, W., Monnot-Chase, E., Gerding, D.N., 2012. Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxicogenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5224–5229. <https://doi.org/10.1128/AAC.00913-12>.
- Wang, X., Ren, W., Nie, Y., Cheng, L., Tan, W., Wang, C., Wei, L., Zhang, R., Yan, G., 2013. A novel watery diarrhoea caused by the co-infection of neonatal piglets with *Clostridium perfringens* type A and *Escherichia coli* (K88, 987P). *Vet. J.* 197, 812–816. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.023>.
- Weese, J.S., Wakeford, T., Reid-Smith, R., Rousseau, J., Friendship, R., 2010. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe* 16, 501–504. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.08.001>.
- Wu, Y., Chen, C.-M., Kuo, C., Lee, J., Chen, P.-C., Chang, Y., Chen, T., 2017. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from a pig slaughterhouse, pork, and humans in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.010>.

9.1.4. Artigo publicado referente ao capítulo 4

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. et al. Evaluation of growth and sporulation of a non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* (Z31) and its shelf viability. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, p.263-269, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs42770-018-0023-4>>.



Evaluation of growth and sporulation of a non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* (Z31) and its shelf viability

Carlos Augusto Oliveira Júnior¹ · Rodrigo Otávio Silveira Silva¹ · Diogo Soares Gonçalves Cruz¹ · Isadora Honorato Pires¹ · Guilherme Guerra Alves¹ · Francisco Carlos Faria Lobato¹

Received: 16 February 2018 / Accepted: 7 August 2018 / Published online: 18 December 2018
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2018

Abstract

The oral administration of non-toxigenic strains of *Clostridioides difficile* (NTCD) is currently showing promising results for the prevention of *Clostridioides difficile* infection (CDI) in humans and animals, and is being considered as a possible commercial product to be used in the near future. The aim of this work was to evaluate five culture media for the growth and sporulation of one NTCD (Z31) and evaluate the viability of a lyophilized spore solution of NTCD Z31 stored at 4 °C or at 25 °C for 2 years. Reinforced clostridial medium (RCM) and brain heart infusion broth (BHI) provided the highest production of NTCD Z31 spores. In the first 6 months of the storage of the lyophilized solution, a reduction in spore count of approximately 0.3 Log₁₀ CFU/mL was observed; however, no further significant reduction in spore count was observed up to 24 months. No difference in spore concentration was found between the two storage temperatures from 6 to 24 months of storage. The present work showed BHI and RCM to be the best choices for the growth and sporulation of NTCD Z31 and suggested that the spores of NTCD Z31 are stable for up to 2 years under both temperature conditions.

Keywords Probiotic · Culture media · Long-term viability · Spores

Introduction

Clostridioides (previously *Clostridium*) *difficile* is a strict anaerobic, sporulated, and Gram-positive bacterium that can be classified as toxigenic or non-toxigenic based on the production of toxins A, B, and binary [1, 2]. *C. difficile* is responsible for pseudomembranous colitis in humans as well as diarrhea in animals, such as pigs, horses, and dogs [3, 4]. Indeed, this pathogen is considered one of the most important causes of neonatal diarrhea in piglets [5, 6] and studies performed in Brazil showed that 35% to 53% of herds were affected, with 16% of neonatal piglets positive for *C. difficile* toxins [7–9]. Despite the importance of *C. difficile* in swine, current control measures for *C. difficile* infection (CDI) are based only on

hygiene and disinfection of facilities, and there are no preventive products available to control the disease [3, 6].

Several studies are currently underway aimed at controlling CDI in humans and domestic animals through immunization (active and passive) and the use of antibiotics or probiotics [10–12]. In 1983, Wilson & Sheagren [13] reported that previous colonization by a non-toxigenic strain of *C. difficile* (NTCD) increased the survival rate of hamsters challenged with a toxigenic strain. Following this report, many studies in hamsters, mice, and humans confirmed the protective effect of oral administration of NTCD against CDI [14–19]. In piglets, administration of NTCD in neonates was also demonstrated to be an effective strategy against CDI, as it reduced toxin detection and the appearance of macroscopic and microscopic lesions in these animals [12, 20].

In Brazil, an NTCD strain (named Z31) isolated from a healthy dog presented promising results for CDI prevention. Whole genome sequencing demonstrated the presence of important genes related to colonization and sporulation [21], and studies in an experimental hamster model showed that the strain could prevent CDI in all of the animals tested [22]. Despite these promising results, the commercial utilization of NTCD to prevent CDI requires the significant in vitro

Responsible Editor: Luis Augusto Nero

✉ Rodrigo Otávio Silveira Silva
rodrigo.otaviosilva@gmail.com

¹ Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil

production of these candidate strains as well as the maintenance of an acceptable shelf viability of their commercial form. Therefore, the aim of this work was to evaluate five culture media for the growth and sporulation of NTCD Z31 and to evaluate the temporal viability of a lyophilized spore solution of NTCD Z31 maintained in two different temperatures for 2 years.

Material and methods

Strain

The NTCD Z31 strain was isolated from a healthy dog in February 2009, in the city of Belo Horizonte (state of Minas Gerais, Brazil). It was confirmed to be non-toxicogenic by PCR owing to the absence of the genes *tdcA*, *tdcB*, and *cdtB* [7] and it was classified as ribotype 009, the most common ribotype among the non-toxicogenic strains in several countries [23, 24]. The complete sequence of the NTCD Z31 genome showed some desirable genes for virulence factors not related to toxin production, such as intestinal colonization (*slpA*) and biofilm formation (*fliC* and *fliD*), which are likely to be important from the perspective of competitive exclusion [21]. This strain also showed a higher spore production than other NTCDs previously isolated and it prevented CDI in 100% of exposed hamsters [22].

Culture media

Five different broth media were used. Two were made according to the recommendations of the manufacturers: brain heart infusion broth (BHI, Oxoid, USA) and reinforced clostridial medium (RCM, Difco, USA). The third medium was BHI supplemented with 0.1% L-cysteine (Merck, USA) and 0.5% yeast extract (Difco, USA) (BHIS) [25]. The fourth medium contained only 1.5% tryptose (Difco, USA) and 1.0% yeast extract (Difco, USA) (TY). Finally, a sporulation broth was used which contained 1.5% tryptose (Difco, USA), 1.1% sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , Synth, Brazil), 0.3% starch (Merck, USA), 0.3% yeast extract (Difco, USA), 0.1% Na-thioglycollate (Synth, Brazil), and 0.01% magnesium sulfate (MgSO_4 , Synth, Brazil) (SB) [26].

Measurement of *C. difficile* growth and spore production

NTCD Z31 was primarily cultured on Müller Hinton agar (Oxoid, UK) supplemented with 5% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (Himedia, India) (AST) in an anaerobic chamber (Thermo Fisher Scientific, USA) (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2) for 2 days. The colonies were diluted in

phosphate-buffered saline (PBS – 1x, pH 7.4), until the solution reached the tube 1 of the McFarland scale ($\sim 3.0 \times 10^8$ UFC/mL). Subsequently, 5.0 μL of this solution was inoculated in 5.0 mL of each pre-reduced culture medium previously described (1:1000 ratio) and incubated under anaerobic conditions, at 37 °C for 5 days [25]. After this period, cultures were maintained in aerobic conditions at 25 °C \pm 2 °C until day 30. The total numbers of cells and spores were counted on days 3, 5, 10, 15, and 30. Assays were performed in sextuplicate for each medium at each time point [25].

To determine the growth of Z31, the solution from each tube was homogenized, serially diluted in PBS, plated on AST, and incubated under anaerobic conditions for 2 days. To measure spore production, the same procedure was followed with the addition of a single heat treatment (20 min, 70 °C) to eliminate the vegetative cells prior to the serial dilution [22, 25]. Plates containing 30 to 300 colonies were used to determine the amount of Z31 from each culture in colony forming units per milliliter (CFU/mL). The frequency of sporulation was calculated by dividing the spore concentration by the total CFU/mL. In addition, a pool of each broth at each time point was analyzed using the Wirtz-Conklin staining technique to visualize spores [27].

Lyophilization and measurement of long-term viability

The spore solution of *C. difficile* was produced in BHI according to a previously described method with some adaptations [28]. Briefly, two steps of pre-inoculation were performed; each step contained 10% of the total volume of the next inoculum and was incubated for 24 h under anaerobic conditions. *C. difficile* was grown in bottles containing 500 mL of BHI, which were incubated under anaerobic condition for 120 h, then aerobic conditions for 120 h. After this period, the solution was centrifuged (3000 \times g, 30 min, 4 °C) (Hettich, Germany) and the pellet was subjected to shock with ethyl alcohol (1:2) at 37 °C for 30 min. The solution was centrifuged again, and the pellet was suspended with the same volume of PBS. This procedure was repeated eight times. The solution was then subjected to a heat treatment (20 min, 70 °C) to eliminate the vegetative cells. Three aliquots were tested using the Wirtz-Conklin staining technique [27] to determinate the proportion of spores using an optic microscopic (Nikon, Japan).

The final solution was used to count the number of spores on AST plates, as previously mentioned, and diluted to a final concentration of 10^8 spores/mL. One milliliter of this solution was aliquoted into tubes, which were frozen (24 h, -80 °C), lyophilized in a freeze dryer (Enterprise, Terroni, Brazil), and maintained at two different temperatures (4 °C and 25 °C) for 2 years. The number of spores was counted after the dilution of the lyophilized strains in 1 mL of PBS following the same procedures for spore counting described above. The analyses

were done in triplicate 1 day after the counting procedure and were performed monthly for 12 months and then again at 18 and 24 months after lyophilization.

Statistical analysis

The spore counts were converted to a base 10 logarithm and analyzed by ANOVA and Student’s *t* test. A *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant. Linear and non-linear regressions were constructed for the data related to long-term viability. The analysis was performed in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA).

Results

Growth and sporulation

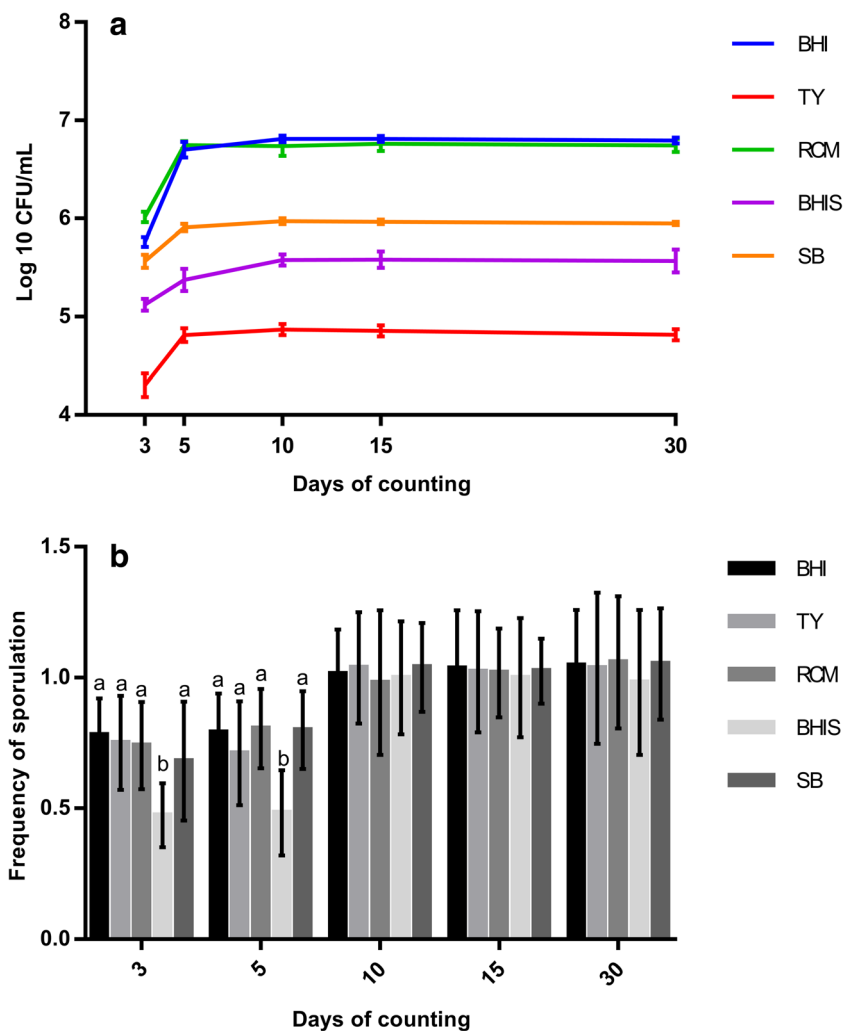
The growth of NTCD Z31 varied from 3.86×10^4 CFU/mL (TY, 3 days) and 7.15×10^6 CFU/mL (RCM, 5 days) for the media tested (data not shown). Spore production of NTCD Z31 varied

from 2.24×10^4 CFU/mL (TY, 3 days) to 6.57×10^6 CFU/mL (BHI, 5 days) (Fig. 1A). At day 3, culture in RCM provided the highest growth and spore production. From day 5 on, culture in RCM and BHI showed similar results, followed by culture in SB, BHIS, and then TY (Fig. 1A). The frequency of sporulation at 72 and 120 h was between 68.1% and 80.5% for the culture media tested, except in BHIS, which featured a sporulation rate under 50.0% at both time points. After storage in aerobic conditions, all culture media showed sporulation rates above 98.0% at days 10, 15, and 30 (Fig. 1B).

Long-term viability

After spore production, solutions containing 10^8 spores of NTCD Z31 were lyophilized, stored at 4 °C (cooled) or 25 °C (room temperature), and tested for their long-term viability during the course of 24 months. A slight decrease in the spore count was observed in both storage temperatures in the first 12 months of the experiment; however, this decrease was followed by the stable maintenance of spore counts for up to 24 months (Fig. 2A). Statistical differences between the two

Fig. 1 Sporulation of NTCD Z31 in five different culture media. All cultures were incubated in anaerobic conditions at 37 °C until day 5, after which, were kept in aerobic conditions at 25 °C until the end of experimentation. (A) Spore counts of NTCD Z31 for each growth medium (Log 10 CFU/mL). (B) Frequency of sporulation of NTCD Z31 for each growth medium. Different letters at a same time of evaluation indicate statistical differences between the sporulation rates of NTCD Z31 in each culture media at that moment (*p* < 0.05)



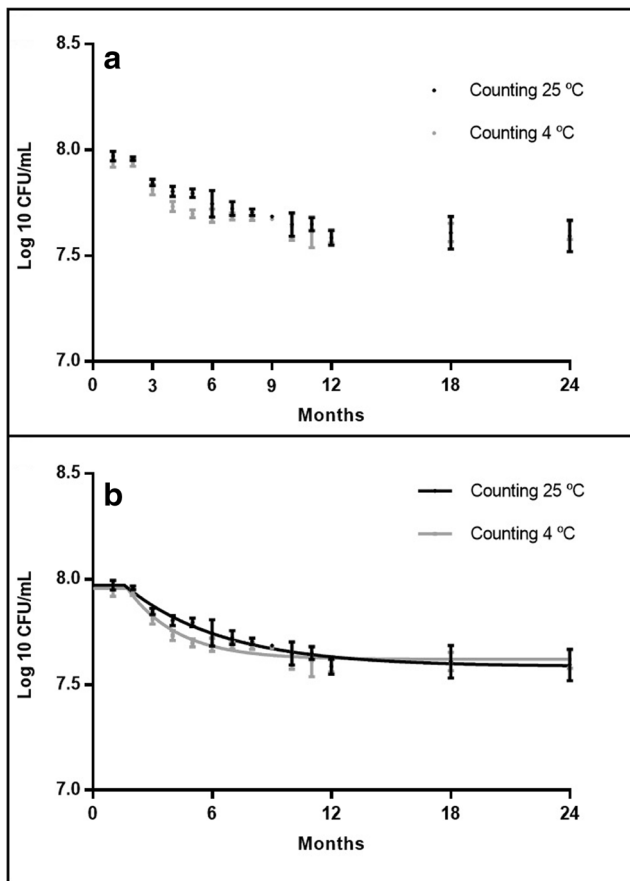


Fig. 2 Spore counts of lyophilized NTCD Z31 stored over a 24-month period at 4 °C or 25 °C. (A) Spore counts and the standard deviation of samples at 4 °C or 25 °C. (B) Non-linear regression model of the original data

storage temperatures were only observed in the fourth and fifth months, with higher concentrations of spores being found in samples maintained at room temperature. No differences were found from 6 months until the end of experiment.

Linear regression performed using the data from the first 12 months of counting estimated that the spore concentrations of NTCD Z31 obtained after 24 months of storage were 1.66×10^7 CFU/mL for the cooled samples and 1.55×10^7 CFU/mL for the room temperature samples, with R^2 values of 81.0% and 94.4%, respectively (data not shown). A non-linear regression using all data obtained in this experiment was also performed (Fig. 2B), because the spore concentration showed relative stability in the last months of measurements. The estimated spore concentration of NTCD Z31 from this model during the stable period was 4.16×10^7 CFU/mL for cooled storage and 3.85×10^7 CFU/mL for room temperature storage (R^2 of 90.58% and 90.67%, respectively). These results were statistically similar to the actual concentrations found in the final measurement of the experiment (4.17×10^7 CFU/mL for cooled storage and 3.92×10^7 CFU/mL for room temperature storage).

Discussion

Growth and sporulation

CDI is an important disease in both humans and domestic animals and the use of bacterial probiotics could be a viable alternative to prevent this disease [12]. NTCD Z31 is a possible candidate to be used for the prevention of CDI, because it was able to prevent disease in 100% of treated hamsters [22]. Despite these results, it is essential to understand the in vitro growth and sporulation characteristics of the strain NTCD Z31 to assess the viability of its commercial use. The quantification of total cells and spores in present study was performed based on colony-forming units (CFU), similar to other studies [25, 29, 30]. Experiments with toxigenic strains of *C. difficile* found spore concentrations between 10^6 and 10^7 CFU/mL after 2 days of incubation and over 10^7 CFU/mL after 3 and 5 days of incubation [25, 30]. Although these values are higher than those found in the present study, comparisons between different studies must be done cautiously, as even small differences in methods may cause significant alterations in the growth and sporulation of the strains [31]. Despite this, the average of the spore concentrations found in two culture media tested (RCM and BHI) were higher than the suggested concentration to prevent CDI in swine (2.0×10^6 spores/mL), which could represent viable productivity if this value could be maintained in large scale [12].

The best results for the growth and sporulation of NTCD Z31 in present study were observed in RCM and BHI media. RCM has been used for the isolation of *C. difficile* and contains the components and nutrients necessary to support growth of *Clostridia* and other anaerobic bacteria [32]. Although culture in RCM provided adequate conditions for growth and spore production during this experiment, the addition of agar in the formula hinders the separation of spores from culture media, which could be a limitation when larger volumes are used. For this application, culture in BHI appears to be the best option among the tested media, because it showed similar results to culture in RCM and is an inexpensive culture media.

Many studies that evaluated *C. difficile* growth and sporulation used BHIS [25, 33]; however, in the present study, culture in this medium produced a concentration of spores more than ten times lower than that produced in the culture with BHI. The addition of L-cysteine in BHIS is the main difference of this broth in comparison to BHI. Although it is not essential for growth, cysteine is one of the main sources of carbon and energy when added to a culture medium, and it is consumed at the beginning of the growth phase [34]. Cysteine also leads to changes in *C. difficile* metabolism, such as reductions in the production of toxins, short-chain fatty acids (SCFAs), and enzymes, including 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [35]. This enzyme is responsible for

solventogenesis in *Clostridium acetobutyricum*, a process that converts SCFAs to ketones and alcohols. Solventogenesis is linked to sporulation in *C. acetobutyricum*, with mutants unable to convert butyric acid to butanol, resulting in poor sporulation [36]. Similarly, this may have led to the low sporulation rate of NTCD Z31 when cultured in BHIS media (Fig. 1B). It is noteworthy that inclusion of cysteine in anaerobic culture media is fairly common, because it is a reducing agent that improves the growth of anaerobic bacteria when conditions are not optimal [37, 38]. Interestingly, some culture media indicated for sporulation use cysteine, even in higher concentrations when compared to present study [39]. Nevertheless, there are many differences among the sporulation patterns of each strain, which make generalizations difficult and reinforce the importance of specific studies focusing on the growth and sporulation of a particular strain [25].

With the exception of BHIS, the sporulation ratio in present study was higher than 68% after 3 and/or 5 days of culture. Previous studies evaluating different strains of *C. difficile* found sporulation rates between 1% and 60% after 2 or 3 days of culture, with some evidence that endemic and hypervirulent strains are associated with enhanced sporulation rates [29, 30, 33, 40]. It is known that spore production increases with incubation time, and recent studies have shown that even non-endemic strains can sporulate at high rates [25, 33, 41]. In this context, NTCD Z31 seems to be a strain with a relatively high sporulation rate, confirming a prior study where NTCD Z31 was the most efficient strain in spore production when compared to four NTCD isolated from different animals [22]. This is an important feature to consider for its possible use as a commercial preventive method, because the administration of spores, and not vegetative cells, has been shown to prevent the disease in piglets [12, 20].

It is worth noting that the sporulation rate found in the present study was higher than 98% after aerobic storage, and the spore concentration was maintained from day 5 until the end of experiment in all culture media. Oxygen present in the atmosphere is toxic to anaerobic microorganisms, such as *C. difficile*. Under aerobic conditions, vegetative cells undergo apoptosis or begin the sporulation process [38]. Despite this, obtaining a solution with a high proportion of spores is difficult in cultures of *Clostridium*, leading to the requirement of additional steps such as heat treatment, alcohol shock, sonication, enzymatic treatment, centrifugation, or a combination of these methods [28, 42, 43]. The NTCD Z31 strain showed a high sporulation rate without any additional steps, which is a promising feature for its potential on a commercial scale.

Long-term preservation

C. difficile spores are commonly stored cooled or frozen and the spore concentration in this storage condition is usually

maintained or slightly decreased between 30 and 56 days of storage [44–46]. In the first step of present study, the spore concentration kept stable in solutions maintained at 25 °C for 30 days. The choice of the two storage temperatures in this study was made considering these previous results and the difficulty of maintaining a cold chain for commercial product delivery in many regions. Additionally, although previous studies have stored spores in a spore solution, the option of lyophilization was selected because this method is one of the most conservative for evaluating long-term viability and it is often applied for biotechnological or commercial use. Furthermore, lyophilization is a safe, stable, and suitable method commonly used for the long-time preservation of bacteria [47–49].

In the first 6 months of storage, a slight decrease in spore concentration was observed at both temperatures. It is known that some spores are capable of germinating in adverse conditions owing to defects in exosporium and spore coat, or spontaneous activation of genetic factors linked to germination [50]. In that case, the decrease in spore count could be explained by apoptosis of vegetative cells from these defective spores. Another explanation is linked to dormancy of spores, which could be accelerated at lower temperatures [51]. This hypothesis could explain differences observed in the fourth and fifth months of counting, when the spores maintained at room temperature showed higher concentrations than those maintained at 4 °C. Results obtained in the last 18 months of experimentation showed maintenance of spore counts for the duration of the experiment.

It should be highlighted that both forms of storage provided the same final concentration of spores. Importantly, this shows that cold chain maintenance, which increases costs and is not practical in many situations, is not necessary for the storage of viable NTCD Z31 [52]. In addition, previous studies using NTCD strains to prevent CDI in piglets have suggested a dosage of approximately 10^6 spores per animal [12, 20]. Following these recommendations, the number of NTCD Z31 spores found in a single bottle after 2 years of storage (around 4.0×10^7 CFU/mL) would be able to prevent CDI in 40 animal; however, further studies on target species will be necessary to confirm this dosage.

Conclusion

The NTCD Z31 strain showed a high sporulation rate when cultured in BHI and RCM, and these spores were highly stable after 2 years of storage under both cooled and room temperature conditions. Additional studies evaluating the ability of NTCD Z31 to prevent disease in target species are needed to corroborate its potential use for the prevention of CDI.

Funding information The authors would like to thank PRPq-UFGM, Fapemig, Capes/Proex, and CNPq for providing financial support in this work.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Natarajan M, Walk ST, Young VB (2013) Aronoff DM. A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 22:1–5
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL (2016) Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40:95–99
- Silva ROS, Guedes RMC, Lobato FCF (2013) *Clostridium difficile*: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Cienc Rural* 43(1):73–80
- Martin JSH, Monaghan TM, Wilcox MH (2016) *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(4):206–216
- Songer JG, Anderson MA (2006) *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12(1):1–4
- Moono P, Foster NF, Hampson DJ, Knight DR, Bloomfield LE, Riley TV (2016) *Clostridium difficile* in production animals and avian species: a review. *Foodborne Pathog Dis* 13(12):647–655
- Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Júnior ECC, Pires PS, Santos RLS, Assis RA, Guedes RMC, Lobato FCF (2011) Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Cienc Rural* 41(8):1130–1135
- Lippke RT, Borowski SM, Marques SMT, Paesi SO, Almeida LL, Moreno AM, Corbellini LG, Barcellos DESN (2011) Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesqui Vet Bras* 31(6):505–510
- Cruz EC Jr, Salvarani FM, Silva ROS, Silva MX, Lobato FCF, Guedes RMC (2013) A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesqui Vet Bras* 33(8):963–969
- Kim HB, Zhang Q, Sun X, Beamer G, Wang Y, Tzipori S (2014) Beneficial effect of oral tigeicycline treatment on *Clostridium difficile* infection in gnotobiotic piglets. *Antimicrob Agents Chemother* 58(12):7560–7564
- Mizrahi A, Collignon A, Péchiné S (2014) Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: state of the art. *Anaerobe* 30:210–219
- Arruda PH, Madson DM, Ramirez A, Rowe EW, Songer JG (2016) Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *Can Vet J* 57:183–188
- Wilson KH, Sheagren JN (1983) Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *J Infect Dis* 147(4):733–736
- Borriello SP, Barclay FE (1985) Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *J Med Microbiol* 19:339–350
- Sambol SP, Merrigan MM, Tang JK, Johnson S, Gerding DN (2002) Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *J Infect Dis* 186:1781–1789
- Merrigan MM, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN (2009) New approach to the management of *Clostridium difficile* infection: colonisation with non-toxicogenic *C. difficile* during daily ampicillin or ceftriaxone administration. *Int J Antimicrob Agents* 33(1):S46–S50
- Villano SA, Seiberling M, Tatarowicz W, Monnot-Chase E, Gerding DN (2012) Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 56(10):5224–5229
- Nagaro KJ, Phillips ST, Cheknis AK, Sambol SP, Zukowski WE, Johnson S, Gerding DN (2013) Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(11):5266–5270
- Gerding DN, Meyer T, Lee C, Cohen SH, Murthy UK, Poirier A, Van Schooneveld TC, Pardi DS, Ramos A, Barron MA, Chen H, Villano S (2015) Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: a randomized clinical trial. *JAMA* 313(17):1719–1727
- Songer JG, Jones R, Anderson MA, Barbara AJ, Post KW, Trinh HT (2007) Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Vet Microbiol* 124:358–361
- Pereira FL, Oliveira Júnior CA, Silva ROS, Dorella FA, Carvalho AF, Almeida GMF, Leal CAG, Lobato FCF, Figueiredo HCP (2016) Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. *Gut Pathog* 8:11
- Oliveira Júnior CA, Silva ROS, Diniz AN, Pires PS, Lobato FCF, Assis RA (2016) Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxicogenic strain. *Cienc Rural* 46(5):853–859
- Janezic S, Ocepek M, Zidaric V, Rupnik M (2012) *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiol* 12:48–55
- Silva ROS, Rupnik M, Diniz AN, Vilela EG, Lobato FC (2015) *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(8):1062–1065
- Zidaric V, Rupnik M (2016) Sporulation properties and antimicrobial susceptibility in endemic and rare *Clostridium difficile* PCR ribotypes. *Anaerobe* 39:183–188
- Atlas RM (1946) Handbook of microbiological media. 4th ed. CRC Press, Miami
- Hamouda T, Shih AY, Baker JR (2002) A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Lett Appl Microbiol* 34(2):86–90
- Yang WW, Crow-Willard EN, Ponce A (2009) Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *J Appl Microbiol* 106:27–33
- Åkerlund T, Persson I, Unemo M, Norén T, Svenungsson B, Wullt M, Burman LG (2008) Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027/NAP1. *J Clin Microbiol* 46(4):1530–1533
- Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan VK, Johnson S, Gerding DN, Vedantam G (2010) Human hyper-virulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *J Bacteriol* 192(19):4904–4911
- Burns DA, Minton NP (2011) Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *J Microbiol Methods* 87:133–138
- Hafiz S, Oakley CL (1976) *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *J Med Microbiol* 9:129–136
- Burns DA, Heap JT, Minton NP (2010) The diverse sporulation characteristics of *Clostridium difficile* clinical isolates are not associated with type. *Anaerobe* 16:618–622
- Neumann-Schaal M, Hofmann JD, Will SE, Schomburg D (2015) Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630Δ_{erm}

- and concomitant fermentation product and toxin formation. *BMC Microbiol* 15:281
35. Karlsson S, Lindberg A, Norin E, Burman LG, Åkerlund T (2000) Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 68(10):5881–5888
 36. Mattsson DM, Rogers P (1994) Analysis of Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* altered in solventogenesis and sporulation. *J Ind Microbiol* 13:258–268
 37. Edwards AN, Suárez JM, McBride SM (2013) Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *J Vis Exp* 79:e50787
 38. Cadnum JL, Hurless KN, Deshpande A, Nerandzic MM, Kundrapu S, Donskey CJ (2014) Sensitive and selective culture medium for detection of environmental *Clostridium difficile* isolates without requirement for anaerobic culture conditions. *J Clin Microbiol* 52(9):3259–3263
 39. Edwards AN, McBride SM (2016) Isolating and purifying *Clostridium difficile* spores. *Methods Mol Biol* 1476:117–128
 40. Underwood S, Guan S, Vijayasubhash V, Baines SD, Graham L, Lewis RJ, Wilcox MH, Stephenson K (2009) Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *J Bacteriol* 191(23):7296–7305
 41. Vohra P, Poxton IR (2011) Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology* 157:1343–1353
 42. Grecz N, Anellis A, Schneider MD (1962) Procedure for cleaning of *Clostridium botulinum* spores. *J Bacteriol* 84:552–558
 43. Paredes-Sabja D, Sarker MR (2012) Interactions between *Clostridium perfringens* spores and raw 264.7 macrophages. *Anaerobe* 18:148–156
 44. Freeman J, Wilcox MH (2003) The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *J Clin Pathol* 56:126–128
 45. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF (2000) Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Investig* 12(4):332–336
 46. Mah JH, Kang DH, Tang J (2009) Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperatures. *J Food Sci* 74(1):M23–M27
 47. Gitaitis RD (1987) Refinement of lyophilization methodology for storage of large numbers of bacterial strains. *Plant Dis* 71:615–616
 48. Milošević MB, Medić-Pap SS, Ignjatov MV, Petrović DN (2007) Lyophilization as a method for pathogens long term preservation. *Proc Nat Sci* 113:203–210
 49. Hoefman S, Van Hoorde K, Boon N, Vandamme P, De Vos P, Heylen K (2012) Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane oxidizing bacteria. *PLoS One* 7(4):e34146
 50. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA (2014) *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination and spores structural proteins. *Trends Microbiol* 22(7):406–416
 51. Rodríguez-Palacios A, Lejeune JT (2011) Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* 77(9):3085–3091
 52. Lloyd J, Cheyne J (2017) The origins of the vaccine cold chain and a glimpse of the future. *Vaccine* 35:2115–2120

9.2. Prêmios

- 9.2.1. Prêmio Professor Cláudio Bonjardim no V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018.



V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

PROFESSOR EDUARDO OSÓRIO CISALPINO:

Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas

CERTIFICADO

Certificamos que **Cruz, D. S. G.; Oliveira Júnior, C. A.; Pires, I. H.; Ferreira, A. C. A.; Guedes, R. M. C.; Silva, R. O. S.; Lobato, F. C. F.** teve o seu trabalho **“UTILIZAÇÃO DE UMA ESTIRPE NÃO TOXIGÊNICA Clostridium difficile (Z ;) PARA A PREVENÇÃO DE DIARREIA NEONATAL EM LEITÕES”** DESTACADO COM O PRÊMIO PROFESSOR CLAUDIO BONJARDIM no **“V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas”**, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2018.

Simone Gonçalves dos Santos

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Coordenadora do V Simpósio de Microbiologia da UFMG

Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

9.2.2. Grande Prêmio de Iniciação Tecnológica e Inovação na XXVI Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2017



Certificamos que o trabalho intitulado "UTILIZAÇÃO DE UMA ESTIRPE NÃO-TOXIGÊNICA CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE (Z31) PARA A PREVENÇÃO DE DIARREIA NEONATAL EM LEITÕES ", recebeu o Grande Prêmio de Iniciação Tecnológica e Inovação na XXVI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA , promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 16-10-2017 a 20-10-2017.

Autor(a): DIOGO SOARES GONCALVES CRUZ

Orientador(a): FRANCISCO CARLOS FARIA LOBATO do(a) ESCOLA DE VETERINÁRIA.

Co-Autores: ISADORA HONORATO PIRES , ANA CAROLINA DE ANDRADE FERREIRA , RAFAEL LOPES, ANA FLÁVIA DE CASTRO ALVIM , CARLOS AUGUSTO DE OLIVEIRA JÚNIOR , ROBERTO MAURÍCIO CARVALHO GUEDES, RODRIGO OTÁVIO SILVEIRA SILVA

Ado Jório de Vasconcelos
Pró-Reitor de Pesquisa

9.3.Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

- 9.3.1. Cadastro SisGen, número A6098AB: Estirpe não toxigênica de *Clostridium difficile* para prevenção e tratamento de infecção e/ou colonização por *Clostridium difficile*



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A6098AB

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A6098AB**
Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Clostridium difficile

Título da Atividade: **Estirpe não toxigênica de Clostridium difficile para prevenção e tratamento de infecção e/ou colonização por Clostridium difficile**

Equipe

Rodrigo Otávio Silveira Silva Universidade Federal de Minas Gerais
Francisco Carlos Faria Lobato Universidade Federal de Minas Gerais
Carlos Augusto de Oliveira Júnior Universidade Federal de Minas Gerais

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **SILVA, Rodrigo Otávio Silveira et al. Padronizaç**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Pereira, F. L., Oliveira Júnior, C. A., Silva, R. O.**

Data do Cadastro: **20/06/2018 14:49:04**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **21:24** de **20/06/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

9.3.2. Cadastro SisGen, número A0E1816: Desenvolvimento de produto para prevenção e tratamento de infecção e/ou colonização por *Clostridium difficile*



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A0E1816

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A0E1816**
Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Clostridium difficile

Título da Atividade: **Desenvolvimento de produto para prevenção e tratamento de infecção e/ou colonização por Clostridium difficile**

Equipe

Rodrigo Otávio Silveira Silva	Universidade Federal de Minas Gerais
Francisco Carlos Faria Lobato	Universidade Federal de Minas Gerais
Carlos Augusto de Oliveira Júnior	Universidade Federal de Minas Gerais

Data do Cadastro: **04/07/2018 13:19:30**
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:19** de **04/07/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

9.4. Certificado CEUA 013/2014: Avaliação de estirpes não toxigênicas de *Clostridium difficile* para a prevenção de diarreia neonatal em leitões



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


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º. **013/2014**, relativo ao projeto intitulado “*Avaliação de estirpes não toxigênicas de Clostridium difficile para a prevenção de diarreia neonatal em leitões.*”, que tem como responsável **Francisco Carlos Faria Lobato** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado com sugestão na reunião de 07/04/2014. Este certificado expira-se em 06/04/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol n.º. **013/2014**, related to the Project entitled “*Evaluation of non-toxigenic strains of Clostridium difficile for the prevention of neonatal diarrhea in piglets*”, under the supervision of **Francisco Carlos Faria Lobato**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 04/07/2014. This certificate expires in 04/07/2019.

Belo Horizonte, 09/04/2014.


Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenadora da CEUA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516 – Fax: (31) 3409-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

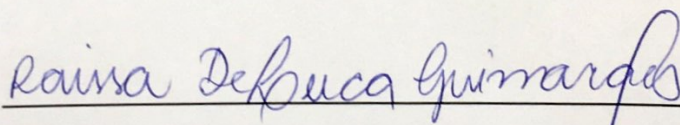
9.5. Depósito de Know-how: Uso de estirpe não toxigênica de *Clostridium difficile* para prevenção e tratamento da infecção e/ou colonização por *Clostridium difficile*

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o *know-how* intitulado "USO DE ESTIRPE NÃO-TOXIGÊNICA CLOSTRIDIUM DIFFICILE PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO E/OU COLONIZAÇÃO POR CLOSTRIDIUM DIFFICILE" foi registrado internamente na Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT/UFMG) sob o nº 53, no dia 18.07.2018. Constam como autores do referido *know-how*: Francisco Carlos Faria Lobato, Rodrigo Otávio Silveira Silva e Carlos Augusto de Oliveira Júnior.

Por ser verdade, firmo o presente documento.

Belo Horizonte/MG, 14 de agosto de 2018.



Raissa De Luca Guimarães

Coordenadora do Setor de Propriedade Intelectual
Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica - CTIT