

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Ocorrência e investigação de fatores de virulência em enteropatógenos de origem bacteriana em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo.

Thays Mizuki Lucas

Botucatu – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Ocorrência e investigação de fatores de virulência em enteropatógenos de origem bacteriana em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo.

Thays Mizuki Lucas

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Nome do Autor: Thays Mizuki Lucas

Título: Ocorrência e investigação de fatores de virulência em enteropatógenos de origem bacteriana em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof.Dr. Antonio Carlos Paes
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

ProfªDrª Lisiane de Almeida Martins
Membro
Hospital Veterinário
UNIPAR – Umuarama, PR.

Data da Defesa: 30 de julho de 2012.

LUCAS, T.M. Ocorrência e investigação de fatores de virulência em enteropatógenos de origem bacteriana em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2012. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A diarreia é causa comum de morbimortalidade em potros neonatos. Os principais agentes causais de origem bacteriana na enterite em potros são: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* e *Rhodococcus equi*. Foram colhidas 80 amostras de fezes de potros com diarreia e 26 sem diarreia, perfazendo 106 animais com idade até três meses de idade, de diferentes raças, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Foi investigado fatores de virulência de *Escherichia coli*, caracterização dos sorotipos de *Salmonella* spp., detecção de toxinas de *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens*, e perfil de sensibilidade microbiana das linhagens de *E. coli* e *Salmonella* spp. Foram isoladas 64 (60,3%) estirpes de *Escherichia coli*, o gene *fimH* em 34 (53,9%) linhagens, o gene *ag43* em 33 (52,3%) estirpes e o gene *papC* em seis (9,5%) isolados. Foram isoladas 17 (16,0%) linhagens do gênero *Salmonella*. Foram identificadas 20 linhagens de *Clostridium perfringens*, 17 positivos para toxina A e três a toxina A beta 2. Duas amostras de fezes foi isolado *Clostridium difficile*, produtores das toxinas A/B. Infere-se no presente estudo a complexidade etiológica na enterite de potros até três meses de idade, a baixa relação dos fatores de virulência de *E. coli* pesquisados com linhagens isoladas de animais com diarreia, a relevância em saúde pública dos sorotipos de *Salmonella* spp. identificados nos potros, o predomínio da toxina A nos isolados de *C. perfringens* e *C. difficile*, e a necessidade da adoção de tratamento das enterites com respaldo dos testes de sensibilidade microbiana.

Palavras-chave: Potros, diarreia, enteropatógenos, fatores de virulência, região centro-oeste.

LUCAS, T.M. Ocorrência e investigação de fatores de virulência em enteropatógenos de origem bacteriana em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2012. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Diarrhea is a common cause of morbidity and mortality in neonatal foals. The main causative agents of bacterial enteritis in foals are: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* and *Rhodococcus equi*. Were collected 80 stool samples from foals with diarrhea and 26 without diarrhea, totaling 106 animals, aged three months old, different races and from properties in the state of São Paulo. Were investigated virulence factors from *E. coli*, characterization of the serotypes of *Salmonella* spp., detection of toxins of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*, and antimicrobial susceptibility to *E. coli* and *Salmonella* spp. strains. Were isolated 64 (60.3%) *E. coli* strains, the detection of the fimH gene in 34 (53.9%) strains, the gene ag43 in 33 (52.3%) strains and gene papC in six (9, 5%) isolated. We isolated 17 (16.0%) strains of *Salmonella*. Were identified 20 strains of *Clostridium perfringens*, 17 detected the toxin A and three the toxin A beta 2. Two stool specimens was isolated *Clostridium difficile* toxin producer A / B. It is inferred in the present study the complexity enteritis in foals up to three months, the low ratio of virulence factors of *E. coli* strains isolated from animals with diarrhea, the public health relevance of the serotypes of *Salmonella* spp. identified in foals, the prevalence of toxin A in isolates of *C. perfringens* and *C. difficile*, and the need to adopt the treatment of bacterial enteritis in foals with the backing of microbial sensitivity tests.

Keywords: Foals, diarrhea, intestinal pathogens, midwest region, virulence factors.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Frequência de detecção de genes de diferentes fatores de colonização, toxinas e outros fatores de virulência em estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes de potros, com e sem diarreia. Botucatu, SP, 2012.....	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de fezes de potros, com e sem diarreia. Botucatu, 2012.....	42
Tabela 2. Sensibilidade microbiana em estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de potros com e sem diarreia, Botucatu, 2012. 49	49
Tabela 3. Frequência de sorotipos em 17 linhagens de <i>Salmonella</i> spp. identificados em potro, com e sem diarreia, com até três meses de idade. Botucatu, SP, 2012.....	50
Tabela 4. Sensibilidade microbiana em estirpes de <i>Salmonella</i> sp. isoladas de amostras de potros com e sem diarreia, Botucatu, 2012.....	51
Tabela 5. Identificação de enteropatógenos de origem bacteriana, isolados ou em associação, em 106 amostras de fezes de potros, com e sem diarreia, até três meses, provenientes do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2012.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

µg – micrograma

ng – nanograma

µL - microlitro

°C – graus Celsius

A - nucleotídeo adenina

A/E – “attaching and effacing”

afa – gene codificador de adesina afimbrial

ag 43 - antígeno 43

APEC – *Escherichia coli* patogênica para aves

ATP – Adenosina Trifosfato

BHI – caldo cérebro-coração

C – nucleotídeo citosina

C. difficile – *Clostridium difficile*

C. perfringens - *Clostridium perfringens*

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

cnf – fator necrosante citotóxico

DAEC – *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC – *Escherichia coli* diarreiogênica

DNA – ácido desoxirribonucléico

E. coli - *Escherichia coli*

eae – *Escherichia coli* “attachment and effacing” / intimina

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora

ELISA – Enzyme Linked immunosorbent assay

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

EPM – Escola Paulista de Medicina

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

EUA – Estados Unidos da América

ExPEC – *Escherichia coli* extra-intestinal

F - fatores de colonização
Fe – ferro
fimH – gene codificador de fímbria H / pili tipo 1
FV – fator de virulência
G – nucleotídeo guanina
GI, GII, GIII – variantes de papG
H – antígeno flagelar
hly – gene codificador de hemolisina
hlyA - α -hemolisina
iuc – gene codificador de aerobactina
g - grama
K – antígeno capsular
KDa – quilo dálton
LEE - Locus of enterocyte effacement
LPS – lipopolissacarídeo
LT – termolábil
mg/kg – miligramas por quilo
MILI – Motilidade, Indol e Lisina
mL - mililitros
mm - milímetros
NaCl – cloreto de sódio
NetB – toxina necrótica B-like
O – antígeno somático
P - pilis
PAI – ilha de patogenicidade
PIC - protein involved in intestinal colonization
papC – subunidade C de fímbria P
papG – subunidade G de fímbria P
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – potencial de hidrogênio
rpm – rotações por minuto
RTX - Repeat Toxin

sfa – gene codificador de fímbria S

SS – *Salmonella Shigella*

ST – termoestável

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga

Stx – toxina de Shiga

T – nucleotídeo timina

TA – temperatura de anelamento

TT - Tetracionato

TSA – ágar tríptico de soja

UV - Ultra Violeta

Vero – células de linhagem de rim de macaco verde africano

VTEC/ STEC - linhagens verotoxigênicas

vt – verotoxina / verocitotoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 <i>Salmonella</i> sp	13
2.2 <i>Clostridium</i> sp	17
2.3 <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.1. <i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	23
2.3.2. <i>E. coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)	24
2.3.3. <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	25
2.3.4. <i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	26
2.3.5. <i>E. coli</i> Enteroinvasora (EIEC)	27
2.3.6. <i>E. coli</i> que adere difusamente (DAEC)	27
2.3.7. Fatores de Virulência (FV)	28
3. OBJETIVOS	38
3.1. Geral	38
3.2. Específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Animais e amostras de fezes	39
4.2. Exames Microbiológicos e Detecção Molecular	40
4.2.1. Diagnóstico de <i>E. coli</i>	40
4.2.2. Diagnóstico de <i>Salmonella</i>	42
4.2.3. Teste de sensibilidade microbiana (antibiograma)	43
4.2.4. Diagnóstico de <i>Clostridium</i>	44
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

Os equídeos convivem com os humanos há milênios e esta espécie animal é utilizada para transporte, tração, lazer, alimento, entretenimento, esporte e na recuperação de crianças especiais (THOMASSIAN, 2005).

A Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária –CNAP referiu que o Brasil é o terceiro país em número de equídeos, superado somente pela China e México, e possui atualmente cerca de dez milhões de animais. Nas regiões norte e nordeste, os equídeos ainda representam um dos principais meios de transporte (BRASIL, 2008). Por outro lado, nas regiões, sudeste, sul e centro-oeste do território nacional localizam-se os principais criatórios de elite, de diferentes raças. A região sudeste do Brasil alberga um terço dos criatórios (IBGE, 2008).

Dentre as raças registradas, o Brasil possui aproximadamente 278 mil quartos de milha, 197 mil crioulos, 186 mil mangalargas, 88 mil campolinas, 80 mil árabes, 30 mil puros sangue ingleses e 25 mil apaloosas. A criação de equídeos no Brasil envolve cerca de 500 mil empregos diretos e indiretos, compreendendo importante segmento na cadeia do agronegócio do país (BRASIL, 2008).

A diarreia é a principal causa de morbimortalidade em potros neonatos (COHEN e WOODS, 1999). Várias causas infecciosas e não infecciosas são responsáveis por enterocolite e enterite em potros recém nascidos (MAGDESIAN, 2005).

A diarreia é o distúrbio entérico mais comum nos potros. Estima-se que 80% dos potros apresentam pelo menos um episódio de diarreia durante os primeiros seis meses de idade, de gravidade variável, persistentes ou de forma transitória (MELO et al., 2007).

Os distúrbios intestinais de origem infecciosa geralmente estão associados a deficiências de manejo higiênico e sanitário nas propriedades e o diagnóstico e tratamento precoces são cruciais no estabelecimento do

prognóstico dos potros. A ocorrência de distúrbios entéricos em potros é bastante variável, sendo influenciada por fatores como clima, densidade populacional dos haras ou criatórios, manejo sanitário, trânsito de animais, coabitação com outras espécies domésticas e uso dos animais (RADOSTITS et al., 2007).

A alteração na consistência das fezes dos potros é o sinal clínico mais evidente de enterite. Potros com enterite apresentam hipertermia ou febre, diferentes graus de desidratação, e podem desenvolver complicações clínicas como acidose, choque hipovolêmico, hipotensão e septicemia (MAGDESIAN, 2005).

A etiologia da enterite infecciosa em potros é complexa. Dentre os agentes infecciosos de origem bacteriana mais frequentes merecem destaque: *Salmonella* sp., *Escherichia coli* (*E. coli*), *Rhodococcus equi* (*R. equi*), *Clostridium difficile* (*C. difficile*) e *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Outros enteropatógenos como Rotavírus, Coronavírus, *Strongyloides westeri*, também estão envolvidos, isolados ou associados com patógenos de origem bacteriana na gênese de distúrbios entéricos em potros (RADOSTITS et al., 2007).

A despeito da pluralidade etiológica e da potencialização do efeito patogênico quando da associação entre os micro-organismos entéricos em potros (COHEN e WOODS 1999), a grande maioria dos estudos não tem avaliado a diarreia na espécie equina sob a forma de síndrome. Ao contrário, usualmente tem-se investigado isoladamente os enteropatógenos envolvidos na diarreia em potros. No Brasil, são praticamente incipientes os estudos conduzidos na investigação simultânea dos principais patógenos entéricos em potros.

O presente estudo investigou a ocorrência de *Salmonella* spp., *E. coli* e *Clostridium* spp., bem como a presença de fatores de virulência destes enteropatógenos em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* é reconhecido como um dos patógenos mais importantes para os animais em todo o mundo e de grande preocupação no contexto de Saúde Pública, devido ao envolvimento em casos e surtos de infecções e toxi-infecções de origem alimentar em humanos (WRAY e WRAY, 2000).

A taxonomia do gênero *Salmonella* é complexa e gera controvérsia entre os bacteriologistas. Aceitamos nos últimos anos que o gênero possa ser dividido em duas espécies denominadas *S. bongori* e *S. enterica*, das quais a última albergaria as principais subespécies e sorotipos patogênicos para animais e humanos. São reconhecidos atualmente mais de 2.300 sorotipos de *Salmonella*, dos quais a maioria pertence a espécie *S. enterica* (BROOKS et al., 2012).

Salmonella sp. pode ser identificada na microbiota fecal de animais domésticos, com e sem sinais entéricos. Os animais eliminam o micro-organismo de forma intermitente pelas fezes. A infecção dos animais ocorre predominantemente pelo consumo de alimentos e água, contaminados por fezes ou pelo hábito da coprofagia manifestada pelos animais jovens, particularmente pelos potros. No entanto, outras vias como a umbilical, genit urinária e transplacentária também são observadas nas infecções em animais domésticos (GREENE, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

Os sorotipos de *Salmonella* podem ser convencionalmente associados a pelo menos três tipos distintos de infecção. Número reduzido de sorotipos são capazes de produzir grave doença sistêmica em animais e humanos hígidos. A transmissão, nestes casos, geralmente ocorre via fecal oral. A multiplicação bacteriana se dá principalmente nas células mononucleares.

Dentre estes sorotipos destacam-se *S. Typhimurium* em animais e humanos, *S. Gallinarium* em aves, *S. Cholerasuis* em suínos e certas estirpes

de Paratyphi B, são relacionadas a febre tifoide em humanos (GYLES et al., 2010).

Outro grupo de sorotipos está relacionado às infecções sistêmicas, com predomínio no trato reprodutivo em mamíferos, além da multiplicação em outros órgãos. Neste grupo merecem destaque *S. Dublin* em bovinos, *S. Abortusovis* em ovelhas, *S. Abortusequi* em cavalos, e *S. Pullorum* em aves. (GYLES et al., 2010).

A grande maioria dos demais sorotipos são incapazes de produzir infecções sistêmicas em animais imunocompetentes, e em animais adultos saudáveis. No entanto, colonizam o trato digestório de várias espécies, e podem causar enterite aguda ou infecções subclínicas (TRABULSI et al., 1999).

A infecção pelos diferentes sorotipos de *Salmonella* também pode ser subdividida com base no hospedeiro. Nesta classificação existem os sorotipos denominados espécie-específicos, que causam geralmente doença sistêmica em um número limitado de espécies, como *S. Typhi*, *S. Gallinarum*, e *S. Abortusovis*, que estão exclusivamente associados a doença sistêmica em humanos, aves e ovinos, respectivamente. Outro grupo é constituído por sorotipos de espectro de infecção restrito, associados com uma ou duas espécies hospedeiras estreitamente relacionadas, e raramente causam doença em outros hospedeiros. Neste grupo incluem-se *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* geralmente associados com doença sistêmica grave em ruminantes e suínos, respectivamente, embora possam induzir gastroenterite em outros animais (GYLES et al., 2010).

A viabilidade intracelular do micro-organismo, a produção de citotoxinas, a presença de endotoxinas e a resistência aos antimicrobianos convencionais, figuram dentre os principais fatores de virulência associados às infecções pelos diferentes sorotipos de *Salmonella* em animais (QUINN et al., 2005).

A salmonelose em animais ocorre comumente pela ingestão de água e alimentos contaminados. Qualquer espécie de mamífero ou ave, selvagem ou doméstica, pode atuar como fonte de infecção. A bactéria é ingerida com o alimento ou água contaminada por fezes de animais infectados (cl clinicamente doentes ou portadores). Após a ingestão, a bactéria invade a parede intestinal e progride, localizando-se nos linfonodos mesentéricos. A disseminação intestinal da bactéria para outros órgãos após a infecção intestinal depende do estado imunológico do hospedeiro, da carga infectante, virulência e sorotipo da bactéria, ou de outros fatores debilitantes para o animal (RIET-CORREA et al., 2001).

A infecção pelo gênero *Salmonella* é considerada a causa mais comum de diarreia aguda de origem bacteriana nos potros (JONES e SPIER, 2000). As infecções por *Salmonella* sp. em animais estão associadas a grande variedade de manifestações clínicas entéricas e extra-entericas (RADOSTITS et al., 2007). Clinicamente são reconhecidas quatro tipos de manifestações: (1) infecções inaparentes com estados de portador latente ou ativo; (2) depressão, febre e anorexia, sem diarreia ou cólica; (3) enterocolite fulminante ou superaguda com diarreia; e (4) septicemia.

A diarreia ocorre, em geral, 24 a 48 horas antes do primeiro pico febril, perdurando por vários dias. As fezes assumem aspecto aquoso, de odor fétido e coloração de tonalidade verde-amarelada (DUIJKEREN et al., 1995; MELO, et al., 2007).

A salmonelose entérica pode evoluir para complicações como bacteremia, choque séptico e morte, especialmente em potros na primeira semana de idade (SPIER, 1993). O maior risco para bacteremia e sepse em animais são suscitados por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (MAGDESIAN, 2005).

O diagnóstico de rotina da salmonelose em potros é baseado no isolamento microbiano em meios convencionais como o ágar sangue ovino e ágar MacConkey, ou seletivos como *Salmonella-Shigella* (SS) [TRABULSI et

al., 1999]. Devido a eliminação intermitente do patógeno nas fezes, recomenda-se a colheita alternada, de duas ou três amostras, a cada 48 horas, em potros com sinais entéricos (RADOSTITS et al., 2007). Após o isolamento procede-se a caracterização bioquímica (MILI, EPM, Citrato) e confirmação utilizando soro polivalente (TRABULSI et al., 1999). Recomenda-se também a caracterização dos sorotipos em laboratórios de referência visando estudos epidemiológicos e de virulência.

No Brasil, estudo sorológico em nove equinos com sinais entéricos do estado de São Paulo mostrou o predomínio dos sorotipos *S. Newport*, *S. Typhimurium* e *S. Glostrup* em potros entre um e dois meses (RIBEIRO et al., 2010). No entanto, são escassos os estudos no país envolvendo a caracterização dos principais sorotipos de *Salmonella* em equinos.

O achado hematológico mais consistente nos casos graves de salmonelose em potros é a leucopenia por neutropenia, que reflete a resposta do animal susceptível à endotoxemia. O leucograma apresenta desvio à esquerda degenerativo e alterações tóxicas nos neutrófilos, com contagens de leucócitos totais inferior a 1500/ μ L, e presença de linfopenia e neutropenia. O hematócrito pode estar elevado devido à hemoconcentração (secundária a desidratação). A concentração da proteína plasmática diminui como resultado da perda entérica de proteínas, decorrente da lesão mucosa e aumento do dano epitelial. A hipoproteinemia e o desenvolvimento de edema são sinais desfavoráveis à sobrevivência (SPIER, 1993).

Os princípios do tratamento da salmonelose em potros incluem reposição das perdas de líquidos e eletrólitos, redução da secreção líquida, controle da endotoxemia e da sepse, e restabelecimento da microbiota normal. O uso de antibióticos é fundamental no controle da septicemia ou em pacientes neutropênicos, e deve ser fundamentado em teste de sensibilidade “*in vitro*”. A sensibilidade dos sorotipos de *Salmonella* obtidas de equinos aos diferentes antimicrobianos é bastante variável (DUIJKEREN et al., 1995, 2002).

As sulfonamidas/trimetoprim e aminoglicosídeos são os principais grupos de antimicrobianos utilizados no tratamento da salmonelose em potros (DUIJKEREN et al., 1995; JONES e SPIER, 2000). O ceftiofur também tem mostrado eficácia no tratamento da salmonelose, com sensibilidade dos isolados de até 97% (DUIJKEREN et al., 2002). Alternativamente, o florfenicol se demonstrou eficaz no controle de surto de salmonelose em equinos (OLIVEIRA et al., 2004).

O controle/profilaxia da salmonelose em potros é fundamentado em ações básicas de manejo e higiene nos criatórios, que inclui retirada periódica de dejetos, desinfecção de instalações, adoção de piquetes maternidade, correta ingestão de colostro pelos potros, desinfecção umbilical e fornecimento de pastos de qualidade. (RIET-CORREA et al., 2001; RADOSTITS et al., 2007). No Brasil, estão disponíveis vacinas inativadas e atenuadas para imunoprofilaxia da salmonelose em potros. No entanto, no Brasil estão recomendadas as vacinas inativadas para a primo-infecção em potros de três a quatro meses, reforço com 30 dias depois e revacinação anuais. Apesar de praticamente não serem utilizadas no país, as vacinas atenuadas possuem como vantagem a indução de resposta imune tanto humoral quanto celular (GYLES, 2010).

2.2 *Clostridium* sp

Clostridium difficile (*C. difficile*) e *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) são causas comuns de enterocolite em potros recém-nascidos, consideradas as espécies mais patogênicas para equinos até um ano de idade, embora possam causar diarreia em adultos (BAVERUD et al., 2003; SONGER et al., 2009). O micro-organismo pertence a microbiota fecal dos potros e pode ser isolado com frequência das fezes (RADOSTITS et al., 2007), embora as estirpes patogênicas estejam associadas à produção de tipos específicos de toxinas (SILVA et al., 2012).

C. perfringens e *C. difficile* são bactérias anaeróbias, Gram-positivas, em forma de bacilos Gram-positivos (SCHOTTE et al., 2004; FURR et al., 2012).

A virulência dos isolados de *C. perfringens* e *C. difficile* é avaliada com base na capacidade de produzir uma ou mais das quatro principais toxinas (alfa, beta, épsilon e iota). Além destas toxinas, estas bactérias podem produzir outros fatores de virulência, como beta-2, associada com diarreia em cavalos (HAZLETT et al., 2011) e toxina necrótica B-like (NetB) [KEYBURN et al., 2010].

As toxinas dos tipos A e C de *C. perfringens* e *C. difficile* são mais comumente associadas com diarreia em potros com menos de 10 dias de idade. O tipo A produz uma toxina, enquanto que o tipo C produz subfrações de toxinas A e B. A tipificação das toxinas é realizada utilizando método molecular (como PCR e sequenciamento). As toxinas do tipo C causam diarreia hemorrágica, por vezes grave, com mortalidade maior do que o tipo A (SILVA, et al., 2012). Outros sinais clínicos associados à infecção por *C. perfringens* incluem cólicas, desidratação, taquipnéia, taquicardia e prostração.

C. perfringens causa diarreia em potros esporadicamente ou sob a forma de surtos. Em animais adultos, tem sido secundária ao uso indevido de antimicrobianos (BAVERUD et al., 2003; SILVA et al., 2012).

A taxa média de mortalidade de potros com infecções por *C. perfringens* foi estimada em 54%. Destes, as linhagens produtoras de toxina apresentaram 28% de mortalidade, enquanto tipo C foi observado mortalidade de 83%. Nesse mesmo estudo, o tratamento não alterou a taxa de mortalidade para a maioria dos potros com linhagens produtoras do tipo C (GYLES et al., 2010).

Nas enterites em potros associadas com *C. perfringens* tipo A, as infecções podem ser brandas (diarreia mucóide) ou graves (septicemia), resultando neste último caso em morte superaguda. Nestes casos graves se observa necrose das mucosas entéricas, enterite hemorrágica, hemorragia de subserosa, na lâmina própria e submucosa (BUESCHEL et al., 1998).

Os estudos de infecção por *C. perfringens* e/ou *C. difficile* em potros no Brasil são praticamente incipientes, e geralmente estão restritos aos relatos de

caso. Neste contexto, Silva et al., (2012) relataram recentemente o primeiro caso de diarreia em dois potros no Brasil causado por *C. difficile*, em linhagens produtoras de toxinas A/B, diagnosticado por métodos moleculares.

A presença dos clostrídios na microbiota de animais saudáveis torna difícil o diagnóstico laboratorial de rotina em infecções causadas por estes agentes em equinos. Desta forma, a identificação das toxinas em linhagens isoladas de potros, com e sem diarreia, é fundamental em estudos voltados a de epidemiologia, virulência e patogenicidade de *C. perfringens* e *C. difficile* em potros (SILVA et al., 2011; UZAL et al., 2012).

O diagnóstico de rotina das clostridioses entéricas em potros é realizado com base no isolamento microbiano em ágar-sangue, utilizando geradores de anaerobiose. A citologia direta das fezes de potros com diarreia corada pelos métodos de Gram, Giemsa ou Panótico deve ser interpretada com cautela, em virtude da presença do micro-organismo na microbiota intestinal de animais sadios (TRABULSI et al., 1999; QUINN e al., 1994). Com efeito a identificação das toxinas é fundamental para o estabelecimento do diagnóstico inequívoco. As diferentes toxinas de *C. perfringens* e *C. difficile* são diagnosticadas pelo uso de cultura em células Vero, ELISA e, mais recentemente, pelo PCR e técnicas de sequenciamento (DELMEÉ, 2001).

Os achados hematológicos em potros com clostridiose entérica incluem, leucopenia com neutropenia, neutrófilos tóxicos e aumento de fibrinogênio. A hipoproteinemia também é usualmente observada (GYLES et al., 2010).

O tratamento das infecções por *Clostridium* sp. em potros é baseado no uso de diferentes antimicrobianos (penicilina, cefalosporinas, metronidazol), reposição de equilíbrio hidroeletrolítico e energético, e anti-inflamatórios não esteroides com efeito anti-endotóxicos (FERNANDES et al., 2003; RADOSTITS et al., 2007).

A semelhança da salmonelose, o controle e a profilaxia das clostridioses entéricas em potros são baseados em medidas gerais de manejo e higiene nos criatórios (RADOSTITS et al., 2007).

Estudos recentes têm descrito que linhagens isoladas de humanos com infecções graves por *C. difficile* possuem similaridade genética com estirpes identificadas em animais domésticos, postulando o risco de potencial zoonótico (JHUNG et al., 2008; NORMAN et al., 2011).

2.3 *Escherichia coli*

E. coli é a principal bactéria da família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos, móveis ou não, anaeróbios facultativos, não esporulados, contendo diferentes fatores de virulência (ACHA e SZYFRES, 2001; QUINN et al., 1994; TRABULSI, 2005).

No cultivo microbiológico em meios convencionais como ágar MacConkey, se apresentam como colônias de 1mm de diâmetro, de coloração rósea ou “Pink” (lactose positivas), ou colônias acinzentadas, por vezes hemolíticas, no meio de ágar sangue ovino ou bovino. Outras características úteis na identificação fenotípica são reação positiva no indol, negativa para a produção de urease e hidrogênio sulfídrico, e não utilização de citrato como única fonte de carbono (ACHA e SZYFRES, 2001; QUINN et al., 1994; TRABULSI, 2005).

Nos animais domésticos, *E. coli* acarreta classicamente distúrbios entéricos. Porém, diferentes infecções extra-entericas também estão relacionadas ao agente como mastite, endometrite, cistite, artrite, abortamento, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite e septicemia (GREENE, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

O micro-organismo é facilmente isolado nas fezes de animais, com e sem diarreia. A severidade clínica das colibaciloses depende da presença de fatores de virulência, que determinam o grau de patogenicidade da linhagem. São reconhecidos fatores de virulência associados a produção de exotoxinas,

como as enterotoxinas, verotoxinas, hemolisinas e fator necrosante citotóxico, além da multiplicação em meios com baixa disponibilidade de ferro (aerobactina, sideróforos) e multirresistência ao antimicrobianos (GYLES et al., 2010).

E. coli é a principal bactéria que coloniza o trato intestinal dos animais domésticos sadios. Na maioria das espécies é encontrada entre $10^7 - 10^9$ organismos por grama de fezes, com maior concentração no intestino grosso comparativamente ao delgado (GYLES et al., 2010).

O trato intestinal de animais recém-nascidos em poucas horas torna-se colonizado por bactérias, como *E. coli*, a partir de micro-organismos do próprio ambiente. *E. coli* se estabelece no intestino e permanece como parte da microbiota normal ao longo de toda a vida do animal, residindo de forma comensal. Somente pequeno número de linhagens são patogênicas. Estas linhagens são classificadas em duas categorias ou patótipos, com base na produção de certos fatores de virulência, mecanismos pelos quais determinam infecções intra e extra-intestinais (GYLES et al., 2010).

E. coli pode apresentar flagelos, que são filamentos proteicos que se projetam da membrana capsular (antígeno H), com finalidade de atuar na movimentação bacteriana e são utilizados para caracterização dos sorotipos. Certas linhagens possuem também cápsula conhecida como antígeno K. As linhagens capsuladas possuem maior resistência à fagocitose. A membrana externa é constituída por lipopolissacarídeos (LPS), porinas e fímbrias. O LPS é composto por uma fração polissacarídica (poli O ou antígeno somático) e lipídeo A. A fração polissacarídica é utilizada nas reações de aglutinação para determinação dos sorogrupos, enquanto a fração lipídica está relacionada a ocorrência de choque endotóxico nas infecções sistêmicas por *E. coli* (TRABULSI, 2005). O LPS são fatores intrínsecos das bactérias Gram-negativas, também chamados de endotoxinas. São reconhecidos atualmente mais de 177 sorogrupos de *E. coli*, 72 antígenos K e 53 antígenos H. O material genético é formado por um cromossomo circular. Os plasmídeos -

material genético extra-cromossomal – contém informações como a produção de toxinas, utilização de substratos, resistência aos antimicrobianos e podem ser transmitidos entre linhagens de *E. coli* (GYLES et al., 2010; TRABULSI, 2005).

A capacidade da maioria das linhagens de *E. coli* exercer efeito patogênico está relacionada ao fenômeno de adesão, mediado por finos filamentos proteicos que se projetam da superfície bacteriana, denominados fatores de colonização (F) ou pilis (P), que encontram receptores nas células alvo. Nos potros, a fímbria F5 (anteriormente denominada K99) e a F41 parecem ser as mais prevalentes em casos de diarreia (RADOSTITS et al., 2007).

As linhagens de *E. coli* que causam diarreia em animais foram convencionalmente agrupadas em seis classes: enterotoxigênicas (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e aderência difusa (DAEC) [GYLES, 1992; TRABULSI, 2005].

Tanto nos animais como nos humanos, as infecções entéricas por *E.coli* estão relacionadas à presença de enterotoxinas (ST, LT) e fatores de colonização, enquanto as linhagens extra-intestinais geralmente exercem o efeito patogênico ligadas a produção de citotoxinas (hemolisinas, verotoxinas, CNF) e endotoxinas (LPS) [GYLES et al., 2010].

E. coli é frequentemente isolada das fezes de potros com diarreia. No entanto, diferentemente de outras espécies domésticas como bovinos e suínos, não existe associação definida entre os diferentes fatores de virulência (citotoxinas, pili, fímbrias), e a ocorrência de diarreia em equinos, particularmente em potros (HOLLAND et al., 1989, 1996). *E. coli* é a causa mais comum também de sepse em potros. No entanto, poucos estudos em potros têm incriminado o micro-organismo como causa primária de diarreia (MAGDESIAN, 2005).

Em animais, os mais importantes patótipos são *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), toxina Shiga (Stx) – produzindo *E. coli* (STEC) e *E. coli* extra-intestinal patogênica (ExPEC) [GYLES, 1992; TRABULSI, 2005].

Na maioria das doenças em animais e humanos causadas por *E. coli*, a patogenicidade está associada a genes de virulência codificados por plasmídeos, bacteriófagos, ou ilhas de patogenicidade (PAIS). A diferenciação das linhagens é importante para distinguir as patogênicas de não patogênicas, e para investigações epidemiológicas (GYLES et al., 2010).

2.3.1. *E. coli* Enteropatogênica (EPEC)

Foi a primeira categoria descrita de *E. coli* causadora de diarreia. Os primeiros estudos datam de 1920 e 1930 na Alemanha, confirmados em 1945 na Inglaterra (KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005).

Em 1995 foi reconhecida a existência de duas categorias de EPEC, denominadas típica e atípica. Esta última é considerada patógeno emergente tanto em países desenvolvidos quanto emergentes (em desenvolvimento), incluindo o Brasil. Ambas causam lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão A/E (“attaching and effacing”). As principais diferenças das linhagens típicas e atípicas são os sorotipos e a presença de plasmídeos específicos (KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005).

EPEC se adere às células da mucosa do intestino delgado e cólon causando perda das microvilosidades e formando um pedestal de filamentos de actina (lesão A/E). As mudanças morfológicas nas microvilosidades estão associadas com a resposta inflamatória. Clinicamente observa-se diarreia aquosa com muco e sem sangue, febre e sinais de desidratação (TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005).

Os humanos são reconhecidos como único reservatório das EPEC típicas. Raramente são encontradas em animais. As prováveis fontes de infecção são pessoas portadoras sadias ou doentes. As vias de transmissão

incluem contato pessoal e ingestão de água e alimentos contaminados (TRABULSI, 2005).

2.3.2. *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC)

Ainda há pouca informação sobre infecções por *E. coli* em equinos por linhagens ETEC, sugerindo ser de menor patogenicidade na espécie por este grupo de *E. coli* ao contrário do que se observa em humanos, bovinos e suínos (GYLES et al., 2010).

ETEC é a causa mais comum de diarreia em ruminantes domésticos e suínos (FAIRBROTHER et al., 2002; NAGY e FEKETE, 2005). Esta classe é caracterizada pela produção de enterotoxinas (proteínas ou peptídeos) e de fatores de colonização (fímbrias ou pili) que aderem a receptores específicos das células do epitélio intestinal e promovem a colonização (GAASTRA e de GRAAF, 1982).

As ETEC produzem dois tipos principais de enterotoxinas denominadas toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST) [KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005]. As enterotoxinas termoestáveis possuem duas frações (STa e STb), possuem baixo peso molecular e são resistentes a 100°C durante 15 minutos. As termolábeis possuem também duas frações (LT1 e LT2) e são inativadas a 60° C durante 15 minutos. A toxina LT possui grande peso molecular e está relacionada imunologicamente com a toxina da cólera (GYLES, 1992).

Os genes da toxinas ST e LT são encontrados no DNA plasmidial, podendo ser transferidas entre linhagens de ETEC (ACHA e SZYFRES, 2001; VERONESI, 2005).

Ao aderirem às células da mucosa do intestino delgado com o auxílio dos fatores de colonização, as bactérias liberam as toxinas. A LT altera a atividade da adenil ciclase ativando canais de cloro, com consequente perda de água e eletrólitos (bicarbonato). A lesão do epitélio intestinal é causada pela aderência das bactérias à superfície apical do enterócito, levando ao

arrasamento das microvilosidades (ROTHBAUM et al., 1982). A ação das duas toxinas resulta na incapacidade do enterócito em reter eletrólitos e líquidos celulares provocando diarreia profusa e aquosa (TRABULSI, 2005).

A fração STa se liga a receptor da glicoproteína na borda em escova das vilosidades e criptas intestinais, estimulando a produção de GMP cíclico (cGMP) (AL - MAJALI et al., 2007; GIANELLA e MANN, 2003; TURNER et al., 2006). Os níveis elevados de cGMP resultam na secreção de cloro e bicarbonato de sódio, bem como inibindo a absorção de Sódio. O jejuno parece ser o principal sítio de hipersecreção em resposta a STa (GYLES, et al., 2010).

As linhagens ETEC de origem animal geralmente não representam risco para os humanos não sendo consideradas de potencial zoonótico. Em contraste, linhagens verotoxigênicas (VTEC/ STEC) de origem animal podem causar doença em humanos.

2.3.3. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

As estirpes EHEC são descritas sob a forma de surtos ou em casos isolados de doença em humanos em países desenvolvidos, com menor frequência de isolamento em países em desenvolvimento (VERONESI, 2005; TRABULSI, 2005). A grande maioria dos surtos estão relacionados ao sorotipo O157:H7 (ACHA e SZYFRES, 2001; KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005).

Esta classe de *E. coli* se notabiliza pelo desenvolvimento de diarreia sanguinolenta (colite), trombocitopenia e síndrome urêmica hemolítica (SUH) em humanos, particularmente fatal em crianças. A ocorrência de colite hemorrágica e síndrome urêmica é atribuída a produção da toxina de Shiga ("Shiga toxin producing *E. coli*") ou STEC pelo sorotipo O157:H7. A toxina é também denominada verocitotoxina (VT) [ACHA e SZYFRES, 2001; GREENE, 2006; KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005].

A absorção da toxina Shiga provoca falência renal e hemorragias intestinais, respectivamente por inibição da síntese proteica e lesão A/E (TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005).

As EHEC são encontradas em baixa frequência nas fezes da maioria dos animais domésticos. No entanto, o reservatório mais importante para os humanos são os bovinos (ACHA e SZYFRES, 2001; KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005), que eliminam o sorotipo O157:H7 pelas fezes em até 1% dos animais. Os humanos se infectam pelo sorotipo O157:H7 principalmente pela ingestão de carne crua ou mal cozida (hambúrguer), frutas, leite, verduras e água contaminada com fezes de animais (RIBEIRO et al., 2000).

São escassos ou praticamente inexistentes os estudos de detecção da classe EHEC em linhagens de *E. coli* verotoxogênicas obtidas de fezes de potros com e sem diarreia.

2.3.4. *E. coli* Enteroagregativa (EAEC)

A principal característica das EAEC é seu padrão de adesão às células epiteliais que consiste em agregado celular que lembra “tijolos empilhados” (ACHA e SZYFRES, 2001; KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005). Tal padrão é denominado agregativo, e foi estabelecido em 1987 por pesquisadores chilenos, em estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia infantil no país (TRABULSI, 2005).

Os mecanismos de patogenicidade das EAEC ainda não foram totalmente esclarecidos (KAPER et al., 2004; VERONESI, 2005; TRABULSI, 2005). Esta classe de *E. coli* possui toxina termoestável denominada EAC (EAST-1) e a “plasmid-encoded toxin” (PET). A EAST-1 se relaciona com ST de ETEC, alterando a corrente iônica das células intestinais. PET induz rompimento do esqueleto da membrana celular (KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005). Sugere-se que a associação destes fatores resulte na ocorrência da diarreia em humanos.

Foram descritas duas proteínas extracelulares denominadas PIC (“protein involved in intestinal colonization”) e dispersina. PIC é uma mucinase que confere à bactéria, “in vitro”, resistência ao soro e a hemaglutinação. A

dispersina é imunogênica e auxilia na dispersão da EAEC pela mucosa intestinal (TRABULSI, 2005).

A doença típica em humanos é caracterizada por diarreia secretória, mucóide e aquosa, com período de incubação curto, pouca febre e episódios esporádicos de êmese. A classe EAEC foi associada com diarreia persistente em diversos países, inclusive o Brasil, com duração igual ou superior a 14 dias (VERONESI, 2005).

Estirpes de EAEC já foram isoladas em estudos pontuais com equinos, cães, bovinos, suínos e primatas não humanos, embora pareça representar pouca patogenicidade para os animais domésticos (TRABULSI, 2005).

2.3.5. *E. coli* Enteroinvasora (EIEC)

Os distúrbios entéricos em humanos provocados por *E. coli* enteroinvasora são semelhantes as infecções causadas pelo gênero *Shigella* (ACHA e SZYFRES, 2001; KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005). A diarreia causada por esta categoria é aquosa, com presença de muco e sangue. O paciente também apresenta febre, mal estar e cólicas abdominais (ACHA e SZYFRES, 2001; KAPER et al., 2004; TRABULSI, 2005).

A capacidade de invasão de células epiteliais e consequente infecção de células adjacentes por estas bactérias é regulada tanto por genes plasmidiais quanto por genes cromossomais (TRABULSI, 2005; VERONESI, 2005).

A transmissão ocorre via fecal-oral pela ingestão de água e alimentos contaminados. O reservatório desta categoria de *E. coli* são os humanos (TRABULSI, 2005). No entanto, possui importância indefinida nos animais domésticos como classe relacionada à de infecção intestinal (RADOSTITS et al., 2007).

2.3.6. *E. coli* que adere difusamente (DAEC)

As estirpes *E. coli* de aderência difusa são caracterizadas por padrão não agregativo de infecção celular, ao contrário do observado nas EAEC

(KAPER et al., 2004). Esta classe tem sido isolada de humanos com e sem diarreia (VERONESI, 2005).

Kaper et al. (2004) estimaram que, aproximadamente, 78% das linhagens de DAEC produzem uma adesina fimbrial denominada F1845 relacionada a ação citopática da bactéria. Esta ação se caracteriza pelo alongamento das microvilosidades ao redor da célula bacteriana, reduzindo borda em escova da mucosa intestinal. A semelhança das classes EIEC e EAEC possuem patogenicidade indefinida para animais domésticos (GYLES et al., 2010).

2.3.7. Fatores de Virulência (FV)

A patogenicidade das linhagens de *E. coli* está intimamente relacionada a presença de diferentes fatores de virulência, incluindo fatores de colonização, citotoxinas, mecanismos de captação de ferro e multi-resistência aos antimicrobianos (GYLES et al., 2010).

A regulação da expressão gênica também é aspecto importante na manifestação da virulência das enterobactérias. Condições ambientais como temperatura, oferta de nutrientes e ferro são fundamentais para a expressão dos principais fatores de virulência (EMODY et al., 2003).

2.3.7.1. Fatores de Colonização

As enterobactérias carregam em sua superfície monômeros, oligômeros simples ou componentes de fibras supramoleculares reconhecidos como fatores de colonização adesinas, pili ou fímbrias (GYLES et al., 2010).

Linhagens de *E. coli* produzem adesinas fimbriais que são estruturas presentes no envelope celular, facilmente identificadas por microscopia eletrônica. *E. coli* carrega cerca de 500 fímbrias em sua superfície. Cada uma destas estruturas é constituída por aproximadamente 1000 subunidades protéicas (GYLES et al., 2010).

Fímbrias e flagelos são morfologicamente e funcionalmente distintos. Os flagelos são longos e flexíveis, responsáveis por motilidade. Diferem também de pili sexual, que possui função de conjugação (JOHNSON, 1991). As fímbrias também podem conter várias cópias de subunidades pequenas, contendo adesinas com propriedades específicas de ligação.

A proteína intimina participa da atividade de adesão ao enterócito e destruição das microvilosidades intestinais em estirpes EAEC. Amostras do tipo EPEC possuem atividade A/E (“attaching and effacing”) e não produzem enterotoxinas ou toxinas do tipo Shiga. STEC produzem toxina Shiga imunologicamente similar a Stx1 e distintas da toxina *Shigella dysenteriae* Stx2. *E. coli* enterohemorrágica sorotipo O157:H7, possui atividade A/E e produz toxinas Shiga do tipo 1 e/ou 2 (FRANCK et al., 1998).

A fímbria K88 (F4) foi reconhecida inicialmente como antígeno capsular, recebendo denominação K, e mais tarde determinada como estrutura fibrilar. A adesão devido à K88 (F4) é mais importante nas infecções em leitões (RADOSTITS et al., 2007).

Fímbria K99 (F5) também foi designada inicialmente como estrutura capsular. A K99 está presente principalmente em estirpes é produzida por ETEC de suínos, bovinos e ovinos principalmente. A diarreia relacionada a linhagens de ETEC detentoras de K99 (F5) é observada em neonatos leitões, bezerros e cordeiros (GYLES et al., 2010).

Recentemente, as pilis denominadas originalmente como K88, K99, 987P, Fy e F107, foram renomeadas, F4, F5, F6, F17, e F18 (GYLES et al., 2010).

2.3.7.2. Fímbria tipo 1

Aproximadamente 80% das linhagens de *E. coli* codificam a fímbria tipo 1 ou pili tipo 1 (HACKER, 1992; MULVEY, 2002). Estruturalmente apresenta-se como bastonete helicoidal espesso, com 7nm de diâmetro e comprimento entre 0,5 e 2µm (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002), constituído por proteínas de

subunidade principal fimA e três proteínas de subunidades menores fimF, fimG e fimH (MULVEY, 2002; TIBA, 2004; GYLES et al., 2010).

Linhagens com a expressão da fímbria do tipo 1 se aderem a diferentes células, incluindo do epitélio bucal humano, intestinal, vaginal, do epitélio uretral e de vasos sanguíneos (JOHNSON, 1991).

A subunidade protéica menor denominada fimH é responsável pela invasão bacteriana no tecido do hospedeiro, atuando propriamente como adesina. A fimA sem a expressão da subunidade fimH não possui capacidade de aderência (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; OELSCHLAEGGER et al., 2002; TIBA, 2004).

Estudos recentes demonstraram que determinadas variantes de fimH podem mediar contato inter-bacteriano, estimulando auto-agregação das bactérias e formação de biofilme. Estas propriedades conferem maior resistência bacteriana às defesas do hospedeiro e também contra a ação de determinados antimicrobianos (GYLES et al., 2010).

2.3.7.3. Fímbria P (papC/papG)

O receptor de fímbria P é alfa-D-Gal (1-4) alfa-D-Gal (globobiose), um digalactosídeo que se encontra associado a um grupo de ceramidas ancorados na membrana de células epiteliais de pacientes do grupo sanguíneo P (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; OELSCHLAEGGER et al., 2002; TRABULSI, 2005; GYLES et al., 2010).

De maneira similar a fímbria do tipo 1, a fímbria P é composta por subunidades que constituem uma fibrila pequena e flexível. Grande parte de sua massa é formada pela subunidade papA. Esta fibrila contém uma adesina distalmente localizada, papG, em associação com três outras subunidades denominadas papE, papF e papK (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; TIBA, 2004). A subunidade papH atua como âncora para papA na membrana externa bacteriana. A papA é necessária para a formação da fímbria, mas não para a aderência com o receptor “Gal-Gal” (JOHNSON, 1991).

2.3.7.4. Fímbria S (sfa)

Pili S é composto por uma subunidade maior sfaA associada com três subunidades menores sfaG, sfaH e sfaS. A subunidade sfaS está localizada na extremidade distal da fímbria e permite interações da bactéria com resíduos de ácido siálico, expressos por receptores em células do epitélio renal e do endotélio dos vasos de humanos e animais. A fímbria S facilita a disseminação da bactéria pelos tecidos do hospedeiro (MULVEY, 2002).

2.3.7.5. Família de adesinas Dr

Este grupo de adesinas inclui adesinas fimbriais Dr e adesinas não fimbriais afal, afall, afalIII, afalIV, nfal e DrII (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002), além de O75X. A adesina afimbrial afa é codificada pelo operon afa e é expressada por linhagens UPECs pertencentes a família de hemaglutininas resistentes a manose (JOHNSON, 1991; TIBA, 2004).

Todas estas adesinas possuem como receptor o antígeno do grupo sanguíneo Dr (MULVEY, 2002; TIBA, 2004).

Os receptores para estas adesinas estão amplamente distribuídos em superfícies epiteliais do trato gastrointestinal, pelve renal, uretra, bexiga e mucosa uterina de humanos e animais (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; TIBA, 2004; GYLES et al., 2010).

2.3.7.6. Antígeno 43

O antígeno 43 (*ag43*) é uma proteína encontrada em grande quantidade na membrana de *E. coli*. Linhagens detentoras de *ag43* possuem capacidade enteroagregativa que poderia favorecer a formação de biofilmes e sobrevivência a fagocitose por polimorfonucleares, consideradas propriedades de virulência de certas bactérias (Van der WOUDE e HENDERSON, 2008).

Estudos recentes tem referido maior frequência do gene *ag43* em linhagens UPEC. Lüthje e Brauner (2010) verificaram que em 118 linhagens de *E. coli* isoladas de 47 crianças com infecções recorrentes ou esporádicas do

trato urinário, o gene *ag43* (flu) foi detectado em 55 (65%) dos isolados, e associação estatisticamente significativa com infecções recorrentes, sugerindo relação desta adesina com ITU e persistência intracelular.

2.3.7.7. Intimina (*eae*)

Este grupo de *E. coli* diarreiogênica adere-se intimamente às células intestinais. O sorotipo O157:H7 também se adere as células formando agrupamentos de microcolônias na superfície do enterócito de maneira íntima e localizada, destruindo as microvilosidades, provocando alterações na constituição e no metabolismo celular. Este tipo de lesão foi denominada Attachment/Effacement (A/E), pois após sua adesão há também formação de “pedestais ou saliências” nas células, encontrados principalmente nas classes EPEC e EHEC, intimamente relacionados a presença da proteína intimina (DANTAS, 2002; MOURA, 2005; NATARO e KAPER, 1998; RIBEIRO, 2001; GYLES et al., 2010).

O desenvolvimento da lesão A/E envolve a participação de genes plasmidiais e cromossômicos, bem como resposta celular. Porém, os principais genes envolvidos com A/E se encontram inseridos no cromossomo bacteriano formando uma ilha de patogenicidade denominada LEE (“Locus of enterocyte effacement”).

Dentre os genes nesta PAI, encontra-se o gene *eae* (*E. coli* attachment and effacing) que codifica a síntese de uma proteína denominada intimina. Esta intimina é responsável pela adesão íntima da bactéria com a célula intestinal (DANTAS, 2002; MOURA, 2005; NATARO e KAPER, 1998; RIBEIRO, 2001; VON SYDOW, 2005).

Apesar do grande número de investigações sobre os principais fatores de colonização de *E. coli* de humanos e algumas espécies animais são praticamente inexistentes os estudos voltados a detecção das fímbrias tipo 1, fímbria P, fímbria S, e adesinas Dr e do gene *eae* em linhagens de *E. coli* isoladas das fezes de potros.

2.3.7.8. Hemolisina (hly)

Diferentes toxinas com efeito lítico em células epiteliais, eritrócitos e

leucócitos são produzidas por *E. coli*, notadamente em linhagens que promovem infecções extra-entericas. Dentre as principais toxinas e citolisinas, assumem destaque α -hemolisina (hlyA), fator necrosante citotóxico (cnf) e verotoxinas (vt).

A α -hemolisina é uma citotoxina capaz de induzir a formação de poros na membrana de diversas células do hospedeiro, resultando em morte celular (TRABULSI, 2005).

Esta toxina faz parte da família RTX ("Repeat Toxin"). Promove a lise de eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e do epitélio renal (JOHNSON, 1991; EMODY et al., 2003), recebendo também a denominação de citolisina (REINGOLD et al., 1999).

A hemolisina é codificada por um operon cromossomal composto de quatro genes designado hlyABCD. O gene *hlyA* é estrutural, *hlyC* é responsável pela ativação pós transcricional da proteína estrutural e as proteínas hlyB e hlyC de membrana, compõem a maquinaria secretória de *hlyA* (GARCIA e LE BOUGUÉNEC, 1996; TIBA, 2004). Em animais, o operon hly costuma se localizar em plasmídeos (JOHNSON, 1991; REINGOLD et al., 1999).

A exposição de polimorfonucleares à α -hemolisina estimula a degranulação e a liberação de ATP e leucotrienos, causando severas alterações morfológicas, diminuindo quimiotaxia e fagocitose. A lise celular ocorre em altas concentrações da toxina. Monócitos e granulócitos são altamente sensíveis a citotoxicidade da hemolisina, enquanto linfócitos são relativamente resistentes (JOHNSON, 1991; GYLES et al., 2010).

A formação de poros, decorrente da ligação de hly com o receptor na célula do hospedeiro permite o fluxo livre de cátions, íons e água, levando a

perda do conteúdo intracelular, alterações no citoesqueleto e no metabolismo da célula (JOHNSON, 1991; TIBA, 2004).

2.3.7.9. Fator Necrosante Citotóxico 1 (cnf-1)

Em 1980 foi descrita toxina produzida por estirpes de *E. coli* isoladas de enterite de crianças, capaz de induzir lesões necróticas em pele de coelho (CAPRIOLI et al., 1980). O efeito citopático desta toxina em linhagens celulares HeLa e Vero leva ao desarranjo do tapete celular. Em 1983, esta toxina foi denominada Fator Necrosante Citotóxico (cnf) [BOQUET, 2001; GARCIA e LE BOUGUÉNEC, 1996; GYLES, 1992; POHL et al., 1993].

A toxina CNF-1 induz reorganização no citoesqueleto de actina, multinucleação e alongamento de células HeLa, além da formação de grandes vacúolos e capacidade de internalização bacteriana em células Hep-2 (GARCIA e LE BOUGUÉNEC, 1996).

2.3.7.10. Verotoxinas (VT1 e VT2)

Konowalchuk e colaboradores descreveram pioneiramente as verotoxinas em 1977, investigando a citotoxicidade do sobrenadante de culturas de *E. coli* bacteriano filtrados sobre células Vero (células de rim de macaco verde africano) [MOURA, 2005].

A verotoxina tipo 1 (VT1) é similar à toxina de Shiga (sintetizada por *Shigella dysenteriae*). A VT2 é antigenicamente distinta de VT1, também denominada toxina Shiga-like (Stx 1 e 2) [DANTAS, 2002; MOURA, 2005; NATARO e KAPER, 1998; RIBEIRO, 2001; VON SYDOW, 2005].

As verotoxinas inibem a síntese protéica das células do hospedeiro. No entanto, ainda permanece incerto o papel destas toxinas nas enterites em animais (DANTAS, 2002). A diarreia ocorre provavelmente pela destruição da camada de células de absorção do intestino (MOURA, 2005).

As toxinas VT1 e VT2 são constituídas por duas subunidades (A – B). A subunidade B é um pentâmero que se liga a um receptor glicolípídico

específico, presente na superfície das células eucarióticas. Após a ligação de B com os enterócitos, a subunidade A é carregada para o interior celular, sofrendo ação de enzimas proteolíticas, reduzida a subfrações. A subfração A1 remove resíduo de adenina da porção 28S ribossomal, inibindo a síntese protéica e causando morte celular (MOURA, 2005; NATARO e KAPER, 1998; RIBEIRO, 2001; VON SYDOW, 2005).

Linhagens de *E. coli* sorotipo O157:H7 produtoras de verotoxinas tem despertado grande preocupação no contexto de saúde pública, em virtude da associação com quadros de colite hemorrágica e falência renal em humanos (DANTAS, 2002; MOURA, 2005; NATARO e KAPER, 1998; RIBEIRO, 2001; VON SYDOW, 2005).

E. coli verotoxigênicas podem ser isoladas de uma grande variedade de animais. Porém, a espécie mais importante é a bovina, considerada fonte de infecção e reservatório para os humanos e outras espécies animais (DANTAS, 2002; MOURA, 2005; NATARO e KAPER, 1998; RIBEIRO, 2001; VON SYDOW, 2005).

A presença de linhagens de *E. coli* isoladas de potros produtoras de VT ou CNF tem sido escassamente investigada (RADOSTITS et al., 2007).

2.3.7.11. Aerobactina (aer)

O ferro é um dos elementos essenciais para o metabolismo bacteriano. Atua no transporte de elétrons e como catalizador de reações enzimáticas essenciais, como as envolvidas no metabolismo de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, além de síntese de DNA (JOHNSON, 1991; BRAUN et al., 1999; FARALDO-GOMÉZ et al., 2003). Em determinadas condições de disponibilidade de oxigênio e pH neutro, torna-se escassa a disponibilidade de ferro em virtude da rápida oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} , e da subsequente formação de hidróxidos insolúveis (JOHNSON, 1991; BRAUN et al., 1999, 2002; FARALDO-GOMÉZ et al., 2003).

O sideróforo hidroxamato aerobactina é o mais efetivo sistema de captação de ferro exógeno de *E. coli*. Aerobactina é uma molécula pequena formada pela condensação de duas moléculas de lisina e uma de citrato. Linhagens detentoras deste fator de virulência multiplicam-se ou mantêm-se viáveis em baixas condições de ferro, incluindo no soro e urina (GARCIA e LE BOUGUÉNEC, 1996; JOHNSON, 1991; ORSKOV et al., 1988; TIBA, 2004).

Em todas as linhagens de *E. coli* o sistema de aerobactina é codificado por um operon de cinco genes (*iucABCD* e *iutA*), no qual quatro genes (*iucABCD*) codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e um quinto gene (*iutA*), codifica o receptor de membrana externa denominado ferroaerobactina (GARCIA e LE BOUGUÉNEC, 1996; JOHNSON, 1991; TIBA, 2004).

A presença de linhagens de *E. coli* produtoras de exotoxinas como CNF e VT, bem como a captação de ferro exógeno (hemolisinas e sideróforos) predominam em infecções extraintestinais em animais e humanos (GYLES et al., 2010). No entanto, estes fatores de virulência tem sido pouco explorados nas linhagens de *E. coli* isoladas de equinos.

O diagnóstico de rotina da colibacilose em potros é realizado cultivando as fezes de animais com diarreia, em meios convencionais como ágar sangue ovino ou bovino, em aerobiose a 37°C, com isolamento das colônias em até 24 horas. Mesmo com a confirmação bioquímica, há a necessidade de se investigar os principais fatores de virulência (fimbria, toxinas), visto que *E. coli* quase que, invariavelmente, pode ser isolada do trato intestinal dos potros.

Os mesmos princípios terapêuticos, bem como as ações de controle e profilaxia descritos para salmonelose podem ser adotados na colibacilose em potros.

Considerando a escassez de estudos no Brasil voltados a investigação dos principais enteropatógenos envolvidos na gênese da diarreia em potros, bem como os fatores de virulência destes patógenos entéricos, o presente

estudo avaliou a ocorrência e investigação de fatores de virulência em enteropatógenos de origem bacteriana em potros até três meses de idade, com e sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a ocorrência de enteropatógenos de origem bacteriana e fatores de virulência dos isolados em potros até três meses de idade, com ou sem diarreia, criados no interior do estado de São Paulo.

3.2. Específicos

- Investigar os principais sorotipos nas linhagens do gênero *Salmonella* isoladas dos potros;
- Identificar *C. perfringens* e *C. difficile* e a presença das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, toxina necrótica B-like e beta 2;
- Detectar as principais citotoxinas (hly, CNF e VT), fatores de colonização (fímbria tipo 1, fímbria P, fímbria S e adesinas Dr) e outros fatores de virulência (intimina e aerobactina) em linhagens de *E. coli* isoladas de potros com e sem diarreia;
- Determinar o perfil de sensibilidade microbiana e a ocorrência de multirresistência em isolados de *E. coli* e *Salmonella* sp. frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da enterite em potros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e amostras de fezes

Foram colhidas 106 amostras de fezes de potros das raças Puro Sangue Inglês, Brasileiro de Hipismo, Quarto de milha, Manga Larga Paulista, Manga Larga, Paint Horse e mestiços, machos e fêmeas, provenientes de criatórios da região centro-oeste do interior do estado de São Paulo, em perímetro de 200Km do município de Botucatu. As amostras foram colhidas de potros com até três meses de idade, obtidas de 80 potros com diarreia e 26 potros sem sinais entéricos.

Antes da colheita das amostras, todos os animais foram submetidos ao exame clínico, no qual foram avaliados os principais parâmetros fisiológicos como temperatura retal, frequências cardíaca e respiratória, e avaliação de mucosas (RADOSTITS et al., 2007).

A diarreia foi definida naqueles animais que apresentam anormalidades na consistência, cor e odor das fezes, bem como aumento no número de episódios de defecação (RIBEIRO et al., 2000).

As fezes foram colhidas utilizando suabe estéril friccionado na mucosa retal com três a quatro movimentos. Em seguida, imediatamente o suabe foi imerso em meio de transporte Stuart, mantido em temperatura de refrigeração (4-8°C) até o laboratório, para processamento imediato. Outra amostra foi colhida por estímulo da ampola retal, utilizando luvas plásticas de procedimento, acondicionadas em frascos coletores universais, também em refrigeração, até o Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ/Botucatu, SP.

No laboratório as amostras colhidas da ampola retal foram separadas em alíquotas de aproximadamente 2mL de fezes em microtubos plásticos, e mantidas em temperatura de congelamento (-20°C). A amostra colhida do suabe foi cultivada com vistas ao isolamento de *E. coli* e *Salmonella* spp. Alíquotas de fezes foram enviadas em refrigeração para o Laboratório de

Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, para realização de isolamento do gênero *Clostridium*, identificação de espécies e detecção de toxinas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato.

4.2. Exames Microbiológicos e Detecção Molecular

4.2.1. Diagnóstico de *E. coli*

4.2.1.1. Caracterização microbiológica

Todas as amostras de fezes colhidas por suabe foram semeadas diretamente nos meios ágar sangue ovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey, mantidas em aerobiose a 37°C, por 72 horas, avaliadas a cada 24 horas, com vistas ao isolamento de *E. coli*.

Colônias sugestivas de *E. coli* foram identificadas segundo características morfo-tintoriais, bioquímicas (Citrato, EPM e Mili) e de cultivo (KRIEG e HOLT, 1994; TRABULSI, 2005), no laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP. Após a identificação fenotípica foi realizado o armazenamento das linhagens em meio de estoque Lignières, mantidas em temperatura ambiente (25°C) até o encaminhamento para o Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, com vistas a detecção dos diferentes fatores de virulência.

4.2.1.2. Detecção fenotípica de hemolisinas em *E. coli* no meio de ágar sangue

A detecção foi realizada semeando todas as amostras de material no meio de ágar sangue ovino desfibrinado (5%), mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por três dias. As linhagens que apresentaram halo de hemólise total ao redor das colônias no meio de ágar sangue, com identificação concomitante de *E. coli* no ágar MacConkey e caracterizadas bioquimicamente, foram considerados como hemolíticas.

4.2.1.3. Detecção Molecular dos Fatores de Virulência de *E. coli* - Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada no Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, com intuito de diagnóstico dos seguintes fatores de virulência dos isolados de *E. coli*: FVL2 (*sfa*, *pap*, *iuc*, *hly*, *cnf-1*), FVL8 (*sfa*, *papGII*, *hly*, *iuc*, *usp*, *cnf-1*) e O157 (*vt1*, *vt2* e *eae*), além de k88, k99, *cnf-2*, LT, ST, *fimH*, ag 43, *iuc* e *pap* (C, E) . Todas as linhagens controle de *E. coli* foram cedidas pelo Prof. Dr. Domingos da Silva Leite da UNICAMP.

O método para obtenção de DNA foi descrito por Blanco et al. (1997) e consistiu inicialmente na inoculação das linhagens em caldo cérebro coração (BHI), a 37°C, “overnight”. Após este período, as estirpes foram semeadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar), a 37°C, por 24 horas. Em seguida, duas ou três colônias típicas foram suspensas 100µL de água ultra-pura esterilizada. Estas suspensões foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 9676,8g (12.000 rpm) por 3 minutos. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para as reações de PCR.

As reações de PCR das soluções foram realizadas em termocicladores programados para pré-aquecimento a 94°C/10 minutos e 30 ciclos de 94°C/1 minuto, temperatura de anelamento de acordo com o gene pesquisado, temperatura de extensão de 72°C/2 minutos, seguida por 72°C/7 minutos. Após realizadas as amplificações dos DNAs bacterianos, foi adicionado às soluções 5µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 25% de ficoll). O gel de agarose foi preparado em concentração 2% em TAE (tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M e pH 8,0). Em cada poço do gel foram dispostos 10µL da mistura.

Em seguida foi procedida a eletroforese com 100mV por 40 minutos e amperagem variável. As bandas foram identificadas após incubação em solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL), por 15 minutos, e visualizadas em transluminador de luz UV. Os géis foram fotografados e as imagens

capturadas, respectivamente pelo sistema Image Master® VDS e programa LISCAP-Capture Application.

Os iniciadores utilizados para a detecção dos diferentes FV, peso molecular e temperatura de anelamento das reações de cada fator de virulência investigado encontram-se na tabela 1.

TABELA 1. Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de *E. coli* isoladas de fezes de potros, com e sem diarreia. Botucatu, 2012.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	TA* (C°)	Produto Amplificado (pb)	Quantidade iniciadores por reação (ng/μg)
<i>cnf1</i>	GAA CTT ATT AAG GAT AGT CAT TAT TTA TAA CGC TG	63	533	90
<i>hlyA</i>	AAC AAG GAT AAG GAC TGT TCT GGC T ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	63	1.177	60
<i>vt1</i>	AAG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G	53	364	90
<i>vt2</i>	GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA GTA TCT GCC TGA AGC GTA A	53	515	90
<i>eae</i>	GAC CCG GCA CAA HCA TAA GG CCA CCT GCA CGA ACA AGA GC	63	384	30

*TA: Temperatura de anelamento

4.2.2. Diagnóstico de *Salmonella*

4.2.2.1 Caracterização microbiológica

Para o diagnóstico o gênero *Salmonella* as amostras de fezes colhidas nos suabes foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Tetrationato (TT), e incubadas a 37°C, “overnight”. Em seguida, as amostras foram cultivadas na superfície de placas contendo ágar *Salmonella-Shigella* (SS), com incubação a 37°C por 18-24h. Colônias características do gênero *Salmonella* (de centro enegrecido no SS), foram submetidas a testes

bioquímicos: produção de indol, utilização de citrato, lisina, H₂S, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação da motilidade e produção de fenilalanina desaminase, nos meios de MILI, EPM, e Citrato (TRABULSI et al., 1999). As linhagens de *Salmonella* sp. foram submetidas ao teste de aglutinação gênero-específica em lâmina, utilizando soro polivalente comercial anti-*Salmonella* flagelar e somático, de acordo com as recomendações do fabricante¹.

As linhagens caracterizadas como gênero *Salmonella* nos testes bioquímicos, e com aglutinação positiva em lâmina, foram acondicionadas em tubos de vidro vedados com tampa de borracha, no meio de Lignières, em temperatura ambiente (25°C), em duplicata, até o processamento para a classificação dos sorotipos. No momento do envio foram repicadas para o meio ágar nutriente (POPOFF e LE MINOR, 1992). Estas linhagens foram encaminhadas em refrigeração (4-8°C) para a caracterização dos sorotipos no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, RJ.

4.2.3 Teste de sensibilidade microbiana (antibiograma)

A totalidade das linhagens de *E. coli* e de *Salmonella* spp. foram submetidas ao teste de sensibilidade microbiana – método de difusão com discos – e o “Clinical and Laboratory Standards Institute” – CLSI (CLSI, 2011), utilizando antimicrobianos indicados no tratamento da diarreia por estas enterobactérias em potros (RADOSTITS et al., 2007), e/ou disponíveis comercialmente para uso na rotina veterinária de grandes animais: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), ceftiofur (30µg), ciprofloxacino (5µg), enrofloxacino (5µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25µg) e tetraciclina (30µg).

¹ Soro polivalente anti-*Salmonella*. Probac do Brasil. Produtos Bacteriológicos do Brasil Ltda. São Paulo, SP.

Foram consideradas multi-resistentes as linhagens que apresentaram resistência simultânea a três ou mais antimicrobianos (KRUPERMAN, 1983).

4.2.4. Diagnóstico de *Clostridium*

4.2.4.1. Caracterização microbiológica

As 106 amostras de fezes foram encaminhadas refrigeradas para o Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, onde foram realizados todos os procedimentos para o diagnóstico de *Clostridium* spp.

O diagnóstico microbiológico para *C. difficile* foi baseado na cultura anaeróbica das amostras fecais em ágar sangue ovino (5%) desfibrinado, mantidas por três a cinco dias, a 37°C. Colônias sugestivas, com halo hemolítico, foram submetidas a coloração de Gram para confirmação à microscopia de bacilos Gram-positivos (QUINN et al., 1994).

4.2.4.2. Detecção molecular de toxinas de *C. difficile*

A detecção das toxinas A e/ou B de *C. difficile* foi realizada no Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, utilizando um kit comercial de ELISA² e pela cultura de células Vero (DELMÉE, 2001).

Para selecionar os esporos de *C. difficile*, volumes iguais de amostras de fezes e etanol a 96% (v/v) foram misturados, e após incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, alíquotas de 50 uL foram inoculadas em placas contendo cicloserina-cefoxitina agar frutose³, suplementada com sangue de cavalo a 7% e taurocolato de sódio 0,1%⁴. Após a incubação anaeróbica, a 37°C durante 72 horas, todas as colônias sugestivas (FEDORKO e WILLIAMS, 1997) foram submetidas a um multiplex-PCR para um gene de limpeza (*tpi*) e

² Ridascreen *Clostridium difficile* toxinas A / B, R-Biopharm, Alemanha

³ Hi-media, Mumbai, Índia

⁴ Sigma-Aldrich Co., Sto Louis, Estados Unidos da América

detecção das toxinas A (TCDA), B (*tcdB*) e genes de toxinas binárias (gene *cdtB*) [SILVA et al., 2011].

4.2.4.3. Isolamento microbiano e detecção molecular de *C. perfringens*

Para o isolamento de *C. perfringens*, no Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, foi utilizado 0,08 a 0,12g de fezes foi diluída em série utilizando fator 10 (10^{-1} a 10^{-6}). Alíquotas de 50 uL de cada diluição foram plaqueadas em ágar de sulfito polimixina sulfadiazina⁵, incubadas anaerobicamente a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, as colônias características foram submetidos a PCR (VIEIRA et al., 2008).

Foram investigados os genes que codificam a toxina beta-2 (*cpb2*), enterotoxina (*cpe*) e as principais toxinas de *C. perfringens* (alfa, beta, épsilon e iota). Ademais, PCR anterior foi realizada para a detecção do gene de codificação NetB-(*redeB*) [KEYBURN et al., 2008]. Todas as reações de PCR, e amplificações foram realizadas em termociclador⁶, e os produtos foram visualizados sob luz UV em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio⁷ (SILVA et al., 2011).

⁵ SPS, Difco Laboratories, Detroit, EUA

⁶ Thermal Cycler PX2 - Thermo Electron Corporation, Milford, EUA

⁷ Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA

5. RESULTADOS

Dentre as raças amostradas, 52 (49%) potros eram Quarto de Milha, 18 (16,9%) Puro Sangue Inglês, 13 (12,2%) Manga Larga Paulistas, 12 (11,3%) Brasileiro de Hipismo, 09 (8,4%) Paint Horse e 02 (1,8%) mestiços, provenientes de criatórios da região centro-oeste do interior do estado de São Paulo.

Foram isoladas 64 (60,3%) linhagens de *E. coli*, das quais 48 (75,0%) de animais com diarreia e 16 (25,0%) sem sinais entéricos.

Dentre os FV pesquisados nas linhagens de *E. coli*, o gene *fimH* foi detectado em 34 linhagens, o gene *ag43* em 33 estirpes e o gene *papC* em seis isolados, enquanto os demais genes pesquisados foram negativos (Quadro 1).

fimH foi detectado em 26 (40,6%) estirpes de potros com diarreia e em oito (12,5%) sem sinais entéricos. *papC* foi identificado em cinco (7,8%) linhagens de potros com diarreia e em uma (1,5%) de animal sem sinais entéricos, enquanto *ag43* foi detectada em 25 (39,0%) linhagens de potros com diarreia e em oito (12,5%) sem sinais entéricos.

Foi observada sensibilidade na detecção de *fimH* e *ag43* em 40,6% isolados de *E. coli*.

Não foi verificada associação estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os diferentes FV de *E. coli* pesquisados e a ocorrência de diarreia em potros.

QUADRO 1. Frequência de detecção de genes de diferentes fatores de colonização, toxinas e outros fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de potros, com e sem diarreia. Botucatu, SP, 2012.

Genes	Nº de linhagens Com diarreia	Nº de linhagens Sem diarreia
<i>K88</i>	0 (-)	0 (-)
<i>vt1</i>	0 (-)	0 (-)
<i>vt2</i>	0 (-)	0 (-)
<i>cnf1</i>	0 (-)	0 (-)
<i>cnf2</i>	0 (-)	0 (-)
<i>Eae</i>	0 (-)	0 (-)
<i>LTI</i>	0 (-)	0 (-)
<i>Sta</i>	0 (-)	0 (-)
<i>Eaec</i>	0 (-)	0 (-)
<i>Eiec</i>	0 (-)	0 (-)
<i>Sfa</i>	0 (-)	0 (-)
<i>Era</i>	0 (-)	0 (-)
<i>k99</i>	0 (-)	0 (-)
<i>papE</i>	0 (-)	0 (-)
<i>fim H</i>	26 (40,6%)	08 (12,5%)
<i>papC</i>	05 (7,8%)	01 (1,5%)
<i>ag43</i>	25 (39,0%)	08 (12,5%)

O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” para os isolados de *E. coli* em potros com diarreia, mostrou que as linhagens foram mais sensíveis frente a ciprofloxacino, gentamicina, amicacina e enrofloxacino. Em contraste, as linhagens isoladas de potros com diarreia apresentaram maior resistência “in vitro” frente a tetraciclina, sulfametoxazole/trimetoprim e ampicilina (Tabela 2). A ocorrência simultânea de resistência a três ou mais antimicrobianos nas linhagens de *E. coli* com diarreia foi observada em 20 (31,2%) isolados.

Nas linhagens identificadas em potros sem diarreia os isolados foram mais sensíveis “in vitro” frente a ciprofloxacino e enrofloxacino, enquanto a maior resistência dos isolados foi observada para tetraciclina, sulfametoxazole/trimetoprim e ampicilina (Tabela 2) .

TABELA 2. Sensibilidade microbiana em estirpes de *E. coli* isoladas de amostras de potros com e sem diarreia, Botucatu, 2012.

Antimicrobiano	N° de linhagens Com diarreia			N° de linhagens Sem diarreia		
	S	PS	R	S	PS	R
Amicacina	35(54,7%)	07(10,9%)	04(6,2%)	09(14,0%)	04(6,2%)	05(7,8%)
Ampicilina	16(25,1%)	12(18,7%)	18(28,2%)	07(10,9%)	05(7,8%)	06(9,3%)
Ceftiofur	25(39,2%)	13(20,3%)	08(12,5%)	07(10,9%)	08(12,5%)	03(4,6%)
Ciprofloxacino	38(59,5%)	06(9,3%)	03(4,6%)	15(23,6%)	01(1,5%)	01(1,5%)
Enrofloxacino	34(53,1%)	07(10,9%)	05(7,8%)	13(20,3%)	03(4,6%)	02(3,1%)
Florfenicol	29(45,5%)	07(10,9%)	10(15,6%)	11(17,1%)	04(6,2%)	03(4,6%)
Gentamicina	36(56,5%)	02(3,1%)	08(12,5%)	11(17,1%)	02(3,1%)	05(7,8%)
Sulfametoxazole/ Trimetoprim	23(36,0%)	03(4,6%)	21(32,9%)	11(17,1%)	-	06(9,3%)
Tetraciclina	11(17,3%)	08(12,5%)	27(42,2%)	-	09(14,0%)	09(14,0%)

* S: Sensível, PS: Parcialmente sensível, R: Resistente

N°=número

O gênero *Salmonella* foi isolado em 17 (16,0%) amostras de fezes, das quais 14 (17,5%) linhagens foram obtidas de animais com diarreia e três (11,5%) de potros sem sinais entéricos.

Foram identificados os sorotipos *S. Infantis* em seis (35,2%) isolados, *S. Typhimurium* em quatro (23,5%), *S. Saintpaul* em três (17,6%), *S. Panama* em dois (11,7%), *S. Muechen* em um (5,8%) e *Salmonella enterica subsp enterica* (O: 6, 8: e, h:-) em um (5,8%) [Tabela 3].

TABELA 3. Frequência de sorotipos em 17 linhagens de *Salmonella* spp. identificados em potro, com e sem diarreia, com até três meses de idade. Botucatu, SP, 2012.

Sorotipo	Com diarreia	Sem diarreia
	nº isolados (%)	Nº isolados (%)
<i>S. Infantis</i>	5 (29,6%)	1 (5,8%)
<i>S. Typhimurium</i>	3 (17,8%)	1 (5,8%)
<i>S. Saintpaul</i>	2 (11,8%)	1 (5,8%)
<i>S. Panama</i>	2 (11,8%)	-
<i>S. Muenchen</i>	1 (5,8%)	-
<i>S. enterica subsp. enterica</i>	1 (5,8%)	-

* nº= número

O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” para as 17 linhagens de *Salmonella* spp. isoladas dos potros com diarreia mostrou que os isolados foram mais sensíveis frente à cirprofloxacina, sulfametoxazole/trimetoprim e gentamicina. Em contraste, a maior resistência destes isolados foi observada frente à tetraciclina, gentamicina, ampicilina e enrofloxacin (Tabela 4).

TABELA 4. Sensibilidade microbiana em estirpes de *Salmonella* sp. isoladas de amostras de potros com e sem diarreia, Botucatu, 2012.

Antimicrobiano	N° de linhagens Com diarreia			N° de linhagens Sem diarreia		
	S	PS	R	S	PS	R
Amicacina	09(52,9%)	04(23,5%)	01(5,9%)	01(5,9%)	01(5,9%)	01(5,9%)
Ampicilina	12(70,6%)	-	02(11,7%)	02(11,7%)	-	01(5,9%)
Ceftiofur	09(52,9%)	04(23,5%)	01(5,9%)	01(5,9%)	01(5,9%)	01(5,9%)
Ciprofloxacino	14(82,3%)	-	-	03(17,7%)	-	-
Enrofloxacino	12(70,6%)	-	02(11,7%)	03(17,7%)	-	-
Florfenicol	13(76,5%)	-	01(5,9%)	02(11,7%)	-	01(5,9%)
Gentamicina	12(70,6%)	-	02(11,7%)	02(11,7%)	-	01(5,9%)
Sulfametoxazole/ Trimetoprim	14(82,3%)	-	-	03(17,7%)	-	-
Tetraciclina	09(53,0%)	03(17,7%)	02(11,7%)	02(11,7%)	-	01(5,9%)

*S: Sensível, PS: Parcialmente sensível, R: Resistente

N° = Número

T= Total

Da totalidade de amostras de fezes foram isoladas 20 (18,8%) linhagens de *C. perfringens*, das quais em 17 linhagens foi detectada a toxina A e em três a toxina beta-2. Dos isolamentos de *C. perfringens* 15 (75,0%) foram obtidos de potros com diarreia e cinco (25,5%) em animais sem sinais entéricos. Foram isoladas somente duas linhagens de *C. difficile*, uma em um potro com diarreia e outra em potro sem sinais entéricos, ambas produtoras de toxina A .

A Tabela 5 demonstra a distribuição de *E. coli*, *Salmonella* spp., *C. perfringens* e *C. difficile*, isolados em associação, em potros com e sem diarreia até os três meses de idade.

TABELA 5. Identificação de enteropatógenos de origem bacteriana, isolados ou em associação, em 106 amostras de fezes de potros, com e sem diarreia, até três meses, provenientes do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2012.

Enteropatógenos	Com diarreia	Sem diarreia	T
	Nº(%)	Nº (%)	
<i>Escherichia coli</i>	48	16	64
<i>Salmonella</i> spp.	14	03	17
<i>Clostridium perfringens</i>	15	05	16
<i>Clostridium difficile</i>	01	01	02
<i>E. coli</i> + <i>Salmonella</i> spp.	05	03	08
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i>	05	03	08
<i>E. coli</i> + <i>Salmonella</i> spp. + <i>C. perfringens</i>	02	-	02
<i>E. coli</i> + <i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	01	01	02

* N°= número

T= total

Não foi observada associação estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre a presença isolada ou associada dos diferentes enteropatógeno e a ocorrência de diarreia nos potros.

6. DISCUSSÃO

As diarreias de origem bacteriana em potros são reconhecidamente uma das causas mais impactantes de morbimortalidade em animais até um ano de idade, em todo o mundo. Os estudos sobre a etiologia das diarreias bacterianas em potros são escassos e geralmente estão restritos a um enteropatógeno (HOLLAND et al., 1989, 1996; RADOSTITS et al., 2012), a descrição de relatos de caso, notadamente no Brasil (SILVA et al., 2012).

Dentre os agentes causais bacterianos, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. figuram dentre os mais frequentes e patogênicos para potros (QUINN et al., 1994, 2005).

Nos potros amostrados, *E. coli* foi isolada de 64 (60,3%) amostras de fezes, das quais 48 (75,0%) de animais com diarreia e 16 (25,0%) sem sinais entéricos. Em estudo similar, Holland et al. (1989) isolaram 61 (61,6%) estirpes de *E. coli* de potros com diarreia e 38 (38,4%) em animais sem sinais entéricos, e sugeriram que o micro-organismo está relacionado a ocorrência de diarreia em potros até um ano de idade. Em estudo subsequente, o mesmo grupo de pesquisadores evidenciou a fímbria K99 em duas estirpes de *E. coli* isoladas de potros e a fímbria K88 expressa em uma estirpe de *E. coli* (HOLLAND et al., 1996). No presente estudo em nenhuma linhagem foram detectadas as fímbrias F4 (k88) e F5 (k99), classicamente envolvidas na diarreia em animais de produção, respectivamente em bezerros e leitões (RADOSTITS et al., 2007). A ausência das fímbrias F4 e F5, bem como das enterotoxinas STa e LT1 nas linhagens isoladas dos potros no presente estudo, indica provável baixa influência destes fatores de colonização e enterotoxinas nesta faixa etária, ou mesmo que outras fímbrias e toxinas não pesquisadas possam estar envolvidas na aderência e virulência de *E. coli* nos potros.

De maneira similar, não houve detecção de citotoxinas como as verotoxinas (VT1, VT2) e necrotoxinas (CNF1, CNF2), bem como do gene *eae* (intimina) nas estirpes de *E. coli* isoladas nos potros amostrados. A ausência de linhagens verotoxigênicas e necrotoxigênicas usualmente relacionadas a

ocorrência de diarreia e infecções do trato geniturinário em humanos (GYLES, 1992), denota pouco risco em Saúde Pública das linhagens de *E. coli* identificadas, e a baixa influência destas citotoxinas na gênese da diarreia em potros até os três meses de idade.

Foi observada alta ocorrência e similaridade na detecção do gene *fimH* e *ag43* nas linhagens de *E. coli* isoladas dos potros no presente estudo, notadamente em animais com enterite. Linhagens detentoras de *fimH* estão associadas a ocorrência de infecções urinárias em humanos e animais, em virtude da presença de receptores para estas fímbrias no epitélio da vesícula urinária (GYLES, 1992). Apesar da ausência de relação direta de *fimH* na ocorrência de diarreia nos potros estudados, a descrição desta fímbria simultaneamente em isolados obtidos das fezes e de infecções urinárias em outras espécies animais (SIQUEIRA et al., 2009), indica potencial uropatogênico das linhagens entéricas de potros.

Dentre a literatura consultada não foi possível identificar estudos com a detecção do gene *ag43* em *E. coli* isoladas de potros com diarreia. O gene *ag43* tem sido motivo de investigações recentes e parece estar relacionado em humanos a linhagens uropatogênicas, em infecções urinárias recorrentes, bem como a estirpes produtoras de biofilme (LÜTHJE e BRAUNER, 2010). A detecção simultânea destes FV em linhagens de *E. coli* pode sugerir a presença destes fatores em mesma “ilha de patogenicidade”. A ausência de outros estudos de detecção de *ag43* em isolados de potros limita a comparação dos achados do presente estudo, embora a detecção de *ag43* nos isolados pode sugerir provável participação na ocorrência de diarreia, em virtude da influência de *ag43* na produção de biofilme considerado importante FV em linhagens patogênicas de *E. coli*.

O gene *papC* foi detectado somente em seis linhagens de *E. coli* no presente estudo. A fímbria P é uma adesina intimamente relacionada às infecções do trato urinário inferior, de maneira similar à *fimH*. Ademais, o gene *papC* auxilia na translocação de pili para o exterior da membrana celular

(BRAGA et al., 1984). A detecção reduzida de fímbria P nos isolados de *E. coli*, do presente estudo, indica pouca participação deste fator de colonização na ocorrência de diarreia em potros, na faixa etária estudada, a despeito do potencial uropatogênico destas linhagens.

As linhagens de *E. coli* isoladas no presente estudo em potros com diarreia mostraram maior sensibilidade “in vitro” frente a ciprofloxacino, gentamicina, amicacina e enrofloxacino, indicando que estes fármacos do grupo das fluorquinolonas e aminoglicosídeos podem ser utilizados como antimicrobianos de escolha no tratamento da colibacilose em potros até três meses de idade.

A resistência aos antimicrobianos é reconhecida como problema tanto na medicina humana como veterinária. Os principais mecanismos de resistência são regulados por genes específicos, resultando em inativação ou modificação enzimática dos antimicrobianos, impermeabilidade da parede ou membrana bacteriana, expulsão ativa do fármaco por bomba de efluxo e alteração dos receptores alvo. As bactérias adquirem genes de resistência aos antimicrobianos por plasmídeos, transposons e integrons, que resultam em mutações nos genes responsáveis pelos sítios de ligação com os fármacos ou na ativação de regiões do cromossomo bacteriano. Adquiridos estes genes de resistência, podem ser transferidos entre bactérias. A habilidade de *E. coli* na transferência de resistência aos antimicrobianos é motivo de preocupação pelos profissionais de saúde (GEORGE, 1996; MATEU e MARTIN, 2001; MIRIAGOU et al., 2006; POLETO e REIS, 2005; SAYAH et al., 2005).

A ocorrência simultânea de resistência de estirpes de *E. coli* a três ou mais antimicrobianos nas linhagens com diarreia do presente estudo foi observada em 20 (31,2%) isolados, de maneira superior ao identificado por Holland et al. (1996), que observaram resistência múltipla aos antimicrobianos em 18% dentre 99 estirpes isoladas de potros, das quais 11 (18%) isoladas de potros com diarreia e de 7 de 38 (18%) isolados oriundos de potros saudáveis.

No presente estudo, as linhagens de *E. coli* isoladas dos animais com diarreia mostraram maior resistência para a tetraciclina e sulfametoxazole/trimetoprim. Tal resultado pode encontrar justificativa no uso intensivo destes fármacos nas últimas décadas em animais de produção, incluindo equinos, fato que poderia aumentar a pressão seletiva para isolados resistentes (TRABULSI et al., 1999; RADOSTITS et al., 2007).

A ocorrência de linhagens multirresistentes de *E. coli* nos potros amostrados, reforça a importância da instituição do tratamento de casos de enterite com respaldo em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”.

Estudo de detecção de sorotipos de *Salmonella* em potros do estado de São Paulo realizado por Ribeiro et al. (2010) com nove linhagens isoladas de *Salmonella* spp., identificou duas (22,2%) linhagens de *Salmonella* Typhimurium, uma (11,1%) *Salmonella* Saintpaul, três (33,3%) *Salmonella* Newport, uma (11,1%) *Salmonella* enterica subsp. enterica 4,5,12i, e duas (22,2%) *Salmonella* Glostrup. Em contraste, no presente estudo foram identificados 17 amostras positivas para *Salmonella* spp. com predomínio do sorotipo *S. Infantis* em seis (35,2%) isolados e *S. Typhimurium* em quatro (23,5%), seguido de três (17,6%) estirpes *S. Saintpaul*, duas (11,7%) *S. Panama*, uma (5,8%) *S. Muenchen* e uma (5,8%) *Salmonella enterica subsp enterica* (O: 6, 8: e, h:-). Dos sorotipos identificados nos estudos supracitados certa similaridade entre a ocorrência de *S. Typhimurium* enquanto para *S. Saintpaul* houve maior percentual no presente estudo. Hofer et al. (2000) realizaram estudo em equinos de abatedouro durante três anos e identificaram 38 (7,3%) isolados do sorotipo *S. Typhimurium*, 13 (2,4%) *S. Infantis*, 78 (14,7%) *S. Panama*, 11 (2,0%) *S. Saintpaul* e 04 (0,5%) *S. Muenchen*.

Segundo Mc Donough et al. (1999) *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são os sorotipos predominantes na salmonelose em humanos, seguidos por *S. Hadar*, *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Newport*, considerados patógenos importantes na ocorrência de infecções e toxinfecções alimentares em humanos. Neste contexto Nosedá et al. (2002)

investigando amostras de fezes humanas, identificaram predomínio do sorotipo *S. enteritidis* (70%), seguido de *S. Typhimurium* (11%), *S. Infantis* (4%) e *S. Agona* (4%).

Os sorotipos *Infantis* e *Muenchen* não são usualmente identificados em equinos. O sorotipo *Infantis* comumente é identificado em aves e humanos, enquanto o sorotipo *Muenchen* predomina em humanos (VERONESI, 2005). A identificação de *Salmonella* spp. em vários dos potros estudados, com predomínio em animais com enterite, reafirma a importância desta enterobactéria nos distúrbios entéricos em potros. Ademais, a presença de sorotipos nos potros amostrados, também são identificados na salmonelose em humanos, particularmente *S. Infantis*, *S. Typhimurium* e *S. Muenchen*, o que alerta para os reflexos em Saúde Pública, com o controle de humanos em relação a material fecal de potros.

No presente estudo, as linhagens de *Salmonella* spp. mostraram maior sensibilidade “in vitro” frente a ciprofloxacino, sulfametoxazole/trimetoprim, florfenicol, enrofloxacino e gentamicina. Ribeiro et al. (2010) encontraram padrão similar de sensibilidade em potros. Estes achados indicam que estes fármacos podem ser utilizados como de escolha no tratamento da salmonelose entérica em potros na faixa etária estudada.

A multirresistência de *Salmonella* sp. aos antimicrobianos tem sido extensivamente discutida também nos últimos anos em medicina humana e veterinária. Muitos dos genes de resistência bacteriana conhecidos atualmente estão localizados em elementos genéticos móveis, passíveis de troca entre bactérias que compartilham o mesmo habitat. Neste contexto, o gênero *Salmonella* desempenha importante função tanto como receptora quanto como doadora de genes de resistência aos antimicrobianos, facilitando a disseminação de tais genes. Assim como em outras bactérias, os plasmídeos são descritos como os principais mecanismos de aquisição de genes de resistência no gênero *Salmonella* (MICHAEL et al., 2006).

Dados da Organização Mundial de Saúde - WHO (2005) ilustraram a emergência da associação entre uso indevido de antimicrobianos e a resistência bacteriana. Segundo a WHO (2005), quando as fluorquinolonas foram inicialmente licenciadas para uso em humanos, não se observou aumento significativo de resistência nas linhagens de *Salmonella*. Em contrapartida, quando este fármaco foi posteriormente licenciado para uso em animais de produção, surgiram relatos de linhagens multirresistentes de *Salmonella* à fluorquinolona em animais e em humanos.

No presente estudo, o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” das 17 linhagens *Salmonella* spp. mostrou que os isolados foram mais resistentes a tetraciclina, gentamicina e ampicilina. Em contraste, Nosedá et al. (2002) encontraram maior resistência dos isolados de *Salmonella* sp. para ciprofloxacino e sulfametoxazole/trimetoprim. A semelhança do relatado para as linhagens foram de *E. coli* no presente estudo, a ocorrência de resistência múltipla evidenciada nos isolados de *Salmonella* spp., reafirma a necessidade da instituição do tratamento da salmonelose entérica em potros com base em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”, bem como para o uso racional destes fármacos em equinos.

C. perfringens foi isolado de 20 (18,8%) amostras fecais, das quais em 17 linhagens foi detectada a toxina A e em três a toxina beta-2. Dos isolados de *C. perfringens*, 15 (75,0%) foram obtidos de potros com diarreia e cinco (25,0%) em animais sem sinais clínicos. O predomínio de *C. perfringens* produtores principalmente de toxina A nos potros com diarreia reforça a patogenicidade de linhagens toxigênicas desta espécie de clostrídio em potros com diarreia (WEESE et al., 2001; RADOSTITS et al., 2007). No entanto, a escassez de estudos envolvendo a detecção de clostrídios toxigênicos em potros, visto que as investigações estão restritas principalmente a relatos de casos (SILVA et al., 2012), limitam confrontar os achados do presente estudo com a literatura nacional relativa ao assunto.

Apenas um animal foi positivo para *C. difficile* produtor de toxinas A/B, na qual também foi isolado *C. perfringens*, sugerindo que pode ocorrer associação entre estas duas espécies de clostrídios em potros, fato também observado por Weese et al. (2001).

No presente estudo foi detectada toxina A/B de *C. difficile* foi identificada em uma amostra de potro sem sinais entéricos. Este achado também foi relatado por outros autores em estudos com equinos (SILVA et al., 2011), em cães (CLOOTEN et al., 2008) e em leitões (KEESSEN et al., 2011).

Frederick et al. (2009) nos Estados Unidos da América, também relataram baixo isolamento de *C. difficile* na fezes de potros. Em contraste, Weese et al. (2001) no Canadá identificaram esta espécie de clostrídio em 16,7% dos isolados. Estes achados podem encontrar justificativa nas diferenças de sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas no diagnóstico da bactéria (MEDINA et al., 2011).

Os achados do presente estudo permitem inferir a complexidade etiológica de origem bacteriana na enterite em potros até três meses a baixa relação dos fatores de virulência de *E. coli* pesquisados com a ocorrência de diarreia, a relevância em Saúde Pública dos sorotipos de *Salmonella* identificados nas fezes de animais, com e sem diarreia, com ênfase na presença de *S. Infantis* e *S. Typhimurium*. Foi observado também o predomínio de linhagens de *C. perfringens* produtores de toxina A nos potros com diarreia, e a necessidade do tratamento das enterite bacterianas em potros com base em testes de sensibilidade “in vitro”, em virtude da ocorrência de linhagens multirresistentes aos antimicrobianos.

A possibilidade de estudos de ocorrência dos principais enteropatógenos de potros, de forma simultânea e em vários animais, fundamentados em técnicas moleculares para o diagnóstico das espécies e dos fatores de virulência, para fornecer subsídios para as ações necessárias ao controle e a profilaxia destes enteropatógenos na criação de potros.

7. CONCLUSÃO

O isolamento de grande número de linhagens de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* nos potros com diarreia reforça para a complexidade etiológica nas enterites em potros;

O isolamento de *Salmonella* spp. em 14/80 (17,5%) amostras de fezes de potros com diarreia reafirma a participação deste enteropatógeno na enterite em potros;

A identificação dos sorotipos *S. Infantis* e *S. Typhimurium* nos isolados do gênero *Salmonella*, frequentemente observados em afecções gastroentéricas em humanos, ressalta para os riscos em Saúde Pública do contato com material fecal de potros até três meses de idade, na região centro-oeste de São Paulo;

A identificação de *C. perfringens* com predominância de produção de toxina A em 15/80 (18,5%) dos potros com diarreia, denota a importância de isolados toxigênicos desta espécie de *Clostridium* nos potros até três meses de idade, na região centro-oeste do estado de São Paulo;

O isolamento de somente duas linhagens de *C. difficile* nos potros revela o baixo envolvimento desta espécie de *Clostridium* na ocorrência de diarreia na faixa etária estudada;

A baixa frequência de detecção dos fatores de colonização (F4, F5, fímbria P, fímbria S, adesinas Dr) enterotoxinas (Sta, LT1), e do mecanismo de captação de ferro (aerobactina), indica a baixa relação entre estes fatores de virulência pesquisados e a ocorrência de diarreia em potros até três meses de idade;

A ausência de detecção de citotoxinas, como as verotoxinas (VT1, VT2) e necrotoxinas (CNF1, CNF2), bem como do gene *eae* (intimina) nas estirpes de *E. coli*, sinaliza para o reduzido envolvimento destes fatores de virulência na

diarreia em potros, até três meses, e o baixo risco em Saúde Pública da presença deste enteropatógeno nas fezes de potros nesta faixa etária;

A similaridade de ocorrência entre *fmH* e *ag43* nos isolados de *E. coli* com diarreia, indica que estes fatores de virulência podem estar relacionados com a patogenicidade do micro-organismo em potros com sinais entéricos, visto que estes mecanismos de virulência estão relacionados a formação de biofilme bacteriano;

A alta sensibilidade “in vitro” das linhagens de *E. coli* obtidas dos potros com diarreia frente a ciprofloxacino, gentamicina e amicacina, e dos isolados de *Salmonella* spp. para sulfa/trimetoprim, ciprofloxacino e florfenicol, sinaliza que estes fármacos podem ser indicados no tratamento da enterite em potros para estas enterobactérias;

A alta ocorrência de resistência múltipla dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp., particularmente frente as tetraciclinas e ampicilina, reforça para a necessidade da instituição do tratamento de potros com diarreia com respaldo em testes de sensibilidade “in vitro”, e do uso racional de antimicrobianos na clínica de equinos.

8. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud. p.398, 2001.

Al-MAJALI, A.M.; ABABNEH, M.M.; SHORMAN, M.; SAEED, A.E. Interaction of *Escherichia coli* heat - stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn kids. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.49, p.35 – 40, 2007.

ANDREU, A.; STAPLETON, A.E.; FENNEL, C.; LOCKMAN, H.A.; XERCAVINS, M.; FERNANDEZ, F.; STAMM, W.E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. **J. Infect. Dis.**, v.176, p.464-469, 1997.

BAGA, M.; NORMARK, S.; HARDY, J.; O'HANLEY, P.; LARK, D.; OLSSON, O.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW, S. **J. Bacteriol.**, v.157, p.330-333, 1984.

BAVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; ASPÁN, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. **Equine Vet J.** v.35, p.465-471, 2003.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; RODRIGUEZ, E.; ABALIA, I.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reactor (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. **J. Microbiol. Methods**, v. 31, n. 1/2 p. 37- 43, 1997.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1) from *Escherichia coli*. **Toxicon**, v.39, n.11, p.1673-1680, 2001.

BRASIL 2008. Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária. Equídeos no Brasil. 2008. Disponível em: <www.cna.org.br/site/noticia> Acesso: 19 nov. 2008.

BRAUN, V.; KILLMANN, H. Bacterial solutions to the iron supply problem. **TIBS**, v.24, p.104-109, 1999.

BUESCHEL, D.; WALKER, R.; WOODS, L.; KOKAI-KUN, J.; McCLANE, B.; SONGER, J.G. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. **J Am Vet Med Assoc.**, 1998 v.213, n.9, p.1305-1307, 1998.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica de Jawtz , Melnick e Adelberg**. 25 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 813p.

COHEN, N.D.; WOODS, A.M. Characteristics and risk factors for failure of horses with acute diarrhea to survive: 122 cases (1990–1996). **J Am Vet Med Assoc.**, v.214, p.382–390, 1999.

CLOOTEN, J.; KRUTH, S.; ARROYO, L.; WEESE, J.S. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. **Vet Microbiol.**, v.129, p.209-14, 2008.

CLSI - Performance standards for Antimicrobial Suceptibility Test. Twenty-first Information Supplement v.31, n.1, January, 2011

DANTAS, L.O. **Marcadores genéticos de virulência de *Escherichia coli* diarreogênicas em cães com e sem diarreia: importância em saúde pública**. 2002. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **Clin Microbiol Infec.**, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

DUIJKEREN, E. V.; KLINGEREN, B. V.; VULTO, A. G. et al. In vitro susceptibility to antimicrobial drugs of 62 *Salmonella* strains isolated from horses in the netherlands. **Veterinary Microbiology**,v. 45, n. 1, p. 19-26, 1995.

DUIJKEREN, E. V.; WANNET, W. J. B.; PELT, W. V. et al. Sero types, phage types and antibiotic susceptibilities of salmonella strains isolated from horses in the Netherlands from 1993 to 2000. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 203-212, 2002.

EMÖDY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, p.29-33, 2003.

FAIRBROTHER, J. M. and NGELEKA, M.. Extraintestinal *Escherichia coli* infections in pigs. In *Escherichia coli in domestic animals and humans*. C. L. Gyles (ed.). Wallingford, Oxon : CAB International, p. 221 – 236, 1994.

FARALDO GOMÉZ, J. e ROUX, B., Electrostatics of Ion Stabilization in a CIC Chloride Channel Homologue from *Escherichia coli*. **J.of Mol. Bio.**, V. 339, Issue 4, 11 June 2004, p. 981-1000

FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and Lproline-aminopeptidase (PRO Discs) in therapid identification of *Clostridium difficile*. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.5, p.1258-1259, 1997.

FERNANDES, W.R.; COELHO, C.S.; MARQUES, M.S.; BACCARIN, R.Y.A.; SILVA, L.C.C. Revisão de 26 casos clínicos de duodenite-jejunité proximal em equinos (1996-2000). **Ciência Rural**, v. 33, n.1, p. 97-102, 2003.

FREDERICK, J.; GIGUÈRES, S.; SANCHEZ, L.C. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008). **J.Vet Intern Med.**, v.23, p.1254-60, 2009.

FURR, M., COHEN, N.D., AXON, J.E., SANCHEZ, L.C., PANTALEON, L., HAGGETT, E., CAMPBELL, R., TENNENT-BROWN, B. Treatment with histamine-type 2 receptor antagonists and omeprazole increase the risk of diarrhoea in neonatal foals treated in intensive care units. **Equine Vet J.** 41, 80-6, 2012.

GAATRA, W. e de CRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbial. Rev.**, 46: 129-161, 1982.

GARCIA, M.I.; LE BOUGUÉNEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrheogenic *Escherichia coli*. **Bull. Inst. Pasteur**, v.94, p.201-236, 1996.

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Canada: Saunders/Elsevier, 2006. 1387p.

GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.734-746, 1992.

GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4ed. Estados Unidos: Wiley-Blackwell, 2010. p.643.

HAZLETT, M.J.; KIRCANSKI, J.; SLAVIC, D.; PRESCOTT, J.F. Beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* type A colitis in a three-day-old foal. **J Vet Diagn Invest.**, v. 23, p.373-376, 2011.

HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GIBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. **J Clin Microbiol.**, v.37, p.358-361, 1999.

HOFER, E.; ZAMORA, M.R.N.; LOPES, A.M.; MOURA, A.M.C.; ARAÚJO, H.L.; LEITE, J.D.D.; LEITE, M.D.D.; FILHO, S.J.S. Sorovares de Salmonella em carne de equídeos abatidos no Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.20, p.80-84, 2000.

HOLLAND R.E.; SRIANGANATHAN, N.; DuPONT L. Isolation of enterotoxigenic *Escherichia coli* from a foal with diarrhea. **J Am Vet Med Assoc.**, v.194, p.389-301, 1989.

HOLLAND R.E.; SCHMIDT, A.; SRIANGANATHAN, N.; GRIMES, S.D. Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. **Vet Microbiol.**, v.48, p.243-255, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Número de equídeos no Brasil. Disponível: www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 25 nov. 2008.

JHUNG, M.A.; THOMPSON, A.D.; KILLGORE, G.E.; ZUKOWSKI, W.E., SONGER, G., WARNY, M., JOHNSON, S., GERDING, D.N., McDONALD, L.C., LIMBAGO, B.M. (2008) Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. **Emerg Infect Dis.** 14, 1039-45.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

JONES, S. L.; SPIER, S. J. Enfermidades inflamatórias do intestino grosso que causam diarreia. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina interna eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.p. 570-586.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev.**, v.2, p.123-140, 2004.

KEESEN, E.C.; HOPMAN, N.E.; van LEENGOED, L.A.; van ASTEN, A.J.; HERMANUS, C.; KUIJPER, E.J.; LIPMAN, L.J. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. **J Clin Microbiol.**, v.49, p.1816-1821, 2011.

KEYBURN, A.L.; BANNAM, T.L.; MOORE, R.J.; ROOD, J.I. NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of *Clostridium perfringens*. **Toxins.** 2, p.1913-27, 2010.

KRUPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *E. coli* to identify high-risk, sources of fecal aontamination of foods. **Applied Envirommental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-167, 1983.

LESTER, G.D. Foal diarrhea. In: Robinson NE, editor. **Current therapy in equine medicine**. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders; 2003. p. 677–80.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Ag43 Promotes Persistence of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in the Urinary Tract. **J Clin Microbiol.**, v.48, n.6, p. 2316-2317, 2010.

MAGDESIAN, K.G.; Neonatal Foal Diarrhea. **Vet Clin Equine**. v. 21,p. 295–312, 2005.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well. **J. Vet. Med.**, v.48, p.569-581, 2001.

MEDINA-TORRES, C.E.; WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. **Vet Microbiol.**, v.152, p.212-215, 2001.

MELO, U.P.; FERREIRA, C.; PALHARES, M.S. DOENÇAS GASTROINTESTINAIS EM POTROS: ETIOLOGIA E TRATAMENTO. **Ciência Animal Brasileira.**, v. 8, n. 4, p. 733-744, 2007.

McDONOUGH, P.L.; FAGELMAN, D.; SHIN, S.J.; BRUNNER, M.A.; LEIN, D.H. Salmonella enteric serotype Dublin infection: an Emerging Infectious Disease for the Northeastern United States. **J Clin Microbiol.**, v.37, n.8, p.2418-2427, 1999.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infect.**, n.8, p.1898-1914, 2006.

MIRIAGOU, V.; CARATTOLI, A.; FANNING, S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. **Microbes and Infection** WHO – WORLD HEALTHY ORGANIZATION. Drug-resistant *Salmonella*. **Fact sheet** [online], n.139, 2005.

MOURA, C. **Caracterização de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia: pesquisa de fatores de colonização e toxinas.** 2005. 64p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MULVEY, M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cel. Microbiol.**, v.4, n.5, p.257-271, 2002.

MULVEY, M.A.; LOPEZ-BOADO, Y.S.; WILSON, C.L.; ROTH, R.; PARKS, W.; HEUSER, J.; HULTGREN S.J.; Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**. v.282, p.1494-1497, 1998.

NATARO, J.P. E KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology**. vol. 11, no. 1. p.142-201, 1998.

NORMAN, K.N.; SCOTT, H.M.; HARVEY, R.B.; NORBY, B.; HUME, M.E.; ANDREWS, K. Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. **Appl Environ Microbiol**. 77, 5755-60, 2011.

NOSEDA, R.P.; BIGALLI, M.C.; ANDRICH, M.G.; CORDEVIOLA, J.M.; BARDÓN, MARTINEZ, A.H.; COMBESSIES, G.M. Aislamiento de *Salmonella* en muestras clínicas humanas, animales y alimentos durante 1988-2001. **Vet. Arg.** 2002.

ORSKOV, C.; SVANBORG, E.; ORSKOV, F. Aerobactin production of serotyped *Escherichia coli* from UTI. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.177, p.9-14, 1988.

POHL, P.; OSWALD, E.; VAN MUYLEM, K.; JACQUMIN, E.; LINTERMANS, P.; MAINIL, J. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. **Vet. Res.** 24, p. 311-315, 1993.

POLETO, K.Q.; REIS, C. Susceptibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, Go. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, n.5, p.416-420, 2005.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. **Centre Collaborateur OMS de référence et de recherches pour les Salmonella**, 1992. p.145.

QUINN. P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.M.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, p.648, 1994

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: ARTMED, 2005, 79p.

RADOSTITIS, O.M; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9.ed. London: W.B. Saunders, 2000. 1880p

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicina: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.2162.

REINGOLD, J.; STARR, N.; MAURER, J.; D LEE, M. Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. **Vet. Micro.** v. 66, n. 2, p.125–134, 1999.

RIBEIRO, M.G.; LANGONI; H., JEREZ; J.A.; LEITE, D.S.; FERREIRA, F.; GENNARI,S.M. Identificação de enteropatógenos em bezerros búfalos, com e sem diarreia, do vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37, n.2, p. 159-165 – 2000.

RIBEIRO, M.G. **Fatores de virulência em linhagens de E.coli isoladas de mastite bovina clínica e sub-clínica**. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicada as Zoonoses e Medicina Veterinária Preventiva e Saúde

Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001

RIBEIRO, M.G.; FERNANDES, M.C.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K.; PINTO, J.P.A.N.; BORGES, A.S. Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 30, n.2, p. 155-160, 2010.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ; M C. Doenças de ruminantes e eqüinos; In: Maria del Carmen Méndez; Franklin Riet-Correa; Ana Lucia Schild; Ricardo A.A. Lemos; 2ª Ed.; São Paulo-SP: Varela editora e livraria Ltda, 2001.

SAYAH, R.S.; KANEENE, J.B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human septage and surface water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.7, n.8, p.1394-1404, 2005.

SCHOTTE, U.; TRUYEN, U., NEUBAUER, H. Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors--a review. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.** 51, 423-6, 2004.

SILVA, R.O.S.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V.; PIRES, P.S.; MARANHÃO, R.P.A.; PALHARES, M.S.; LOBATO, F.C.F. First confirmed case of *Clostridium difficile*- associated diarrhea in foals in Brazil. **Ciência Rural.** v.42, n. 3, p.498-500, 2012.

SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JÚNIOR, E.C.C.; PIRES, P.S.; SANTOS, R.L.R.; ASSIS, R.A.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. **Ciência Rural.** v.41, p.1130-1135, 2011.

SIQUEIRA, A. K., RIBEIRO, M.G., LEITE, D. S., TIBA, M. R., MOURA, C., LOPES, M.D., PRESTES, N.C., SALERNO, T., SILVA, A.V. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Res. Vet. Sci.**, v.86, n.2, p. 206-10, 2009.

SONGER, J.G., TRINH, H.T., KILLGORE, G.E., THOMPSON, A.D., McDONALD, L.C. e LIMBAGO, B.M. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. **Emerging Infect Dis** 15, 819–821, 2009.

SPIER, S. J. Salmonellosis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 2, p. 385-397, 1993.

TIBA, M.R. **Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de Escherichia coli isoladas de cistites**. 2004. 72p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades de equinos**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2005. 573p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. p.543, 586..

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

UZAL, F.A.I; DIAB,S.S.; BLANCHARD, P.; MOORE, J.; ANTHENILL, L.; SHAHRIAR, F.; GARCIA, J.P.; Songer, J.G.; *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. **Veterinary Microbiology**. v. 156 p.395–402, 2012.

VAN der WOUDE, M. W. e HENDERSON, I. R. Regulation and function of Ag43 (Flu). **Annu Rev Microbiol** 62, 153–169, 2008.

VERONESI, R.F. **Tratado de infectologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 2167p.

VIEIRA, A.A.S., GUEDES, R.M.C., SALVARINI, F.M., SILVA, R.O.S., ASSIS, R.A., LOBATO, F.C.F. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. **Arq Instit Biol.** **75**, 513-6, 2008.

VON SYDON, A.C.M.; DEL, G. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de Escherichia coli em fezes de cães errantes.** 2005. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

WRAY, C. e WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals.** 1.ed. New York: CABI Publishing, 2000. 463p.

WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. **Equine Vet J.**, v.33, p.403-409, 2001.

YAMAMOTO, S.; TSUKAMOTO, T.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patient. **Microbiol. Immunol.**, v.39, p.401-404, 1995.

YAMAMOTO, S.; NAKANO, M.; TERA, A.; YURI, K.; NAKATA, K.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H.; OGAWA, O. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. **J. Urol.**, v.165, p.1347-1350, 2001.

YATES D.G. The antimicrobial sensitivity of bacteria isolated from 30 cases of pyometra in the bitch. **Irish Vet. J.**, v.49, n.12, p.709-710, 1996.

TRABALHO CIENTÍFICO



Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *C. perfringens* from foals

Journal:	<i>Equine Veterinary Journal</i>
Manuscript ID:	EVJ-GA-12-257
Wiley - Manuscript type:	General Article
Discipline:	Infectious diseases, Microbiology
Body System/Disorder:	Not applicable
Abstract:	The objective of this study was to detect A/B toxins and to isolate <i>Clostridium difficile</i> and <i>C. perfringens</i> in stool samples from diarrheic and non-diarrheic foals. A total of 153 samples from foals were collected: 139 samples from farms (63 from diarrheic and 76 from non-diarrheic foals) and 14 samples from diarrheic foals admitted to a veterinary hospital. A/B toxins were detected by cytotoxicity assay in Vero cells. All suspected colonies of <i>C. perfringens</i> were subjected to PCR for detection of the major toxin genes (alpha, epsilon, beta and iota) and for detection of beta-2-, NetB- and enterotoxin-encoding genes. Furthermore, seven <i>C. difficile</i> and 29 <i>C. perfringens</i> isolates were evaluated for in vitro antimicrobial susceptibility by the agar dilution method. For <i>C. difficile</i> A/B toxin detection, seven out of 153 (4.6%) samples, all from diarrheic foals, were positive. Of these, five out of 14 (35.7%) were from hospitalized foals, and only two out of 63 (3.2%) diarrheic foal samples were from visited farms, which was a significant difference. Four animals positive for A/B toxin were negative for <i>C. difficile</i> isolation, whereas a toxigenic strain was isolated from a diarrheic foal that was negative by cytotoxicity assay. <i>C. perfringens</i> was isolated from 31 (20.3%) foals, of which 21 out of 76 (27.6%) were diarrheic and ten out of 76 (13.1%) were from non-diarrheic animals, demonstrating a difference between these two groups. Only four strains were positive for the beta-2-encoding gene (cpb2). The NetB-encoding gene (netb) and the enterotoxin-encoding gene (cpe) were not detected. All <i>C. difficile</i> and <i>C. perfringens</i> isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin. <i>C. difficile</i> isolates were also susceptible to oxytetracycline and florfenicol, while resistance was observed for penicillin, erythromycin and tylosin. <i>C. perfringens</i> strains were susceptible to penicillin, while resistance was detected for oxytetracycline, tylosin and erythromycin.

Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *C. perfringens* from foals

Rodrigo Otávio Silveira SILVA I, Marcio Garcia RIBEIRO II, Maristela Palhares SILVEIRA I, Alexandre Secorun BORGES II, Renata de Pino Albuquerque MARANHÃO I, Marcos Xavier SILVA I, Thays Mizuki LUCAS II, Giovane OLIVO II, Francisco Carlos Faria LOBATO I*

I. Veterinary School. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Antônio Carlos Avenue, 6627. Belo Horizonte, MG – Brazil, 31.270-901. *Corresponding author: flobato@vet.ufmg.br

II. School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP – Brazil, 18618-970

ABSTRACT

The objective of this study was to detect A/B toxins and to isolate *Clostridium difficile* and *C. perfringens* in stool samples from diarrheic and non-diarrheic foals. A total of 153 samples from foals were collected: 139 samples from farms (63 from diarrheic and 76 from non-diarrheic foals) and 14 samples from diarrheic foals admitted to a veterinary hospital. A/B toxins were detected by cytotoxicity assay in Vero cells. All suspected colonies of *C. perfringens* were subjected to PCR for detection of the major toxin genes (alpha, epsilon, beta and iota) and for detection of beta-2-, NetB- and enterotoxin-encoding genes. Furthermore, seven *C. difficile* and 29 *C. perfringens* isolates were evaluated for *in vitro* antimicrobial susceptibility by the agar dilution method. For *C. difficile* A/B toxin detection, seven out of 153 (4.6%) samples, all from diarrheic foals, were positive. Of these, five out of 14 (35.7%) were from hospitalized foals, and only two out of 63 (3.2%) diarrheic foal samples were from visited farms, which was a significant difference ($p=0.002$). Four animals positive for A/B toxin were negative for *C. difficile* isolation, whereas a toxigenic strain was isolated from a diarrheic foal that was negative by cytotoxicity assay. *C. perfringens* was isolated from 31 (20.3%) foals, of which 21 out of 76 (27.6%) were diarrheic and ten out of 76 (13.1%) were from non-diarrheic animals, demonstrating a difference between these two groups ($p=0.045$). Only four strains were positive for the beta-2-encoding gene (*cpb2*). The NetB-encoding gene (*netb*) and the enterotoxin-encoding gene (*cpe*) were not detected. All *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin. *C. difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline and florfenicol, while resistance was observed for penicillin,

erythromycin and tylosin. *C. perfringens* strains were susceptible to penicillin, while resistance was detected for oxytetracycline, tylosin and erythromycin.

INTRODUCTION

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, gram-positive bacillus recognized as the pathogen responsible for most cases of antibiotic-associated diarrhea in humans [1]. In equines, *C. difficile* is responsible for colitis in adult horses [2] and diarrhea in foals, which can occur spontaneously or be associated with antibiotic use [3,4]. Moreover, recent studies also showed that isolates from humans suffering from *C. difficile* infection (CDI) are highly related, genetically, to strains isolated from animals, suggesting hypothetical zoonotic potential [5,6].

Clostridium perfringens is an anaerobic, spore-forming, gram-positive bacillus that has been associated with enteritis in adult horses and foals [7,8]. *C. perfringens* isolates are conventionally classified as one of five toxigenic types (A-E) based on the capacity to produce one or more of the four major toxins (alpha, beta, epsilon and iota). In addition to the major toxins, *C. perfringens* can produce additional virulence factors such as beta-2 toxin, which has been associated with diarrhea in horses [9], and necrotic enteritis toxin B-like (NetB), a pore-forming toxin recently described as an important virulence factor for necrotic enteritis in broiler chickens [10]. *C. perfringens* is commonly found in the enteric microbiota of healthy animals, complicating the laboratory diagnosis of infections caused by this microorganism. In addition, due to the absence of control case studies with foals, the role of beta-2, enterotoxin and NetB in this species remains unclear.

Toxin detection and screening could contribute to the knowledge of *C. difficile* and *C. perfringens* transmission patterns, risk factors and epidemiology [11]. In light of this, the objective of this study was to detect *C. difficile* A/B toxins and to identify *C. perfringens* and *C. difficile* strains in stool samples from diarrheic and non-diarrheic foals.

MATERIAL AND METHODS

Samples

A total of 153 samples from foals were collected from farms and from animals admitted to the Veterinary Hospital(VH) of “detail to be provided on acceptance”. A total of 139 samples from 17 different farms were isolated, with 63 samples from diarrheic foals and 76 samples from non-diarrheic foals. Samples from foals collected at the VH account for a total of 14 diarrheic stool samples. The samples from hospitalized animals were obtained at the time of clinical examination and were only collected from foals with a

history of diarrhea. All specimens were collected in sterile containers and were stored at -20°C until testing was performed.

Cytotoxicity assay (CTA)

The CTA for the detection of *C. difficile* A/B toxins was performed with Vero cells (Vero–ATCC CCL 81) as described earlier [12]. Briefly, fecal samples were diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (pH 7.0) and centrifuged at 3,000 x g for 5 minutes at 4°C. The resulting supernatant was filtered through a 0.22-µm pore size filter and diluted 2-fold until a dilution of 1:1024 was reached. Serial dilutions and parallel samples with *C. sordellii* antitoxin^a were added onto Vero cell monolayers. The cells were examined after 24 hours of incubation at 37°C in a 5% CO₂ incubator. A specimen was considered positive for the CTA if at least 90% of cells were rounded and, in the same dilution of the parallel sample, the effect was neutralized by antitoxin.

Isolation and PCR of C. difficile

To select *C. difficile* spores, equal volumes of stool samples and 96% ethanol (v/v) were mixed, and after incubation for 30 minutes at room temperature, aliquots of 50 µl were inoculated on plates containing cycloserine-cefoxitin fructose agar^b supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate^c. After anaerobic incubation at 37°C for 72 hours, all colonies with suggestive morphology were subjected to a previously described multiplex-PCR for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*) [11].

Isolation and PCR of C. perfringens

For isolation of *C. perfringens*, 0.08 to 0.12 g of feces were serially diluted by factors of 10, ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁶. Aliquots of 50 µl of each dilution were plated on sulfite polymyxin sulfadiazine agar^d and were anaerobically incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, characteristic colonies were subjected to previously described PCR [13] for the detection of genes encoding the beta-2 toxin (*cpb2*), enterotoxin (*cpe*) and major *C. perfringens* toxins (alpha, beta, epsilon and iota). In addition, a previously described PCR was applied for the detection of the NetB-encoding gene (*netb*) [14]. For all PCR reactions, amplifications were carried out in a thermocycler (Thermal Cycler Px2 – Thermo Electron Corporation, Milford, USA), and the products were visualized under UV light in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide^e.

Antimicrobial susceptibility

The minimal inhibitory concentration (MIC) for isolated *C. difficile* and *C. perfringens* strains was determined by the agar dilution method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [15]. The following antimicrobials were evaluated: penicillin, florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, vancomycin, metronidazole and tylosin. For each antimicrobial tested, the MIC₅₀ and MIC₉₀, i.e., the minimum concentration that inhibited growth of 50% and 90% of the strains, respectively, were calculated. *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) was used as a control strain.

Statistical analysis

Fisher's exact test was used to evaluate associations between variables. Significance was set at a p-value of <0.05 (STATA, College Station, Texas, EUA).

RESULTS

In the detection of *C. difficile* A/B toxins, seven samples, all from diarrheic foals, were positive (Table 1). Of these, five out of 14 (35.7%) were from hospitalized foals, and only two out of 63 (3.2%) diarrheic foal samples were from visited farms, demonstrating a significant difference ($p=0.002$). Two positive foals had a history of antibiotic treatment before diarrhea, and four had a spontaneous onset of the disease. There was no information about the clinical history for the remaining A/B toxin positive foal. None of the non-diarrheic foals were positive for A/B toxins by CTA.

C. difficile strains were isolated from seven animals, with five strains from diarrheic foals and two strains from non-diarrheic foals. Four out of seven strains were toxigenic (A^+B^+), while the remaining three were non-toxigenic by PCR. Four animals positive for A/B toxin were negative for *C. difficile* isolation, whereas a toxigenic strain was isolated from a diarrheic foal that was negative by CTA.

C. perfringens were isolated from 31 (20.3%) foals, for which 21 out of 76 (27.6%) were diarrheic and ten out of 76 (13.1%) were from non-diarrheic animals, indicating a difference between these two groups ($p=0.045$). Among the diarrheic foals, 20 strains were isolated from samples from farms, while one out of 14 (7.1%) was isolated from hospitalized foals. All *C. perfringens* were classified as type A, and four strains were positive for beta-2-encoding gene (*cpb2*), with three strains coming from non-diarrheic foals and one strain from a diarrheic foal. The Net-B-encoding gene (*netb*) and the enterotoxin-encoding gene (*cpe*) were not detected.

All *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin. *C. difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline and

florfenicol, while three strains were resistant to penicillin, and two were resistant to erythromycin and tylosin. *C. perfringens* strains were susceptible to penicillin (Table 2), while 3, 4 and 5 strains were resistant to oxytetracycline, florfenicol and tylosin, respectively. For erythromycin, a clearly bimodal distribution was observed, with 17 (58.6%) resistant strains, all with a MIC >256.0 µg/mL, and 12 susceptible strains, with a MIC ≤ 2.0 µg/mL.

DISCUSSION

A/B toxin detection and isolation of *Clostridium difficile*

The detection of A/B toxin in non-diarrheic foals was not observed in the present study, suggesting that subclinical CDI in foals is not an important event, in contrast with previous reports for dogs and piglets [11,16,17]. The absence of A/B toxin in non-diarrheic foals has also been previously reported [18,19], and although it is known information, a recent survey showed that clinicians and pathologists commonly request the inclusion of normal stool samples from foals for laboratory diagnosis of CDI [20]. Testing non-diarrheic foals might lead to a decrease in the positive predictive value if the test is not 100% specific, mainly when there is a low prevalence of the disease, as shown in the present report. It is also important to note that in the current study, A/B toxins were detected by CTA, which is considered the “gold standard” method. However, most laboratories report the use of commercial enzyme immunoassays for A/B toxin detection in equine stool samples, which are more rapid and economical but might have less sensitivity and specificity [20]. The results of this study and previous reports suggest that there is no justification to test the feces of non-diarrheic foals for the presence of A/B toxins.

In the diarrheic group, seven out of 77 (9.1%) foals, of which four were 5 months old, one was 3 months and two were 13 days old, were positive for A/B toxin detection. The prevalence found here is higher than the 5% reported by Frederick et al. [21] in EUA but lower than the 16.7% reported by Weese et al., [18] in Canada. It is also interesting to note the significant difference ($p=0.002$) between the positive rate in animals from farms and animals from the VH; in the foals we examined, an animal sampled in the VH had 16 times greater probability to be positive for A/B toxin than a diarrheic animal from a farm.

This higher rate found in hospitalized foals could not be interpreted as a nosocomial infection, as all samples were collected at the time of clinical examination. However, foals admitted to the VH commonly have been previously treated with antibiotics on the farm but have not responded. In fact, in this report, all positive animals from the VH were initially diagnosed by clinicians with causes of diarrhea other than *C. difficile*. Indeed, the higher rate of CDI in foals at the VH was most likely caused by a lack of

knowledge about *C. difficile*-associated diarrhea by veterinarians on the farm, leading to unsuccessful treatment and worsening of clinical signs. In addition, this report highlights the need for laboratory diagnostics that differentiate enteropathogens in foals, allowing for adequate antimicrobial therapy.

Two foals positive for A/B toxins had a history of diarrhea two days before antibiotic treatment with penicillin G for clinical suspicion of pneumonia. These cases were also the first confirmed description of *C. difficile* in foals in Brazil [4]. Among the animals examined, there was no data about antibiotic administration or clinical history for one positive foal that was sampled on a farm. However, four positive foals (three hospitalized and one from a farm) had a history of spontaneous onset of the diarrhea. Curiously, in these four cases, a worsening of clinical signs was observed after antimicrobial therapy other than metronidazole, which is considered the first choice for CDI in foals. Three foals received metronidazole after diagnosis of CDI (by toxin detection) and recovered well, although one foal that was treated with ceftiofur died. These results suggest the clinical efficacy of metronidazole for CDI in foals with *C. difficile* diarrhea [3].

Four toxigenic strains of *C. difficile* were isolated, all from diarrheic foals. Of these foals, three were positive for A/B toxins, and one, aged 1 day old, was negative. An asymptomatic carrier status must be considered for this animal, as previous reports have shown that it is a common event in foals younger than 14 days [19]. Moreover, it should be emphasized that the incidence of carrier status among the young animals examined in the present study was much lower than previously reported. From a total of 16 animals younger than 14 days old, only two (12.5%) were positive for the isolation of *C. difficile*, of which one strain was toxigenic and other was non-toxigenic. This result is similar to that previously reported in foals by Magdesian et al. [22], but it is lower than the 30% carrier rate found by Baverud et al. [19] at this age. Another possible explanation for the presence of a toxigenic strain in a CTA-negative foal is toxin degradation by proteases found in feces [16], but this hypothesis must be considered with caution because studies have shown great stability of the A/B toxins in equine feces [19,23]. Three non-toxigenic strains were also isolated from two non-diarrheic foals, aged 7 days and 12 months old, and another from a diarrheic foal, aged 5 months. Notably, *C. difficile* was recovered from only one out of 68 (2.9%) non-diarrheic foals greater than 1 month old. This result agrees with previous studies, which have shown that isolation in healthy foals older than 1 month is rare but can sometimes occur, mainly after antibiotic treatment [3,19]. Unfortunately, there is no data regarding antibiotic administration in this healthy foal.

Four animals were positive for A/B toxin detection, but *C. difficile* was not isolated from stool samples. However, there is no standard method for the isolation of *C. difficile*, making it difficult to compare results from other studies, although similar results have been described in foals [18, 19, 24, 25] as well as in other species such as

dogs and piglets [11,16]. It is well known that some *C. difficile* strains cannot grow due to susceptibility to one or both antibiotics used in medium [26]. In addition, the use of TCCFA, even with the supplementation of taurocholate, could have variable sensitivity for *C. difficile* spore recovery when compared with other media such as TCCFB (cefoxitin-cycloserine-broth, supplemented with taurocholate) [27].

***Clostridium perfringens* isolation and genotype**

C. perfringens strains were isolated from animals of all ages, including one-day-old diarrheic foal, showing early colonization by this enteric agent. The high detection rate of *C. perfringens* type A is not surprising, as this type is considered to be the most common in animal feces and also in the environment [28]. *C. perfringens* type C was not detected, and no strains were positive for *cpe* or *netb* genes. To our knowledge, the *netb* gene has not been described in equine *C. perfringens* isolates [10], while the absence of the *cpe* gene observed here contrasts with previous studies [18,21] that have reported a low rate of the *cpe* gene (between 2 and 12.5%) in equine *C. perfringens* isolates, commonly without association with diarrhea or worsening clinical signs. Only one animal positive for *C. difficile* A/B toxins was also positive for *C. perfringens* isolation, suggesting that an association between these two enteropathogens is uncommon, as previously reported [18].

Only four strains were positive for the beta-2-encoding gene, suggesting that this gene is not a good virulence factor marker for *C. perfringens* in foals. There is little data about the role of *cpb2* in foals, as the majority of studies focus on adult horses, and the importance of beta-2 toxin remains controversial. Herholz et al. [28] reported an association between enteric disorders and the presence of *cpb2*, while Bacciarini et al. [29] described the beta-2 toxin in horses with intestinal disease and with other diseases. In a study with mare-foal pairs, Tillotson et al. [30] did not find an association between *cpb2* or *cpe* genes and enteric disorders in foals. Recently, a case of colitis in a three-day-old foal was associated with *C. perfringens* beta-2 toxin by isolation and immunochemistry [9], but the long period of time between death and intestinal content collection makes it difficult to draw conclusions about the role of *C. perfringens* in this case.

Disregarding the genotyping, there was a significant association between the isolation of *C. perfringens* and the presence of diarrhea ($p=0.045$), corroborating Netherwood et al [31]. These results suggest that, despite the presence *cpb2*, *cpe* or *netb* genes, the isolation of *C. perfringens* from diarrheic foals could implicate the involvement of this agent in diarrhea. However, as *C. perfringens* could be recovered from non-diarrheic foals, a positive isolation of *C. perfringens* cannot be interpreted alone, and the absence of other enteropathogens might be necessary to confirm the diagnosis [9].

Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* and *C. difficile* strains.

All *C. difficile* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin, which are considered the first and second choices, respectively, for the treatment of CDI in horses [3]. These results are similar to previous studies in various species [19,32], and at present, metronidazole-resistant isolates have been found only in American horses [33,34]. Likewise, all *C. difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline. A wide range of susceptibilities to tetracycline are commonly reported in *C. difficile* isolates from human and swine, but in general, nearly all isolates are susceptible [35,36].

Two *C. difficile* strains that were resistant to penicillin were isolated from foals that had signs of diarrhea before antibiotic treatment with penicillin G for clinically diagnosed pneumonia [4]. According to Baverud [37], beta-lactams are commonly implicated in *C. difficile*-associated diarrhea after antibiotic treatment in foals and also in adult horses.

Two strains were resistant to erythromycin, which was previously reported in horses by Baverud et al. [19] and is also commonly found among *C. difficile* isolates from humans [38]. All *C. difficile* isolates were susceptible to florfenicol, while only one strain was resistant to enrofloxacin, but no data regarding these two compounds were found for *C. difficile* isolates from foals. For tylosin, only one strain showed an intermediate susceptibility, whereas the remaining six *C. difficile* isolates were susceptible to the drug. Previous studies reported *in vitro* tylosin activity against *C. difficile* isolates from piglets with enteritis, but in contrast with our findings, some strains were also resistant [36]. The MIC results must be interpreted with caution, as most *C. difficile* isolates from cases of antimicrobial-induced CDI in humans were susceptible to the implicated drug [39], suggesting that successful treatment is most likely dependent on both the susceptibility of *C. difficile* and other components of the enteric microbiota [18].

All *C. perfringens* strains were susceptible to penicillin, vancomycin and metronidazole, corroborating other studies with equine isolates and also other domestic animal species [40-43]. The resistance of *C. perfringens* to these drugs is rare but has already been shown by others studies with isolates from human and animal sources [44,45], although to our knowledge, resistance has not been reported in equine isolates. In these studies, the results were interpreted as an inherently lower susceptibility to these drugs and not as resistance mediated by acquired genes or mutation.

In this report, resistance was observed for two macrolides tested: 17 (58.6%) *C. perfringens* strains were resistant to erythromycin and five (17.2%) were resistant to tylosin. Similar results were previously reported for isolates from various sources [32,36,45]. A clear bimodal distribution could also be observed for erythromycin, suggesting a genetic mechanism of resistance, which is likely due to the presence of the

ermQ genes [46]. These resistance genes were previously described in *C. perfringens* isolates from several domestic animals [45], but until now, they were not found in foal isolates.

For oxytetracycline, five (17.2%) strains were also resistant. It was previously reported that *Clostridium* species can carry tetracycline resistance genes that encode a ribosome-protecting cytoplasmic protein that mediates the active efflux of tetracycline from the cell [47]. As it is common to see oxytetracycline-resistant *C. perfringens*, the resistance rate found in this study is not surprising and is also lower than that of previous reports on *C. perfringens* isolates from foals and other species including poultry, cattle, dogs, swine and humans [43-45].

CONCLUSIONS

The present report highlights the need for laboratory diagnostics to differentiate *C. difficile*-associated disease in foals from other causes of diarrhea, allowing for adequate antibiotic therapy. More studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* as a primary agent of diarrhea in foals, as there is no consensus about the role of beta-2 and other additional virulence factors. Finally, although not routinely performed, the evaluation of antimicrobial susceptibility of *C. difficile* and *C. perfringens* isolates from foals might be useful in the treatment of the enteric diseases associated with these pathogens in foals.

The next step following this study is to evaluate the presence of antimicrobial resistance genes in these isolates. In addition, the ribotyping of the *C. difficile* strains would be interesting, as until now, it has not been performed on *C. difficile* isolates from any animal source in Brazil.

MANUFACTURES' DETAILS

^a (NIBSC - National Institute for Biological Standards and Control, London, England)

^b (Hi-media, Mumbai, India)

^c (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

^d (SPS, Difco Laboratories, Detroit, USA)

REFERENCES

1. Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.D., Wehland, J., Aktories, K. (2009) *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Patho. **5**, e1000626.
2. Songer, J.G., Trinh, H.T., Dial, S.M., Brazier, J.S., Glock, R.D. (2009) Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. J Vet Diagn Invest. **21**, 377-380.
3. Båverud, V. (2004) *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. Vet Clin North Am Equine Pract. **20**, 615-30.
4. Silva, R.O.S., Moreira, F.M., Rezende, J.V., Pires, P.S., Maranhão, R.P.A., Palhares, M.S., Lobato, F.C.F. (2012) First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. Ciência Rural. **42**, 498-500.
5. Jung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C., Limbago, B.M. (2008) Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. Emerg Infect Dis. **14**, 1039-45.
6. Norman, K.N., Scott, H.M., Harvey, R.B., Norby, B., Hume, M.E., Andrews, K. (2011) Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. Appl Environ Microbiol. **77**, 5755-60.
7. Schotte, U., Truyen, U., Neubauer, H. (2004) Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors--a review. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. **51**, 423-6.
8. Furr, M., Cohen, N.D., Axon, J.E., Sanchez, L.C., Pantaleon, L., Haggett, E., Campbell, R., Tennent-Brown, B. (2012) Treatment with histamine-type 2 receptor antagonists and omeprazole increase the risk of diarrhoea in neonatal foals treated in intensive care units. Equine Vet J **41**, 80-6.
9. Hazlett, M.J., Kircanski, J., Slavic, D., Prescott, J.F. (2011) Beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* type A colitis in a three-day-old foal. J Vet Diagn Invest. **23**, 373-6.
10. Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J., Rood, J.I. (2010) NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of *Clostridium perfringens*. Toxins. **2**, 1913-27.
11. Silva, R.O.S. Salvarani, F.M., Cruz Júnior, E.C.C., Pires, P.S., Santos, R.L.R., Assis, R.A., Guedes, R.M.C. Lobato, F.C.F. (2011) Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. Ciência Rural. **41**, 1130-35.

12. Van den Berg, R.J., Bruijnesteijn Van Coppenraet, L.S., Gerritsen, H.J., Endtz, H.P., Van Der Vorm, E.R., Kuijper, E.J. (2005) Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. J Clin Microbiol. **43**, 5338-40.
13. Vieira, A.A.S., Guedes, R.M.C., Salvarani, F.M., Silva, R.O.S., Assis, R.A., Lobato, F.C.F. (2008) Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. Arq Instit Biol. **75**, 513-6.
14. 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.
15. CLSI (2011). Performance standards for Antimicrobial Suceptibility Test. Twenty-first Information Supplement v.31, n.1, January, 2011.
16. Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L., Weese, J.S. (2008) Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. Vet Microbiol. **129**, 209-14.
17. Keessen, E.C., Hopman, N.E., van Leengoed, L.A., van Asten, A.J., Hermanus, C., Kuijper, E.J., Lipman, L.J. (2011) Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. J Clinic Microbiol. **49**, 1816-21.
18. Weese, J.S., Staempfli, H.R., Prescott, J.F. (2001) A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. Equine Vet J. **33**, 403-9.
19. Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán, A., Gunnarsson, A. (2003) *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. Equine Vet J. **35**, 465-71.
20. Medina-Torres, C.E., Weese, J.S., Staempfli, H.R. (2011) Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. Vet Microbiol. **152**, 212-215.
21. Frederick, J., Giguère, S., Sanchez, L.C. (2009) Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008). J Vet Intern Med. **23**, 1254-60.
22. Magdesian, K.G., Hirsh, D.C., Jang, S.S., Hansen, L.M., Madigan, J.E. (2002) Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993-1997). J Am Vet Med Assoc. **220**, 67-73.
23. Weese, J.S., Staempfli, H.R., Prescott, J.F. (2000) Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. J Vet Diagn Invest. **12**, 332-6.

24. Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A., Gunnarsson, A. (1997) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J.* **29**, 279-84.
25. Arroyo, L.G., Staempfli, H., Weese, J.S. (2007) Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet Microbiol.* **120**, 179-83.
26. Songer, J.G., Uzal, F.A. (2005) Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest.* **17**, 528-36.
27. Thitaram, S.N., Frank, J.F., Lyon, S.A., Siragusa, G.R., Bailey, J.S., Lombard, J.E., Haley, C.A., Wagner, B.A., Dargatz, D.A., Fedorka-Cray, P.J. (2011) *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J Food Prot.* **74**, 130-3.
28. Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H., Straub, R. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol.* **37**, 358-61.
28. Siqueira, F.F., Almeida, M.O., Barroca, T.M., Horta, C.C., Carmo, A.O., Silva, R.O., Pires, P.S., Lobato, F.C., Kalapothakis, E. (2012) Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet Microbiol.* Epub ahead of print.
29. Bacciarini, L.N., Boerlin, P., Straub, R., Frey, J., Gröne, A. (2003) Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Vet Pathol.* **40**, 376-81.
30. Tillotson, K., Traub-Dargatz, J.L., Dickinson, C.E., Ellis, R.P., Morley, P.S., Hyatt, D.R., Magnuson, R.J., Riddle, W.T., Bolte, D., Salman, M.D. (2002). Population-based study of fecal shedding of *Clostridium perfringens* in broodmares and foals. *J Am Vet Med Assoc.* **220**, 342-8.
31. Netherwood, T., Wood, J.L., Townsend, H.G., Mumford, J.A., Chanter, N. (1996) Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiol Infect.* **117**, 375-83.
32. Marks, S.L., Kather, E.J. (2003) Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet Microbiol.* **94**, 39-45.
33. Jang, S.S., Hansen, L.M., Breher, J.E., Riley, D.A., Magdesian, K.G., Madigan, J.E., Tang, Y.J., Silva, J. Jr., Hirsh, D.C. (1997) Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin Infect Dis.* **25**, S266-7.

34. Magdesian, K.G., Dujowich, M., Madigan, J.E., Hansen, L.M., Hirsh, D.C., Jang, S.S. (2006) Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. J Am Vet Med Assoc. **228**, 751-5.
35. Delmée, M., Avesani, V. (1988) Correlation between serogroup and susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother. **22**, 325-31.
36. Post, K.W., Songer, J.G. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. Anaerobe. **10**, 47-50.
37. Båverud, V. (2002) *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. Vet Q Journal. **24**, 203-219.
38. Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P., European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). (2011) Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. **66**, 2227-34.
39. Dzink, J., Bartlett, J.G.. (1980) *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. Antimicrob Agents Chemother. **17**, 695-8.
40. Watkins, K.L., Shryock, T.R., Dearth, R.N., Saif, Y.M. (1997). *In-vitro* antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. Vet. Microbiol. **54**, 195-200.
41. Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., de Gussem, K., Decostere, A., Haesebrouck, F. (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chicken to antibiotics and anticoccidials. Avian Pathol. **33**, 3-7.
42. Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J., Boerling, P. (2008) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chicken at a commercial farm. Vet. Microbiol. **127**, 116-127.
43. Silva, R.O.S., Salvarani, F.M., Assis, R.A., Martins, N.R.S., Pires, P.S., Lobato, F.C.F. (2009) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. Braz J Microbiol. **40**, 261-3.
44. Tansuphasiri, U., Matra, W., Sangsuk, L. (2005) Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. **36**, p.954-61.

Table 2: Distribution of the minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) for 29 *Clostridium perfringens* strains isolated from foals.

Antibiotic	Number of <i>Clostridium perfringens</i> strains (%) with MIC values ($\mu\text{g/mL}$)												MIC ₅₀	MIC ₉₀
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256		
Penicillin	23 (79.3)	6 (20.7)											0,25	0,5
Oxytetracycline	2 (6.9)		2 (6.9)	2 (6.9)	4 (13.8)	5 (17.2)	11 (37.9)	3 (10.4)					8,0	16,0
Florfenicol	2 (6.9)		2 (6.9)	15 (51.7)		6 (20.7)		4 (13.8)					2,0	32,0
Erythromycin	3 (10.4)		6 (20.7)	3 (10.4)								17 (58.6)	>256,0	>256,0
Tylosin	12 (41.4)	7 (24.1)	1 (3.4)		2 (6.9)		2 (6.9)					5 (17.9)	0.5	>256,0
Metronidazole	2 (6.9)	27 (93.1)											0,5	0,5
Vancomycin		18 (62.1)	9 (31.1)			1 (3.4)	1 (3.4)						0.5	1,0

MIC₅₀: Concentration to inhibit 50% of the tested strains (≥ 15 strains in this study).

MIC₉₀: Concentration to inhibit 90% of the tested strains (≥ 26 strains in this study).

Table 1: Results of A/B toxin detection and isolation of *Clostridium difficile* and *C. perfringens* from foals (n=153)

Assay	Results	Foals			Total
		Non-diarrheic (Farm)	Diarrheic		
			Hospitalized	Farm	
<i>C. difficile</i> A/B toxin detection	Positive	0/76 (0%)	5/14 (35.7%)	2/63 (3.2%)	7/153 (4.6%)
	Negative	76/76 (100%)	9/14 (64.3%)	61/63 (96.8%)	146/153 (95.4%)
<i>C. difficile</i> isolation	Positive	2/76 (2.6%)	4/14(28.6%)	1/63(1.6%)	7/153 (4.6%)
	A ⁺ B ⁺	0/76 (0%)	3/14 (21.4%)	1/63 (1.6%)	4/153 (2.6%)
	A ⁻ B ⁻	2/76 (2.6%)	1/14 (7.2%)	0/63 (%)	3/153 (2%)
	Negative	74/76 (97.4%)	10/14 (71.4%)	62/63 (98.4%)	146/153 (95.4%)
<i>C. perfringens</i> isolation	Positive	10/76 (13.2%)	1/14 (7.2%)	20/63 (31.7%)	31/153 (20.3%)
	<i>cpb2</i> ⁺	3/76 (4%)	0/14 (0%)	1/63 (1.6%)	4/153 (2.6%)
	<i>cpb2</i> ⁻	7/76 (9.2%)	1/14 (7.2%)	19/63 (30.1%)	27/153 (17.6%)
	Negative	66/76 (86.8%)	13/14 (92.8%)	43/63 (68.3%)	122/153 (79.7%)