

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DETECÇÃO DE *CLOSTRIDIODES DIFICILIS* EM
FEZES DE ANIMAIS SILVESTRES

MAIARA CALDAS DE LIMA

Botucatu, SP
Dezembro de
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS DE BOTUCATU

DETECÇÃO DE *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* EM FEZES DE
ANIMAIS SILVESTRES

MAIARA CALDAS DE LIMA

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Botucatu, SP
Dezembro de
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lima, Maiara Caldas de.

Detecção de Clostridioides difficile em fezes de
animais silvestres / Maiara Caldas de Lima. - Botucatu,
2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Capes: 50501062

1. Animais selvagens. 2. Fezes. 3. Clostridium. 4.
Clostridioides. 5. Reação em cadeia da polimerase em tempo
real. 6. Toxinas.

Palavras-chave: Animais selvagens; Clostridioides;
Clostridium; Reação em cadeia da polimerase em tempo
real; Toxinas.

Nome do autor: Maiara Caldas de Lima

Título: DETECÇÃO DE *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* EM FEZES DE ANIMAIS SELVAGENS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Paes Oliveira-Filho

Membro da banca

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Diego Delfiol

Membro da banca

Departamento de Clínica Veterinária

Universidade Federal de Uberlândia

Data da defesa: 21/12/2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus familiares. Aos meus pais, Antonio e Maria, que nunca mediram esforços para que eu estudasse e realizasse meus sonhos, principalmente os acadêmicos.

Meus pais sempre foram meu combustível para que eu estudasse e conquistasse aquilo que infelizmente eles não tiveram a oportunidade de conquistar, um diploma de graduação e agora um de pós-graduação.

Ao meu marido Diego, que sem o apoio dele não seria possível realizar essa conquista, já que o mesmo me deu forças para que eu nunca desistisse dessa conquista, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao professor e orientador Alexandre Borges, por me acolher como sua aluna, mesmo sem me conhecer e confiar a mim um trabalho tão importante com sua incrível orientação, ele é uma pessoa incrível e profissional melhor ainda.

A minha amiga Roberta Martins Basso, que sempre me auxiliou no projeto de pesquisa e que foi como uma mãe, sempre disposta a ajudar, não importando o dia ou horário ela sempre estava disponível para sanar minhas dúvidas, uma profissional que tenho como espelho e uma pessoa maravilhosa. A Heloísa, por coletar as amostras utilizadas nesse trabalho no CEMPAS.

Ao meu parceiro de pós graduação Fabrício Cerri, por todo apoio e ajuda, sem a ajuda dele não seria possível a realização desse projeto.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da FMVZ - Unesp - Botucatu/SP, pelo auxílio prestado durante o curso de mestrado.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu/SP, pelo apoio desta instituição para o desenvolvimento deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

Lista de tabelas

Página

Table 1: Resultados da detecção do *C. difficile*, *tcdA* e *tcdB* em animais selvagens pela técnica de qPCR e isolamento bacteriano

21

Lista de abreviaturas

CDI - Infecção associada ao *Clostridioides difficile*

CDT - Toxina não binária

cdtA - Gene A da toxina binária

cdtB - Gene B da toxina binária

PacLoc - Locus de patogenicidade do *C. difficile*

TcdA - Toxina A do *C. difficile*

TcdB - Toxina B do *C. difficile*

PCR - Polymerase chain reaction, do inglês (Reação em cadeia de polimerase).

CEMPAS - Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens

qPCR - Quantitative polymerase chain reaction, do inglês (Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Sumário

	Página
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO...	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 <i>Clostridioides difficile</i> - História	5
2.2 <i>Clostridioides difficile</i> - O Agente	6
2.3 <i>Clostridioides difficile</i> - Toxinas	8
2.4 Diagnóstico	9
2.5 <i>Clostridioides difficile</i> em seres humanos.	10
2.6 <i>Clostridioides difficile</i> em animais...	12
2.6.1 <i>Clostridioides difficile</i> em suínos	12
2.6.2 <i>Clostridioides difficile</i> em equinos.	13
2.6.3 <i>Clostridioides difficile</i> em bovinos.	14
2.6.4 <i>Clostridioides difficile</i> em cães e gatos.	15
2.6.5 <i>Clostridioides difficile</i> em animais selvagens.	16
OBJETIVOS GERAIS	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO	19
CAPÍTULO 3 -DISCUSSÃO GERAL	30
CONCLUSÕES GERAIS	31
REFERÊNCIAS	32

LIMA, M.C. **DETECÇÃO DE CLOSTRIDIODES DIFFICILE EM FEZES DE ANIMAIS SILVESTRES**- 2022. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Clostridioides difficile é uma bactéria estritamente anaeróbica e formadora de esporos. Este patógeno está associado a quadros de diarreia (CDI) especialmente em seres humanos com histórico prévio da utilização de antimicrobianos. Sua presença em animais com problemas entéricos já foi descrita em equinos, cães, suínos e bovinos. Isolamentos em animais selvagens são descritos de forma escassa na literatura. Da mesma maneira estes podem atuar como reservatórios e/ou carreadores. O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de *C. difficile* nas fezes de animais selvagens e comparar duas técnicas de detecção. Foram colhidas amostras de 100 animais de 34 espécies diferentes entre répteis e mamíferos. Estas foram submetidas à qPCR para a detecção da presença do agente (16S) e de suas toxinas (*tcdA* e *tcdB*), e ao isolamento bacteriano anaeróbico e multiplex para detecção do perfil toxigênico das colônias. Na qPCR observou-se 61% dos animais a presença do *C. difficile*, dessas uma foi positiva para *tcdA*, três para *tcdB* e 17 para ambas as toxinas. Foi possível o isolamento anaeróbico de 16% das amostras, sendo três isolados positivos para TcdA e TcdB. O *C. difficile* foi observado em diversas espécies de animais selvagens, assim como a presença de cepas toxigênicas. A técnica de qPCR apresentou maior positividade comparada ao isolamento bacteriano e a presença deste agente infeccioso nas fezes dos animais selvagens ressalta a importância destes como possíveis carreadores de infecção para animais de produção ou humanos.

Palavras-chave: *Clostridioides difficile*; *Clostridium difficile*; toxinas A e B; animais selvagens; qPCR.

LIMA, M.C. **DETECTION OF *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* IN FECES OF ANIMALS WILD**- 2022. 55p. Thesis (Master's)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Clostridioides difficile is a strictly anaerobic, spore-forming bacterium. This pathogen is associated with diarrhea (CDI) especially in humans with a previous history of antimicrobial use. Its presence in animals with enteric problems has already been described in horses, dogs, pigs and cattle. Isolations in wild animals are scarcely described in the literature. Likewise, they can act as reservoirs and/or carriers. The objective of the present work was to determine the occurrence of

C. difficile in the feces of wild animals and to compare two detection techniques (qPCR and anaerobic culture). Samples were collected from 100 animals of 34 different species including reptiles and mammals. These were submitted to qPCR to detect the presence of the agent (16S) and its toxins (*tcdA* and *tcdB*), and to anaerobic isolation and multiplex PCR to detect the toxigenic profile of the colonies. In qPCR the presence of *C. difficile* was observed in 61% of the animals, of which one was positive for *TcdA*, three *TcdB* and 17 for both toxins. The anaerobic isolation of 16% of the samples was possible; with three positive isolates for *TcdA* and *TcdB*. *C. difficile* was observed in several species of wild animals, as well as the presence of toxigenic strains. The qPCR technique showed greater positivity compared to bacterial isolation and the presence of this infectious agent in the feces of wild animals underscores their importance as possible carriers of infection for production animals or humans.

Keywords: *Clostridioides difficile*; *Clostridium difficile*; toxins A and B; wild animals; qPCR

1. INTRODUÇÃO

O *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbica, em forma de bacilos gram positivos, com capacidade de esporulação e produção de toxinas. Sua importância está associada ao desenvolvimento de desordens entéricas em seres humanos e animais (CZEPIEL et al. 2019; WEESE 2020). É a principal causa de diarreia associada ao uso de antimicrobianos em seres humanos (KURKE; LAMONT, 2014; CATALDO et al., 2021). Estes quadros são denominados como infecção causada pelo *C. difficile* (CDI) (MASLENNIKOV et al., 2022). Nos últimos anos, a CDI foi relatada em pacientes jovens e sem histórico prévio de hospitalização ou tratamento com antibióticos. Todavia o uso de corticoides e supressores da bomba de prótons são fatores de risco nesta faixa etária (ANJEWIERDNEN et al., 2020).

A infecção inicia-se predominantemente pela via fecal-oral. Os esporos são eliminados por animais com CDI e portadores clinicamente saudáveis. No intestino delgado ocorre a germinação do *C. difficile* em resposta a presença de sais biliares (taurina e glicina) (SORG; SONESHEIN, 2008). Ao atingirem regiões intestinais onde exista anaerobiose (ceco e cólon), ocorre a sua proliferação. O *C. difficile* pode constituir a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis (WEESE, 2020).

Em situações normais o *C. difficile* não é capaz aderir-se a mucosa intestinal devido ao microbioma estruturado no trato gastrointestinal (ZHU et al., 2018). Desta forma, a disbiose é necessária para o aparecimento da CDI e disseminação do *C. difficile* (BÅVERUD et al., 2002). A resposta inflamatória é o segundo ponto crucial para o aparecimento da CDI (PENICHE et al., 2013). Pois, os hospedeiros respondem de maneira diferente aos estímulos oriundo das toxinas (*TcdA* e *TcdB*) (TENG et al., 2018; WEESE, 2020). Neste momento existe eliminação de esporos nas fezes.

As cepas toxigênicas de *C. difficile* produzem duas toxinas: a toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina) que causam lesões no epitélio intestinal e

hipersecreção de mediadores inflamatórios (LYERLY et al., 1988). Os sinais clínicos de *C. difficile* podem variar de enterite pseudomembranosa a colite fulminante com hemorragia e necrose dos enterócitos (SLOVIS, 2009). Algumas cepas são capazes de produzir outra toxina, conhecida como não binária (CDT). Esta toxina possui dois genes (*cdtA* e *cdtB*) localizados em uma região distinta do seu genoma sua participação na CDI é pouco conhecida (PENICHE et al., 2013).

A partir de 1978, diversos estudos focaram no isolamento e caracterização do *C. difficile* em seres humanos com e sem diarreia. Esta bactéria já foi descrita em inúmeras espécies (WEESE, 2020), como potros (JONES et al., 1989), gatos (WEBER et al., 1989), cães (RILEY et al. 1991), suínos (MARTIROSSIAN et al., 1992) e avestruzes em cativeiro (FRAZIER et al., 1993). Estes estudos tiveram por objetivo determinar a influência desta patógeno nos casos de diarreia.

O diagnóstico da CDI é baseado na detecção das toxinas A/B por cultura de células ou por ELISA (DELMEE, 2001). O isolamento é realizado por meio de cultivos seletivos e manutenção da condição de anaerobiose (WHITTIER et al., 1993; LYERLY et al., 1998). As cepas toxigênicas são diferenciadas por meio da identificação das toxinas “*in vitro*”. Os genes responsáveis pela produção da toxina A (*tcdA*) e B (*tcdB*) podem ser detectados por técnicas de biologia molecular (KATO et al., 1991; ZIMMEL, 2008).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – *Clostridioides (Clostridium) difficile*

Os primeiros isolamentos de *C. difficile* ocorreram a partir de amostras fecais obtidas de crianças no primeiro dia de vida (HALL; O'TOOLE, 1935). Naquele momento, os pesquisadores identificaram uma bactéria de estrutura bacilar, gram positiva, capaz de formar esporos e produtora de toxina altamente patogênica para coelhos e cobaias. Em função de sua morfologia foi inicialmente denominada de *Bacillus difficilis* devido à grande dificuldade de cultivar a mesma. Prévot (1938) sugeriu a sua mudança para o gênero

Clostridium. Posteriormente a comunidade internacional modificou sua classificação para *Clostridium difficile* no Approved Lists of Bacterial Names (SKERMAN et al., 1980). Em 2016 foi reclassificado, sendo denominado como *Clostridioides difficile*, terminologia utilizado nos dias atuais (OREN; GARRITY, 2016).

Os primeiros casos de diarreia em animais domésticos relacionando *C. difficile* foram relatados em equinos entre 1970 a 1980 (DABARD et al., 1979). Posteriormente foi isolado em cães e gatos, cogitando-se que os animais de companhia poderiam atuar como reservatórios (BORRIELLO et al., 1983). Anos depois o *C. difficile* foi associado a quadros entéricos em cães (BERRY; LEVETT, 1986; WEESE et al., 2001).

Atualmente é possível estabelecer que algumas cepas de *C. difficile* são mais frequentes em seres humanos e outras em animais de produção (ZHU et al. 2018; CZEPIEL et al., 2022). A presença do patógenos nas fezes não está diretamente ligada à manifestação da doença (JARDINE et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2016). A presença de *C. difficile* em seres humanos e animais iniciou uma discussão sobre um possível potencial papel zoonótico do patógeno (MULLIGAN, 1984). A semelhança genética de isolados de seres humanos e animais demonstraram a existência de possíveis associações epidemiológicas a CDI (KEESSEN et al., 2013; LOO et al., 2016).

Os casos de CDI em humanos aumentaram substancialmente na última década. Neste contexto, acredita-se que os animais tenham importância epidemiológica na transmissão da doença. De forma que a CDI começa a ser tratada pela perspectiva da saúde única (HENSGENS et al., 2012; SQUIREAND-RILEY, 2013).

2.2 *Clostridioides difficile* – O agente

Clostridioides difficile é um bastonete, gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos, com dimensões variando entre 0,5-1,9 x 3,0 -16,9 µm são potencialmente patogênicos para humanos e diversos animais. Pertence ao gênero de bactérias formadoras de esporos, são usualmente móveis e produtoras de grande quantidade de gás (LAWSON et al., 2016).

Genotipicamente podem ser divididos em dois grandes grupos, produtoras de toxinas e atoxigênicas. As cepas toxigênicas possuem ilha genômica de 19,6 kb conhecida como *locus* de patogenicidade (PaLoc), a qual alberga os genes das toxinas A (*TcdA*) e B (*TcdB*) (GERDING et al., 2014; NATARAJAN et al., 2013).

O processo de esporulação é um mecanismo essencial para a perpetuação da bactéria no ambiente (SORG et al., 2008). A forma vegetativa do *C. difficile* não tolera a presença de oxigênio, sendo inviável sua replicação fora do intestino do hospedeiro (PAREDES-SABJA et al., 2014). O microrganismo em sua forma esporulada pode permanecer viável no ambiente por períodos prolongados. Quando estão na presença de sais biliares (taurina e glicina) existe a germinação dos esporos (YOUNG, 2014). A forma esporulada minimiza os danos ao material genético. Assim estes se tornam resistentes à dessecação e conferindo resistência a diversos métodos físicos e químicos de desinfecção (SORG et al. 2008; GIL et al., 2017).

Quando esporulado o *C. difficile* pode permanecer viável em instalações hospitalares mesmo após a realização de procedimentos de desinfecção (LIM et al., 2019; AWAD et al., 2014; KOENIGSKNECHT et al., 2015). Proteínas presentes na cápsula dos esporos são capazes de interagir com receptores de macrófagos e enterócitos (PAREDES-SABJA et al., 2012; AWAD et al., 2014).

Dentro da patogênese da CDI, além das toxinas amplamente estudadas, a formação de biofilme por esta bactéria é associada a manutenção deste quadro. Este facilita a permanência do *C. difficile* no intestino, e dificulta a ação de antibiótico sobre as bactérias (VUOTTO et al., 2018). Atualmente observa-se um perfil de resistência elevado aos antibióticos associados ao aparecimento da CDI (Fluoroquinolonas e clindamicina). Todavia, com relação aos principais fármacos utilizados no seu tratamento (metronidazol e vancomicina) não são amplamente relatados (SHOLEH et al., 2020).

A utilização de antimicrobianos é associada a CDI, pois altera o microbioma intestinal e consequentemente os metabólitos produzidos no intestino são modificados tornando possível a multiplicação e adesão do *C. difficile* (THERIOT; YOUNG, 2015).

2.3 *Clostridioides difficile* – Toxinas

C. difficile toxigênicos são capazes de produzir duas toxinas (TcdA e TcdB), responsáveis por causar danos nos enterócitos e consequentemente desenvolvimento dos sinais clínicos da CDI (AKTORIES et al., 2017). Acredita-se que TcdA e TcdB possuem a mesma importância na patogênese da CDI. Inicialmente acredita-se que a TcdA era a única causadora dos sinais clínicos e resposta inflamatória na mucosa intestinal. Todavia, a observação de cepas A⁻B⁺ em indivíduos com apresentação clínica de CDI (KYNE 2007; MACKIN t al., 2015). Estas possuem uma mutação no gene de TcdB, tornando estas capazes de realizar a glicosilação das células da mucosa intestinal de maneira semelhante a TcdA (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017).

Determinadas cepas são capazes de produzir também outra toxina, denominada como não binária (CDT) e sua participação na CDI não é completamente elucidada (PENICHE et al., 2013). Esta é codificada por duas regiões genômicas *cdtA* e *cdtB* (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017). Pesquisas demonstraram que a produção de CDT concomitantemente com TcdA e TcdB relaciona-se ao aparecimento de quadros grave de CDI (KYNE 2007; MACKIN t al., 2015; CHANDRASEKARAN; LACY, 2017).

Em humanos, a CDI é uma das causas mais importantes de infecção em pacientes hospitalizados por um longo período, especialmente com administração de antimicrobianos, em especial as fluorquinolonas (MARTIN et al., 2016; LIM et al., 2020). Com a ocorrência de alterações no microbioma intestinal e presença de esporos, que vêem a germinar, o *C. difficile* consegue aderir-se a mucosa intestinal. A TcdA causa a quebra das junções celulares. Posteriormente, a TcdB atua sobre o citoesqueleto causando sua desorganização (LIM et al., 2020). As ações de ambas as toxinas causam a secreção de mediadores inflamatórios no lúmen intestinal e modulam o sistema nervoso autônomo exacerbando as respostas já instaladas (PENICHE et al., 2013; HRYCKOWIAN et al., 2017). Devido à lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem atingir a circulação e alcançar outros órgãos.

Consequentemente há uma migração intensa leucocitária intestinal, que resulta na formação da pseudomembrana, típica da CDI (HOOKMAN et al., 2009).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da CDI é baseado na sintomatologia clínica, dados epidemiológicos e confirmados por testes laboratoriais. Laboratorialmente a CDI é diagnosticada por meio da identificação do agente, suas toxinas A/B ou material genético (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017). O isolamento do *C. difficile* baseia-se na cultura em condições de anaerobiose (KNIGHT et al., 2014; YANG et al., 2014; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017). Por meio dos avanços desta técnica, e com o desenvolvimento de meios seletivos e caldos de enriquecimento, o isolamento vem apresentando maiores índices de sensibilidade (PENG et al. 2018). Todavia, é necessária a utilização de outras técnicas para determinar o padrão de toxigenicidade (KNIGHT et al., 2014; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017).

A técnica de isolamento em cultura celular é capaz de identificar cepas toxigênicas ou não toxigênicas (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017). Possui alta sensibilidade, considerado como padrão ouro. Este é comumente utilizado como referência para comparação de outros testes (KNIGHT et al., 2014; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017; McDONALD et al., 2018). O ensaio de neutralização de citotoxicidade é uma opção para confirmação da presença de ambas as toxinas (PENG et al. 2018). Atualmente também está disponível teste rápido baseado na identificação do glutamato desidrogenase (GDH) (RAMOS et al., 2021; CARVALHO et al., 2022).

Outra opção é a identificação dos genes responsáveis pela produção das toxinas A e B, por meio da amplificação pela PCR diretamente das fezes (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017; BANDEJI et al. 2018). Esta técnica possui alta sensibilidade, boa especificidade, podendo ser realizada rapidamente (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017; McDONALD et al., 2018).

Conceitualmente pode-se diferenciar o termo colonização, o qual significa a identificação do *C. difficile* e a ausência dos sinais clínicos. Todavia,

a sua detecção e das suas toxinas acompanhadas de diarreia e/ou colite, determina-se a presença da CDI (CROBACH et al., 2018).

2.5 *Clostridioides difficile* em humanos

Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em 1935, somente na década de 70 *C. difficile* foi reconhecido como agente causador de doença. Desde então passou a ser a principal causa bacteriana de diarreia associada à antibioticoterapia prolongada e uso de fármacos que alterem o pH gástrico (SAMIE et al., 2008; ANJEWIERDEN et al., 2021).

A CDI acomete aproximadamente 400 mil pessoas por ano nos EUA, os custos com o seu tratamento e medidas de controle e prevenção estão em torno de 800 milhões de dólares anualmente (DESAI et al., 2016). Estes custos estão intimamente associados ao aumento na incidência e observação de cepas toxigênicas e altamente resistentes (ELLIOTT et al., 2017).

Os sintomas da CDI estão associados ao nível de infecção e a toxigenicidade das cepas envolvidas. Clinicamente observa-se diarreia leve à grave, colite pseudomembranosa, megacólon tóxico e eventualmente óbito. O intestino grosso, em especial o colón, parece ser a região mais acometida. Deve-se destacar que apesar da grande quantidade de casos observados acredita-se que o sub-diagnóstico e a indivíduos assintomáticos favorecem a disseminação desta enfermidade (JACOBS et al., 2001).

O tratamento desta infecção utiliza geralmente metronidazol e vancomicina, essencialmente pela via oral (KOCIOLEK; GERDING, 2016). A retirada do antimicrobiano desencadeador da DCI é preferível. O transplante de microbiota fecal é uma opção viável e com resultados satisfatórios. Cuidados direcionados ao restabelecimento da imunidade também são adotados em pacientes imunossuprimidos (KOCIOLEK; GERDING, 2016; ELLIOTT et al., 2017).

A mortalidade associada à CDI está associada, ao aumento na resistência bacteriana (MASLENNIKOV et al. 2022). A colite pseudomembranosa foi à principal causa de óbito em pacientes internados ano

de 1999 em hospitais na Inglaterra (KELLY; LAMONT, 2008). Acredita-se que o aumento do número de casos registrados deve-se ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas. Os principais riscos para o desenvolvimento da CDI são, além do uso de antimicrobianos, idade avançada e hospitalização (BARTLETT, 2009).

A possibilidade de animais agirem como reservatórios e transmissores de *C. difficile* para humanos foi sugerida pela primeira vez por Borriello (1983) considerando a presença do agente nas fezes de cães e gatos. Com o desenvolvimento e maior aplicabilidade das técnicas de biologia molecular, estudos direcionados as mais diversas cepas do *C. difficile* tornaram-se comuns, entre essas técnicas, a mais utilizada nos dias atuais é a ribotipagem, proposta inicialmente por Gurtler et al. (1993). Essa permitiu a criação de uma biblioteca de mais de 160 padrões (ribotipos) a partir de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais, humanos e do ambiente (STUBBS et al., 2000).

Com o uso destas técnicas de ribotipagem, estudos recentes relataram que estirpes de *C. difficile* isoladas de produtos cárneos compartilhavam grande semelhança com os isolados de seres humanos com colite pseudomembranosa, sugerindo uma possível transmissão do *C. difficile* por alimentos de origem animal (RODRIGUEZ et al., 2007; SONGER et al., 2009). A partir desses resultados, alguns trabalhos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a semelhança entre estirpes isoladas em seres humanos e de animais domésticos, sendo observado que muitos ribotipos isolados de bovinos, suínos e cães eram os mesmos isolados em seres humanos com infecção por *C. difficile* (ARROYO et al., 2005; JHUNG et al., 2008).

Recentemente um estudo revelou que a exposição ocupacional a suínos aumenta significativamente a chance de colonização pelo agente em seres humanos e as estirpes isoladas dos trabalhadores e dos animais tinham o mesmo ribotipo, reforçando a hipótese de transmissão entre espécies (NORMAN et al., 2011).

Nas últimas décadas *C. difficile* foi mais bem compreendido, aparecendo nas listas de diagnóstico diferenciais em casos de diarreia em seres humanos. Todavia, existem diversas lacunas em sua cadeia epidemiológica e diversos

elementos de sua patogênese ainda não foram completamente elucidados (SONGER, 2004; SONGER; ANDERSON, 2006; THERIOT; YOUNG, 2015; ELLIOTT et al., 2017).

2.6 *Clostridioides difficile* em animais

Em animais, a infecção por *C. difficile* é comum em suínos e equinos, ocorrendo também em cães, bovinos e animais de laboratório como cobaias, coelhos e hamsters (BARTLETT et al., 2009; WEESE, 2020). O *C. difficile*, é conhecido como causador de diarreia em potros (SILVA et al., 2012), leitões (YAEGER et al., 2007) e colite profusa em equinos adultos (GOHARI et al., 2014). A sua importância e contribuição para causa de anormalidades entéricas em felinos (WEESE et al., 2001; SCHNEEBERG, et al., 2012), caninos (WEESE et al., 2001; BUSCH et al., 2015) e animais selvagens ainda não é completamente entendida. Em aves (ABDEL-GIL et al., 2018) e ovinos (KNIGHT; RILEY, 2013) o *C. difficile* parece não possuir importância epidemiológica (WEESE, 2020).

2.6.1 *Clostridioides difficile* em suínos

A CDI em suínos ocorre quase que exclusivamente em leitões com até sete dias de idade a adesão na mucosa intestinal ocorre facilitada pela não estabilidade da microbiota intestinal. O desenvolvimento da doença nesta espécie está associado a falhas na colonização intestinal, e não a utilização de antibióticos (SONGER; UZAL, 2005). O *C. difficile* encontra-se disseminado nas granjas suínas, sendo potencialmente eliminado nas fezes pelas porcas. (HOPMAN et al., 2011).

Clinicamente, a CDI em leitões é caracterizada pela presença de diarreia pastosa á aquosa, anorexia, baixo desenvolvimento corporal, subdesenvolvimento, anorexia e morte (SONGER; UZAL, 2005; GRZESKOWIAK et al., 2017). Em granjas acometidas pela enfermidade, cerca de 30% dos animais apresentam-se positivos para a presença das toxinas A/B, (SONGER et al., 2004; YAEGER et al., 2007).

Em leitões o *C. difficile* pode ser isolado em animais saudáveis e com enterite. Existe correlação entre a identificação do agente nas matrizes e seus produtos. Em leitões o *C. difficile* pode ser observado a partir de 1 hora após o nascimento devido ao contato com fezes no momento do parto. Nas porcas é possível identificá-lo de forma intermitente. Nesta ocasião o principal ribotipo identificado foi 078, o qual possuiu elevada dispersão no ambiente e comumente observado em seres humanos (HOPMAN et al., 2011).

Observa-se nesta espécie animal a presença de cepas multirresistentes e toxigênicas causando CDI em indivíduos jovens. Destaca-se a resistência da cepa RT 078/126 resistente a amoxiciclina, cefalosporinas, flurquinolonas e cefotaxima. Fármacos estes comumente utilizados na medicina humana (ANDINO-MOLINA et al., 2019).

Em leitões com CDI observa-se no exame necroscópico o edema mesocolônico, distensão de alças intestinais por gás e enterite. Histologicamente infiltrado celular neutrófilo e perda de células caliciformes são as principais observações. O quadro está associado a introdução de alimentação sólida a neonatos. Supõe-se que este procedimento inicie a modificação do microbioma intestinal favorecendo o desenvolvimento do *C. difficile* (GRZESKOWIAK et al., 2017).

2.6.2 *Clostridioides difficile* em equinos

Em equinos, a infecção por *C. difficile* acomete principalmente potros com até cinco meses de idade, porém animais dentro dos 10 primeiros dias de vida são os acometidos com maior gravidade. Os principais sinais clínicos observados são a presença de diarreia aguda (frequentemente sanguinolenta), desconforto e distensão abdominal, desidratação e morte em poucas horas (KEEL; SONGER, 2006). Em equinos adultos observa-se diarreia profusa com grande quantidade de líquidos, sudorese excessiva evoluindo ao óbito (DIAB et al., 2013). Especialmente em animais adultos os principais fatores associados ao desenvolvimento dos quadros são a utilização prévia e prolongada de antimicrobianos (β -lactâmicos, rifampicina, eritromicina e gentamicina),

hospitalização e mudanças na alimentação (BÅVERUD, 2002; PREIS et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Os achados de necropsia e histopatologia são semelhantes aos relatados em outras causas de enterite (WEESE, 2020; DIAB et al., 2013). Presença de áreas de hemorragia multifocal e difusa espaçamento de mucosa são encontrados no intestino delgado e grosso. Especialmente em ceco e cólon descreve-se a presença da pseudomembrana com coloração variando de marrom a verde escuro sobre a mucosa nesta região (DIAB et al., 2013).

Em potros com até uma semana de vida a ultrassonografia abdominal é importante, já que achados não específicos pode sugerir a presença de clostridium como agente causal da diarreia, sendo geralmente possível observar a presença de gás intramural em alças de intestino delgado e espaçamento de submucosa (>5 mm), distensão de alças, acúmulo de líquido com aspecto heterogêneo em abdômen e aumento de ecogenicidade difuso de alças intestinais (SOLIS et al., 2012).

No Brasil a primeira descrição do *C. difficile* em potros diarreicos ocorreu no estado de Minas Gerais. Dois equinos da raça mangalarga marchador com cinco meses de idade apresentaram diarreia aquosa após a instituição de antibioticoterapia (penicilina e florfenicol). Foi possível realizar a identificação do patógeno o qual apresentava caráter toxigênica (A^+B^+) (SILVA et al., 2012). A primeira determinação da frequência de *C. difficile* observou 4,6% de positividade, sendo todas estas isoladas de potros diarreicos e/ou internados (SILVA et al., 2013).

Os principais ribotipos isolados de equinos são 078 principalmente em animais que convivem com bovinos, 001, 012, 014, 017 e 027 (WEESE, 2020). No Brasil observou-se a presença do ribotipo 009 ($A^-B^-CDT^-$), 014/20 (A^+B^+CDT), 053 ($A^-B^-CDT^-$) em animais com diarreia (SILVA et al., 2015).

2.6.3 *Clostridioides difficile* em bezerros

Em bovinos adultos o *C. difficile* não é correlacionado com o desenvolvimento de CDI. Em bezerros a sua real participação ainda não é

completamente elucidada (WEESE, 2020). Sabe-se que a presença de diarreia, uso de antimicrobianos (quinolonas e penicilinas) e polimixina E, são fatores de risco para o desenvolvimento desta síndrome (MAGISTRALI et al., 2015).

Em ruminantes o *C. difficile* e TcdA e TcdB foram encontrados em bezerros com diarreia (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2006). Em bezerros o RT-126 e RT-033, são os mais observados (BLASI et al., 2021; MASARIKOVA et al., 2020; BANDEJI et al., 2018). Nos neonatos com diarreia a prevalência varia entre 19,9% a 7,6% (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2006; BANDEJI et al., 2018; MASARIKOVA et al., 2020; BLASI et al., 2021).

De acordo com a literatura consultada, há apenas um relato da presença do *C. difficile* em bezerros diarreicos no Brasil (SILVA et al., 2015). Existem estudos internacionais, avaliando a ocorrência, realizados na Itália (BLASI et al., 2021), República Tcheca (MASARIKOVA et al., 2020), Alemanha (SCHNEEBERG et al., 2013), Bélgica (RODRIGUEZ et al., 2013), Eslovênia (BANDEJI et al., 2018), Canadá, China (ZHANG et al., 2020), (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2006) e Estados Unidos (REDDING et al., 2021).

Os isolados de bezerros demonstram um maior perfil de resistência a antimicrobianos, em especial à vancomicina. Fármaco este que é uma das primeiras escolhas em casos de CDI em humanos (BLASI et al., 2011). Neste sentido estudos envolvendo trabalhadores rurais e bezerros observaram a presença dos mesmos ribotipos em ambos (BANDEJI et al., 2018).

2.6.4 *Clostridioides difficile* em cães e gatos

Em cães, a importância de *C. difficile* diarreicos ainda não é totalmente elucidada. Acreditava-se que o agente era responsável por casos de diarreia crônica recidivante em cães (BERRY; LEVETT, 1986; MARKS; KATHER, 2003) e síndrome hemorrágica aguda (CAVE et al., 2002). Todavia, estudos demonstram maior risco de colonização e infecção com estirpes toxigênicas de *C. difficile* em pacientes internados e sob antibioticoterapia (STRUBLE et al., 1994; CLOOTEN et al., 2008).

Os sinais clínicos da CDI em animais de companhia variam de uma apresentação subclínica e diarreia hemorrágica aguda e fatal. Manifestações de dor abdominal estão associadas a localização da lesão, seja no intestino delgado ou grosso (MARKS et al., 2011).

Estudos de ocorrência determinaram resultados baixos (1,2%) de isolamento de *C. difficile* em cães. Em cães com cinomose a imunossupressão não é capaz de aumentar o risco de CDI. Assim como outros patógenos, principalmente virais, em causar disbiose intestinal (SILVA et al., 2017).

Devido ao contato próximo entre cães e gatos com seus proprietários, imunossuprimidos ou não, a possibilidade de disseminação entres estes é elevada. O ribotipo 027 foi o mais observado nessas situações. Todavia, cepas patogênicas são descritas (WESSE et al., 2010). A presença de cepas altamente resistentes a antibióticos são relatadas em cães com a ausência de diarreia (FINSTERWALDER et al., 2022).

Em gatos os valores de prevalência variam entre 2,5 a 38,1% em animais saudáveis e diarreicos (WEESE, 2020). Especialmente em animais hospitalizados observaram-se valores próximos a 20%, com o isolamento intermitente em alguns indivíduos estudados. Os principais ribotipos foram 010 e 106 (CLOOTEN et al., 2008). Em animais diarreicos cepas toxigênicas foram observadas em gatos com quadros de diarreia aguda sem o histórico de utilização prévia de antimicrobianos (WESSE et al., 2001).

2.6.5 *Clostridioides difficile* em animais selvagens

O *C. difficile* foi isolado em inúmeras espécies selvagens, incluindo carnívoros, onívoros, herbívoros e insetívoros (BANDELJ et al., 2014; WEESE et al. 2020). No Brasil já foi descrita em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) com a observação de cepas patogênicas (A⁺B⁺) (SILVA et al., 2014).

A patogencidade do *C. difficile* em animais selvagens não é bem definida. Dados sobre a prevalência desta em animais de vida livre e sem outras alterações é um ponto crucial para a observação da sua participação

(ANDERSON et al., 2015; WEESE 2020). A infecção em animais de vida livre pode estar intimamente ligada aqueles que se aproximam da sociedade. Assim a contaminação por resíduos de antibióticos, contato com animais de produção e animais carreadores são pontos que podem estar associados a CDI nestes (SILVA et al., 2013; HIMSWORTH et al., 2014).

Marsupias e roedores de vida livre apresentam-se como carreadores do *C. difficile* entre áreas urbana e regiões de mata. A sua movimentação por áreas altamente povoadas e a presença de esporos do *C. difficile* nas suas fezes é um problema de saúde única (SANTANA et al., 2022).

A sua observação em ursos polares (*Ursus maritimus*) mantidos em cativeiro e em seu habitat natural demonstra a sua elevada capacidade de sobrevivência de seus esporos. Com a detecção da toxina A e do gene TcdB na maioria dos animais (WEESE et al., 2019).

Atualmente supõe-se que os animais selvagens atuem como carreadores para a CDI em animais e seres humanos. Estes são capazes de interligar regiões distantes do planeta e facilitar disseminação de ribotipos patogênicos e genes de resistência (WEESE, 2022).

3- OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência de *Clostridioides difficile* em fezes de animais selvagens acolhidos no CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu.

4- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a detecção de *C. difficile* e de suas toxinas utilizando a técnica de qPCR e o a cultura em anaerobiose e posterior detecção de suas toxinas por PCR convencional.

5. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista “*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*”, cuja as normas podem ser encontradas em <https://journals.sagepub.com/author-instructions/VDI>.

Detecção do *C. difficile*, toxinas A/B em animais silvestres

¹São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Clinical Science, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Alexandre Secorun Borges. ¹São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Clinical Science, Botucatu, São Paulo, Brazil. R. Dr. Valter Maurício Corrêa, s/n, Botucatu - SP, Brazil. alexandre.s.borges@unesp.br

Running head: *C. difficile* em animais selvagens

27 Abstract.

28 *Clostridioides difficile* é uma bactéria estritamente anaeróbica e formadora de esporos. Este
 patógeno está
 29 associado a quadros de diarreia (CDI) especialmente em seres humanos com histórico prévio
 30 da utilização de antimicrobianos. Sua presença em animais com problemas entéricos já foi
 31 descrita em equinos, cães, suínos e bovinos. Isolamentos em animais selvagens são descritos
 32 de forma escassa na literatura. Da mesma maneira estes podem atuar como reservatórios e/ou
 33 carreadores. O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de *C. difficile* nas
 34 fezes de animais selvagens e comparar duas técnicas de detecção. Foram colhidas amostras de
 35 100 animais de 34 espécies diferentes entre reptéis e mamíferos. Estas foram submetidas a
 36 qPCR para a detecção da presença do agente (16s) e de suas toxinas (*tcdA* e *tcdB*), e ao
 37 isolamento bacteriano anaeróbico e multiplex para detecção do perfil toxigêncio das colônias.
 38 Na qPCR observou-se 61% dos animais a presença do *C. difficile*, dessas uma foi positiva
 39 para *TcdA*, três para *TcdB* e 17 para ambas as toxinas. Foi possível o isolamento anaeróbico
 40 de 16% das amostras, sendo três isolados positivos para *TcdA* e *TcdB*. O *C. difficile* foi
 41 observado em diversas espécies de animais selvagens, assim como a presença de cepas
 42 toxigências. A técnica de qPCR apresentou maior positividade comparada ao isolamento
 43 bacteriano e a presença deste agente infeccioso nas fezes dos animais selvagens ressalta a
 44 importância destes como possíveis carreadores de infecção para animais de produção ou
 45 humanos.

46 **Key words:** *cdtA*; *cdtB*, qPCR, *Didelphis spp.*

47
 48 O *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbica, dispostas em bacilos,
 49 gram positiva, com capacidade de esporulação e formação biofilme e de produção de toxinas.
 50 O agente está associado a quadros de diarreia pseudomembranosa em seres humanos e
 51 animais (CZEPIEL et al. 2019; WEESE 2020). Geralmente *C. difficile* causa de diarreia em
 52 pacientes hospitalizados e sob antimicrobianos. A estes quadros dá-se o nome de infecção
 53 causada pelo *C. difficile* (CDI) (MASLENNIKOV et al., 2022). Nos últimos anos, a CDI foi
 54 relatada em pacientes jovens e sem histórico prévio de hospitalização ou tratamento com
 55 antibióticos. As suas principais toxinas são toxina A (*cdtA*) e B (*cdtB*) (ANJEWIERDNEN et
 56 al. 2020).

O *C. difficile*, causa diarreia aguda e letal em potros (SILVA et al., 2012), leitões (YAEGER et al., 2007) e colite profusa em equinos adultos (GOHARI et al., 2014). Apesar da descrição do agente em animais, a sua importância em felinos (WEESE et al., 2001; SCHNEEBERG, et al., 2012), caninos (WEESE et al., 2001; BUSCH et al., 2015) ainda não está adequadamente determinada.

Em animais selvagens a sua importância não está completamente elucidada (BANDELJ et al., 2014; SILVA et al., 2014; WEESE et al. 2020). Atualmente supõem-se que os animais selvagens possam atuar como carreadores para a CDI em animais domésticos e seres humanos. Isto ocorre pois estes são capazes de interligar regiões distantes e facilitar disseminação de ribotipos patogênicos e genes de resistência (HIMSWORTH et al., 2014; WILLIAMS et al., 2018 KRIJGER et al., 2019; WEESE et al.; 2019). Outro aspecto importante é a proximidade entre animais selvagens e humanos especialmente em áreas cercadas por matas. No Brasil existem poucos estudos sobre a presença do *C. difficile* em animais selvagens (SILVA et al. 2013; SILVA et al., 2014). O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *C. difficile* nas fezes de animais selvagens por meio da técnica de qPCR e isolamento, além de determinar a presença de suas principais toxinas.

Os procedimentos de coleta e o presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP - Protocolo CEUA 0088/2022. As colheitas foram realizadas adaptando-se a rotina de atividades diárias de alimentação, limpeza e manejo do CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens. As amostras foram colhidas durante o procedimento de manutenção do recinto ou no momento da admissão dos animais ao CEMPAS. Imediatamente após a colheita as amostras foram congeladas a -80°C. A extração de DNA foi feita a partir de 200 mg de fezes utilizando o kit E.Z.N.A™ Stool DNA Kit (PROMEGA® Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de qPCR para a detecção do gene 16S (MUTTERS et al.,

2009), *TcdA* e *TcdB* (KILIC et al., 2015) foram realizadas conforme descrito anteriormente utilizando GoTaq[®] Probe Master Mix (PROMEGA[®] Madison, Wisconsin, EUA).

Para realização do isolamento bacteriano nas amostras positivas na qPCR para o gene 16S do *C. difficile*, aproximadamente 1g de fezes foi submetido ao procedimento de enriquecimento, descrito anteriormente (SILVA et al., 2012;2013;2014). As colônias com morfologia sugestiva foram submetidas a multiplex PCR para detecção do gene *housekeeping* (*tpi*) e *TcdA* e *TcdB* (SILVA et al., 2011).

Foram analisadas 100 amostras de fezes de 34 espécies diferentes. E os resultados da identificação do *C. difficile* e as suas toxinas estão descritos na Tabela 1. As amostras foram colhidas entre os meses de junho a novembro de 2020. A técnica de qPCR detectou o agente em 61% das amostras de fezes. Destas 17 foram positivas para ambas as toxinas, 1 apenas para TcdA (Cachorro do mato - *Cerdocyon thous*) e três apenas para TcdB (Dragão-Barbado - *Pogona vitticeps*, Jaguaritica *Leopardus pardalis* e Tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla*). O isolamento sob condições de anaerobiose obteve 16% de recuperação de colônia de *C. difficile*. Na multiplex PCR das colônias amplificou-se o gene de ambas as toxinas em três animais (Dragão-Barbado - *Pogona vitticeps*, Raposinha do campo - *Lycalopex vetulus* e sagui *Callithrix sp*) sendo o restante amostras atoxigenicas.

Das 21 amostras dos gambas (*Didelphis* spp.) estudados, nove (42,86%) foram positivas para ambas a toxinas na qPCR. Este percentual é inferior aos observados por Bondo et al. (2019) em animais que habitavam granjas suínas utilizando a técnica de cultivo anaeróbico. A elevada ocorrência observada pode demonstrar um potencial disseminador das cepas de *C. difficile* por espécies próximas a centro urbanos (SILVA et al. 2014a; ZLENDER et al., 2022).

Outro marsupial observado, foi a Cuíca d'água (*Chironectes minimus*) com cepa toxigênica (A⁺B⁺) na qPCR. Esta é espécie de hábitos aquáticos e regiões de nascentes

(FERNANDEZ et al., 2015). A presença em outros marsupiais determina a sua participação da disseminação da CDI pois estes atuam como reservatórios (SANTANA et al., 2022). Pequenos mamíferos atuam como sentinelas de outras doenças bacterianas (FURNESS et al., 2017).

No presente estudo foram observadas sete espécies estritamente carnívoras (Cachorro-do-mato - *Cerdocyon thous*, Gato-do-mato pequeno - *Leopardus tigrinus*, Gato-mourisco - *Puma yagouaroundi*, Jaguaritica - *Leopardus pardalis*, Lobo-guará - *Crysocyon brachyurus*, onça parda - *Puma concolor* e Raposinha do campo - *Lycalopex vetulus*). Em todas estas espécies foi realizado o isolamento *C. difficile* em pelo menos um dos animais em ambas as técnicas. Destes 22 animais estudados, em 15 (68,18%) e quatro (18,18%) foi possível isolar o patógeno ocorreu apenas em quatro oportunidades (TcdA: Cachorros-do-mato - *Cerdocyon thous*, TcdB: Jaguaritica - *Leopardus pardalis*; TcdA e TcdB: Onça parda- *Puma concolor* e Raposinha do campo *Lycalopex vetulus*). É interessante observar que destes 4 apenas a Raposinha do Campo teve cultivo positivo com presença de isolados produtores de toxinas. Valores inferiores de ocorrência de isolamentos em carnívoros selvagens foi descrita por SILVA et al. (2014b). Assim como no presente estudo também foi possível isolar o patógeno em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), sendo esta amostra considerada toxigênica (A⁺B⁺) ribotipo 046 (SILVA et al., 2013).

Apesar do baixo valor amostral, apenas em um indivíduo, houve a identificação de uma cepa toxigência (A⁺B⁺) em rato (*Mus musculus*) na qPCR. Estes animais aparecem como possíveis carreadores da CDI entre animais e seres humanos, uma vez que a maioria dos isolados desses animais são toxigenicos virulentos (WILLIAMS et al., 2018) e atuam como reservatórios para ribotipos com perfil de resistência elevado (HIMSWORTH et al., 2014; KRIJGER et al., 2019).

No presente estudo a ocorrência de cepas toxigênicas de *C. difficile* em animais selvagens mantidos em um centro de recuperação, pela técnica de qPCR, foi superior ao descrito por Jardine et al. (2013) em animais selvagens que habitavam fazendas de produção animal. Nesta ocasião todas as amostras foram A⁺B⁺.

Seis amostras de fezes de ouriços (Ouriço - *Erinaceus roumanicus* e ouriço cacheiro *Sphiggurus villosus*) foram negativas em ambas as técnicas. Este resultado difere do observado por Izquierdo-Rodriguez et al., (2020) onde 33% dos ouriços da espécie *Atelerix algirus* localizados nas Ilhas Canárias foram positivos, porém todos apresentavam diarreia.

Não se realizou a identificação do *C. difficile* e suas toxinas, por nenhum um dos meios diagnósticos, em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e lebres (*Lepus europaeus*). A pesquisa pela referida bactéria em coelhos oriundos de sistema de produção intensivo, observou-se a incidência de 3% com a presença de cepas toxigênicas (RT-014/020, RT-078, RT-012) (DRIGO et al., 2015).

Dentre as espécies de répteis (Dragão-barbado - *Pogona vitticeps*, Gecko *Eublepharis macularius*, Jabutu-piranga - *Chelonoidis carbonária*, jiboia - *Boa constrictor constrictor*, Píton - *Python molurus*, Teiu - *Tupinambis merianae*) (n=19), observou-se duas amostras A⁺B⁺ em jiboias (*Boa constrictor constrictor*) e uma A⁺B⁻ (Dragão-barbado – *Pogona vitticeps*), pela técnica de qPCR e pesquisa de toxinas no isolado. Os resultados são semelhantes aos observados por Ramos et al. (2019) no Brasil e Andrés-Lasheras et al. (2018) na Espanha.

A observação de um perfil toxigênico A⁻B⁺ no tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) pela técnica de qPCR não é comumente observada em animais e seres humanos (PENG et al., 2018; WEESE, 2020). Quando submetida a técnica de cultivo e multiplex PCR os resultados obtidos foram, A⁻B⁻ e negativo, respectivamente.

Os principais limitantes deste estudo são a impossibilidade da obtenção de informações epidemiológicas dos animais estudados devido as questões operacionais. Assim como a não realização da ribotipagem das cepas isoladas e determinação do perfil de sensibilidade. A dificuldade na obtenção de grupos distintos de espécies selvagens altera a interpretação dos dados. Estudos posteriores são essenciais para a determinação dos animais selvagens como reservatórios. O *C. difficile* é observado em diversas espécies de animais selvagens, assim como cepas toxigênicas. A técnica de PCR se mostrou mais sensível para a detecção do *C. difficile* e suas toxinas nas amostras de animais selvagens.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Referencies

1. Andrés-Lasheras S, et al. Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. BMC Vet Res 2018;14:78-72.
2. Anjewierden S, et al. Risk factors for *Clostridioides difficile* colonization among hospitalized adults: A meta-analysis and systematic review. Infection Control Hospitalization Epidemiology 2021,42:565-572.
3. Bandeji P, et al. Quantification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in feces of calves of different age and determination of predominant *Clostridioides difficile* ribotype 033 relatedness and transmission between family dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat analysis. BMC Veterinary Research 2018,14: 1616-1618.

4. Bondo KJ, et al. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, and anti-microbial resistant *Escherichia coli* in the faeces of sympatric meso-mammals in southern Ontario, Canada. *Zoonoses and Public Health* 2019;66:406-416.
5. Busch K, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dog. *Veterinary Records* 2015;173:1-5.
6. Czepiel J, et al. *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infections diseases* 2019;38:1211-1221.
7. Drigo I, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Vet Microbiol* 2015;18:3-4.
8. Drigo I, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Vet Microbiol* 2015;181: 3-4.
9. Fernandez FAS et al. Natural history of the water opossum *Chironectes minimus*: a review. *Oecologia Australis* 2015;19:47-62.
10. Furness LE, et al. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environmental Research* 2017;154:28-34.
11. Gohari IM, et al. Characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of adult horses and foals with acute enterocolitis. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2014;78:1-7.
12. Himsworth CG, et al. Carriage of *Clostridium difficile* by Wild Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*) and Black Rats (*Rattus rattus*). *Appl Environ Microbiol* 2014;80:1233-1305.
13. Himsworth CG, et al. Carriage of *Clostridium difficile* by wild wrban norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Applied and Environmental Microbiology* 2014;80:1299-1305.

14. Izquierdo-rodriguez E, et al. Study of Zoonotic Enteric Pathogens of *Atelerix algirus* in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Front. Vet. Sci* 2020;8:1-4.
15. Jardine CM, et al. Detection of *Clostridium difficile* in Small and Medium sized Wild Mammals in Southern Ontario, Canada. *BioOne* 2013;49:418-421.
16. Krijger IM, et al. *Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands. *Letters in Applied Microbiology* 2019;96:35-40.
17. Kilic A, et al. Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. *Ann Lab Med* 2015;35:306-313.
18. Loo VG, et al. Household transmission of *Clostridium difficile* to family members and domestic pets. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2016;37:1342–1348, 2016.
19. Maslennikov R, et al. *Clostridioides difficile* co-infection in patients with COVID-19. *Future Microbiology* 2022,1:1-11.
20. Mutters R, et al. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction. *J. Hosp Infec* 2009;71:43-48.
21. Peng Z, et al. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerging Microbes & Infections* 2018;7:1-15.
22. Ramos C.P, et al. Identification and characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. *Biomed Res Int* 2019;1:1-9.
23. Santana JA, et al. *Clostridioides difficile* and multi-drug-resistant staphylococci in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. *Vet Microbiol* 2022;53:401-410.
24. Silva ROS, et al. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe* 2014;30:99-101.

- 228 25. Silva ROS, et al. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore
229 species in Brazil. *Anaerobe* 2014;28:207-211.
- 230 26. Silva ROS, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus*
231 *pardalis*). *Anaerobe* 2013;20:82-84.
- 232 27. Silva ROS, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus*
233 *pardalis*). *Anaerobe* 2013;20: 82-84, 2013.
- 234 28. Silva ROS, et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and
235 *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Veterinary Journal* 2012;45: 671-675.
- 236 29. Silva ROS, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from
237 piglets in Brazil. *Cienc. Rural* 2011;41:1130-1135.
- 238 30. Silva ROS, et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in
239 foals in Brazil. *Cienc Rural* 2012;42:1-4.
- 240 31. Weese JS, et al. *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* shedding by polar bears (*Ursus*
241 *maritimus*) in the Canadian Arctic. *Anaerobe* 2019;57:35-38.
- 242 32. Weese JS, et al. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *J Am*
243 *Vet Med Assoc* 2001;218:1436-1439.
- 244 .
- 245 .

DISCUSSÃO GERAL

Das 21 amostras dos gambas (*Didelphis spp*) estudados, nove (42,86%) foram positivas para ambas as toxinas na qPCR. Estes resultados são inferiores aos observados por Bondo et al. (2019) em animais que habitavam granjas suínas utilizando a técnica de cultivo anaeróbico. A elevada ocorrência observada pode demonstrar um potencial disseminador das cepas de *C. difficile* por espécies próximas a centros urbanos (SILVA et al. 2014a; ZLENDER et al., 2022)

Outro marsupial observado, foi a Cuíca d'água (*Chironectes minimus*) com cepa toxigênica (A⁺B⁺) na qPCR. Esta é espécie de hábitos aquáticos e regiões de nascentes (FERNANDEZ et al., 2015). A presença em outros marsupiais determina a sua participação da disseminação da CDI pois estes atuam como reservatórios (SANTANA et al., 2022). Pequenos mamíferos atuam como sentinelas de outras doenças bacterianas (FURNESS et al., 2017). Desta forma a elevada presença nestes podem favorecer o desenvolvimento de mutações.

No presente estudo foram observadas sete espécies estritamente carnívoras (*Cerdocyon thous*, *Leopardus tigrinus*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus pardalis*, *Crysocyon brachyurus*, *Puma concolor* e *Lycalopex vetulus*). Em todas estas espécies foi realizado o isolamento *C. difficile* em pelo menos um dos animais em ambas as técnicas. Dos 22 animais estudados, em 15 (68,18%) e quatro (18,18%) foi possível isolar o patógeno pelas técnicas qPCR e isolamento, respectivamente. Todavia, detecção de cepas patogênicas ocorreu apenas em quatro oportunidades (TcdA: *Hydrochoerus hydrochaeris*, TcdB: *Leopardus pardalis*; TcdA e TcdB: *Puma concolor* e *Lycalopex vetulus*). Valores inferiores de ocorrência de CDI em carnívoros selvagens (SILVA et al. 2014b). Assim como no presente estudo também foi possível isolar o patógeno em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Está foi considerada toxigênica (A⁺B⁺) ribotipo 046 (SILVA et al., 2013).

Apesar do baixo valor amostral, apenas um indivíduo, houve a identificação de uma cepa toxigênica (A⁺B⁺) em rato (*Mus musculus*). Estes animais aparecem como possíveis carreadores da CDI entre animais e seres

humanos, uma vez que a maioria dos isolados desses animais são toxigênicos virulentos (WILLIAMS et al., 2018) e atuam como reservatórios para ribotipos com perfil de resistência elevado (HIMSWORTH et al., 2014; KRIJGER et al., 2019).

No presente estudo a ocorrência de cepas toxigênicas de *C. difficile* em animais selvagens mantidos em um centro de recuperação, pela técnica de qPCR, foi superior ao descrito por Jardine et al., (2013) em animais selvagens que habitavam fazendas de produção animal. Nesta ocasião todas as amostras foram A⁺B⁺.

Seis amostras de fezes de ouriços (*Erinaceus roumanicus* e *Sphiggurus villosus*) foram negativas em ambas as técnicas. Este resultado difere do observado por Izquierdo-Rodriguez et al., (2020). Nesta ocasião 33% dos ouriços da espécie *Atelerix algirus* com diarreia localizados nas Ilhas Canárias foram positivos.

Não se realizou a identificação do *C. difficile* e suas toxinas, por nenhum um dos meios diagnósticos, em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e lebres (*Lepus europaeus*). A pesquisa pela referida bactéria em coelhos oriundos de sistema de produção, observou-se a incidência de 3% com a presença de cepas toxigênicas (RT-014/020, RT-078, RT-012) (DRIGO et al., 2015).

Os principais limitantes deste estudo são a impossibilidade da obtenção de informações epidemiológicas dos animais estudados devido às questões operacionais. Assim como a não realização da ribotipagem das cepas isoladas e determinação do perfil de sensibilidade. A dificuldade na obtenção de grupos distintos de espécies selvagens altera a interpretação dos dados. Estudos posteriores são essenciais para a determinação dos animais selvagens como reservatórios do *C. difficile*.

CONCLUSÕES GERAIS

O *C. difficile* é observado em diversas espécies de animais selvagens, assim como cepas toxigênicas. A técnica de PCR se mostrou mais sensível para a detecção do *C. difficile* e suas toxinas nas amostras de animais selvagens.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GIL, M.Y.; THOMAS, P.; SCHMOOCK, G.; EL-AZM, K.A.; WIELER, L.H.; NEUBAUER, H.; SEYBOLDT, C. Presence of *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat in Egypt. *Anaerobe*, v.51, n.1, p.21-25, 2018.
- AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; JANK, T. *Clostridium difficile* toxin biology. *Annual Review of Microbiology*, v.71, n.1, p.281–307, 2017.
- ANDERSON C.E.; HAULENA, M.; ZABEK, E.; HABING, G.; RAVERTY, S. Clinical and epidemiologic considerations of *Clostridium difficile* in harbor seals (*Phoca vitulina*) at a marine mammal rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife medicine*, v.42, n.2, p.191-197, 2015.
- ANDINO-MOLINA, M.; BARQUERO-CALVO, E.; SEYBOLDT, C.; SCHMOOCK, G.; NEUBAUER, H.; TZOC, E.; RODRIGUES, C.; GOMEZ, C.Q. Multidrug-resistant *Clostridium difficile* ribotypes 078 and 014/5-FLI01 in piglets from Costa Rica. *Anaerobe*, v.55, n.1, p.78-82, 2019.
- ANDRÉS-LASHERAS, S.; MARTÍN-BURRIEL, I.; MAINAR-JAIME, R.C.; MORALES, M.; KUIJPER, E.; BLANCO, J.L.; CHIRINO-TREJO, M.; BOLEA, R. Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. *BMC Veterinary Research*, v.14, n.77, p.1-5, 2018.
- ANJEWIERDEN, S.; HAN, Z.; BROWN, A.M.; DONSKEY, C.J.; DESHPANDE, A. Risk factors for *Clostridioides difficile* colonization among hospitalized adults: A meta-analysis and systematic review. *Infection Control Hospitalization Epidemiology*, v.42, n.5, p.565-572, 2021.
- ARROYO, L.G.; KRUTH, S.A.; WILLEY, B.M. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal Medicine Microbiology* v.54, p.163-166, 2005.
- AWAD, M.M.; JOHANESSEN, A.; CARTER, G.P.; ROSE, E.; LYRAS, D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, v.5, n.5, p.579–593, 2014.

BANDELJ P.; TRILAR, T.; BLAGUS, R.; OCEPEK, M.; ROUSSEAU, J.;
WEESE, J.C.; VENGUST, M. Prevalence and molecular characterization of
Clostridium difficile isolated from European Barn Swallows (*Hirundo rustica*)
during migration. *BMC Veterinary Research*, v.40, n.10, p.1-4, 2014

BANDELJ, P.; HARMANUS, C.; BLAGUS, R.; COTMAN, M.; KUIJPER, E.J.;
OCEPEK, M.; VENGUST, M. Quantification of *Clostridioides (Clostridium)*
difficile in feces of calves of different age and determination of predominant
Clostridioides difficile ribotype 033 relatedness and transmission between family
dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *BMC*
Veterinary Research, v.1, n.14, p.298-306, 2018.

BARKETI-KLAI, A.; MONOT, M.; HOYS, S.; BORDES, S.L.; KUENE, S.A.;
MINTO, N.; COLLIGNON, A.; DUPUY, B.; KANSUN, I. The flagellin FliC of
Clostridium difficile is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo
infection. *PLoS ONE*, v.9, n.5, p.96876, 2014.

BARTLETT, J.G. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-
associated enteric disease. *Annals of Internal Medicine*, v.145, n.21, p.758-
764, 2006.

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

BÄVERUD, V.; *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses.
Veterinary Clinician of the North America: Equine Practice, v.20, p.615-630, 2014.

BERRY, A. P.; LEVETT, P. N. Chronic diarrhea in dogs associated with
Clostridium difficile infection. *The Veterinary Record*, v.118, n.4, p.102-3, 25,
1986.

BLASI, F.; LOVITO, C.; ALBINI, E.; BANO, L.; DALMONTE, G.; DRIGO, I.;
MARESCA, C.; MASSACCO, F.R.; ORSINI, S.; PRIMAVILLA, S.; SCOCCI, E.;
TOFANI, S.; FORTE, C.; MAGISTRALI, C.H. *Clostridioides difficile* in Calves in
Central Italy: Prevalence, Molecular Typing, Antimicrobial Susceptibility and
Association with Antibiotic Administration. *Animals*, v.11, n.2, p.1-15, 2021.

BONDO, K.J.; PÉROLA, D.L.; REID-SMITH, R.J.; PARMELEY, E.J.; WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; TABOADA, E.; MUTSCHALL, S.; JARDINE, C.M. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, and anti-microbial resistant *Escherichia coli* in the faeces of sympatric meso-mammals in southern Ontario, Canada. *Zoonoses and Public Health*, v.66, n.4, p.406-416, 2019.

BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, v.146, n.6, p.1547–53, 2014.

BURKE, D.E.; LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. *Gut Liv*, v.8, n.1, 1-6, 2014.

BUSCH, K.; SUCHODOLSKI, J.S.; KUHNER, K.A.; MINAMOTO, Y.; MULLER, R.S.; HARTMANN, K.; UNTERER, S. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dog. *Veterinary Records*, v.173, n.253, p.1-5, 2015.

CARVALHO, G.M.; RAMOS, C.P.; LOBATO, F.C.F.; GUEDES, R.M.C.; GIARETTA, P.R.; SILVA, R.O.S. Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. *Anaerobe*, v.75, n.1, p.1-5, 2022.

CATALDO, M.A.; GRANATA, G.; D'AREZZO, S.; TORNIELLO, G.; VULCANO, A.; GIULI, C.D.; MELANDRI, M.; CARO, A.D.; PETROSILLO, N. Hospitalized patients with diarrhea: Rate of *Clostridioides difficile* infection underdiagnosis and drivers of clinical suspicion. *Anaerobe*, v.70, n.10, p.1-12, 2021.

CAVE, N.J.; MARKS, S.L.; KASS, P.H.; MELLI, A.C.; BROPHY, M.A. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of America Veterinary Mededical Association*, v.221, n.1, p.52-59, 2002.

CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D.B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. The role of toxin in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Reveviw*, v.41, n.6, p.723-750, 2017.

CLOOTEN, J.; KRUSTH, S.; ARROYO, L.; WEESE, J.S. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Veterinary Microbiology*, v.129, n.1-2, p.209-214, 2008.

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. *Veterinary Microbiology*, v.129, n.2, p.209-214, 2008.

CROBACH, M.J.; VERNON, J.J.; LOO, V.G.; KONG, L.Y.; PÉCHINÉ, S.; WILCOX, M.H.; KUIJPER, E.J. Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clinical Microbiology Review*, v.31, n.2, p.1-87, 2018.

CZEPIEL, J.; DRÓZDZ, M.; PITUCH, H.; KUIJPER, E.J.; PERUCKI, W.; MIELIMONKA, A.; GOLDMAN, S.; WULTÁNSKA, D.; GARLICKI, A.; BIESIADA, G. *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious diseases*, v. 38, n.7, p.1211-1221, 2019

DABARD, J.; DUBOS, F.; MARTINET, L.; DUCLUZEAU, R. Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infection and Immunity*, v.24, n.1, p.7–11, 1979.

DELMÉE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology Infections*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

DESAI, K.; GUPTA, S.B.; DUBBERKE, E.R.; PRABHU, V.S.; BROWNE, C.; MAST, T.C. Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States: estimates from a modeling approach. *BMC Infectious Diseases*, v.303, n.1, p.1-5, 2017.

DINIZ, A.M.; MOURA, L.N.F.; CRUZ, D.S.G.; OLIVEIRA JÚNIOR, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CUNHA, J.L.C., VILELA, E.G.; KUIJPER, E.J., WILCOX, M.H.; LOBATO, F.C.; SILVA, R.O.S. Characterization of the virulence of three novel clades 2 *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains and a two-year screening in animals and humans in Brazil. *Plos One*, v.17, n.8. p.1-13, 2022.

DRIGO, I.; MAZZOLINI, E.; BACCHIN, C.; TONON, E.; PIUATTI, C.; BANO, L.; SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; AGNOLETTI, F. Molecular characterization and

antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Veterinary Microbiology*, v.181, n.31, p.3-4, 2015.

ELLIOTT, B.; ANDROGA, G.O.; KNIGHT, R.; RIELY, T.V. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infections, Genetics and Evolution*, v.49, n.1, p.1-11, 2017.

FERNANDEZ, F.A.S.; GALLIEZ, M.; LEITE, MS.; QUEIROZ, T.L.; PALMERIM, A.F. natural history of the water opossum *Chironectes minimus*: a review. *Oecologia Australis*, v.19, n.1, p.47-62, 2015.

FINSTERWALDER, S.K.; LONCARICO, I.; CABAL, A.; SXOSTAK, M.P.; BARF, L.M.; MARZ, M.; ALLEBERG, F.; BURGNER, I.A.; TICHY, A.; SCHWARTZ, S.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; RUPPITSCH, W.; SPERFGSER, J.; KUNZEL, F. Dogs as carriers of virulent and resistant genotypes of *Clostridioides difficile*. *Zoonoses Public Health*, v.69, n.8, p.673-681, 2022.

FURNESS, L.E.; CAMPEBELL, A.; ZHANG, L.; GAZE, W.H.; McDONALD, R.A. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environmental Research*, v.154, n.1, p.28-34, 2017.

GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; RUPINIK, M.; AKTORIES, K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, v.5, n.1, p.15–27, 2014.

GIL, F.; LAGOS-MORANGA, S.; CÁLDERON-ROMERO, P.; PIZARRO-GUAJARDO, M. Updates on *Clostridium difficile* spore biology. *Anaerobe*, v.45, p.3–9, 2017.

GOHARI, I.M.; ARROYO, L.; MACLNNES, J.I.; TIMONEY, J.F.; PARREIRA, V.R. Characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of adult horses and foals with acute enterocolitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.78, n.1, p.1-7, 2014.

GONÇALVES, C.; DECRÉ, D.; BARBUT, F.; BURGHIFER, B.; PETIT, J.C. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP ribosyl transferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.5, p.1933-1939, 2004.

GRZESKOWIAK, L.; VALLESPÍN, B.M.; DADI, T.H.; RADLOFH, J.; AMASHEH, S.; HEINSEN, F.A.; FRANCO, A.; REINERT, K.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J.

Formula Feeding Predisposes Neonatal Piglets to *Clostridium difficile* Gut Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v.219, n.9, p.1-9, 2018.

GUERRANT, R. L.; STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; BOBAK, D. A. How intestinal bacteria cause disease. *The Journal of Infection Diseases*, v.179, 331-337, 1999.

GUPTA A, KHANNA S. Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat. *Infection Drug Resistance*, v.7, n. 1, p.63-72, 2014.

GÜRTLER, V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *Journal Genetical Microbiology*, v.139, n.12, p.3089-3097, 1993.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infant. *American Journal of Diseases of Children*, v.49, n.2, p.390, 1935.

HENSGENS, M. P. M.; KEESEN, E.C.; SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V.; KOENE, M.G.; BOER, E.; LIPMAN, L.J.A.; KUIJPER, E.J.; *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 635–645, 2012.

HIMSWORTH, C.G.; PATRICK, D.M.; MAK, S.; JARDINE, C.M.; WEESE, J.C. Carriage of *Clostridium difficile* by Wild Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*) and Black Rats (*Rattus rattus*). *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, n.4, p.1299-1305, 2014.

HOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World JOURNAL Gastroenterology*, v.15, n.13, p.1554-80, 2009.

HOPMAN, N.E.M.; KEESEN, E.C.; HARMANUS, C.; SANDRES, I.M.; LEENGOED, A.M.G.; KUIJPER, E.J.; LIPMAN, L.J.A. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, v.149, n.1-2, p.186-192, 2011.

HRYCKOWIAN, A.J.; PRUSS, K.M.; SONNENBURG, J.L. The emerging metabolic view of *Clostridium difficile* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v.35, n.1, p.42-47, 2017.

IZQUIERDO-RODRIGUEZ, E.; CARRILO, N.M.; VALLADARES, B.; FORONDA, P. Study of Zoonotic Enteric Pathogens of *Atelerix algirus* in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Frontiers Veterinary Science*, v.8, n.1, p.1-4, 2020.

JACOBS, A.; BARNARD, K.; FISHEL, R.; GRANDON, J.D. Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections: Presentation of 2 cases and review of the literature. *Medicine*, v.80, n.1, p.88-101, 2001.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, v.37, p.13–24, 2016.

JARDINE, C. M.; REID-SMITH, R.J.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild infection. *Journal of Clinical Pathology*, v.36, n.1, p.84–87, 1983.

JARDINE, C.M.; REID-SMITH, R.J.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Detection of *Clostridium difficile* in Small and Mediumsized Wild Mammals in Southern Ontario, Canada. *BioOne*. v.49, n.2, p.418-421, 2013.

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. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infection Diseases*, v.14, n.7, p.1039- 45, 2008.

JONES, G. F.; WARD, G.E; MURTAUGH, M. P.; LIN, G.; GEBHART, C. J. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.31, n.10, p.2611-2615, 1993.

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

KATO, N.; OU, C. Y.; KATO, H.; BARTLEY, S. L.; BROWN V. K.; DOWELL Jr, V. R.; UENO, K. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.29, p.33-37, 1991.

KEESSEN, E. C.; HARMANUS, C.; DOHMEN, C.; KUIJPER, E.; LIPMAN, L.J.A. *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, n.6, p.1032–1034, 2013.

KING, A.M.; MACKIN, K.E.; LYRAS, D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. *Future Microbiology*, v.1, n.10, p.1–4, 2015

KNIGHT, D.R.; SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V. Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.52, n.11, p.3856–62, 2014.

KNIGHT, D.R.; RILEY, T.V. Prevalence of gastrointestinal *Clostridium difficile* carriage in australian sheep and lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, v.79, n.18, p.5689-5692, 2013.

KOCIOLEK, L.K.; GERDING, D.N. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nat. Rev. Gastroenterology Hepatology*, v.13, n.1, p.150-160, 2016.

KOENIGSKNECHT, M.J.; THERIOT, C.M.; BERGIN, I.L.; SCHUMACHER, C.A.; SCHLOSS, P.D.; YOUNG, V.B. Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, v.83, n.3, p.934–941, 2015.

KRIJGER, I.M.; MEERBURG, B.G.; BURT, S.A. *Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands. *Letters in Applied Microbiology*, v.96, n.1, p.35-40, 2019.

KYNE, L.; WARNY, M.; QAMAR A.; KELLY, C.P. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*, v.357, n.1, p.189–193, 2007.

LAWSON, P.A.; CITRON, D.M.; TYRREL, K.L.; FINEGOLD, S.M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, v.40, p.95–99, 2016.

LIM, S.C.; KNIGHT, D.R.; RILEY, T.V.; *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology ad infection*, v.26, n.7, p.857-863, 2020.

LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L. Effects of *Clostridium difficile* toxins a and b in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infection and Immunity*, v.56, n.3, p. 582-588, 1988.

LOO, V.G.; BRASSARD, P.; MILLER, M.A. Household transmission of *Clostridium difficile* to family members and domestic pets. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v.37, n.11, p.1342–1348, 2016.

LYERLY, D.M.; NEVILLE, L.M.; EVANS, D.T. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.1, p.184-190, 1998.

MAGISTRALI, C.F.; MARESCA, C.; CUCCU, L.; BANO, L.; DRIGO, I.; FILIPPINI, G.; DETTORI, A.; BROCCATELLI, S.; PEZZOTI, G. Prevalence and risk factors associated with *Clostridium difficile* shedding in veal calves in Italy. *Anaerobe*, v.33, n.1, p.42-47, 2015.

MARKS, S.L.; RANKIN, S.C.; BYRNE, B.A.; WEESE, J.S. Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.25, n.6, p.1195-1208, 2011.

MARTIN, J.S.H.; MONAGHAN, T.M.; WILCOX, M.H. *Clostridium difficile* infection: mammals in Southern Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, v.49, n.2, p.418–421, 2013.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A.; CAMACHO-ORTIZ, A.; MORFIN-OTERO, R.; JÉSUS, H.; TREVINO, L.V.; GONZALEZ, E.G. Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *World Journal of Gastroenterology*, v.23, n.9, p.1552–1567, 2017.

MARTIROSSIAN G.; SOKOŁ-LESZCZYŃSKA B, MIERZEJEWSKI J. Occurrence of *Clostridium difficile* in the digestive system of dogs. *Medycyna Doswiadczalna I Microbiologia*, v.44, p.49–54, 1992.

MASARIKOVA, M.; SIMKOVA, I.; PLESKO, M.; ERETOVA, V.; KRUTOVA, M.; CIZEK, A. The Colonisation of Calves in Czech Large-Scale Dairy Farms by Clonally-Related *Clostridioides difficile* of the Sequence Type 11 Represented by Ribotypes 033 and 126. *Microorganisms*, v.8, n.6, p.1-9, 2020.

MASLENNIKOV, R.; IVASHKIN, V.; UFTIMTSEVA, A.; POLUEKTOVA, E.; ULYANIN, A. *Clostridioides difficile* co-infection in patients with COVID-19. *Future Microbiology*, p.1-11, 2022

McDONALD, L.C.; GERDING, D.N.; JOHNSON, S.; BAKKEN, J.S.; CARROLS, K.C.; COFFIN, S.E.; DURBERKE, E.R.; GAREY, K.W.; GOULD, C.V.; KELLY, C.; LOO, V.; SAMMONS, J.K.; SANDORA, T.S.; WILCOX, M.H. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, v.66, n.7, p. 1–48, 2018.

MULLIGAN, M.E. Epidemiology of *Clostridium difficile*-induced intestinal disease. *Reviews of Infectious Diseases*, v.6, n.1, p. 222-228, 1984.

NATARAJAN, M.; WALK, S.T.; YOUNG, V.B.; ARONOFF, D.M. A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, v.22, n.734, p.1–5, 2013.

OREN, A.; GARRITY, G.M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.66, n.9, p.3761–3764, 2016.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J.A. *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, v.22, n.7, p.406–416, 2014.

PENG, Z., LING, L.; STRATTON, C.W., LI, C.; POLAGE, C.R.; WU, B.; TANG, Y. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerging Microbes & Infections*, v.7, n.7, p.1-15, 2018.

PENICHE, A.G.; SAVIDGE, T.C.; DANN, S. Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. *Infectious Diseases*, v.26, n.5, p.447-453, 2013.

PENICHE, A.G.; SAVIDGE, T.C.; DANN, S. Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. *Infectious Diseases*, v.26, n.5, p.447-453, 2013.

PLANCHE, T.; AGHAIZU, A.; HOLLIMAN, R.; RILEY, P.; POLONIECKI, I.; BREATNACH, A.; KRISHNA, S. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases*, v.8, n.12, p.777-84, 2008.

RAMOS, C.P.; DINIZ, A.N.; LEITE, S.M.; LOBATO, F.C.F.; PEREIRA, S.T.; RENNÓ, M.C.; FERREIRA, E.O.; SILVA, R.O.S. Evaluation of an immunochromatographic test for the detection of glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in dogs. *Veterinary Microbiology*, v.52, n.1, p.2555-2558, 2021.

RAMOS, C.P.; SANTANA, J.A.; COURA, F.M.; XAVIER, R.G.C.; LEAL, C.A.G.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella Spp.*, *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. *Biomed Research Internal*, p.1-9, 2019.

REDDING, L.; HUANG, E.; RYAVE, J.; WEBB, T.; BARNHART, D.; BAKER, L.; BENDER, J.; KRISTULA, M.; KELLY, D. *Clostridioides difficile* on dairy farms and potential risk to dairy farm workers. *Anaerobe*, n.1, v.69, p.1-5, 2021.

RILEY, T.V.; ADAMS, J.E.; O'NEILL, G.L.; BOWMAN, R.A. Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiology Infections*, v.107, n.3, p.659- 665, 1991.

RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; BROECK, J.V.; DAUBE, G. *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.932, n.1, p.65-92, 2016.

RODRIGUEZ-PALÁCIOS, A.; STAEMPFLI, H.R.; DUFFIELD, T.; PEREGRINE, A.W.S.; TROTZ-WILLIAMS, L.A.; ARROYO, L.G.; BRAZIER, J.S.; WEESE, J.S. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, n.11, p.1730-1736, 2006.

RUPNIK, M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection*, v.13, n.5, p.457–459, 2005.

SAMIE, A.; OBI, C.L.; FRANASIAK, J.; PANNONE, L.A.; BESSONG, P.O.; WARREN, C.A.; GUERRANT, R.L. PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (tpi), toxin A (tcdA), toxin B (tcdB), binary toxin (cdtA, cdtB), and tcdC genes in Vhembe District, South Africa. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. v.78, n.4, p.577-585, 2008.

SANTANA, J.A.; COLOMBO, S.A.; SILVA, B.A.; OLIVEIRA, L.R.A.A.; LOBATO, F.C.F.; TRINDADE, G.S.; PAGLIA, A.P. SILVA, R.O.S. *Clostridioides difficile* and multi-drug-resistant *staphylococci* in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1, p.401-410, 2022.

SCHNEEBERG, A.; RUPNIK, M.; NEUBAUER, H.; SAYBOLDT, C. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, v.18, n.5, p.484-488, 2012.

SCHNEEBERG, A.; RUPNIK, M.; NEUBAUER, H.; SAYBOLDT, C. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, v.18, n.5, p.484-488, 2012.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T.; VAN HAM, M.; ROHDE, M.; HARDT, W.D.; WEHLAND, J.; AKTORIES, K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*, v.5, p. 1-10, 2009.

SHOLEH, M.; KRUTOVA, M.; FOROUZESH, M.; MIRONOV, S.; SADEGHIFARD, N.; MOLAEIPOUR, L.; MALEKI, A.; KOUHSARI, E. Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from

humans: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance Infection Control*, v.25, n.9, p.815-850, 2020.

SHRESTHA, R.; SORG, J. A. Hierarchical recognition of amino acid co-germinants during *Clostridioides difficile* spore germination. *Anaerobe*, v.49, p.41–47, 2018.

SILVA, R.O.S.; VILELA, E.G.; NEVES, M.S; LOBATO, F.C.F.Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.47, n.4, p.447–450, 2014.

SILVA, R.O.S.; ALMEIDA, L.R.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; SOARES, D.F.M.; PEREIRA, P.L.L.; RUPNIK, M.; LOBATO, F.C.F. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe*, v.30, n.1, p.99-101, 2014.

SILVA, R.O.S.; D'ÉLIA, M.L.; SOARES, D.F.M.; CAVALCANTI, A.R.; LEAL, R.C.; CAVALCANTI, R.; PEREIRA, P.L.L.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, n.1, p.82-84, 2013.

SILVA, R.O.S.; D'ELIA, M.L.; TEIXEIRA, E.P.T.; PEREIRA, P.L.L.; SOARES, D.F.M.; CAVALCANTI, A.R.; KOCUVAN, A.; RUPNIK, M.; SANTOS, A.L.Q.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe*, v.28, n.1, p.207-211, 2014.

SILVA, R.O.S.; DORELLA, F.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; COSTA, E.A.; PELÍCIA, V.; RIBEIRO, B.L.D.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. *Anaerobe*, v.48, n.1, p.66-69, 2017.

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.1-4, 2012.

SILVA, R.O.S.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S.; BORGES, A.S.; MARANHÃO, R.P.A.; SILVA, M.X.; LUCAS, T.M.; OLIVIO, G.; LOBATO, F.C.F. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Veterinary Journal*, v.45, n.1, p.671-675, 2012.

SILVA, R.O.S.; SOARES, M.L.D.D.F.M., CAVALCANTI, A.R.; LEAL, R.C. PEREIRA, P.L.L.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, n.1, p.82-84, 2013.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.30, n.1, p.225–420, 1980.

SLOVIS, N.M. My horse has Salmonella – now what? In: *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, p.13-27, 2007.

SNOOK SS, CANFIELD DR, SEHGAL PK. Focal ulcerative ileocolitis with terminal thrombocytopenic purpura in juvenile cotton top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Laboratory Animal Science*, v.39, n.1, p.109–114, 1989.

SOLIS, C.N.; PALMER, J.E.; BOSTON, R.C.; REEF, V.B. The importance of ultrasonographic pneumatosis intestinalis in equine neonatal gastrointestinal disease. *Equine Veterinary Journal*, v.44, n.41, p.64-68, 2012.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, v.5, n.02, p.321–326, 2004.

SONGER, J.G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, v.12, n.1, p.1–4, 2006.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v.17, n.6, p.528–36, 2005.

SONGER, J.G.; TRINH, H.T.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A.D.; McDONALD, L.C.; LIMBARGO, B.M. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infection Diseases*, v.15, n.5, p.819-821, 2009.

SORG, J.; SONENSHEIN, A.B. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, v.190, n.7, p.2505-2512, 2008.

SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.365, n.4, p.299– 314, 2013.

STRUBLE, A.L.; TANG, Y.J.; KASS, P.H.; GUMERLOCK, P.H.; MADEWELL, B.R.; SILVA, J. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, n.3, p.342-347, 1994.

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B.; POPOFF, M. Production of actin-specific ADP ribosyl transferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, v.186, p.307-312, 2000.

THERIOT, C.M.; YOUNG, V.B. Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. *Annual Review of Microbiology*, v.69, n.1, p. 445-461, 2015.

VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian Journal Medicine Microbiology*. v.27, n.4, p.289-300, 2009.

VUOTTO, C.; DONELLI, G.; BUCKLEY, A.; CHILTON, C. *Clostridium difficile* Biofilm. *Advances in Experimental Medicine Biology*, v.10, n.5, p.97-115, 2018.

WEBER, A.; KROTH, P.; HEIL, G. The occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of dogs and cats. *Zentralbl Veterinarmed*, v.36, p.568–576, 1989.

WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F.; KRUTH, S.A.; GREENWOOD, S.J.; WEESE, H.E. The Roles of *Clostridium difficile* and

Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.15, n.4, p.374–378, 2001.

WEESE, J.S.; BIERMAN, F.S.; RUPNIK, M.; SMITH, D.A.; GROOT, P.V.C. *Clostridium (Clostridioides) difficile* shedding by polar bears (*Ursus maritimus*) in the Canadian Arctic. *Anaerobe*, v.57, n.1, p.35-38, 2019.

WEESE, J.S.; FINLEY, R.; REID-SMITH, R.R.; JANECKO, N.; ROUSSEAU, J. Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiology Infections*, v.138, n.8, p.1100-1104, 2010.

WEESE, J.S.; WEESE, H.E.; BOURDEAU, T.L.; STAEMPFLI, R.H. Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *Journal American Veterinary Science Medical Association*, v.218, n.9, p.1436-1439, 2001.

WESSE, J.S. *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.32, n.2, p.213-221, 2020.

WHITTIER, S.; SHAPIRO, D.S.; KELLY, W.F.; WALDEN T.P.; WAIE, K.J.; McMILLON, L.T.; GILLIGAN, P.H. Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. V.31, n.11, p.2861-2865, 1993.

WILLIAMS, S.H.; CHE, X.; PAULICK, A.; GUO, C.; LEE, B.; MULLER, D.; UHLEMANN, A.C.; LOWY, F.D.; CORRIGAN, R.M.; LIPKIN, W.I. New York City House Mice (*Mus musculus*) as Potential Reservoirs for Pathogenic Bacteria and Antimicrobial Resistance Determinants. *American Society for Microbiology*, v.9, n.2, p-14-18, 2018.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; GLENN SONGER, J.A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v.19, n.1, p.52–9, 2007.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; SONGER, J.G. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colo/n

of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, n.1, p.52-59, 2007.

YANG, J.J.; NAM, Y.S.; KIM, M.J.; CHO, S.Y.; YOU, E.; SOH, Y.S.; LEE, H.J. Evaluation of a chromogenic culture medium for the detection of *Clostridium difficile*. *Yonsei Medical Journal*, v.55, n.4, p.994–8, 2014.

ZHANG, W.Z.; LI, W.G.; LIU, Y.Q.; GU, W.P.; LI, H.; LIU, Z.H.; ZHANG, X.; WU, Y.; LU, J.X. The molecular characters and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* from economic animals in China. *BMC Microbiology*, v.20, n.70, p.1-7, 2020.

ZHU, D.; SORG, J. A.; SUN, X. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.8, n.2,p.1–10, 2018.

ZHU, D.; SORG, J.A.; SUN, X. *Clostridioides difficile* Biology: Sporulation, Germination, and Corresponding Therapies for *C. difficile* Infection. *Fronteirs in Cellular andInfection Microbiology*, v.8, n.2, p.28-29, 2018.

ZLENDER, T.; GOLOB, Z.; RUPNIK, M. Low *Clostridioides difficile* positivity rate in wild animal shelter in Slovenia. *Anaerobe*, v.77, n.12, p.102643, 2022.