

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO DE VIAS DE
TRANSMISSÃO DE *Clostridium difficile* EM LEITÕES JOVENS**

**Lívia Boarini Ferroni
Bióloga**

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO DE VIAS DE
TRANSMISSÃO DE *Clostridium difficile* EM LEITÕES JOVENS**

Lívia Boarini Ferroni

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

B662i Boarini-Ferroni, Livia
Infecção experimental e avaliação de vias de transmissão de
Clostridium difficile em leitões jovens / Livia Boarini Ferroni. --
Jaboticabal, 2016
vi, 56 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Co-orientador: Luis Guilherme de Oliveira

Banca examinadora: Alessandra Aparecida Medeiros, Caroline
Peters Pigatto de Nardi, Fernando Antônio Ávila, Lilian Cristina Makino
Bibliografia

1. Desafio. 2. Clostridiose. 3. Suínos. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.4



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFECÇÃO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO DE VIAS DE TRANSMISSÃO
DE *Clostridium difficile* EM LEITÕES JOVENS

AUTORA: LIVIA BOARINI FERRONI

ORIENTADOR: RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

COORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ALESSANDRA APARECIDA MEDEIROS
Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia/MG

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO
UNESP - / Registro, SP

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2016

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LIVIA BOARINI FERRONI – Nascida em Jaboticabal, SP, aos 24 de Março de 1986, filha de Maria Aparecida Morello Boarini e Jayme Aparecido Boarini, graduada em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas (2008), pelo Centro Universitário de Araraquara, SP. Mestre em Microbiologia Agropecuária (2013) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), sob orientação do Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Os grandes propósitos são sempre atravessados por diversos obstáculos e dificuldades”

São Vicente de Paulo

Dedico esta Conquista

À minha família, em especial a meus pais (Jayme e Maria Ap.) que me ensinaram a sempre ter coragem e nunca desistir perante as dificuldades;

E ao meu marido Felipe, por todo companheirismo, incentivo e ser meu suporte nos momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Dom da Vida e por me manter na Fé por todos momentos de maiores dificuldades; e à Maria Santíssima que sempre intercedeu por mim quando mais precisei de Fé, paciência e auxílio na caminhada. Não conseguiria sem a Força da Oração.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, ao Programa de Microbiologia Agropecuária e a Todos os Docentes que auxiliaram em minha caminhada acadêmica, além do ótimo ensino e acolhimento que sempre proporcionaram.

À Capes pela bolsa concedida, e as agências de fomento FAPESP e CNPq que contribuíram indiretamente para a execução dessa pesquisa.

À Fazenda Progresso por ter cedido todos os leitões no decorrer do projeto e experimento.

Ao Prof. Dr. Pablo, por acreditar no meu trabalho, me permitindo adquirir conhecimento acadêmico e para a Vida, e principalmente por toda confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Luis Guilherme, pela prontidão em me co-orientar, e por todos os ensinamentos e colaboração na execução do projeto.

As minhas queridas amigas da Microbiologia, que compartilharam momentos únicos, difíceis, de aconselhamentos, cumplicidade e muita amizade. Marita, Mari, Uréia, Lilian e Silvina, não sei como agradecer por tantos momentos vividos. Vocês fizeram toda a diferença! Espero que nossa amizade perdure por anos sem fim.

Aos amigos que ganhei nesse doutorado da SUINOS, muito obrigada pela amizade e por todo aprendizado em suínos.

.As amigas do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Andressa, Roberta, Larissa obrigada por sempre me receberem e partilharem de aprendizados acadêmicos e de vida.

A todos meus amigos de Jabuka, que sempre torceram por mim e pela minha carreira profissional. Obrigada por partilharem dos meus momentos.

E em especial, ao meus Pais (Jayme e Maria Ap.) e a meu marido (Felipe), os quais eu sei que poderei contar a todo momento e em todas minhas necessidades. São vocês que me amparam e me colocam em seus colos de amor. Amo vocês!!

E ao meu irmão, minha cunhadinha e a toda minha Família (primas, primos, tios, tias, sogro e sogra), obrigada por estarem sempre presentes torcendo pelo meu sucesso

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO LITERATURA	20
2.1. <i>Clostridium difficile</i>	20
2.2. Característica de Ação e Patogenicidade.....	20
2.3. Ação tóxica.....	21
2.4. Ação Inflamatória	22
2.5. <i>Clostridium difficile</i> em Animais.....	23
2.6. <i>Clostridium difficile</i> em Humanos	24
2.7. Perfil de Resistência.....	25
2.8. Métodos de Identificação.....	25
2.9. Fatores Negativos na Produção	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E METODOS	29
4.1. Transmissão Naso-Nasal	29
4.2. Transmissão Aerógena	34
5. RESULTADOS	37
5.1. Transmissão Naso-Nasal	37

5.2. Transmissão Aerógena	43
6. DISCUSSÃO	48
6.1. Transmissão Naso-Nasal	48
6.2. Transmissão Aerógena	51
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERENCIAS.....	55



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

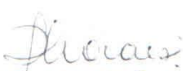


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 006479/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Transmissão horizontal de *Clostridium difficile* em leitões recém-desmamados submetidos a desafio", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de agosto de 2014.

Jaboticabal, 12 de agosto de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

INFECÇÃO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO DE VIAS DE TRANSMISSÃO DE *Clostridium difficile* EM LEITÕES JOVENS

RESUMO – A infecção por *Clostridium difficile* é na maioria das vezes de manifestação subclínica em leitões jovens. E como atualmente este agente tem tido grande importância na medicina veterinária e possivelmente potencial zoonótico, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a transmissão de *C. difficile* por via naso-nasal e aerógena em leitões jovens, utilizando análises microbiológicas, histopatológicas e moleculares. Leitões foram divididos em três grupos (Infectado, Sentinela e Controle), e distribuídos em baias isoladoras. Os grupos Infectados receberam inóculo 10^9 UFC.mL⁻¹ e 10^8 UFC.mL⁻¹ de *C. difficile* 096 para via de transmissão naso-nasal e aerógena, respectivamente. Suabes anorretais foram colhidos diariamente para análises microbiológicas e moleculares da excreção nas fezes, utilizou-se técnica de PCR com iniciadores oligonucleotídeos que codificam os genes das toxinas TcdB e TcdA de *Clostridium difficile* para identificação molecular. Realizou-se eutanásia dos leitões, após 18 dias de infecção experimental, para avaliações histopatológicas e microbiológicas de intestino delgado, cólon, fígado, baço, tonsilas palatinas e linfonodos. Os grupos Infectado e Sentinela da via naso-nasal desenvolveram sinais clínicos de enfermidade, enquanto os animais da via aerógena não apresentaram sinais de infecção. Os leitões avaliados por via naso-nasal foram positivos para o gene TcdB nos grupos Infectado e Sentinela, enquanto os leitões desafiados por via aerógena foram positivos para TcdB apenas no grupo Infectado. Nas análises histopatológicas dos leitões da via naso-nasal foram observadas diversas lesões nos órgãos alvos tanto dos animais do grupo Infectado quanto no Sentinela; nos leitões da via aerógena avaliados histologicamente, apenas o grupo Infectado apresentou lesões nos órgãos, sendo que em ambas as vias, as lesões mais notáveis foram no intestino delgado. A transmissão de *Clostridium difficile* foi confirmada com a técnica de PCR apenas na via naso-nasal, inclusive com sinais clínicos durante período experimental no grupo Sentinela. Com isso, destaca-se a importância do controle preventivo deste agente nas granjas, a fim de minimizar a ocorrência de infecções em leitões jovens. Conclui-se que experimentalmente o *Clostridium difficile* pode ser transmitido entre leitões jovens pelo contato focinho-focinho, desencadeando doença clínica. Por outro lado, a transmissão pela via aerógena não ocorreu entre suínos jovens em situação experimental.

Palavras-Chave: desafio, clostridiose, suínos

EXPERIMENTAL INFECTION AND EVALUATION OF TRANSMISSION ROUTES OF *Clostridium difficile* IN YOUNG PIGLETS

ABSTRACT – *Clostridium difficile* infection is most often of subclinical manifestation in young piglets. As this agent has been of great importance in veterinary medicine and also zoonotic potential, the objective of this research was to evaluate the naso-nasal and aerogenic transmission of *C. difficile* in young pigs, using microbiological, histopathological and molecular analyzes. Piglets were divided into three groups (Infected, Sentinel and Control), and distributed in isolation bays. The infected group received inoculum 10^9 CFU.mL⁻¹ and 10^8 CFU.mL⁻¹ of *C. difficile* 096 for the naso-nasal and aerogenic transmission route, respectively. Anorectal swabs were harvested for microbiological and molecular analyzes of faecal excretion, a PCR technique was used with primers that encode the TcdB and TcdA toxin genes of *Clostridium difficile* for molecular identification. Euthanasia of piglets after 18 days of experimental infection was performed for histopathological and microbiological evaluations of small intestine, colon, liver, spleen, palatine tonsils and lymph nodes. The Infected and Sentinel groups of the naso-nasal route developed clinical signs of disease, whereas the animals in the aerogenic showed no signs of infection. The naso-nasal piglets were positive for the TcdB gene in the Infected and Sentinel groups, while the pigs challenged by the aerogenic route were positive for TcdB only in the Infected group. In the histopathological analyzes of piglets of the naso-nasal route, several lesions were observed in the target organs of both the Infected group and the Sentinel; in the piglets of the aerogenic histologically evaluated, only the Infected group presented lesions in the organs, and in both routes, the most notable lesions were in the small intestine. Only the naso-nasal route confirmed transmission of *Clostridium difficile*, including clinical signs during the experimental period in the Sentinel group. With this, it stands out as a preventive control of this agent in the farms, in order to minimize an occurrence of infections in young piglets. It is concluded that experimentally, *Clostridium difficile* can be transmitted between young piglets the snout-snout contact, triggering clinical disease. On the other hand, aerial transmission did not occur among young experimental pigs.

Keywords: challenge, clostridiosis, swines

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados neste estudo.	31
Tabela 2: Sinais Clínicos apresentados pelos leitões do grupo Infectado e Sentinela após infecção experimental por <i>Clostridium difficile</i>	35
Tabela 3: Excreção de <i>Clostridium difficile</i> pelos leitões dos grupos Infectado e Sentinela pós-infecção por <i>C. difficile</i> no período de 17 dias.....	39
Tabela 4: Alterações microscópicas do jejuno, íleo, cólon proximal e cólon distal de leitões do grupo Infectado e Sentinela, infectados experimentalmente por <i>C. difficile</i> após 18 dias de infecção.....	39
Tabela 5: Alterações microscópicas das tonsilas palatinas, linfonodos ileocólicos, linfonodos mesentéricos e baço de leitões do grupo Infectado e Sentinela, infectados experimentalmente por <i>C. difficile</i> após 18 dias de infecção.....	40
Tabela 6: Alterações microscópicas dos órgãos dos leitões do grupo Infectado após 18 dias de infecção experimental por <i>Clostridium difficile</i> avaliando a via de transmissão aerógena.....	43
Tabela 7: Excreção de <i>C. difficile</i> pelos animais do grupo Infectado após a infecção experimental por <i>C. difficile</i> por via aerógena	47

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Disposição dos isoladores para avaliação de transmissão de *Clostridium difficile* por via naso-nasal. (1) Entrada de ar com filtro HEPA; (2) Condutores de ar; (3) Caixa de entrada dos leitões, dotada de porta interna e externa; (4) Reservatório para ração; (5) Orifício para conexão com outro isolador (contato naso-nasal); (6) Cabine isoladora do grupo Controle; (7) Cabine isoladora do grupo Sentinela; (8) Cabine isoladora do grupo Infectado; (9) Saída de ar com filtro HEPA; (10) Reservatório para excretas.31
- FIGURA 2.** Disposição linear dos isoladores para avaliação de transmissão de *Clostridium difficile* por via aerógena. (1) Entrada de ar com filtro HEPA; (2) Condutores de ar; (3) Cabine isoladora do grupo Controle; (4) Cabine isoladora do grupo Infectado; (5) Cabine isoladora do grupo Sentinela; (6) Saída de ar com filtro HEPA.35
- FIGURA 3.** (A) Leitão do grupo Infectado por *C. difficile*, apresentando diarreia pastosa amarelada; (B) Leitão do grupo Infectado demonstrando vermelhidão/dermatite subcaudal e erupções perianal após período de diarreia; (C) Intestino delgado com hemorragia difusa, repleto de gases (enterite hemorrágica); (D) Intestino delgado hemorrágico, distensão das alças e presença de gás.....38
- FIGURA 4.** Eletroforese do produto da PCR visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (Applied Biosystems); (Pb) Pares de bases; (PM) Padrão de peso molecular; (CN) Controle Negativo da reação de PCR; (CP) Controle positivo da reação utilizando os primers do gene *tcdB*; (1 ao 9) Amostras representativas para a positividade de *Clostridium difficile* nas fezes dos leitões dos grupos Infectado e Sentinela.....39
- FIGURA 5.** Histopatologia das lesões causadas por *C. difficile* aos 18 dias pós-infecção experimental. A. Cólon: hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes (asteriscos). Coloração (Col.): Hematoxilina-Eosina (H-E). Aumento (A): 400x. B. Intestino Delgado: edema de mucosa e submucosa (destaque). Col.: H-E. A.: 100x. C. Intestino Delgado: presença de bactérias bastoneiformes (destaque) inseridas no estrato submucoso, comprovando a colonização do órgão. Canto superior direito: insert evidenciando bactérias bastoneiformes. Col.: H-E. A.: 400x. D. Intestino

Delgado: ruptura epitelial (quadrado) e descamação da mucosa (chave). Col.: H-E. A.: 400x. E. Intestino Delgado: áreas de necrose e descamação epitelial (destaque) e áreas de congestão (círculo). Col.: H-E. A.: 200x. F. Baço: hipotrofia linfóide (quadrado) e áreas de congestão (destaques em vermelho). Col.: H-E. A.: 400x. ...42

FIGURA 6. Intestino de suínos do grupo Infectado após 18 dias de infecção experimental com *C. difficile*; (A) Alças intestinais repletas de gases e adelgadas; (B) Presença de gases no conteúdo intestinal.....43

FIGURA 7. Análises histopatológica dos animais do grupo Infectado com *Clostridium difficile*. (A) Intestino delgado: hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes (asteriscos). Presença de macrófagos (seta). Coloração H-E. Aumento 400x; (B) Cólon com presença de discretos infiltrados mononucleares (destaque) e hiperplasia nas criptas e células caliciformes (asteriscos). Coloração H-E. Aumento 400x; (C) Fígado com discreta inflamação nos ductos, nas artérias e veias da região portal. Coloração H-E. Aumento 200x; (D) Baço com congestão e áreas arredondadas sugerindo presença de macrófagos. Coloração H-E. Aumento 200x; (E) Intestino Delgado hemorrágico com pontos de necrose. Coloração H-E. Aumento 200x; (F) Intestino delgado com desnudamento focal no topo das vilosidades. Coloração H-E. Aumento 40x.45

FIGURA 8. (A) Intestino delgado com sinais hemorrágicos nos leitões infectados experimentalmente por *C. difficile*; (B) Ceco hemorrágico de leitão infectado por *C. difficile*.....46

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura no âmbito mundial destaca-se como uma atividade de grande importância econômica e social, e na indústria brasileira essa atividade também tem se destacado em produção de carne e com produtos cárneos derivados dessa matéria-prima.

Neste setor produtivo estima-se que cerca de 730 mil pessoas são diretamente beneficiadas com o processo integrado suinícola, desde a disponibilidade de grãos e insumos para a alimentação dos rebanhos até a produção final de carne e derivados (Gonçalves e Palmeira, 2006 *apud* Carvalho e Viana, 2012).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os investimentos na suinocultura no Brasil contribuem para que a produção atinja crescente aumento de 4% ao ano, sendo os estados do Sul brasileiro os principais investidores e produtores no país. Além disso, o Brasil representa 10% do total de volume exportado de carne suína mundialmente, lucrando desta forma cerca de um bilhão de dólares/ano.

Os dados acima indicam como esta atividade possui caráter competitivo e amplo, e dessa forma, a partir de um planejamento adequado na produção, o Brasil tende a se destacar tanto na produção quanto na exportação de carne suína, ao lado da bovina e avícola. Além deste fato, o custo produtivo brasileiro é considerado o menor frente a países como China e Estados Unidos, contribuindo dessa forma com para melhor procura comercial (COLONI, 2011).

Diante do cenário lucrativo e promissor que a suinocultura vem demonstrando, os produtores e toda indústria pertencente a este setor, devem-se atentar aos cuidados de manejo e sanidade animal, os quais interferem diretamente no sucesso do setor e da produção.

Dentre os cuidados sanitários na suinocultura, vários agentes bacterianos são responsáveis por enfermidades nos animais e conseqüentemente prejuízos econômicos, e as clostridioses são um perigo constante para os rebanhos com

prejuízos certos aos pecuaristas, já que sua ação é encarada de forma agressiva para a saúde animal e seu controle dificilmente realizado.

Diante de várias clostridioses que interferem no setor, uma forma recente de infecção nos suínos ocorre pelo *Clostridium difficile*, o qual infecta principalmente leitões neonatos, causando inapetência, diarreia, edema facial, depressão e até morte súbita. Estima-se que leitões infectados por *C. difficile*, em grau mais brando, apresentam redução no desempenho, como o peso ao desmame, de até 15% (OUROFINO, 2012). Este fato é relevante e preocupante para que, principalmente, medidas profiláticas sejam adotadas na suinocultura brasileira, a fim de afastar problemas e prejuízos futuros.

O *Clostridium difficile* é uma bactéria amplamente distribuída no ambiente, que pode ser encontrada em amostras de solo, água, trato intestinal de animais e mesmo em produtos alimentícios. É um bastonete Gram positivo, formador de esporos e anaeróbio estrito. Na literatura, além dos leitões (SONGER; ANDERSON, 2006; AVBERSEK et al., 2009; DEBAST et al., 2009; NORMAN et al., 2009; HOPMAN et al., 2011), há outros animais também são considerados portadores deste agente, como ovinos, equinos (BAVERUD et al., 2003), cães (ARROYO et al., 2005), bovinos (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007), elefantes (BOJESEN; OLSEN; BERTELSEN, 2006) e moluscos bivalves (TROIANO et al., 2015).

Hopman et al (2011) encontraram *C. difficile* em fezes tanto de leitões doentes, quanto de leitões saudáveis. Além disso, esses autores também encontraram similaridade genética das cepas isoladas de leitões e de humanos, levantando-se grande possibilidade desses animais estarem diretamente relacionados a serem reservatórios para humanos, ou ainda hospedeiro clínico.

Porém, as ações de transmissão relacionadas a epidemiologia de *C. difficile* estão ainda à serem esclarecidas, já que há controvérsias tanto no modo de ação dessa bactéria quanto no de transmissão.

Com isso a questão sanitária é de extrema importância tanto para os pecuaristas garantirem os lucros e o retorno dos investimentos, como para os consumidores dos produtos finais, já que tal agente pode manter-se por toda linha de produção e contaminar a carne para consumo. Como a boa procedência e a segurança alimentar preocupam os consumidores, técnicas que priorizam toda a

higiene operacional e a eliminação de microrganismos patogênicos do meio contribuem com a aceitação no mercado consumidor.

2. REVISÃO LITERATURA

2.1. *Clostridium difficile*

Clostridium difficile é uma bactéria em forma de bastonete, composta por parede celular de peptidoglicano espessa que ao ser corada pelo método de Gram, se apresenta como positiva (FRAISE et al, 2015). Seu metabolismo é anaeróbio estrito, e esta espécie possui várias exigências nutricionais para crescimento *in vitro*. Por ser uma espécie patogênica, a utilização de meios de cultura compostos com adição de sangue são habituais para avaliação de hemólise, sendo que nesta espécie se-dá por β -hemólise ou γ -hemólise (JOBSTL et al, 2010; LOBATO, 2013).

A transmissão de *C. difficile* ocorre por via fecal-oral, principalmente a partir dos esporos que são transmissíveis de pessoas ou animais doentes para organismos saudáveis que estejam com depleção da microbiota intestinal, já que este agente utiliza desse fator como estratégia de adesão (LEAV et al, 2010). Os esporos e células vegetativas ao adentrarem no organismo pela via oral, passam pelo estômago do hospedeiro, onde as células vegetativas são eliminadas pela ação digestória. Os esporos por sua vez, após a ação gástrica, germinam e continuam o trajeto até encontrarem células do epitélio intestinal para sua adesão.

2.2. Característica de Ação e Patogenicidade

Após a aderência e colonização de *C. difficile* nas células e tecidos do organismo, inicia-se a produção das toxinas A e B. Essas toxinas agem sobre o citoesqueleto de actina no epitélio gastrointestinal e induzem ao acúmulo de fluídos e a resposta inflamatória (CARTER et al, 2010). Com isso, há a liberação de citocinas pelas células do hospedeiro e recrutamento de neutrófilos, levando também a desorganização do citoesqueleto, o que compromete as junções celulares e acarreta arredondamento celular e apoptose dos enterócitos (SONGER, 2004).

A virulência de *C. difficile* é mediada pela produção destas duas toxinas, sendo que a toxina A é caracterizada por ser uma enterotoxina e a toxina B uma citotoxina. Ambas são também glicosiltransferase que inativam Rho, Rac e Cdc42,

interrompendo a atuação do citoesqueleto e junções das células epiteliais do cólon (JUST; GERHARD, 2004; JANK et al., 2007).

A patogenicidade das cepas toxigênicas do *C. difficile* são formadas pelos genes TcdA, TcdB, TcdC, TcdE e TcdR, sendo que os dois primeiros que codificam a produção das toxinas A e B, respectivamente. Os genes TcdR e TcdC são reguladores da produção das toxinas, positivo e negativo, respectivamente. E o gene TcdE é um auxiliador, o qual propicia a abertura de poros para que a passagem das toxinas possa ocorrer (PEREIRA et al., 2014).

Os domínios de ligação ao receptor de carboxi-terminal funcionalmente semelhantes são partilhados pelos genes TcdA e TcdB, mediando a ligação das toxinas ao receptor de carboidratos na superfície do epitélio intestinal (GRECO et al., 2006)

2.3. Ação tóxica

A ação da toxina A atua principalmente no estímulo da produção de citocinas, quimiocinas e liberação de metabólitos de ácido araquidônico, além de influenciar a migração e ativação de neutrófilos e macrófagos, agravando o processo inflamatório e as lesões celulares. Após sua produção, ela se fixa aos receptores do enterócito e é ativada, internalizando sua atuação como enterotoxina e citotoxina (PEREIRA et al, 2014).

Ainda não está demonstrada a existência de receptores neste mesmo local para a toxina B, contudo, sabe-se que esta constitui-se na mais potente citotoxina, e age interrompendo as fibras de actina do citoesqueleto e destruindo o epitélio. Além de ser fundamental na virulência de *C. difficile*, pois as cepas que produzem apenas essa toxina causam doenças semelhantes e até de maior gravidade que as cepas que apenas produzem a toxina A (PEREIRA et al, 2014).

E, além destas duas toxinas, algumas estirpes podem produzir a toxina binária, a qual segundo alguns autores contribui para a adesão da bactéria às células epiteliais do cólon, aumentando a virulência desse patógeno, porém sua função ainda não é bem esclarecida (SANTOS et al., 2015).

Esta terceira toxina, a binária, já foi identificada por PCR em certas estirpes (ribotipos 027 e 078), sendo associada a níveis altos de mortalidade e morbidade (GOORHUTS et al., 2008). Sugere-se também que esta toxina contribui para a gravidade da doença, pois demonstrou-se que ela afeta na adesão de *C. difficile* às células pela formação de uma protrusão das células epiteliais (SCHWAN et al., 2009).

A cepa conhecida como BI/NAP1/027, é um caso de cepa constituída pela toxina binária, e se apresenta como hipervirulenta, pois além de produzir as duas toxinas conhecidas, produz também a toxina binária, além de possuir uma menor participação do gene TcdC, que é responsável pela regulação negativa da produção das toxinas (PEREIRA et al., 2014).

Além dessas toxinas relacionadas a virulência de *C. difficile*, pouco se conhece sobre outros possíveis fatores de virulência e seu papel na colonização e estabelecimento da infecção no hospedeiro. O que se encontra na literatura, são possíveis proteínas de superfície que estão envolvidas, ou hipoteticamente envolvidas, no desempenho de adesão no cólon, as quais são as proteínas flagelares (TASTEYER et al., 2001), proteína de camada S (CALABI et al., 2002), Cwp84 (JANOIR et al., 2007), proteína A de ligação à fibronectina (BARKETI-KLAI et al., 2011) e CD1581 (JANOIR et al., 2013).

Outro agravante das infecções por *C. difficile* é que com a lesão no epitélio intestinal, as toxinas podem atingir a circulação sistêmica, levando a uma intensa migração leucocitária intestinal e provocando reação sistêmica (LOBATO et al., 2013).

2.4. Ação Inflamatória

O quadro clínico de infecção por *C. difficile* mais comum, ocorre na porção gastrointestinal, pela ativação de mecanismos inflamatórios que acarretam sinais de diarreias, que se assemelha às diarreias causadas por salmoneloses. São caracterizadas por um aumento da permeabilidade da barreira intestinal com perda de água, eletrólitos e proteínas. Desse modo, o conteúdo do cólon adquire frequentemente coloração amarelada com consistência mais pastosa (SONGER; ANDERSON, 2006).

A intensidade dos sinais clínicos e lesões variam de acordo com o indivíduo e o “*status*” do sistema imunológico, podendo apresentar enterite de intensidade leve a severa, colite pseudomembranosa, edema, ascite, até necrose e perda de vilosidades, o que altera o desenvolvimento dos animais infectados (KEEL; SONGER, 2006).

Trabalhos científicos demonstraram que, com a microbiota intestinal bem estabelecida e saudável a aderência desse agente é minimizada, já que a principal estratégia de adesão ocorre quando a microbiota não é capaz de inibir a colonização. Normalmente as bactérias presentes no lúmen produzem ácidos que modificam o pH intestinal e saturam o epitélio onde ocorre a aderência. Por esse motivo o *C. difficile* coloniza comumente o intestino após alguma depleção intestinal (SILVA et al., 2011).

2.5. *Clostridium difficile* em Animais

Infecções por *C. difficile* em animais de produção tem sido descrito nas últimas duas décadas, acometendo principalmente leitões neonatos (SONGER; ANDERSON, 2006; AVBERSEK et al., 2009; DEBAST et al., 2009; NORMAN et al., 2009; HOPMAN et al., 2011). A gama de criações que relataram a presença deste agente vem aumentado consideravelmente. Criações como ovinos (BAVERUD et al., 2003), bovinos (RODRIGUES-PALACIOS et al., 2007; COSTA et al., 2012), moluscos bivalves (TROIANO et al., 2015), e com grande frequência atualmente a avicultura (ZIDARIC et al., 2008; SIMANGO et al., 2008; WEESE et al., 2010; SKRABAN et al., 2013) veem sofrendo com infecções e prejuízos econômicos por *C. difficile*.

Infecção em leitões por *C. difficile* já foram descritas há mais de duas décadas, caracterizada por sinais clínicos de dispneia, distensão abdominal e diarreia em animais de até 5 dias de vida. Macroscopicamente foram demonstradas lesões como edema escrotal, ascite, edema de mesocólon e no cólon ascendente, com acúmulo multifocal de muco e fibrina (SONGER et al., 2000).

As infecções por *C. difficile* em leitões ocorrem principalmente nos neonatos de até 7 dias de idade, devido à ausência da microbiota permanente e pela imaturidade do sistema imunológico, fatos que resultam em uma infecção mais agressiva e algumas vezes fatal (RAMIREZ et al., 2014).

Em animais jovens e adultos com microbiota saudável, as infecções subclínicas ocorrem e mantêm esses indivíduos como portadores e excretadores intermitentes do agente (LOBATO et al., 2013), o que contribui para a manutenção da bactéria no ambiente, causando infecções recorrentes e comprometendo a performance, e a saúde do rebanho, além de ser um alerta para saúde pública.

Outros relatos de infecções por *C. difficile* ocorrem também em animais de companhia e equinos (KELL et al., 2007), alertando ainda mais às questões de saúde pública, principalmente pela proximidade e contato com o ser humano.

2.6. *Clostridium difficile* em Humanos

As infecções em humanos já foram objeto de estudos epidemiológicos relatados em várias partes do mundo, como em vários países da América do Norte e Europa (WARNY et al., 2005), e também Taiwan (HUNG et al., 2012) e Finlândia (KOTILA et al., 2013). Estirpes de *C. difficile* foram isoladas de produtos de origem animal e de animais domésticos, e apresentaram grande semelhança genética com estirpes isoladas de infecções humanas no Brasil (LOBATO et al., 2013).

No ser humano, o patógeno *C. difficile* é o principal responsável por diarreias nosocomiais infecciosas, podendo causar diversos sintomas, desde uma diarreia leve, até quadros de maior gravidade como a colite pseudomembranosa (KUIJPER et al., 2006). A prevalência global de casos relatados por infecção em humanos vem aumentando na última década, inclusive com maiores casos graves da doença e mortalidade (CHEN et al., 2015)

Segundo Rupnik et al., (2009), as diarreias nosocomiais ocasionadas por *C. difficile* e associadas a utilização de antibióticos são a principal causa de 500.000 novas infecções e 20.000 mortes ocorridas anualmente nos Estados Unidos. Associando ao uso dos antibióticos no tratamento de enfermos a ruptura da microbiota gastrointestinal, o que estimula o crescimento e colonização excessivos de *C. difficile*.

Com isso, o tratamento para esta clostridiose é de extrema dificuldade, dada a persistência dos esporos no ambiente hospitalar, bem como a falta de terapias medicamentosas eficazes para o combate ao agente, principalmente quando a doença é recorrente.

2.7. Perfil de Resistência

Atualmente, os protocolos medicamentosos para o tratamento terapêutico de infecções por *C. difficile* estão baseados na associação de metronidazol e vancomicina. Porém há vários relatos que o tratamento com a metronidazona não tem sido eficaz, e que o *C. difficile* vem demonstrando resistência a este antibiótico (NORMAN et al., 2014).

A alta resistência a inúmeros antibióticos é a maior preocupação das infecções por *C. difficile*, pois além de causarem infecções altamente agressivas, a ausência de possíveis tratamentos conduz ao aumento de morbidade e mortalidade associadas a estas infecções.

Outro fator que dificulta o tratamento de pessoas infectadas por *C. difficile* é a sua identificação, pois para este agente, a microbiologia básica não contribui para um diagnóstico rápido, já que a identificação por esta técnica há exigências nutricionais para o crescimento *in vitro*, além do tempo estimado para o crescimento, sendo que autores indicam até 7 dias (AVBERSEK et al., 2013).

2.8. Métodos de Identificação

Inicialmente a tipagem das amostras sugestivas de *C. difficile* eram baseadas a partir do fenótipo após o crescimento em placas, seguido de classificação por sorologia, porém com o advento da biologia molecular e a facilidade de genotipagem baseada na PCR, a utilização dessas técnicas permitiu uma maior diferenciação das amostras, com uma execução menos laboriosa (SILVA, 2014).

A partir da facilidade de genotipagem e identificação por conceito molecular, esquemas como a ribotipagem e a avaliação toxigênicas das cepas de *C. difficile* são os métodos mais utilizados de diferenciação (STUBBS et al., 2000). Além disso, autores partem do princípio que o isolamento de *C. difficile* seguido de tipagem tem se mostrado essencial para a elucidação da epidemiologia da doença (LEMEÉ et al., 2004; ARROYO et al., 2007). Existem evidências também que a tipificação permite afirmar com convicção sobre a potencial de virulência das estirpes de *C. difficile* (STUBBS et al., 2000).

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é capaz de amplificar seletivamente os genes responsáveis pelas toxinas A (TcdA) e B (TcdB), as quais podem estar distribuídas nas estirpes de *C. difficile* como *tcdA*⁻/*tcdB*⁺, *tcdA*⁺/*tcdB*⁺, *tcdA*⁻/*tcdB*⁻, sendo que em bactérias com maior potencial patogênico sempre há a presença de *tcdB*, não havendo relatos de efeitos da presença de estirpes apenas com *tcdA*. Além disso, a detecção do gene TcdB por PCR é um indicativo de citotoxicidade da estirpe de *C. difficile* (OSSIPRANDI et al., 2010).

A detecção de *C. difficile* por PCR é uma ótima alternativa para um diagnóstico eficiente e rápido, e sem a necessidade de toda execução microbiológica para o isolamento. Outras técnicas também podem ser utilizadas, como os kits ELISA, mas atualmente esta técnica tem apresentado resultados insatisfatórios para diagnóstico. Esta técnica detecta apenas a toxina A, e estirpes variantes como as cepas A⁻B⁺ que estão habitualmente envolvidas nas infecções e que possuem alta virulência, deixariam de ser detectadas, apresentando um diagnóstico falso-negativo (ARROYO et al., 2007).

As estirpes variantes tem aumentado sua prevalência diante das infecções por *C. difficile*, e possuem grande interferência nos surtos em humanos e animais. Estudos tem sugerido que alguns tipos toxigênicos de *C. difficile* tem alta correlação com uma maior seriedade da doença (VOTH & BALLARD, 2005). Em estudo com animais, essas cepas variantes também apresentaram frequência significativa nas infecções, estimando que 17% das estirpes eram variantes (ARROYO et al., 2007).

2.9. Fatores Negativos na Produção

No setor agropecuário e na medicina veterinária, a ocorrência de infecções por *C. difficile* têm comprometido o desempenho dos diversos setores, principalmente na suinocultura, sendo que esta bactéria possui as maiores prevalências de infecções (KEEL et al., 2007). Esse fato compromete a saúde dos animais e a recria, além de aumentar os gastos destinados ao tratamento dos animais doentes e o controle da transmissão desse patógeno.

Este agente prejudica também a conversão alimentar, pois mesmo doentes os animais não apresentam grande inapetência e consomem ração normalmente, promovendo uma baixa eficiência alimentar.

Além da importância na medicina veterinária e na suinocultura, outro agravamento da ocorrência de *C. difficile*, é seu possível potencial em ser uma zoonose (JOBSTL et al., 2010).

Apesar da importância deste patógeno na suinocultura, atualmente os dados não estão claros quanto ao tipo de transmissão desse microrganismo nas granjas, bem como a relação com a idade e prevalência em animais com e sem sinais de diarreia (ALVAREZ-PEREZ et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar duas vias de transmissão para *Clostridium difficile* em leitões jovens após infecção experimental

3.2. Objetivos Específicos

Verificar possível transmissão de *Clostridium difficile* por via aerógena e via direta (naso-nasal), após infecção experimental em leitões jovens.

Avaliar os sinais clínicos da doença e período de excreção do microrganismo.

Verificar alterações macroscópicas e microscópicas nos tecidos de leitões jovens desafiados experimentalmente.

4. MATERIAL E METODOS

Todo protocolo experimental adotado seguiu os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Jaboticabal, registrado sob o nº006479/14.

4.1 Transmissão Naso-Nasal

A fim de avaliar a via de transmissão nasal em leitões em fase de creche, o delineamento contou com seis leitões de 20 dias de idade, saudáveis e de uma mesma leitegada. Os animais foram divididos em três grupos de tratamento (Infectado, Sentinela e Controle), em que cada grupo contou com dois leitões. Para esta proposta de ensaio, toda metodologia ocorreu com duas repetições para o experimento de transmissão, totalizando 12 animais utilizados.

Os grupos de leitões foram dispostos em isoladores com sistema de entrada e saída de ar controlados e filtrados por filtros HEPA, situados no Câmpus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP.

O inóculo foi preparado a partir de cepa toxigênica *C. difficile* 096, cedida pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a qual foi recuperada e isolada na unidade de Escola Veterinária desta mesma instituição de um animal infectado.

A cepa toxigena de *C. difficile* 096 foi repicada em meio sólido de BHI (Brain Heart Infusion) Himedia® e incubada a 37°C por 48h em jarras de anaerobiose com Anaerobac®. Então, colônias foram repicadas em 6 mL de solução de água peptona 0,1%, até se obter a concentração de 10⁶ na escala de MacFarland®. Com a concentração atingida, transferiu-se 1 mL da solução em placas de Petri estéreis, adicionou-se meio de cultura BHI fundido, homogeneizou-se pela técnica de “pour-plate” e incubou-se a 37°C por 48h em jarras de anaerobiose com Anaerobac®.

Realizou-se a contagem bacteriana e dessa forma o número exato de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do inóculo.

A solução de água peptonada 0,1% concentrada com *C. difficile* foi centrifugada por 7 minutos a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o pellet suspenso em 5 mL de caldo BHI (Himedia®).

Os leitões do grupo Infectado receberam 3 mL do inóculo por via orofaríngea, com dose infectante de $2,16 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Enquanto os grupos Sentinela e Controle receberam 3mL de solução placebo (BHI caldo estéril) na via orofaríngea.

Após a inoculação, os animais foram alojados em isoladores projetados para estudos epidemiológicos, desenvolvido a partir do protótipo de Torremorell et al. (1997), com dimensões de 0,80m x 0,80m x 1,30m em material de aço inoxidável e sistema fechado.

Os isoladores foram dispostos de forma que o Controle permanecesse separado dos outros grupos. Enquanto os grupos Sentinela e Infectado foram dispostos em cabines projetadas com um orifício que permitia o contato de focinhos dos leitões destes grupos (Figura 1).



FIGURA 1. Disposição dos isoladores para avaliação de transmissão de *Clostridium difficile* por via naso-nasal. **(1)** Entrada de ar com filtro HEPA; **(2)** Condutores de ar; **(3)** Caixa de entrada dos leitões, dotada de porta interna e externa; **(4)** Reservatório para ração; **(5)** Orifício para conexão com outro isolador (contato naso-nasal); **(6)** Cabine isoladora do grupo Controle; **(7)** Cabine isoladora do grupo Sentinela; **(8)** Cabine isoladora do grupo Infectado; **(9)** Saída de ar com filtro HEPA; **(10)** Reservatório para excretas.

Os animais permaneceram nos isoladores por 18 dias, monitorados diariamente com aferição de temperatura, avaliação clínica (frequência respiratória, presença de apatia e inapetência, características das fezes) e coleta de amostras da região anorretal para avaliação da excreção de *C. difficile*.

Os suabes colhidos diariamente da região anorretal foram colocados em tubos de rosca contendo caldo BHI enriquecido com extrato de levedura (Oxoid®) e L+ Cisteína Cloridrato PA 0,05% (Vetec Química Fina Ltda), e incubados a 37°C por 72h.

Após esse período, as amostras foram semeadas em *Clostridium difficile* Agar Base (Himedia®) enriquecido com taurocolato de sódio BRP 0,1% (European Pharmacopoeia Reference Standard) e sangue de equino (5%). Posteriormente, incubou-se as amostras jarras de anaerobiose com Anaerobac® a 37°C por 48h. As colônias crescidas foram transferidas para tubos de rosca contendo caldo BHI e incubadas novamente a 37°C por 48h, para proceder com a extração do DNA, a qual seguiu-se por técnica de lise térmica (KESKIMAKI et al., 2001), com modificações para extração do gênero *Clostridium* spp.

A partir do DNA extraído, realizou-se reações de PCR para detecção dos genes que codificam as toxinas A e B de *Clostridium difficile*, para isso utilizou-se os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores do gene TcdB com 400pb (GUMERLOCK et al., 1993) e TcdA com 700 pb (KATO et al., 1999) (Tabela 1). O perfil térmico para a amplificação dos iniciadores seguiu por: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 52°C para amplificação dos genes (*tcdA* e *tcdB*), seguido de extensão a 72°C por 40 segundos, e um ciclo final a 72°C por 7 minutos (CHINA; PIRSON; MAINIL, 1996) com modificações. Posteriormente as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), com brometo de etídio (0,5µg/mL) e padrão de peso molecular 1kb Ladder (Fermentas). Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento fotodocumentador GEL DOC XR (Applied Biosystems).

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados neste estudo.

Primers	Genes	Orientação	Sequência de Nucleotídeos	Posição
YT17	<i>tcdB</i>	Forward	GTGTAACCTACTITCATAACACCAG	400pb
YT18		Reverse	GGTGGAGCTTCAATTGGAGAG	
NK11	<i>tcdA</i>	Forward	TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAAC	700pb
NK9		Reverse	CCACCAGCTGCAGCCATA	

Após os 18 dias de isolamento dos leitões, realizou-se a eutanásia dos animais segundo a Resolução nº1000 de 11 de maio de 2012, e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Jaboticabal, registrado sob o nº006479/14. A necropsia foi

realizada imediatamente após o óbito dos leitões, para a análise anatomopatológica e investigação microbiológica nos órgãos acometidos.

Durante a necropsia foram realizadas coletas de tonsilas palatinas, fígado, baço, linfonodos mesentéricos, linfonodos ileocólicos, jejuno, íleo, cólon proximal, cólon distal e conteúdo cecal para as análises microbiológicas. Fragmentos coletados destes órgãos foram colocados em tubos de rosca contendo caldo BHI enriquecido com extrato de levedura e L+ Cisteína Cloridrato PA 0,05%, incubados a 37°C por 72h, posteriormente foram semeadas em *Clostridium difficile* Agar Base (Himedia®) enriquecido com taurocolato de sódio BRP 0,1% (European Pharmacopoeia Reference Standard) e sangue de equino (5%) e incubadas em jarras de anaerobiose com Anaerobac® a 37°C por 48h. As colônias foram transferidas para tubos de rosca contendo caldo BHI e incubadas novamente a 37°C por 48h, para continuidade com a extração do DNA por lise térmica (KESKIMAKI et al., 2001) com modificações para extração do gênero *Clostridium* spp, e as reações de PCR seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Para as análises histológicas, coletou-se fragmentos de tonsila palatinas, fígado, baço, linfonodos mesentéricos, linfonodos ileocólicos, jejuno, íleo, cólon proximal e cólon distal, os quais foram fixados em solução de formalina tamponada 10% com fosfato de sódio (pH7,4). Posteriormente as amostras foram processadas de acordo com a rotina histológica, compreendendo as etapas de secção em pequenas partes destes fragmentos, desidratação em etanol, seguida da diafanização em xilol e impregnação das peças em mistura de xilol e parafina. As amostras foram incluídas em parafina pura fundida a 60°C e foram emblocadas.

Após emblocamento das amostras, estas foram seccionadas no micrótomo em fatias de 5 µm de espessura, que foram montadas em laminas de vidro para microscopia, e então submetidas as técnicas de rotina para coloração em hematoxilina-eosina (HE). Após coloração, as laminas foram montadas em lamínulas e observadas ao microscópio óptico de luz. As laminas histológicas foram fotomicrografadas em fotomicroscópio AXIOSKOP-ZEISS acoplado a câmara vídeo digital LEICA DM 2500, modelo DSC 280, software Qwin 3.

4.2. Transmissão Aerógena

A avaliação da transmissão por via aerógena contou com um delineamento experimental constituído de seis leitões em fase de creche, com 20 dias de idade, saudáveis e de uma mesma leitegada. Os animais foram divididos em três grupos de tratamento (Infectado, Sentinela e Controle), em que cada grupo contou com dois leitões. Para esta proposta de ensaio, toda metodologia ocorreu com duas repetições para o experimento de transmissão, totalizando 12 animais utilizados.

Os grupos de leitões foram dispostos nos isoladores com sistema de entrada e saída de ar controlados e filtrados por filtros HEPA (High Efficiency Particulate Arrestance), situados no Campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP.

O inóculo foi preparado a partir de cepa toxigênica *C. difficile* 096, cedida pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a qual foi recuperada e isolada na unidade de Escola Veterinária desta mesma instituição de um animal infectado.

A cepa toxigena de *C. difficile* 096 foi repicada em meio sólido de BHI (Brain Heart Infusion) Himedia® e incubada a 37°C por 48h em jarras de anaerobiose com Anaerobac®. Então, colônias foram repicadas em 6 mL de solução de água peptona 0,1%, até se obter a concentração de 10⁶ na escala de MacFarland®. Com a concentração atingida, transferiu-se 1 mL da solução em placas de Petri estéreis, adicionou-se meio de cultura BHI fundido, homogeneizou-se pela técnica de “pour-plate” e incubou-se a 37°C por 48h em jarras de anaerobiose com Anaerobac®. Realizou-se a contagem bacteriana e dessa forma o número exato de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do inóculo.

A solução de água peptonada concentrada com *C. difficile* foi centrifugada por 7 minutos a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o pellet suspenso em 5 mL de caldo BHI (Himedia®).

Os leitões do grupo Infectado receberam 3 mL do inóculo por via orofaríngea, com dose infectante de 1,14x10⁸ UFC.mL⁻¹. Enquanto os grupos Sentinela e Controle receberam 3mL de solução placebo (BHI caldo estéril) na via orofaríngea.

Os isoladores foram dispostos de forma que o Controle não sofresse risco de infecção, e para isso o sistema foi disposto de forma linear, na ordem Controle, Infectado, Sentinela, com fluxo de ar contínuo e unidirecional (Figura 2).



FIGURA 2. Disposição linear dos isoladores para avaliação de transmissão de *Clostridium difficile* por via aerôgena. **(1)** Entrada de ar com filtro HEPA; **(2)** Condutores de ar; **(3)** Cabine isoladora do grupo Controle; **(4)** Cabine isoladora do grupo Infectado; **(5)** Cabine isoladora do grupo Sentinela; **(6)** Saída de ar com filtro HEPA.

Os animais permaneceram nos isoladores por 18 dias, e foram monitorados diariamente com aferição de temperatura, avaliação clínica (frequência respiratória, presença de apatia e inapetência, características das fezes) e coleta de amostras da região anorretal para avaliação da excreção de *C. difficile*.

Após os 18 dias de isolamento dos leitões, realizou-se a eutanásia dos animais segundo a Resolução nº1000 de 11 de maio de 2012, e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Jaboticabal, registrado sob o nº006479/14.

Os procedimentos de coletas diárias, eutanásia, necropsia, coletas de órgãos para microbiológica e histopatologia, extração de DNA e técnica de PCR foram os mesmos adotados na via de transmissão naso-nasal.

As análises histológicas também seguiram o mesmo protocolo realizado nas análises da via de transmissão naso-nasal.

5. RESULTADOS

5.1. Transmissão Naso-Nasal

Os animais do grupo controle não apresentaram alterações nos parâmetros clínicos avaliados. Nas análises histopatológicas, observou-se microscopicamente discreta reatividade das placas de Peyer do cólon, e hiperplasia nas criptas e inflamatório mononuclear na submucosa em dois animais.

Os animais do grupo Infectado, apresentaram diversos sinais clínicos (Tabela 2 e Figura 3), e as análises moleculares confirmaram a presença dos genes codificadores da toxina *tcdB* nas fezes de todos os animais (Figura 4), embora a excreção da bactéria tenha ocorrido em dias alternados (Tabela 3).

Tabela 2: Sinais Clínicos apresentados pelos leitões do grupo Infectado e Sentinela após infecção experimental por *Clostridium difficile*.

GRUPOS	REPETIÇÕES	SINAIS CLÍNICOS						
		Inapetência	Apatia	Diarreia	Perda de Peso	Tremores	Eriçamento de pelos	Vermelhidão na região perianal
Infectado	1	-	++	+++	+++	++	+	+++
	2	-	++	++	++	++	-	-
Sentinela	1	-	+	+++	++	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	-	-

- = ausência de sinais clínicos

+ = sinais clínicos de grau leve

++ = sinais clínicos de grau moderado

+++ = sinais clínicos graves

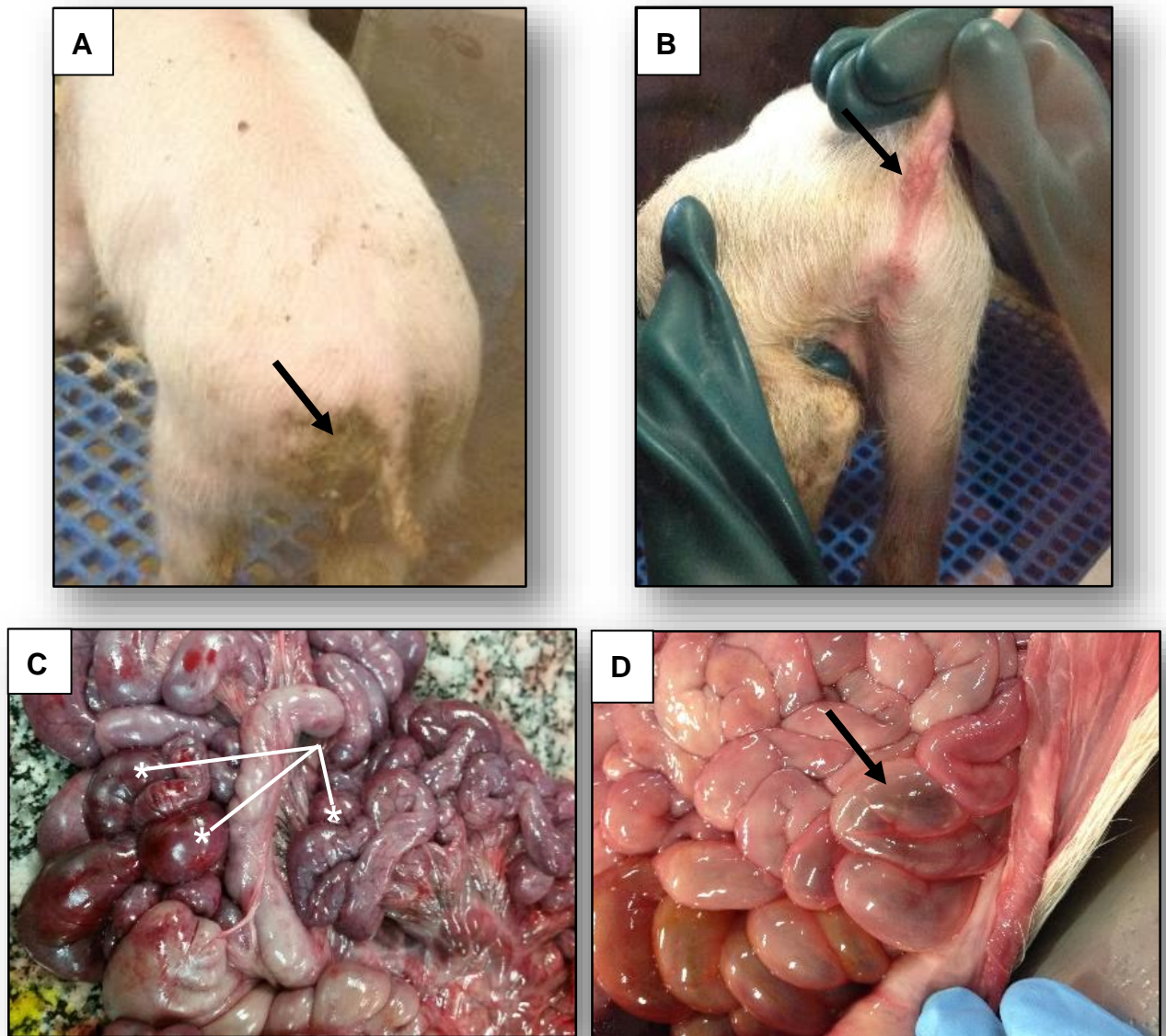


FIGURA 3. (A) Leitão do grupo Infectado por *C. difficile*, apresentando diarreia pastosa amarelada; (B) Leitão do grupo Infectado demonstrando vermelhidão/dermatite subcaudal e erupções perianal após período de diarreia; (C) Intestino delgado com hemorragia difusa, repleto de gases (enterite hemorrágica); (D) Intestino delgado hemorrágico, distensão das alças e presença de gás.

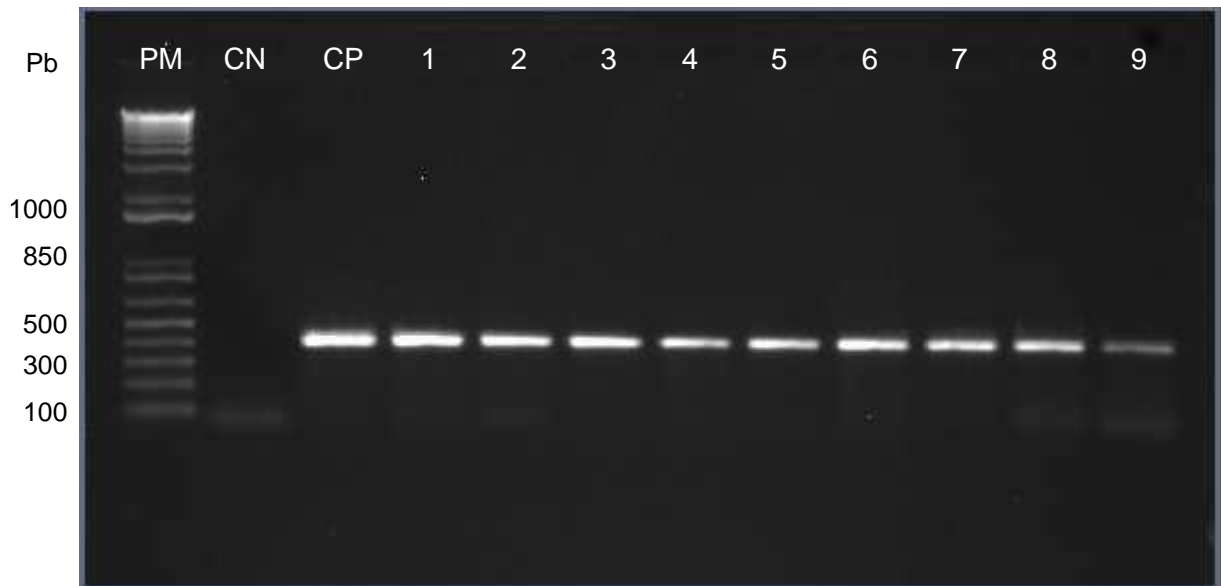


FIGURA 4. Eletroforese do produto da PCR visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (Applied Biosystems); **(Pb)** Pares de bases; **(PM)** Padrão de peso molecular; **(CN)** Controle Negativo da reação de PCR; **(CP)** Controle positivo da reação utilizando os primers do gene *tcdB*; **(1 ao 9)** Amostras representativas para a positividade de *Clostridium difficile* nas fezes dos leitões do grupos Infectado e Sentinela.

Tabela 3: Excreção de *Clostridium difficile* pelos leitões dos grupos Infectado e Sentinela pós-infecção por *C. difficile* no período de 17 dias

GRUPOS	REPETIÇÃO	DIAS DE COLETA																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Infectado	1	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Sentinela	1	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

- = ausência de excreção

+ = presença de excreção

As análises histopatológicas, demonstrou diversas lesões condizentes com a infecção por *C. difficile* nos leitões do grupo Infectado e Sentinela, apenas variando na intensidade da lesão nos animais e nas repetições (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Alterações microscópicas do jejuno, íleo, cólon proximal e cólon distal de leitões do grupo Infectado e Sentinela, infectados experimentalmente por *C. difficile* após 18 dias de infecção.

		LESÕES						
GRUPOS	REPETIÇÕES	Intestino Delgado (jejuno e íleo)				Cólon Proximal e Distal		
		Edema de submucosa	Edema de mucosa	Hiperplasia das células caliciformes e criptas	Bactérias no Lúmen	Necrose da Mucosa	Desnudamento e Necrose das Vilosidades Intestinais	Hiperplasia das Placas de Peyer
Infectado	1	+++	++	+++	++	+++	+++	++
	2	+	+	++	++	++	++	++
Sentinela	1	+	++	+	+++	++	+++	++
	2	+	+	-	+	+	-	+

- = ausência de sinais clínicos
 + = sinais clínicos de grau leve
 ++ = sinais clínicos de grau moderado
 +++ = sinais clínicos graves.

Tabela 5: Alterações microscópicas das tonsilas palatinas, linfonodos ileocólicos, linfonodos mesentéricos e baço de leitões do grupo Infectado e Sentinela, infectados experimentalmente por *C. difficile* após 18 dias de infecção.

GRUPOS	REPETIÇÕES	LESÕES		
		Tonsilas Palatinas	Linfonodos	Baço
		Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia da polpa branca
Infectado	1	+	+	+
	2	-	-	-
Sentinela	1	++	++	++
	2	++	++	+

- = ausência de sinais clínicos

+ = sinais clínicos de grau leve

++ = sinais clínicos de grau moderado

+++ = sinais clínicos graves.

Algumas outras lesões pontuais foram observadas, em que o fígado de um dos animais apresentou ao exame histopatológico áreas com infiltração linfoplasmocitária lobular, com distribuição central e periportal, e eosinofilia. Em outro animal, o fígado apresentou-se com inflamação discreta, com infiltração linfoplasmocitária na região portal e também reatividade nos linfonodos e no baço (Figura 5).

Os animais do grupo Sentinela apresentaram diversos sinais clínicos e lesões condizentes com a infecção por *C. difficile* (Figura 3), assemelhando-se aos sinais observados nos animais infectados. O comportamento de excreção bacteriana identificado pela presença do gene *tcdB* na técnica de PCR também apresentou alternância durante os dias avaliados, mantendo um perfil semelhante ao grupo infectado (Tabela 3).

No grupo Sentinela (primeira repetição) foi constatado óbito de um leitão quatro dias após o início dos sinais clínicos da infecção, e as análises histopatológicas demonstraram nas tonsilas, sinais de apoptose no epitélio de revestimento e início de necrose, presença de debris celulares e grumos de bactérias basofílicas no lúmen da fenda da tonsila, e desprendimento de células e restos de núcleo com bactérias presentes. O baço exibiu severa atrofia linfática. O fígado apresentou moderada evidência do tecido fibroso interlobular e congestão (Figura 5).

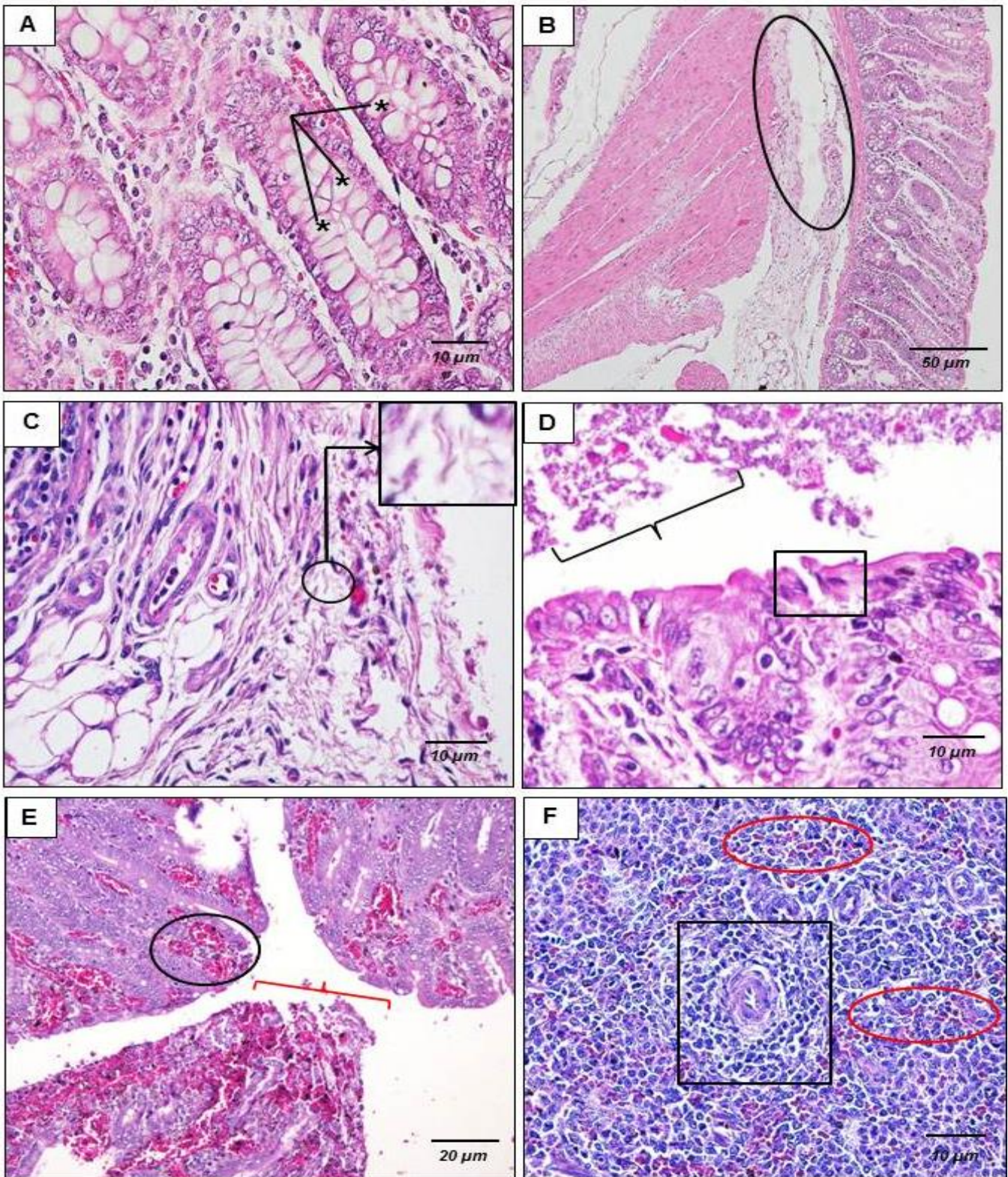


FIGURA 5. Histopatologia das lesões causadas por *C. difficile* aos 18 dias pós-infecção experimental. **A. Cólon:** hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes (asteriscos). Coloração (Col.): Hematoxilina-Eosina (H-E). Aumento (A): 400x. **B. Intestino Delgado:** edema de mucosa e submucosa (destaque). Col.: H-E. A.: 100x. **C. Intestino Delgado:** presença de bactérias bastoneiformes (destaque) inseridas no estrato submucoso, comprovando a colonização do órgão. Canto superior direito: *insert* evidenciando bactérias bastoneiformes. Col.: H-E. A.: 400x. **D. Intestino Delgado:** ruptura epitelial (quadrado) e descamação da mucosa (chave). Col.: H-E. A.: 400x. **E. Intestino Delgado:** áreas de necrose e descamação epitelial (destaque) e áreas de congestão (círculo). Col.: H-E. A.: 200x. **F. Baço:** hipotrofia linfóide (quadrado) e áreas de congestão (destaques em vermelho). Col.: H-E. A.: 400x.

5.2. Transmissão Aerógena

A avaliação clínica durante a primeira repetição desta via de transmissão, não apresentou nenhum sinal indicativo e/ou alarmante de infecção nos leitões durante todo o período de isolamento, sendo que em nenhum dos grupos (Controle, Infectado e Sentinela) obteve-se o indicativo de infecção.

Com o término do período de isolamento (18 dias), e a continuidade das análises após a eutanásia dos animais, pode-se avaliar alterações macroscópicas nos órgãos dos animais Infectados, sendo ascite, alças intestinais anormalmente adelgadas, presença de gases além do normal no cólon (Figura 6).

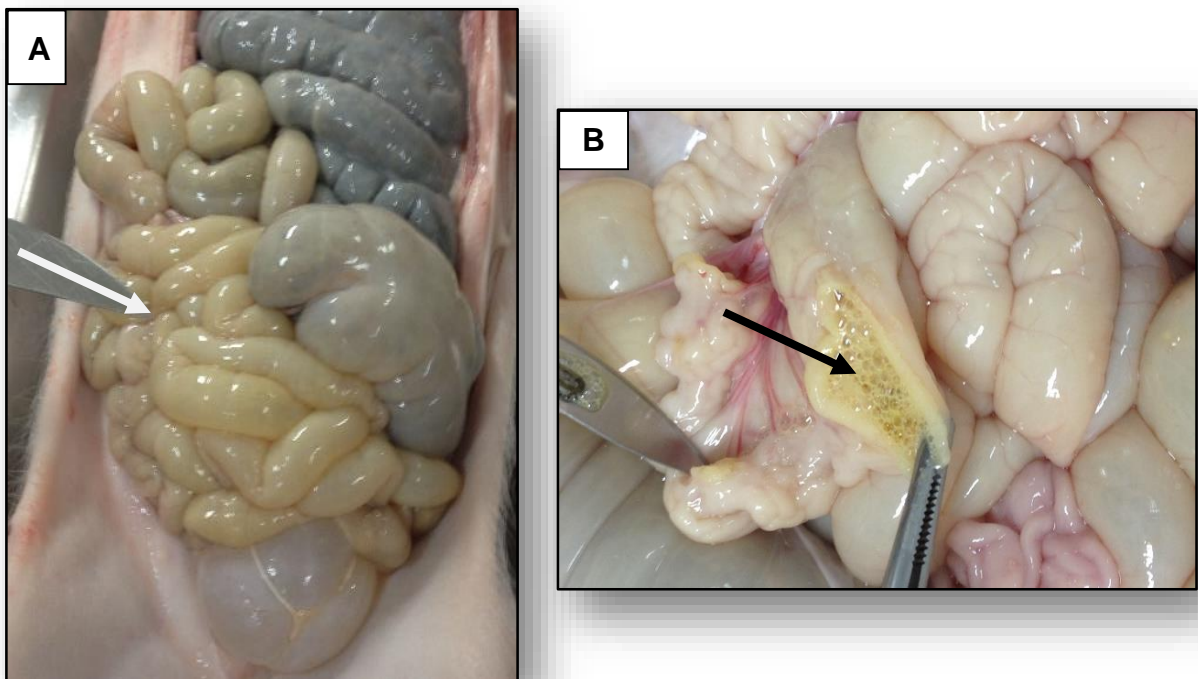


FIGURA 6. Intestino de suínos do grupo Infectado após 18 dias de infecção experimental com *C. difficile*; **(A)** Alças intestinais repletas de gases e adelgadas; **(B)** Presença de gases no conteúdo intestinal

As análises histopatológicas dos órgãos coletados apresentaram diversas lesões (Tabela 6 e Figura 7), bem como presença de abundante infiltrado mononuclear no cólon e intestino delgado nos animais do grupo Infectado. Já os leitões do grupo Controle e Sentinela não demonstraram nenhuma lesão condizente/indicativa de infecção por *C. difficile*, bem como sinal de lesão macroscópica ou histológica nas amostras.

Tabela 6: Alterações microscópicas dos órgãos dos leitões do grupo Infectado após 18 dias de infecção experimental por *Clostridium difficile* avaliando a via de transmissão aerógena.

REPETIÇÃO	LEITÃO	ÓRGÃOS/LESÕES					
		<i>Intestino Delgado</i>	<i>Cólon</i>	<i>Tonsilas Palatinas</i>	<i>Fígado</i>	<i>Baço</i>	<i>Linfonodos</i>
1	1	Hiperplasia de células calciformes e focos discretos de macrófagos (processo inflamatório) na mucosa	Presença de eusínófilos e hiperplasia nas placas de Peyer	Calcificação no interstício e moderada hiperplasia	Acentuada degeneração hidrópica difusa	Congestão com evidência de áreas arredondadas e rosadas, sugerindo presença de macrófagos	Acentuada reatividade
	2	Hiperplasia e infiltrados mononucleares com macrófagos na submucosa, e edema moderada de mucosa.	Apoptose e células granulares com macrófagos na lamina própria e submucosa, discreto infiltrado mononuclear associado a macrófagos, hiperplasia moderada nas criptas e nas células calciformes, hiperplasia moderada nas placas de Peyer.	Reativas	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
2	1	Sem alteração	Discreta enterite, criptas dilatadas, hiperplasia celular com muco "pleuro mesentérico", invasão de infiltrado mononuclear na submucosa (linfócitos e plasmócitos)	Destruição de linfócitos (apoptócitos) e invasão de linfócitos no epitélio	Discreta inflamação nos ductos e nas artérias e veias da região portal. Presença de leucócitos.	Rarefação linfocitária na polpa branca, pouca ação linfocítica	Sem alteração
	2	Desnudamento focal da mucosa no topo das vilosidades	Reatividade nas Placas de Peyer	Rarefação de células epiteliais, presença de mitose e apoptose celular	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração

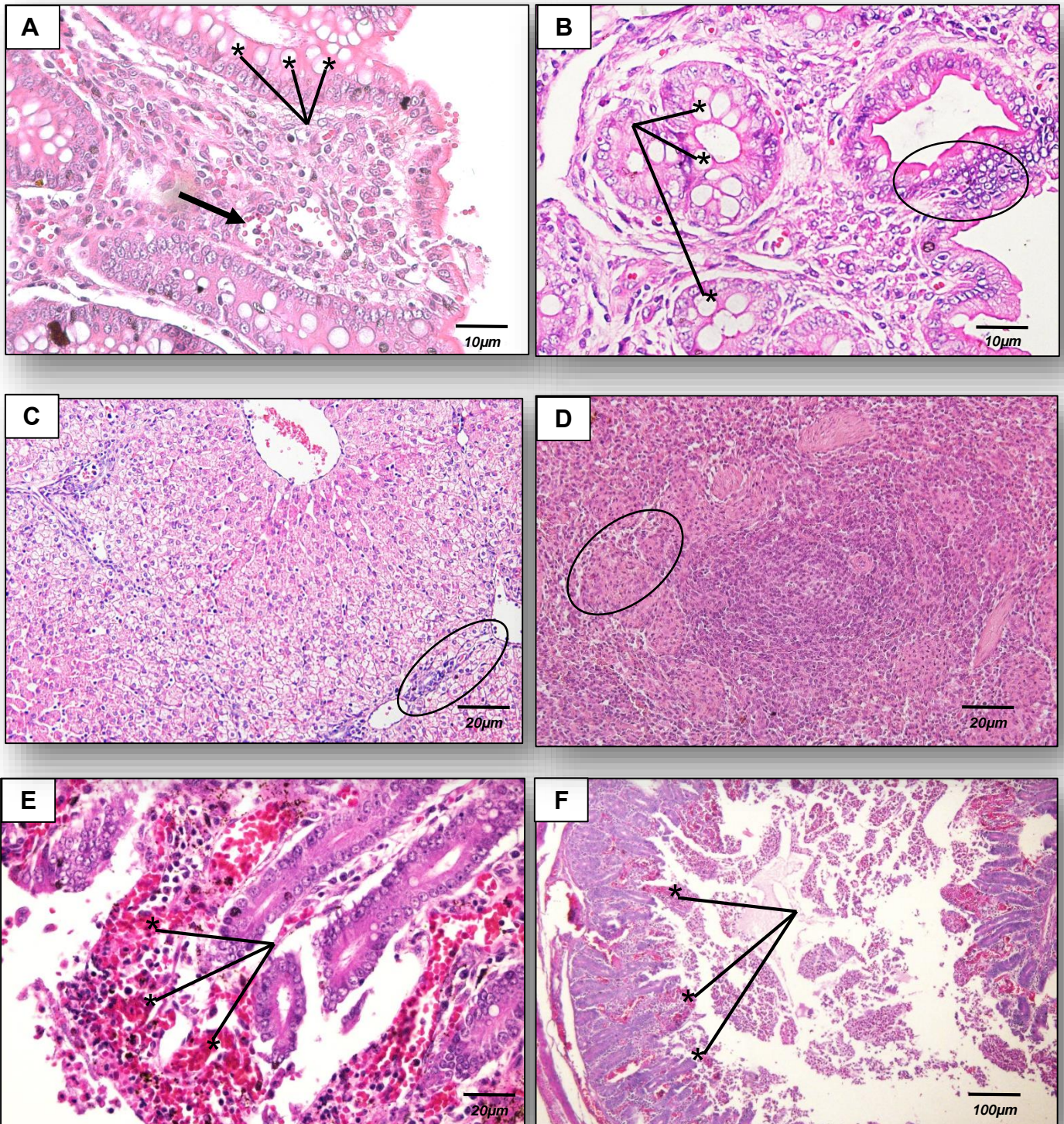


FIGURA 7. Análises histopatológica dos animais do grupo Infectado com *Clostridium difficile*. **(A)** Intestino delgado: hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes (asteriscos). Presença de macrófagos (seta). Coloração H-E. Aumento 400x; **(B)** Cólon com presença de discretos infiltrados mononucleares (destaque) e hiperplasia nas criptas e células caliciformes (asteriscos). Coloração H-E. Aumento 400x; **(C)** Fígado com discreta inflamação nos ductos, nas artérias e veias da região portal. Coloração H-E. Aumento 200x; **(D)** Baço com congestão e áreas arredondadas sugerindo presença de macrófagos. Coloração H-E. Aumento 200x; **(E)** Intestino Delgado hemorrágico com pontos de necrose. Coloração H-E. Aumento 200x; **(F)** Intestino delgado com desnudamento focal no topo das vilosidades. Coloração H-E. Aumento 40x.

A segunda repetição desta mesma via de transmissão obteve resultados macroscópicos, microscópicos semelhante à primeira repetição, contudo os animais pertencentes ao grupo Infectado apresentaram sinais clínicos de diarreia, desidratação, apatia e vestígios de sangue nas fezes, condizentes com uma infecção por *C. difficile*. Os leitões pertencentes ao grupo Controle e Sentinela mantiveram-se por todo período experimental sem alterações clínicas.

A avaliação histopatológica realizada nesta segunda repetição demonstrou lesões de natureza leve a grave nos animais do grupo Infectado (Tabela 6). Além de que durante a necropsia, alterações nos órgãos alvos também foram observadas, como porções hemorrágicas nas alças intestinais e ceco (Figura 8). Os leitões do grupo Controle e Sentinela não apresentaram nenhum sinal de lesão macroscópica ou histológica nas amostras.

Durante o período experimental de infecção, as amostras coletadas de suabes anorretais, e submetidas à extração de DNA e identificação por PCR, apresentaram positividade para a presença dos genes codificadores da toxina *tcdB* em todos os animais do grupo Infectado (Figura 4), de ambas as repetições, porém salienta-se que o período de excreção bacteriana não ocorreu consecutivamente (Tabela 7).

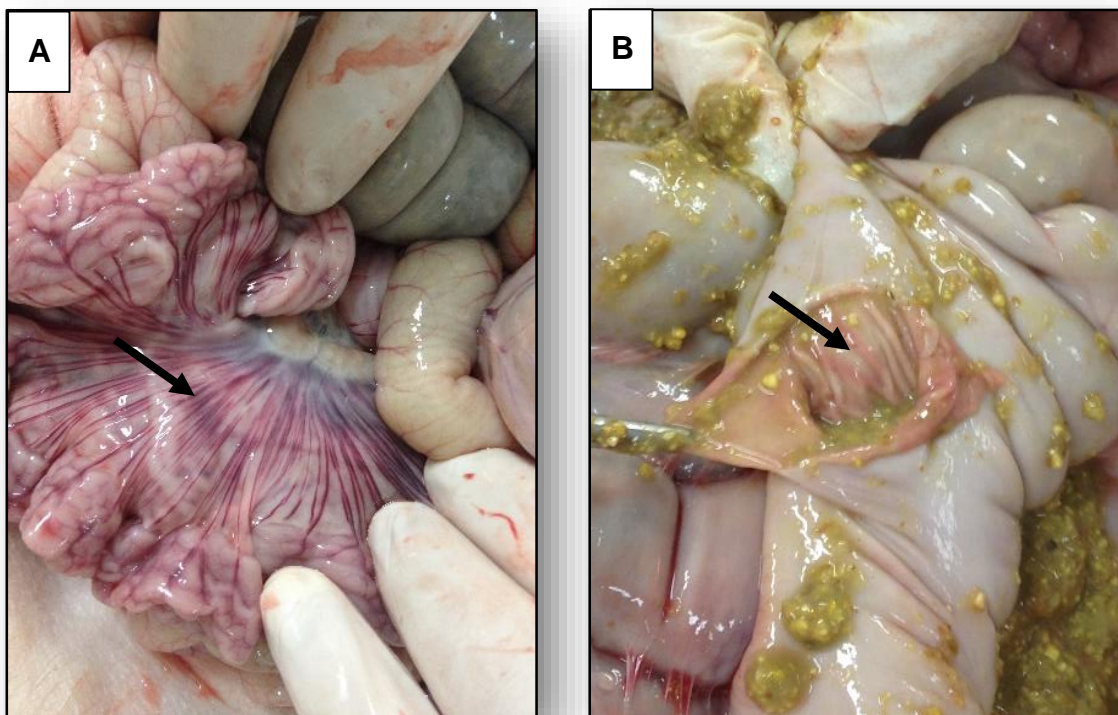


FIGURA 8. (A) Intestino delgado com sinais hemorrágicos nos leitões infectados experimentalmente por *C. difficile*; **(B)** Ceco hemorrágico de leitão infectado por *C. difficile*.

Tabela 7: Excreção de *C. difficile* pelos animais do grupo Infectado após a infecção experimental por *C. difficile* por via aerógena

GRUPOS	REPETIÇÃO	DIAS DE COLETA																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Infectado	1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ausência de excreção

+ = presença de excreção

6. DISCUSSÃO

O modelo experimental proposto foi idealizado para avaliar, de forma precisa, outras vias de transmissão de *C. difficile*, já que até o momento a via fecal-oral é a preconizada.

O modelo mais próximo ao proposto neste estudo, utilizando infecção experimental e transmissão com *C. difficile*, foi realizado com hamsters sírios (SILVA, 2014), espécie mais usualmente utilizada devido a facilidade no manuseio e por ser altamente sensível à infecções e testes *in vivo*.

6.1. Transmissão Naso-Nasal

Os animais do grupo Controle não foram infectados por *C. difficile*, comprovado pela ausência dos genes dessa bactéria nas fezes, demonstrado pela técnica de PCR.

A avaliação histológica dos grupos Infectado e Sentinela, os locais com maior incidência de lesões foram intestino delgado, com características de moderado-severo, e no cólon com lesões de leve-moderado.

Essas lesões no intestino delgado dos animais Infectados e Sentinelas são similares aos encontrados por Lizer (2010) após infecção em leitões neonatos, com a presença de infiltrados neutrofílicos no colón, ceco e também no intestino delgado, com intensidade que variaram de leve a severa em 8 animais dos 10 desafiados.

Porém, os achados histopatológicos do presente estudo são diferentes aos obtidos por Songer et al. (2000), o qual afirma que no intestino delgado geralmente não são observadas lesões por *C. difficile*. No entanto, as lesões observadas foram bem características, inclusive com observação de invasão bacteriana e presença de bactérias no lúmen do intestino dos grupos Infectado e Sentinela, com morfologia semelhante ao *C. difficile*.

Essas lesões confirmaram a ocorrência de transmissão de *C. difficile* pela via naso-nasal, já que além da positividade para *C. difficile* ser confirmada pela técnica de PCR, reafirmando a transmissão no grupo Sentinela, foi observada a presença de

lesões principalmente neste grupo, ressaltando a importância da infecção em suínos jovens.

Em leitões neonatos, a prevalência de *C. difficile* é de 50% (NORMAN et al., 2009), enquanto em leitões de 1 a 7 dias de idade a prevalência é de 25,3% (ALVAREZ-PEREZ et al., 2009). Desta forma, ao passo que a idade dos leitões aumenta, a prevalência de *C. difficile* tende a diminuir.

Quanto à frequência de infecção em jovens e adultos, Hopman et al. (2011) confirmaram a presença de *C. difficile* em oito de onze porcas avaliadas, e como portadoras tendem a agravar a infecção para os leitões. Neste mesmo estudo foi confirmado que após 32 h do parto, 100% da leitegada estava infectada por *C. difficile*.

Como a principal via de transmissão e infecção nos leitões neonatos, ocorre principalmente pelo contato com esporos de *C. difficile* eliminados pelas fezes e pelas porcas (HOPMAN et al., 2011), os estudos envolvidos nessa faixa etária já estão bem caracterizados.

Pesquisas envolvendo *C. difficile* e leitões já desmamados não são encontradas na literatura, sendo que o foco até hoje se direciona aos leitões neonatos, acreditando estes serem os mais susceptíveis à infecção.

O contato dos suínos focinho-focinho mostrou-se relevante na transmissão de *C. difficile*, já que o grupo Sentinela excretou a bactéria nas fezes e apresentou sinais clínicos da doença semelhantes ao do grupo Infectado. Dessa forma, elucidou mais uma possível via de transmissão deste agente, levantando a problemática de que, animais jovens e saudáveis podem apresentar sinais clínicos de doença e causar prejuízos ao produtor.

A partir das coletas diárias com suabes anorretais, para avaliar a excreta desta bactéria nas fezes, pode-se observar que sua excreção foi alternada, entre períodos positivos e negativos de identificação, confirmado pela técnica de PCR.

Uma correlação de lesões histológicas associadas com a infecção por *C. difficile* foi representada por Silva (2014), que relacionou a presença de lesões como edema de mesocolon em leitões diarreicos e a detecção de *C. difficile* utilizando o teste de Elisa para as toxinas A/B nestes animais.

Com as técnicas moleculares, é possível detectar a presença dos genes das duas toxinas de *C. difficile* que são fatores de virulência, porém algumas estirpes

podem produzir ou expressar apenas uma das toxinas, não sendo necessário ambas se expressarem para caracterizar uma virulência (SACHSE; FREY, 2003).

Em surtos de *C. difficile* em humanos, Kyne et al. (2001) também documentaram aumento da incidência e gravidade da doença associada com isolados A⁻B⁺. E Drudy, Fanning e Kyne (2007) afirmaram também que o espectro da doença causada por *C. difficile* A⁻B⁺ é o mesmo das estirpes A⁺B⁺, podendo variar desde colonização assintomática à colite mais grave em humanos, além de lesões necróticas da mucosa, que podem ser associadas à ação citotóxica da toxina B.

Os níveis tóxicos da toxina B podem ser expressivamente maiores no quadro de infecção, mesmo quando a transcrição de TcdB é menor que a TcdA (VOHRA; POXTON, 2011). Sugere-se que mesmo em estirpes que possuem menor expressão gênica de TcdB, seu potencial de toxicidade pode ser igual ou superior a toxina A.

Essa afirmação assegura o potencial virulento da estirpe utilizada nesta pesquisa, já que o potencial patogênico da toxina B desencadeou o quadro de enfermidade e de sinais clínicos da infecção por *C. difficile* nos leitões desafiados.

A utilização da técnica de PCR para detecção dos genes das toxinas A/B de *C. difficile* nesta pesquisa, e posteriormente as análises histopatológicas dos órgãos coletados na necropsia dos animais, vêm corroborar com Silva (2014), que destaca como diagnósticos laboratoriais para detecção de *C. difficile* no Brasil a utilização de técnicas moleculares, bem como a avaliação histopatológica, por ser uma ferramenta auxiliar e essencial para a confirmação, principalmente em animais que vieram a óbito.

Guedes, Viott e Cruz (2012) afirmaram que a chance de detecção dos genes que codificam as toxinas A/B de *C. difficile* foi 2 vezes maior em animais com diarreia, e as lesões histopatológicas foram compatíveis com a infecção de *C. difficile*, apresentando presença de infiltrados neutrofílicos associados a erosão superficial de mucosa. Além disso, esses mesmos autores correlacionaram positivamente a observação de edema de mesocólon em animais diarreicos com a detecção de toxinas A/B por teste de ELISA.

6.2. Transmissão Aerógena

Durante o período experimental, os leitões da primeira repetição, não apresentaram nenhum sinal de infecção e doença. Essa avaliação clínica no decorrer dos dias contribuiu para a afirmação de que o *Clostridium difficile* pode se apresentar de maneira subclínica nos animais (HANNAH; LIMBAGO, 2010), já que nas análises moleculares para presença dos genes codificadores das toxinas, os animais do grupo Infectado apresentaram positividade.

Apesar dos leitões da primeira repetição não apresentarem quaisquer sinais clínicos da infecção, durante a necropsia algumas lesões puderam ser observadas nos animais do grupo Infectado, como quadros de ascite, gases e alças intestinais delgadas. Este fato nos remete a um dos possíveis sinais que as infecções por *C. difficile* pode apresentar, que é a constipação (BARBOSA et al, 2010), em que animais infectados podem apresentar um sinal clínico inverso ao habitual (diarreia), que no caso seria a constipação.

Animais que apresentem este quadro clínico podem dificultar ainda mais a leitura e controle da doença, já que na suinocultura os produtores não perceberiam a presença de infecção no rebanho, o tratamento não seria realizado e com isso o *C. difficile* pode-se manter na propriedade.

Além das lesões encontradas durante a necropsia, a histologia dos órgãos coletados apresentou lesões condizentes de infecção no grupo desafiado, sendo que os órgãos mais lesionados foram o intestino delgado e o cólon. Estas lesões foram condizentes com os expostos por Lizer (2010), que também se assemelhou aos padrões de lesões observados no desafio da transmissão naso-nasal.

Durante a execução da segunda repetição desta via, o comportamento dos animais infectados apresentou alterações e sinais clínicos causados pela infecção, o que diferiu dos leitões da primeira repetição. Isso acarreta o entendimento de que a presença de sinais clínicos e o modo de ação da bactéria varia de acordo com o estado de susceptibilidade de cada organismo infectado, e seu estado imunológico, sendo que os animais da segunda repetição possivelmente apresentavam fatores individuais que contribuíram para a colonização, aderência e exposição dos sinais da doença.

Autores sugerem que a variedade de sinais clínicos demonstrado em uma infecção pode variar de acordo com a virulência da estirpe e a concentração utilizada (VOTH & BALLARD, 2005), porém neste estudo, tais características não apresentaram variação, sendo que para todos os animais desafiados, utilizou-se um mesmo padrão de inóculo, tanto em estirpe quanto em concentração.

As coletas de suabes anorretais diárias, que foram avaliadas por biologia molecular (PCR), confirmaram a ausência de *C. difficile* nos grupos Controle e Sentinela, de ambas as repetições. Enquanto que os animais infectados foram positivos para *C. difficile* B, utilizando os genes codificadores das toxinas *tcdA/tcdB*. O padrão de excreção deste grupo apresentou a mesma conformidade dos animais que o excretaram na via de transmissão naso-nasal, havendo alternância da excreção deste agente nas fezes.

Em pesquisa de *C. difficile*, Songer e Anderson (2006) afirmaram que amostras fecais obtidas por suabes retais são seguras para diagnósticos ante-mortem, pois obtiveram 92,8% de correlação com exames de conteúdo intestinal. Com isso, a variação na positividade de *C. difficile* nas fezes neste estudo, possivelmente é um evento característico da infecção.

Como dito anteriormente, nenhum leitão dos grupos Controle e Sentinela, de ambas as repetições, apresentaram quaisquer sinais clínicos da infecção, nem lesões durante a necropsia e histologia, o que remete a ausência na transmissão de *C. difficile* pela via aerógena. Um estudo sugestivo de uma possível transmissão por via aérea foi conduzido por Lizer (2010), em que acreditaram na ocorrência de transmissão por aerossol, porém com avaliação mais criteriosamente dos resultados, concluíram que os esporos de *C. difficile* não foram conduzidos pelo ar, e sim possivelmente por contato direto de manejo, já que leitões em outro recinto também estavam positivos.

Sabe-se que diversos patógenos e estirpes bacterianas, fúngicas e virais são conduzidos pela via aerógena, inclusive os esporos de *Clostridium* spp., por possuírem peso demasiadamente baixo e fáceis de serem levados pelo vento. Contudo, nesta pesquisa pode-se afirmar que quadros de infecção por *Clostridium difficile* não ocorrem por essa via, sendo necessário o contato direto com o patógeno para que a infecção se instale em leitões com idade de creche.

A ausência dessa transmissão pela via aerógena torna-se um ponto positivo, e que contribui para melhores prevenções e controle do *C. difficile* nas granjas. O fato deste agente não causar doença quando conduzido por esta via, direciona as estratégias de ação preventiva para as vias de contato direto, e dessa forma incentiva a adoção de manejo sanitário de qualidade na produção suinícola.

7. CONCLUSÃO

Experimentalmente o *Clostridium difficile* pode ser transmitido entre leitões jovens pelo contato focinho-focinho, desencadeando doença clínica. Com isso, elucida-se mais uma possível via de transmissão deste agente, e sua importância no processo de transmissão, contribuindo para a prevenção nas granjas.

Por outro lado, a transmissão via aerógena não ocorreu entre leitões jovens em situação experimental.

8. REFERENCIAS

- ALVAREZ-PEREZ, S.; BLANCO, J.L.; BOUZA, E.; ALBA, P.; GIBERT, X.; MALDONADO, J.; GARCIA, M.E. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrheic and non-diarrheic piglets. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.302-305, 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.015,
- ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M.; STAEMPFLI, H.R.; LOW, D.E.; WEESE, J.S. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.163-166, 2005. DOI: 10.1099/jmm.0.45805-0
- ARROYO, L.G.; STAEMPFLI, H.; WEESE, J.S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.120, n.1-2, p.179-183, 2007. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.10.013
- AVBERSEK, J.; JANEZIC, S.; PATE, M.; RUPNIK, M.; ZIDARIC, V.; LOGAR, K.; VENGUST, M.; ZEMLJIC, M.; PIRS, T.; OCEPEK, M. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. **Anaerobe**, v.15, p.252-255, 2009. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.07.004
- AVBERSEK, J.; ZAJC, U.; MICUNOVIC, J.; OCEPEK, M. Improved detection of *Clostridium difficile* in animals by using enrichment culture followed by LightCycler real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.93-100, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.031>
- BARBOSA, C.G.; DUGAICH, B.; BIERHALS, T.; ZUFFO, P.; HENN, P.K.V.K.; VAZ, E.K. Ocorrência de *Clostridium difficile* em leitões submetidos à antibioticoterapia nas regiões de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.874-879, 2010.
- BARKETI-KLAI, A.; HOYS, S.; LAMBERT-BORDES, S.; COLLIGNON, A.; KANSAU, I. Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. **Journal Medical Microbiology**, v.60, p.1155-1161, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.029553-0>
- BAVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; ASPAN, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment and antimicrobial susceptibility. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.5, p.465-471, 2003. DOI 10.2746/042516403775600505
- 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, p.329-335, 2006. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.04.025
- CALABI, E.; CALABI, F.; PHILLIPS, A.D.; FAIRWEATHER, N.F. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. **Infectious and Immunology**, v.70, p.5770–5778, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.10.5770-5778.2002>.

CARTER, G.P.; ROOD, J.I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: past and present perspectives. **Journal Gut Microbes**, v.1, p.58–64, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.1.1.10768>

CARVALHO, P.L.C.; VIANA E.F. Suinocultura SISCAL e SISCON: análise e comparação dos custos de produção. **Custos e @gronegócios**, v.7, n.3, online, 2011. ISSN 1808-2882.

CHEN, Y.; RASHID, M.U.; HUANG, H.; FANG, H.; NORD, C.E.; WANG, M.; WEINTRAUB, A. Molecular characteristics of *Clostridium difficile* strains from patients with a first recurrence more than 8 weeks after the primary infection. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.20, p.1-5, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.10.017>

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.9, p.3462-3465, 1996.

COLONI, R.D. Aspectos da Suinocultura Brasileira e a Produção Carnea. **Jornal Dia de Campo**. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=25446&secao=Artigos%20Especiais>, acesso em: 03 nov. 2011

COSTA, N.C.; REID-SMITH, R.; GOW, S.; HANNON, S.J.; BOOKER, C.; ROUSSEAU, J.; BENEDICT, K.M.; MORLEY, P.S.; WEESE, J.S. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from feedlot beef cattle upon arrival and mid-feeding period. **BMC Veterinary Research**, v.8, n.38, p.1-7, 2012. DOI: 10.1186/1746-6148-8-38

DEBAST, S.B.; VAN LEENGOED, L.A.M.G.; GOORHUIS, A.; HARMANUS, C.; KUIJPER, E.J.; BERGWERFF, A.A. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrheal pigs identical to isolates from affect humans. **Environmental Microbiology**, v.11, n.2, p.505-511, 2009. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01790.x

DRUDY, D.; FANNING, S.; KYNE, L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.11, p.5-10, 2007. DOI: 10.1016/j.ijid.2006.04.003

FRAISE, A.P.; WILKISON, M.A.C.; BRADLEY, C.R.; PATON, S.; WLAKER, J.; MAILLARD, .Y.; WESGATE, R.L.; HOFFMAN, P.; COIA, J.; WOODALL, C.; FRY, C.; WILCOX, M. Development of a sporicidal test method for *Clostridium difficile*. **Journal of Hospital Infection**, v.89, p.2-15, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.014>

GRECO, A.; HO, J.G.S.; LIN, S.J.; PALCIC, M.M.; RUPNIK, M.; NG, K.K. Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. **Nature Structural and Molecular Biology**, v.13, p.460-461, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1084>

GUEDES, R.M.C.; VIOTT, A.M.; CRUZ JR, E.C.C. Estudos recentes com enteropatógenos de suínos no Brasil. **Informativo Técnico**, v.186, 2012. In.: <http://www.sossuinos.com.br/Tecnicos/info186.htm>

GUMERLOCK, P.H.; TANG, Y.J.; WEISS, J.B.; SILVIA JUNIOR, J. Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.3, p.507-511, 1993. DOI: 0095-1137/93/030507-05\$02.00/0

HANNAH, L.; LIMBAGO, B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, n.5, p.577-582, 2010. DOI: 10.1086/655692

HOPMAN, N.E.M.; KEESSEN, E.C.; HARMANUS, C.; SANDERS, I.M.J.G.; VAN LEENGOED, L.A.M.G. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.186-192, 2011. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.013

HUNG, Y.P.; TSAI, P.J.; HUNG, K.H.; LIU, H.C.; LEE, C.; LIN, H.J.; WU, Y.H.; WU, J.J.; KO, W.C. Impact of toxigenic *Clostridium difficile* colonization and infection among hospitalized adults at a district hospital in Southern Taiwan. **Plos One**, v.7, n.8, p.1-7, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0042415.t002

JANK, T.; GIESEMANN, T.; AKTORIES, K. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. **Glycobiology**, v.17, p.15R–22R, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwm004>

JANOIR, C.; PECHINE, S.; GROSDIDIER, C.; COLLIGNON, A. Cwp84, a surface associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. **Journal Bacteriologic**, v.189, p.7174–7180, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00578-07>

JANOIR, C.; DENEVE, C.; BOUTTIER, S.; BARBUT, F.; HOYS, S.; CALEECHUM, L.; CHAPETON-MONTES, D.; PEREIRA, F.C.; HENRIQUES, A.O.; COLLIGNON, A.; MONOT, M.; DUPUY, B. Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from in vivo transcriptomics. **Infections and Immunity**, v.81, p.3757–3769, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00515-13>

JOBSTL, M.; HEUBERGER, S.; INDRA, A.; NEPF, R.; KOFER, J.; WAGNER, M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. **International Journal Food Microbiology**, v.138, p.172-175, 2010. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.022

JUST, I.; GERHARD, R. Large clostridial cytotoxins. **Review of Physiology Biochemistry and Pharmacology**, v.152, p.23-47, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10254-004-0033-5>

KATO, H.; KATO, N.; KATOW, S.; MAEGAWA, T.; NAKAMURA, S.; LYERLY, D.M. Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. **FEMS Microbiology Letter**, v.175, p.197-203, 1999.

KELL, M.K.; SONGER, J.G. The Comparative Pathology of *Clostridium difficile*-associated Disease. **Veterinary Pathology**, v.43, p.225-240, 2006.

KEEL, K.; BRAZIER, J.S.; POST, K.W.; WEESE, S.; SONGER, J.G. 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, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00224-07

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.40, n.4, p.151-156, 2001. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00265-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00265-6)

KOTILA, S.M.; PITKANEN, T.; BRAZIER, J.; EEROLA, E.; JALAVA, J.; KUUSI, M.; KONONEN, E.; LAINE, J.; MIETTINEN, I.T.; VUENTO, R.; VIROLAINEN, A. *Clostridium difficile* contamination of public tap water distribution system during a waterborne outbreak in Finland. Scandinavian. **Journal Public Health**, v.41, p.541-545, 2013. DOI: 10.1177/1403494813481648

KUIJPER, E.J.; COIGNARD, B.; TULL, P. Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe. **Clinical Microbiology Infection**, v.12, n.6, p.S2–S18, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x>.

KYNE, L.; WARNY, M.; QAMAR, A.; KELLY, C.P. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. **Lancet**, v.357, p.189-193, 2001.

LEAV, B.A.; BLAIR, B.; LENEY, M.; KNAUBER, M.; REILLY, C.; LOWY, I.; GERDING, D.N.; KELLY, C.P.; KATCHAR, K.; BAXTER, R.; AMBROSIONO, D.; MOLRINE, D. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). **Vaccine**, v.28, p.965-969, 2010. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.144

LEMÉE, L.; DHALLUIN, A.; TESTELIN, S.; MATTRAT, M.A.; MAILLARD, K.; LEMELAND, J.F.; PONS, J.L. 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, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004

LIZER, J.T. Development of a conventional pig model for *Clostridium difficile* infection and associated disease in neonatal pigs. **Tese**, pp.55, 2010. In.: <http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2615&context=etd>

LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; GOLÇALVES, L.A.; PIRES, P.S.; SILVA, R.O.S.; ALVEZ, G.G.; NEVES, M.; OLIVEIRA JR., C.A.; PEREIRA, P.L.L. Clostridioses em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.29-48, 2013.

NORMAN, K.N.; HARVEY, R.B.; SCOTT, H.M.; HUME, M.E.; ANDREWS, K.; BRAWLEY, A.D. Varied prevalence of *Clostridium difficile* in na integrated swine operation. **Anaerobe**, v.15, p.256-260, 2009. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.09.006

NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B.; NORBY, B.; HUME, M.E. Comparison of antimicrobial susceptibility among *Clostridium difficile* isolated from an integrated human and swine population in Texas. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.11, n.4, 2014. DOI: 10.1089/fpd.2013.1648

OSSIPRANDI, M.C.; BUTTRINI, M.; BOTTARELLI, E.; ZERBINI, L. Preliminary molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates from healthy horses in northern Italy. **Comp. Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.33, p.25-29, 2010. DOI: 10.1016/j.cimid.2009.10.008

OUROFINO SAÚDE ANIMAL. Doenças entéricas na maternidade suína: um desafio constante. Disponível em: <http://www.ourofinosaudeanimal.com/blog/doencas-entericas-na-maternidade-suina-um-desafio/>, 2012, acesso em: 03 nov. 2016.

PEREIRA, N.G. Infecção pelo *Clostridium difficile*. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.102, n.5, p.27-49, 2014.

RAMIREZ, A.; ROWE, E.W.; ARRUDA, P.H.; MADSON, D.M. 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 Production**, v.22, n.1, p. 29-32, 2014.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STAMPFLI, H.R.; STALKER, M.; DUFFIELD, T.; WEESE, J.S. Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.166-172, 2007. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.03.016

TORREMORREL, M; PIJOAN, C; JANNI, K; WALKER, R; JOO, H.S. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.8, p.828-832, 1997.

RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; GERDING, D.N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.526-536, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2164

SACHSE, K.; FREY, J. PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v.216, p.137-152, 2003.

SANTOS, A.; ISIDRO, J.; JULIO, C.; OLEASTRO, M. *Clostridium difficile*: diversidade genética e perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Boletim Epidemiológico)**, v.11, n.5, 2015.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T.; HMYAN ROHDE, M.; HARDT, W.D.; WEHLAND, J.; AKTORIES, K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. **PLoS**

Pathogens, v.5, n.10, p.e1000626, 2009. DOI: <http://doi:10.1371/journal.ppat.1000626>

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JUNIOR, E.C.C.; PIRES, P.S.; SANTOS, R.L.R.; ASSIS, R.A.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. 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, 2011. DOI: 10.1590/S0103-84782011005000100

SILVA, R.O.S. Padronização de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*. **Ciência Rural**, v.44, n.8, p.1415-1421, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20131344

SIMANGO, C.; MWAKURUDZA, S. *Clostridium difficile* in broiler chicken sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.268-270, 2008. DOI: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.020

SKRABAN, J.; DZEROSKI, S.; ZENKO, B.; TUSAR, L. Changes of poultry faecal microbiota associated with *Clostridium difficile* colonization. **Veterinary Microbiology**, v.165, p.416-424, 2013. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.014

SONGER, J.G.; POST, K.W.; LARSON, D.J.; JOST, B.H.; GLOCK R.D. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. **Swine Health Production**, v.8, n.4, p.185-189, 2000.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal Health Research Review**, v.5, p.321-326, 2004.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M.A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. **Anaerobe**, v.12, p.1-4, 2006. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2005.09.001

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GILBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B.; POPOFF, M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. **FEMS Microbiology Letters**, v.186, p.307-312, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09122.x>

TASTEYRE, A.; BARC, M.C.; COLLIGNON, A.; BOUREAU, H.; KARJALAINEN, T. Role of *FliC* and *FliD* flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. **Infection Immunology**, v.69, p.7937-7940, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001>

TROIANO, T.; HARMANUS, C.; SANDERS, I.M.J.G.; PASQUALE, V.; DUMONTET, S.; CAPUANO, F.; ROAMNO, V.; KUIJPER, E.J. Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes in edible marine bivalve molluscs in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.208, p.30-34, 2015. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.002

WARNY, M.; PEPIN, J.; FANG, A.; KILLGORE, G.; THOMPSON, A.; BRAZIER, J.; FROST, E.; MCDONALD, L.C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium*

difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europa. **Lancet**, v.366, p.1079-1084, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67420-X

WEESE, J.S.; WAKEFORD, T.; REID-SMITH, R.; ROUSSEAU, J.; FRIENDSHIP, R. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. **Anaerobe**, v.16, p.501-504, 2010. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2010.08.001

VOHRA, P.; POXTON, I.R. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. **Microbiology**, v.157, p.1343-1353, 2011. DOI: 10.1099/mic.0.046243-0

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, 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005.

ZIDARIC, V.; ZEMLJIC, M.; JANEZIC, S.; KOCUVAN, A.; RUPNIK, M. High diversity of *Clostridium difficile* genotype isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. **Anaerobe**, v.14, p.325-327, 2008. DOI: doi:10.1016/j.anaerobe.2008.10.001