

CAROLINA GASEL BARBOSA

**OCORRÊNCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM LEITÕES SUBMETIDOS
A ANTIBIOTICOTINERAPIA NAS REGIÕES DE SANTA CATARINA**

LAGES-SC

2008

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CAROLINA GRASEL BARBOSA

**OCORRÊNCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM LEITÕES SUBMETIDOS
A ANTIBIOTICOTINERAPIA NAS REGIÕES DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada a coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Microbiologia e Sanidade Suína como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Eliana Knackfuss Vaz

LAGES-SC

2008

CAROLINA GRASEL BARBOSA

**OCORRÊNCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM LEITÕES SUBMETIDOS
A ANTIBIOTICOTINERAPIA NAS REGIÕES DE SANTA CATARINA**

Dissertação aprovada a coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre. Universidade do Estado de Santa Catarina; área de concentração Microbiologia.

Banca examinadora:

Orientador: _____
Prof^a. Doutora Eliana Knackfuss Vaz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: _____
Prof^a. Doutora Sandra Maria Borowski
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Membro: _____
Prof^o. Doutor José Cristani
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 10 de novembro de 2008

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a minha linda família que sempre me deu força para continuar os meus estudos, pela sua paciência, dedicação e pelo apoio financeiro e emocional que sempre me foi dado.

Ao meu noivo Pedro que sempre esteve ao meu lado, nas dificuldades e alegrias, me incentivando a sempre seguir em frente, pela sua amizade, companheirismo e amor.

A minha orientadora Doutora Eliana K. Vaz, pela sua paciência, dedicação e amizade depositados em mim nesses dois anos em que estivemos estudando e trabalhando juntas.

Aos bolsistas de iniciação científica Beatriz Dugaich e Thomas Bierhls pela sua amizade e auxílio na concretização neste trabalho.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia do CAV que contribuíram para a realização deste projeto: Denis A. Spricigo, Felipe Noel Seixas, Fábio Gouvêa, Andréa Rosa Machado, Heloise Peterle, Caroline Pissetti, Débora Santos, Francisco Vendruscolo, Camila Pliéski, Carla, Rosane Federle, Michelle dos Santos, pela alegria contagiante, pelo apoio e amizade.

À professora Doutora Sandra Maria Ferraz pela amizade e apoio durante esses dois anos em que convivemos juntas no Laboratório de Microbiologia.

Às empresas e laboratórios onde realizei as coletas dos meus dados e o teste

de ELISA, pela oportunidade, apoio e comprometimento com o trabalho realizado.

À pessoas especiais que sempre estiveram do meu lado, pela sua amizade e companheirismo Ronise Tochetto, Débora Santos, Felipe Noel Seixas, Beatriz Daugaich e Heloise Pertele

À todas as pessoas que acreditaram e torceram por mim...

Senhor! Fazei de mim um instrumento da vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor.

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve a união.

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.

Onde houver erro, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei que eu procure mais:

consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois é dando que se recebe.

É perdoando que se é perdoado.

E é morrendo que se vive para a vida eterna.

São Francisco de Assis

RESUMO

O *Clostridium difficile* é um bastonete oportunista Gram-positivo, anaeróbio obrigatório, formador de esporos, encontrado no solo, água e microbiota entérica de várias espécies animais. Tem sido descrito como causa de enterite em seres humanos e animais. Em suínos tem adquirido grande importância devido ao grande número de casos de enterites neonatais que afeta o cólon de leitões entre um a sete dias de idade. Essa bactéria produz dois tipos de toxinas: A (enterotóxica) e B (citotóxica) que possuem papel importante na patogênese da doença. Com o objetivo de pesquisar a presença da bactéria em leitões com até 7 dias de idade submetidos a antibioticoterapia bem como a produção das toxinas A e B nas amostras isoladas realizaram-se 8 coletas em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina, totalizando 490 amostras de fezes e suabes retais de leitões, coletados no período de Janeiro de 2008 a Março de 2008. Os suabes retais foram processados no mesmo dia da coleta no Laboratório de Microbiologia – CAV/UEDESC e as fezes foram congeladas a -4°C em ependorf estéril para posterior realização do teste de ELISA. Foram isoladas 23 colônias do *C. difficile*, sendo que nenhuma delas produziu as toxinas A e B, pela análise do teste do ELISA. Já das 69 fezes analisadas, 32 (46,37%) amostras foram positivas, 3 (4,34%) amostras intermediárias e 34 (49,27%) amostras negativas, conforme demonstrou o teste de ELISA.

PALAVRAS CHAVES: Suínos; *Clostridium difficile*; Diarréia; Antibiótico

ABSTRACT

The *Clostridium difficile* is a Gram-positive opportunist rod, anaerobic, spore-forming, found in the soil, water and enteric microbiota of many animal species. It has been described as the cause for enteritis in human beings and animals. In pigs it has grown in importance due to the large number of cases of neonatal enteritis that affects the colon of one to seven day old piglets. This bacterium produces two kinds of toxins: A (enterotoxin) and B (cytotoxin) that have an important role in the disease's pathogenesis. With the objective of researching the presence of the bacterium in up to seven days piglets submitted to antibiotic therapy as well as the production of the toxins A and B in isolated samples, 8 collections were made in different regions of the state of Santa Catarina, totalizing 490 samples of stool and retal swabs of piglets, gathered in the period of January 2008 to March 2008. The retal swabs were processed in the same day they were collected in the Microbiology Lab of CAV/UDESC and the stools were frozen at -40C in steril Ependorf so that they could be submitted to the ELISA test later. Twenty-three colonies of *C. difficile* were isolated, but no one produced the A and B toxins according to the ELISA test. Of the 69 stools analyzed, 32 (46,37%) were positive samples, 3 (4,34%) were intermediate samples, and 34 (49,27%) were negative samples, according to the ELISA test.

KEY WORDS: Swine; *Clostridium difficile*; Diarrhea; Antibiotic

LISTAS DE TABELAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

A incorporação de novas tecnologias, os avanços obtidos por pesquisas e o aprendizado permanente tornaram-se ferramentas quase que essenciais para a sobrevivência no atual mercado da suinocultura. Especialmente na área sanitária, essa tendência é forte, pois cada novo problema enfrentado e resolvido, com freqüência é seguido por um novo desafio ainda maior (SOBESTIANKY e BARCELLOS., 2007).

O Brasil ocupa o quarto lugar como maior produtor e exportador de carne suína no mundo, de janeiro a julho de 2008, 326.793 toneladas de carne suína já foram exportadas. As exportações, após o recorde de 2005 e a queda de 2006 por conta do ressurgimento da febre aftosa, voltaram a superar a marca das 600 mil toneladas em 2007. Essa tendência persiste para 2008, sustentada pelos investimentos em reformas de instalações no campo, pelas ampliações industriais e pela construção de novas granjas e modernas fábricas. Também deram suporte à expansão da produção, os investimentos em garantia da sanidade, na redução do impacto ambiental, na segurança alimentar e no bem-estar animal. (ABIPECS, 2007). Os principais importadores de carne suína brasileira são a Rússia, com cerca de 45% do total, seguida por Hong Kong com 18% e Ucrânia e Argentina com 5% (ABIPECS 2007).

A evolução tecnológica e científica ocorrida nas últimas décadas permitiu o desenvolvimento de muitos antimicrobianos, especialmente os de amplo espectro,

os quais são amplamente difundidos na produção de suínos e aves. O sistema moderno de produção intensiva predispõe ao aparecimento de doenças infecciosas, de forma que os aditivos antimicrobianos são usados com o objetivo de prevenir os distúrbios digestivos, melhorar a utilização dos alimentos e o desempenho animal, com a finalidade de reduzir perda de nutrientes e custos de produção. A microbiota associada ao trato digestivo é extremamente potente nas suas funções, mas também frágil, podendo ser alterada por diversos fatores entre os quais os mais conhecidos são o uso de drogas antimicrobianas, a mudança na alimentação e o estresse (Martins et al., 2007). Estes tem grande importância não somente no tratamento curativo, mas também na utilização de modo preventivo melhorando o desempenho dos animais. Porém o uso inadequado desses fármacos pode acarretar consequências negativas à saúde dos humanos e dos animais, devido à resistência desenvolvida por alguns microorganismos e elevando a ocorrência de doenças relacionadas a agentes oportunistas. Recentemente tem sido bastante estudada a correta utilização dos antimicrobianos para evitar o aparecimento de resistência bacteriana, maximizar sua eficácia e prevenir a presença de resíduos acima dos limites toleráveis em produtos de origem animal para o consumo humano.

Atualmente, existe uma tendência para começar a diminuir gradativamente o uso dos antibióticos como promotores de crescimento. Isso já vem sendo praticado em vários países, principalmente na União Européia que desde 1º de janeiro de 2006 oficializou o banimento do uso de antibióticos como promotores de crescimento animal. Isso significa que eles não irão mais aceitar nenhum tipo de produto de origem animal, vindo de qualquer parte do mundo, que tenha recebido antibióticos na sua dieta alimentar (AGOSTINI, 2008).

Com a crescente intensificação dos processos de produção, em que os animais passaram a ser criados cada vez mais em sistemas de confinamento, ocorreu um aumento na predisposição às doenças infecciosas. As principais diarreias na primeira semana de vida dos leitões são causadas pela *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* tipo C e pelo vírus da Gastroenterite Transmissível. Porém essas formas comuns de diarreia estão diminuindo enquanto as infecções causadas pelo *Clostridium difficile* estão adquirindo significativa importância, podendo ser a causa de mais de 50% das diarreias neonatais (MENIN., 2005). Nos EUA as cepas toxigênicas do *C. difficile* são consideradas o principal agente etiológico, sendo ele responsável por em 35% das diarreias neonatais (MASARIKOVÁ et al., 2008).

No Brasil ainda existem poucos trabalhos publicados sobre a ocorrência da forma de diarreia causada por este agente, isso se deve as dificuldades de isolamento da bactéria e a não utilização de protocolos eficientes para detectá-lo (MENIN et al., 2005).

A utilização do termo enterite clostridial, em 1988 referia-se somente a enterite necrótica causada pelo *C. perfringens* tipo C (CPC). Atualmente sabe-se que existe o complexo das doenças clostridiais formada pela CPC, *C. perfringens* tipo A e *C. difficile* que contribuem para o desenvolvimento das diarreias neonatais em leitões (YAEGER et al., 2002).

O *C. difficile* tem sido associado a uma forma de colite pseudomembranosa e diarreia em seres humanos, animais domésticos e de laboratório. A infecção tem sido freqüentemente associada ao uso de antibióticos, que levam a alterações na microbiota intestinal e oportunizam a colonização pelo agente. Em condições normais, o *C. difficile* se mantém inócuo no intestino (MENIN., 2005).

Em decorrência disso é essencial que sejam feitas mais pesquisas nessa área para melhorar as condições sanitárias dos nossos rebanhos.

A proposta dessa dissertação foi determinar a ocorrência do *C. difficile* em leitões com idade entre 1 a 7 dias, nas principais regiões produtoras de suíno no estado de Santa Catarina e verificar se as cepas isoladas e as fezes coletadas produzem as toxinas A e B através do teste de ELISA

Revisão Bibliográfica

1. *Clostridium difficile*

Os clostrídios são bactérias grandes, Gram-positiva, fermentativas, catalase-negativas, oxidase-negativa e necessitam de meios enriquecidos para crescer. São bacilos retos ou levemente curvos e a maioria possui motilidade pela presença de flagelos peritríquios. A maioria das espécies de clostrídios patogênicos são anaeróbios estritos, porém alguns são aerotolerantes (QUINN et al., 2005).

Clostridium difficile é um bastonete, oportunista, anaeróbio estrito, formador de esporos, encontrado no solo, água e na microbiota entérica de vários mamíferos, aves e répteis. Foi isolado pela primeira vez de fezes de recém-nascidos e foi originalmente denominado *Bacillus difficilis* devido a sua morfologia e da dificuldade de isolá-lo em laboratório. (KEEL e SONGER., 2006). É comumente associado a doenças entéricas em várias espécies de animais incluindo gatos, cachorros, suínos, hamsters, cavalos, avestruz e coelhos. (YAEGER et al., 2007; WATERS et al., 1998). A germinação dos esporos geralmente não ocorre de forma significativa no intestino grosso, a não ser que haja uma alteração da microbiota entérica. Os esporos são resistentes ao calor, podem sobreviver por meses ou anos no meio ambiente e podem ser carregados por mãos ou equipamentos (WALTERS et al., 1998).

A infecção causada pelo *Clostridium difficile* em suínos foi descrita pela primeira vez há mais ou menos duas décadas atrás, em consequência da exposição accidental de leitões gnotobióticos que apresentaram uma colite pseudomembranosa (SONGER, 2006).

Essa bactéria produz duas toxinas denominadas toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina). Porém, foram isoladas em portadores humanos e animais, cepas que não produzem toxinas (ROCHA et al., 1999).

O *Clostridium difficile* é responsável por causar uma enterocolite em potros, diarreia nosocomial e tifocolites em cavalos e em hamsters, enterites neonatais em leitões e uma colite pseudomembranosa em humanos associado ao uso de antibióticos (SONGER et al, 2000; WATERS et al, 1998; POST et al., 2002).

2. Epidemiologia

Nos últimos anos a infecção causada pelo *C. difficile* têm adquirido significativa importância, podendo ser a causa de mais de 50% das diarreias neonatais em leitões com idade entre 1 e 7 dias e pela morte de até 10% dos leitões nas maternidades (SONGER et al., 2004). Nos EUA as cepas toxigênicas do *C. difficile* são consideradas o principal agente etiológico, pois é o único responsável por 35% das diarreias neonatais e é encontrado com outros enteropatógenos em 25% de outros casos de enterites (MASARIKOVÁ et al., 2008).

A doença associada ao *Clostridium difficile* (CDAD) tem surgido como um importante problema em leitões (SONGER et al, 2007; POST et al, 2002). Em um estudo realizado por Songer e Uzal (2005) 30 leitões com enterite apresentaram uma CDAD leve, e desenvolveram infecções mistas em 20% a 25%.

Segundo Anderson et al. (2008) rebanhos de suínos afetados podem ter uma morbidade de até 97%, porém muitos leitões conseguem se recuperar, e a taxa de mortalidade pode chegar a 16%.

Dados de prevalência do agente são escassos em suínos, porém Yaeger et al (2002) diagnosticaram a infecção pelo *C. difficile* em fezes diarréicas de 39% (n=100) dos leitões com diarréia neonatal com idade média de 3 dias entre 2000 e 2001. Em outro estudo, Yaeger (2007) verificou que entre 2005 e 2006 a prevalência de diarréia neonatal causada pelo *C. difficile* foi de 10% (n=273) das amostras submetidas a diagnóstico na Universidade de Iowa. Contudo essa prevalência entre 2006 e 2007 subiu para 48% (n=77). (LIPPKE, 2008).

O *Clostridium difficile* é um patógeno amplamente difundido nos mamíferos, mas a incidência da doença varia muito em relação com as espécies de hospedeiros, idade, densidade de esporos no meio ambiente, administração de antibióticos, estresse, alimentação e outros fatores (KEEL e SONGER, 2006; WALTERS et al, 1998). A quantidade do *C. difficile* no intestino é muito baixa variando entre 1 e 2%, desta forma a colonização de origem endógena é relativamente baixa (DELMEEÉ et al., 2001).

Segundo Songer et al. (2000) o *C. difficile* coloniza a microbiota de animais jovens e de humanos recém nascidos, mas é rapidamente substituído pela microbiota madura.

Adultos saudáveis resistem à colonização pelo *C. difficile*, e a doença associada à bactéria em humanos é geralmente ligada a procedimentos que alteram a microbiota normal, como os tratamentos com antimicrobianos ou quimioterapia antineoplásica (WALTERS et al., 1998, KEEL et al., 2007). Desta forma a doença tem sido frequentemente associada ao uso de antibióticos que levam a uma alteração da

microbiota entérica e oportunizam a colonização pelo agente. Quando ocorrem determinadas alterações nesta microbiota, bactérias resistentes a antimicrobianos podem se multiplicar inibindo o crescimento das bactérias benéficas ao trato intestinal favorecendo assim o crescimento de bactérias patogênicas, como o *C. difficile*. Em condições normais o *C. difficile* se mantém inócuo no intestino (FURTADO et al, 2005). Mais de 90% das infecções por essa bactéria ocorrem após ou durante o tratamento com antibióticos. (BARBUT e PETIT., 2001 e SUNENSHINE et al., 2006).

Uma variedade de mecanismo pode ser usada pela microbiota entérica na exclusão de bactérias patogênicas, incluindo: produção de bacteriocinas, depleção dos nutrientes essenciais, produção de metabólitos e produtos tóxicos, como os ácidos graxos voláteis, competição pelos locais de adesão, estimulação do peristaltismo, indução das respostas imunológicas e produção de H₂S (KEEL e SONGER., 2006).

O desequilíbrio da microbiota intestinal se manifesta especialmente com o surgimento de diarreia, ou até mesmo quadro grave de colite pseudomembranosa provocada pelo *C. difficile* (ROCHA et al., 1999).

O *C. difficile* é responsável por 20 a 25% dos casos de diarreia associado ao uso de antibióticos e colites e por 90% dos casos de colite pseudomembranosa (LYERLY et al., 1988; BARBUT et al., 1993; SUNENSHINE et al., 2006). Quase todos os agentes antimicrobianos aplicados oralmente, principalmente os de amplo espectro exceto os aminoglicosídeos aplicados intravenosamente, estão sendo associado com o CDAD (BARBUT e PETIT., 2001; SUNENSHINE et al., 2006). Porém estudos feitos anteriormente revelou que as fluorquinolonas podem estar fortemente ligadas à CDAD, incluindo a clindamicina, penicilinas, penicilinas associadas com inibidores

beta-lactâmicos e celalosporinas (BABUT e PETIT., 2001; LOO et al., 2005; SUNESHINE et al., 2006).

Segundo Buggy et al. (1983) o *C. difficile* pode ser isolado de fezes de 3 a 7% de adultos saudáveis e de mais ou menos 20% de pacientes que receberam antibióticos, mas não apresentavam diarreia.

Crianças são refratárias a doença associada ao *C. difficile*, apesar de carregarem um alto número desse organismo e um alto nível da toxina B em suas fezes, isso aparentemente ocorre devido a ausência de receptores nos enterócitos para a toxina (SONGER et al., 2000). Estudos revelaram que mais de 50% das crianças assintomáticas são colonizadas com cepas do *C. difficile* toxigênicas (KEEL e SONGER., 2006; LYERLY et al., 1988).

Recentemente foi identificada uma nova cepa do *C. difficile* designado North American tipo 1 (NAP 1) em eletroforese, o qual foi responsável por numerosos surtos da doença na América do Norte e na Europa (WARNY et al., 2005; MCDONALD et al., 2005). O NAP 1 produz 16 vezes mais toxina A e 23 vezes mais toxina B que as outras cepas, possivelmente devido a uma deleção do gene regulatório negativo. Essa nova cepa é resistente a gatifloxacina e moxifloxacina (SUNESHINE et al., 2006).

A colite causada pelo *C. difficile* vem aumentando sua prevalência e severidade em toda a parte do mundo, necessitando fazer um diagnóstico mais acurado e o tratamento da diarreia o mais precoce possível para tentar reduzir a propagação da infecção (MUSHER et al., 2007).

Segundo Lippke (2008) existem poucos estudos sobre a etiologia das diarreias em leitões lactantes no Brasil e não há relatos até o momento do *C. difficile* como agente de diarreia em leitões neonatais no nosso país.

3. Patogenia

Segundo Glock et al. (2004) os principais fatores de patogenicidade do *C. difficile* incluem a quantidade da bactéria à qual o animal foi exposto, habilidade de competir por nutrientes, taxa de adesão e persistência junto à microbiota entérica, virulência, susceptibilidade do hospedeiro e, principalmente a toxigenicidade das diferentes cepas bacterianas. Algumas cepas do *C. difficile*, que não produzem toxinas são incapazes de desenvolver a doença (Rocha et al., 1999). Segundo Songer et al (2007) 6% das amostras isoladas de leitões com CDAD são não toxigênicas.

Existem vários fatores de virulência que estão associadas com o desenvolvimento da CDAD incluindo flagelos, enzimas hidrolíticas, cápsula, taxa de adesão, porém as mais importantes são as exotoxinas, toxina A (*tcdA*) e toxina B (*tcdB*), localizadas em uma grande ilha de patogenicidade no cromossomo bacteriano (KEEL e SONGER., 2006; YAEGER et al., 2007). A toxina A é uma enterotoxina responsável pelo acúmulo de fluidos no intestino, enquanto que a toxina B é uma citotoxina extremamente citopática para os tecidos celulares. Essas toxinas agem sinergicamente: a TcdA produz um grande dano na mucosa, permitindo assim que a TcdB altere as células epiteliais (KEEL e SONGER., 2006; WATERS et al., 1998).

As duas toxinas intoxicam as células pelo mesmo mecanismo, porém a TcdB é 1000 vezes, mas potente que a TcdA e a TcdB tem pelo menos 100 vezes mais atividade enzimática que a TcdA, então se acredita que essa é a principal característica que as diferenciam na potência citotóxica (POXTON., 2001).

Ambas toxinas induzem a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral alfa e interleucinas, as quais contribuem para uma resposta inflamatória e para o desenvolvimento da pseudomembrana em humanos (YAEGER et al., 2007).

O *C. difficile* é uma bactéria não invasiva e necessita colonizar o colón ou o ceco para causar a doença. As lesões só irão ocorrer a partir da liberação das toxinas que subsequentemente atacam os receptores dos enterócitos (WATERS et al., 1998).

A patogênese da CDAD é um processo multifatorial, que envolve alterações nos mecanismos de sinalização celular e nas funções mitocôndrias pelas toxinas do *C. difficile*, assim como a estimulação direta e indireta das reações inflamatórias e neurogênicas. A atividade da toxina A é dependente da ligação dos receptores da superfície do lúmen dos enterócitos seguindo a internalização e ativação no endossoma. A toxina B reconhece os receptores basolateral dos enterócitos, que normalmente não são acessíveis no lúmen intestinal. Após a perda das junções comunicantes, a TcdB pode se ligar aos receptores expostos, contribuindo para a uma resposta sinérgica entre as duas toxinas (KEEL e SONGER., 2006).

No interior das células, as toxinas alteram o citoesqueleto pela ação enzimática nos alvos intracelulares. A parada da síntese protéica e a divisão celular são seguidas da exfoliação dos enterócitos. A desgranulação dos mastócitos da mucosa e a liberação de mediadores inflamatórios causam um fluxo de granulócitos resultando em um dano tecidual (SONGER et al., 2000).

A toxina A, através de seus efeitos enterotóxicos, é capaz de produzir uma intensa secreção de fluidos, aumento da permeabilidade intestinal e uma potente reação inflamatória aguda na mucosa intestinal, caracterizada por necrose epitelial,

edema hemorrágico, ulceração e ativação de macrófagos e mastócitos, com a subsequente mobilização de neutrófilos para o foco inflamatório (Rocha et al., 1999).

4. Sinais Clínicos e Lesões

Segundo Keel e Songer (2006) os sinais clínicos, a distribuição e a severidade das lesões podem variar entre as espécies susceptíveis à infecção pelo *C. difficile*.

Em suínos, a infecção geralmente ocorre em leitões com idades variando entre 3 dias até 2 meses. A sintomatologia é mais evidente entre 1 e 7 dias de idade (SONGER., 2002). Os sinais clínicos iniciam-se com uma leve depressão e inapetência, seguindo para uma diarreia auto-limitante amarelada com consistência pastosa à aquosa, porém alguns animais podem apresentar constipação, podendo até ocorrer morte súbita (SONGER et al., 2004). Leitões de 2 meses de idade podem apresentar retardo no crescimento, diarreia e enterocolite fibrino-necrótica (FURTADO et al., 2005). Leitões que se recuperam da CDAD tem um ganho de peso abaixo do esperado resultando numa perda em torno de 1 a 1,5kg abaixo do peso ao desmame (LEENGOED et al., 2008 e SONGER e UZAL., 2005).

Yaeger (2002) relatou que apenas 41% dos animais positivos para a presença de toxinas apresentam diarreia, demonstrando que a ausência deste sinal clínico não exclui a ocorrência da infecção.

Segundo Glock *et al.* (2004) os leitões apresentam dispnéia moderada, distensão abdominal e edema escrotal. Ocasionalmente tem diarreia, ascite e hidrotórax e um característico edema de mesocólon ascendente. A presença de ascite e hidrotórax são achados comuns nos animais necropsiados (FURTADO et al., 2005). Microscopicamente, são descritos focos de supuração na lâmina do cólon, acúmulo

de neutrófilos no mesocólon e edema de cólon. A exsudação multifocal de muco, neutrófilo e fibrina adjacente à superfície da mucosa intestinal conferem um aspecto de “vulcão” às lesões (PERFUMO et al., 2004). É comum a formação de uma camada diftérica sobre a mucosa do cólon, resultando em colite catarral, podendo chegar à purulenta.

5. Diagnóstico

Os procedimentos mais utilizados nos laboratórios para o diagnóstico da CDAD incluem histórico clínico, lesões macro e microscópicas, isolamento bacteriano, teste de citotoxicidade em cultivo celular, aglutinação em látex e a quantificação das toxinas A e B nas fezes e conteúdo intestinais através do teste de ensaio imuno-enzimático (ELISA). (ANDERSON e SONGER., 2008). Segundo Yaeger (2002) para o diagnóstico laboratorial podem ser utilizadas as fezes ou suabes retais dos leitões, pois há uma correlação de 95% entre o nível de toxinas presente no cólon e no suabe retal.

O simples isolamento da bactéria tem valor limitado, pois o agente pode ser encontrado em leitões normais. Para um diagnóstico definitivo, faz-se necessário a identificação das toxinas A e B nas fezes, utilizando o teste de ELISA (teste imunoenzimático) (SOBESTIANSKY e BARCELLOS., 2007).

O isolamento do *C.difficile* é considerado o método mais sensível, embora seja muito trabalhoso e depende de mais tempo para se dar o diagnóstico, entretanto permite uma análise epidemiológica do organismo isolado (MERZ et al., 1994).

O isolamento do *C. difficile* pode ser obtido pela semeadura das fezes ou de raspados da mucosa intestinal de animais afetados em meio seletivo CCFA (ágar frutose cicloserina cefoxitina). As amostras coletas devem ser colocadas em meio de transporte específico para bactérias anaeróbias, estas devem ser processadas no laboratório dentro de 24 horas. Se as amostras não forem processadas neste período elas devem ser refrigeradas o mais rápido possível (KEEL e SONGER., 2006).

A cultura é o método mais sensível, mas não é muito específico devido à possibilidade do isolamento de amostras não toxigênicas. As colônias do *C. difficile* são facilmente reconhecidas devido a sua morfologia bem característica onde elas se apresentam acinzentadas, irregulares, rugosas, salientes e com odor semelhante com estrume de cavalo (DELMEÉ et al., 2001 e GEORGE et al., 1979).

A detecção da toxina pode ser realizada através do uso de “Kits” comerciais de ELISA, que proporcionam um resultado rápido a partir do exame de suabes retais (MENIN., 2005). Porém alguns laboratórios utilizam outros métodos de diagnóstico, como o teste de citotoxicidade em cultivo celular, teste de aglutinação em látex para antígenos de superfície e reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção das toxinas nas fezes, através da demonstração de citotoxicidade em cultivo de células, é considerado o método de referência para o diagnóstico da CDAD. Porém a técnica demanda muito tempo para ser realizada (5-7 dias) e não detecta a toxina A (LIPPKE, 2008). O teste de aglutinação rápida não diferencia a cepas toxigênicas das não toxigênicas que podem estar presentes no trato gastrointestinal (YAEGER et al., 2002). O PCR com *primers* específicos para as toxinas A e B pode ser utilizado para identificar bactérias portadoras de cópias desses genes, todavia não

podem ser utilizados para determinar se os genes estão codificando as proteínas (POST e al., 2002 e LIPPKE, 2008).

O teste de ELISA foi descrito pela primeira vez em 1971 e desde então é considerado uma das mais importantes técnicas de diagnóstico. É utilizada basicamente para a detecção de pequenas quantidades de anticorpos ou antígenos que não são detectadas pelas técnicas convencionais. O teste de ELISA utiliza uma enzima como marcador, que pode unir-se tanto ao antígeno como anticorpo, de forma tal que os conjugados resultantes conservem as suas atividades enzimática e imunológica. O teste de ELISA tem como vantagem ser uma técnica simples e prática, os resultados são obtidos rapidamente (2 a 3 horas), permite testar um grande número de amostras simultaneamente e com o mínimo de pessoal e pode ser conservado por um longo tempo (FLORES, 2007).

Segundo Post (2002) a correlação entre os resultados do teste comercial ELISA quando comparado com o teste de efeito citotóxico em cultivo celular foi alto, 88%. A sensibilidade e a especificidade do ELISA foram também alto, 91% e 86% respectivamente.

As amostras coletadas que serão utilizadas para a detecção das toxinas A e B por ELISA podem ser coletadas do conteúdo do colón ou diretamente do reto do animal. Quando comparado esses dois locais de coleta em relação aos níveis de toxinas detectadas no ELISA, foi observado uma correlação de 95%. (YAEGER et al., 2002 e LIPPKE, 2008).

O exame histopatológico é importante por demonstrar as lesões específicas produzidas pelo agente e para o exame devem-se remeter fragmentos de ceco e cólon em formol a 10% (SOBESTIANSKY e BARCELLOS., 2007).

6. Tratamento e Controle

Devida a falta de informações da CDAD em suínos, têm sido utilizadas como referência nessa espécie opções terapêuticas utilizadas em outros animais. Metronidazol, bacitracina de zinco e vancomicina são utilizados no tratamento dessa infecção em cavalos, e este último é utilizado no tratamento de tifocolite em hamsters. O metronidazol e a vancomicina não são aprovados para o uso em animais destinado ao abate (SONGER et al., 2000).

Post e Songer (2004) analisaram a adição de antibióticos à alimentação para porcas com o intuito de diminuir a eliminação da bactéria no ambiente. Foram testados, tetraciclina, tiamulina, tilosina e virginiamicina, sendo todas consideradas eficazes no controle do *C. difficile*, enquanto que a bacitracina e a tilmicosina demonstraram baixa eficácia.

Normand (2004) utilizou *Saccharomyces cerevisiae boulardii* no intuito de controlar a infecção pelo *C. difficile* em leitões. Os resultados no controle da diarreia neonatal e no seu desenvolvimento no pós-desmame foram positivos e se fundamentam na exclusão competitiva no intestino entre essa levedura e o *C. difficile*.

Estudos realizados por Songer (2007) sugerem que a pré-colonização com cepas não toxigênicas do *C. difficile* podem prevenir os efeitos da acumulação das suas toxinas.

As medidas de controle ainda não estão bem definidas, porém as recomendações geralmente incluem práticas de manejo adequadas nos primeiros dias de vida dos leitões, cuidados no arraçamento das porcas, principalmente leitoas primíparas, durante o período de gestação, melhorando assim a produção de leite (SOBESTIANSKY e BARCELLOS., 2007). As enterites ocorrem mais nos leitões de

primíparas. O uso de probióticos na ração das fêmeas no final da gestação ou lactação pode ser uma alternativa eficiente, no sentido de recuperar a microbiota normal (SOBESTIANSKY e BARCELLOS., 2007; GLOCK et al., 2004).

Segundo Songer e Anderson (2006) a resposta imune à infecção do *C. difficile* em leitões não tem sido estudado. Embora anticorpos contra TcdA previnam a ligação da bactéria nas células, a eliminação de secreções e dos sinais clínicos em ratos e hamsters, anticorpos contra TcdB também tem um papel na proteção contra a CDAD.

A concentração de anticorpos antitoxinas no soro é inversamente proporcional à severidade da doença e a reincidência da doença (SONGER e ANDERSON., 2006).

O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência do *C. difficile* em leitões de 1 a 7 dias de idade submetidos à antibioticoterapia, nas principais regiões produtoras de suínos de Santa Catarina e através das amostras isoladas, verificar quais produziram as toxinas A e B pelo teste de ELISA.

3 DESENVOLVIMENTO

OCORRÊNCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM LEITÕES SUBMETIDOS A ANTIBIOTICOTINERAPIA NAS REGIÕES DE SANTA CATARINA

Artigo a ser submetido para publicação na Revista Ciência Animal Brasileira

OCORRÊNCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM LEITÕES SUBMETIDOS À
ANTIBIOTICOTERAPIA NAS REGIÕES DE SANTA CATARINA

Carolina Grasel Barbosa¹, Beatriz Duagaich², Eliana Knackfuss Vaz³

¹ Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinária (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Santa Catarina, Brasil. Laboratório de Microbiologia Veterinária. Av: Luis de Camões, 2090. CEP 88520-000 Lages, SC, e-mail: a2fns@cav.udesc.br. Autor para correspondência.

² Aluna-Bolsista de Iniciação Científica.

³ Professora orientadora – Centro de Ciências Agroveterinária (CAV).

RESUMO

O *Clostridium difficile* é um bastonete oportunista Gram-positivo, anaeróbico obrigatório, formador de esporos, encontrado no solo, água e microbiota entérica de várias espécies animais. Tem sido descrito como causa de enterite em seres humanos e animais. Em suínos tem adquirido grande importância devido ao grande número de casos de enterites neonatais que afeta o cólon de leitões entre um a sete dias de idade. Essa bactéria produz dois tipos de toxinas: A (enterotóxica) e B (citotóxica) que possuem papel importante na patogênese da doença. Com o objetivo de pesquisar a presença da bactéria em leitões com até 7 dias de idade submetidos a antibioticoterapia bem como a produção das toxinas A e B nas amostras isoladas realizaram-se 8 coletas em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina, totalizando 490 amostras de fezes e suabes retais de leitões, coletados no período de Janeiro de 2008 a Março de 2008. Os suabes retais foram processados no mesmo dia da coleta no Laboratório de Microbiologia – CAV/UDESC e as fezes foram congeladas a -4⁰C em ependorf estéril para posterior realização do teste de ELISA. Foram isoladas 23 colônias do *C. difficile*, sendo que nenhuma delas produziu as toxinas A e B, pela análise do teste do ELISA. Já das 69 fezes analisadas, 32 (46,37%) amostras foram positivas, 3 (4,34%) amostras intermediárias e 34 (49,27%) amostras negativas, conforme demonstrou o teste de ELISA.

PALAVRAS CHAVES: Suínos; *Clostridium difficile*; Diarréia; Antibiótico

ABSTRACT

The *Clostridium difficile* is a Gram-positive opportunist rod, anaerobic, spore-forming, found in the soil, water and enteric microbiota of many animal species. It has been described as the cause for enteritis in human beings and animals. In pigs it has grown in importance due to the large number of cases of neonatal enteritis that affects the colon of one to seven day old piglets. This bacterium produces two kinds of toxins: A (enterotoxin) and B (cytotoxin) that have an important role in the disease's pathogenesis. With the objective of researching the presence of the bacterium in up to seven days piglets submitted to antibiotic therapy as well as the production of the toxins A and B in isolated samples, 8 collections were made in different regions of the state of Santa Catarina, totalizing 490 samples of stool and retal swabs of piglets, gathered in the period of January 2008 to March 2008. The retal swabs were processed in the same day they were collected in the Microbiology Lab of CAV/UEDESC and the stools were frozen at -4oC in steril Ependorf so that they could be submitted to the ELISA test later. Twenty-tree colonies of *C. difficile* were isolated, but no one produced the A and B toxins according to the ELISA test. Of the 69 stools analyzed, 32 (46,37%) were positive samples, 3 (4,34%) were intermediate samples, and 34 (49,27%) were negative samples, according to the ELISA test.

KEY WORDS: Swine; *Clostridium difficile*; Diarrhea; Antibiotic

INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, formador de esporos, encontrado no meio ambiente e no trato intestinal de vários mamíferos, pássaros e répteis (NAGY e BILKEI., 2003).

O *C. difficile* é responsável por causar uma colite pseudomembranosa e diarreia associada ao uso de antibióticos em humanos, cavalos e em animais de laboratório (POST et al., 2004). Recentemente foi reconhecido como o agente etiológico responsável por causar enterites em leitões (SONGER et al., 2000; WATERS et al., 1998).

Nos últimos anos a infecção causada pelo *C. difficile* tem adquirido significativa importância, podendo ser a causa de mais de 50% das diarreias neonatais em leitões na primeira semana de vida e pela morte de até 10% dos leitões nas maternidades (SONGER et al., 2004). Nos EUA as cepas toxigênicas do *C. difficile* são consideradas o principal agente etiológico, pois é o único responsável por 35% das diarreias neonatais e é encontrado com outros enteropatógenos em 25% de outros casos de enterite (MASARIKOVÁ et al., 2008; SONGER et al., 2007).

A doença causada pelo *C. difficile* tem sido frequentemente associada ao uso de antibióticos que levam a uma alteração na microbiota entérica e oportunizam a colonização pelo agente. Quando ocorrem determinadas alterações nesta microbiota, bactérias resistentes a antimicrobianos podem se multiplicar inibindo o crescimento das bactérias benéficas ao trato intestinal favorecendo assim o crescimento de bactérias patogênicas, como o *C. difficile* (FURTADO et al., 2005).

Os leitões apresentam dispnéia moderada, distensão abdominal e edema escrotal. Ocasionalmente tem diarreia, ascite, hidrotórax, dificuldade respiratória e uma alta morbidade e mortalidade podem ocorrer. As lesões macroscópicas revelam uma enterite inflamatória, edema de mesocólon, acúmulo de neutrófilos e fibrina na lâmina própria (SONGER et al., 2000). O *C. difficile* produz as toxinas A e B que são as principais responsáveis pelo desencadeamento da doença.

O diagnóstico da infecção pelo *C. difficile* é realizado pela detecção das toxinas e pelo isolamento da bactéria em meio de cultura específico. O simples isolamento da bactéria tem valor limitado, pois o agente pode ser encontrado em leitões saudáveis. Para um diagnóstico definitivo, faz-se necessário a identificação das toxinas A e B nas fezes, utilizando o teste de ELISA (SOBESTIANSKY e BARCELLOS., 2007).

A proposta desse artigo foi determinar a ocorrência do *Clostridium difficile* no Estado de Santa Catarina e através das amostras isoladas, verificar quais produziram as toxinas A e B pelo teste de ELISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de material. Para realização do presente estudo as amostras do material foram obtidos de maternidades de suínos localizadas nas seguintes regiões de Santa Catarina: Vale do Itajaí (Rio do Sul e Ituporanga), Meio-Oeste catarinense (Concórdia, Jaborá, Luzerna e Erval Velho) e região Sul (Braço do Norte e São Ludgero) no período de Janeiro de 2008 a Março de 2008. Foram coletados aleatoriamente amostras de fezes e suabes retais de 490 leitões com 1 a 7 dias de idade, tratados com antibióticos de amplo espectro no primeiro dia de vida. Os suabes retais foram colocados no meio de transporte Amies com carvão, específico para bactérias anaeróbicas, e as fezes foram colocadas em ependorf estéreis, todos acondicionados em caixas de isopor com gelo reciclável e transportados até o Laboratório de Microbiologia do CAV – UDESC. Os suabes retais foram processados no mesmo dia das coletas e as fezes foram congeladas a -4°C para posterior realização do teste de ELISA para identificação das toxinas A e B.

Processamento microbiológico. No Laboratório, o meio de cultura seletivo Ágar Cicloserina-cefoxitina Frutose (CCFA), específico para o isolamento do *Clostridium difficile*, foi preparado de acordo com George (1979). O CCFA foi suplementado com 0,5mL de taurochocolate de sódio adicionado após a esterilização deste. Os suabes retais foram semeados pela técnica de esgotamento neste meio e incubados anaerobicamente por 48 horas a 37°C em jarras com Gaspak. Após esse período, primeiramente, foi analisada a morfologia das colônias suspeitas e logo em seguida feito à coloração de Gram dessas colônias, para a identificação dos bacilos Gram positivos.

Testes bioquímicos. Os isolados foram confirmados bioquimicamente pelo teste da motilidade, produção de indol e hidrólise de gelatina. As colônias isoladas incubadas no meio de enriquecimento BHI, por 48 horas nas mesmas condições anteriores, e após foram congeladas.

Teste de ELISA. O teste de ELISA foi utilizado para determinar qualitativamente a produção das toxinas A e B pelo *Clostridium difficile* nas amostras de fezes e nas colônias isoladas. As primeiras 46 unidades do Kit ELISA foram utilizadas para correlacionar a produção das toxinas pelas colônias isoladas com a produção das toxinas das suas respectivas fezes. O restante do teste foi utilizado somente na análise das fezes. O teste foi executado 5 meses após a realização da última coleta, no laboratório de sorologia da Perdigão. O Kit RIDASSCREEN® *Clostridium difficile* Toxina A/B utiliza anticorpos monoclonais contra as

toxinas A e B do *Clostridium difficile* e foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação e interpretação dos resultados foi realizado o cálculo do CUT - Off (ponto de corte). As amostras cujo valor de absorbância ficam mais de 10% acima do CUT-OFF calculado são consideradas positivas e as amostras que ficam mais de 10% abaixo do CUT-OFF calculado são considerados negativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Clostridium difficile* é o principal agente etiológico das diarreias associadas ao uso do antibiótico e a colite pseudomembranosa em humanos. Em suínos ele é o agente responsável por causar diarreia e morte em leitões de 1 a 7 dias de idade. Entretanto ainda se tem poucos dados publicados sobre a sua importância na suinocultura brasileira.

No presente trabalho foi possível isolar 23 (4,7%) colônias do *Clostridium difficile*, de um total de 490 amostras coletadas de suabes retais, no meio CCFA incubados em uma jarra anaeróbica a 37^o por 24 horas. Nesse meio as colônias se apresentaram acinzentadas, não hemolíticas, circulares, rugosas, salientes e modificavam a cor do meio, do mesmo modo como descrito por George (1979). Através da coloração de Gram verificou-se a presença de bacilos Gram positivos. Nos testes bioquímicos o indol foi negativo, as bactérias se mostraram imóveis e hidrolisaram a gelatina, o que caracterizou o *Clostridium difficile* (MERZ et al., 1994).

Os resultados da produção das toxinas pelas fezes e pelas colônias que foram realizadas pelo teste do ELISA, constam na Tabela 1. O Kit de ELISA foi dividido em três grupos, onde no primeiro verificamos a produção das toxinas A e B pelas colônias isoladas, no segundo correlacionamos a produção das toxinas pelas colônias com as suas respectivas fezes e no terceiro utilizamos somente as fezes. Primeiramente das 23 colônias isoladas, nenhuma produziu as toxinas, pela análise do teste de ELISA. Já das 22 amostras de fezes correlacionadas com as colônias, 11 (50%) foram positivas. Por conseguinte foram analisadas 47 amostras de fezes, nos quais 20 (42,55%) amostras foram positivas, 3 (6,38%) amostras intermediárias e 24 (51,06%) amostras negativas, totalizando 69 amostras de fezes analisadas sendo 31 (44,95%) amostras positivas. Foram analisadas somente 47 amostras de fezes das 490 coletadas devido ao Kit de ELISA utilizado ser somente para 92 amostras. As amostras de fezes foram selecionadas aleatoriamente.

Tabela 1. Resultados da produção das toxinas A e B no teste de ELISA

	Positivo	Intermediário	Negativo	Total
Colônias	0	0	0	0
Colônias x Fezes	11	0	11	22
Fezes	20	3	24	47
Total	31	3	35	69

No meio de cultura CCFA observou-se o crescimento de outras bactérias, que não foram identificadas pela coloração de Gram e nem pelos testes bioquímicos. As colônias dessas bactérias eram menores e não possuíam as características morfológicas do *C. difficile*.

O CCFA é um meio de cultura seletivo e diferencial, considerado o melhor meio para o isolamento do *C. difficile*. As colônias do *C. difficile* que crescem neste meio são morfolologicamente diferentes e apresentam propriedades fluorescentes que são suficientes para uma identificação presuntiva. Apresentam em sua formulação os antibióticos cicloserina e cefoxitina que inibem parcialmente o crescimento de outras bactérias. A escolha desses antibióticos como componentes do meio foi baseado no nível de resistência das 16 cepas do *C. difficile* à cefoxitina (concentração inibitória mínima $\geq 32\mu\text{g/ml}$) e à cicloserina (concentração inibitória mínima $\geq 1,024\mu\text{g/ml}$)(GEORGE et al., 1979).

O isolamento das colônias do *C. difficile* é considerado por muitos autores o melhor método de diagnóstico, embora o exame das toxinas precise ser executado para diferenciar as cepas toxigênicas das não toxigênicas (MERZ et al., 1994) . Reller e colaboradores (2007) sugeriram que a colônia é mais sensível que as fezes para detecção das cepas toxigênicas do *Clostridium difficile*, porém o isolamento da colônia é demorado, trabalhoso e é difícil de ser realizado. Neste estudo o *C. difficile* foi isolado de amostras fecais de (23/490) 4,7% leitões. Diferentemente do encontrado por Yaeger et al. (2007) onde o *C. difficile* foi isolado do intestino grosso de (61/129) 47%. Essa diferença pode ser explicada por vários fatores, incluindo os efeitos dilucionais da diarreia, dificuldade de isolamento e ao congelamento prolongado (GEORGE et al., 1979). No Brasil não existem trabalhos publicados sobre o isolamento do *C. difficile* em leitões.

Em 50 % (11/22) dos leitões o isolamento do *C. difficile* e a produção da toxina foram negativos e em nenhum dos leitões a cultura e a produção das toxinas foram positivas, isso se deve ao fato de que nenhuma colônia produziu as toxinas. Resultados diferentes foram encontrados por Yaeger et al. (2007) nos Estados Unidos, onde 31% (40/129) dos leitões foram negativos para ambas, cultura e produção da toxina e em 35% (45/129) dos leitões ambas, cultura e a produção das toxinas foram positivas. As hipóteses mais prováveis para explicar esses resultados são pelo fato de que as amostras foram congeladas à -20°C ou pelo descongelamento das mesmas, mais de uma vez, pois assim pode ocorrer uma rápida perda da atividade citotóxica e também podem ser um indicativo da presença de cepas não toxigênicas. (DELMÉE et al., 2001 e WALTERS et al., 1998).

Já as toxinas das amostras de fezes foram detectadas em 44,95% (31/69) leitões onde o isolamento foi negativo. Esses resultados são semelhantes ao trabalho realizado por Yaeger e colaboradores (2007) onde as toxinas foram detectadas no conteúdo do colón de 50% (65/129) dos leitões.

A detecção das toxinas nas fezes e não nas colônias isoladas, pode ser explicado ao fato de que as fezes são mais resistentes ao congelamento que as colônias, pois aparentemente, neste estudo a interferência do congelamento parece ter sido menor, visto que em 44,92% das amostras foi detectado a toxinas nas fezes e não nas colônias. No total de 69 amostras de fezes analisadas 32 (46,37%) produziram as toxinas demonstrando que as fezes são melhor material para a detecção da toxina.

Para a detecção das toxinas A e B do *C. difficile* nas fezes ou do conteúdo intestinal de leitões Post et al (2002) comparou o teste de efeito citotóxico em cultivo celular com o teste de ELISA. Das 50 amostras analisadas, 20 foram positivas e 24 foram negativos para ambos os testes, gerando uma correlação de 88%. A sensibilidade e a especificidade foram de 91 e 86% respectivamente. Concluindo assim que o teste de ELISA foi considerado um adequado método para se fazer o diagnóstico da CDAD

Resultados semelhantes ao desse trabalho foram encontrados por Anderson (2008), que verificou que a detecção da toxina do *Clostridium difficile* nas fezes é o elemento chave para o diagnóstico da CDAD (doença associada ao *Clostridium difficile*) em humanos e animais e o teste de ELISA é desejável devido a sua economia e tempo de trabalho.

Em um trabalho recentemente publicado por Lippke (2008) foi observado que em leitegadas sem diarreia os coccídeos (8,5%) e o *C. difficile* (16,6%) foram os agentes mais freqüentemente encontrados e em leitegadas com diarreia o *C. difficile* foi observado em 10,6%, não ocorrendo diferença significativa na presença entre as leitegadas caso e controle. A explicação para esses resultados pode ser explicado por Yaeger et al. (2007) que detecção das toxinas A e B não representa um bom indicador para a presença ou ausência de diarreia já que foi observado em um estudo caso-controle que a maioria (59%) dos leitões positivos para as toxinas A e B não apresentaram diarreia quando comparados com os leitões negativos para as duas toxinas. Especula-se que possa haver algum outro fator, além das toxinas A e B, que seja essencial para o desencadeamento da diarreia. Não foi observada associação entre a maior quantidade de toxinas detectadas nas fezes e diarreia (LIPPKE, 2008). Neste trabalho não foi correlacionado os tipos de fezes com a produção de toxinas.

Todas as amostras coletadas proviram de leitões com 1 a 7 dias de idade, entretanto as amostras de fezes positivas para a produção da toxina foram dos leitões com até 4 dias, dados

semelhantes foram encontrados por Lippke (2008), pois assim como as toxinas beta do *Clostridium perfringens*, as toxinas A e B do *C. difficile* são destruídas pela ação da tripsina, fazendo com que a ocorrência de casos de infecção por esse agente concentrem-se no início do período neonatal (LIPPKE, 2008).

CONCLUSÃO

Foi possível isolar o *Clostridium difficile* de fezes e suabes retais de leitões com 1 a 7 dia de idade submetidos a antibiótico terapia nas regiões de Santa Catarina e também observou-se que a produção das toxinas A e B utilizando as fezes e os suabes retais foi maior que a produção das toxinas pelo isolamento das colônias.

Ainda se tem poucos trabalhos publicados sobre esta bactéria, principalmente na área de suínos e, se faz necessário um melhor conhecimento da infecção por ela causada

AGRADECIMENTOS

Aos Médicos Veterinários Priscila Koerich e João Zuffo – PERDIGÃO S/A– Videira/SC, pelo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M.A.; SONGER, J.G. et al. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in Swine. **Veterinary Microbiology**, v.128, p. 204-206, 2008.

DELMEÉ, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, p. 411-416, 2001.

DUARTE, C.S. *Clostridium difficile*: um grande problema ainda pouco conhecido. **Suinocultura em foco**, v.5, n.14, p.4, 2005.

GEORGE, W.L.; SUTTER, V.L.; CITRON, D. et al. Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, n.2, p. 214-219, 1979.

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

LIPPKE, R.T. **Estudo caso controle avaliando a freqüência dos principais agentes causadores de diarréia neonatal em suínos**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado de Ciências Veterinárias) Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MASARIKOVÁ, M. *Clostridium difficile*-Associated Disease (CDAD) in Czech Piglet Production. In: IPVS CONGRESS, 20., 2008, Durban. **Proceedings...**Durban, 2008, v.3, p. 251.

MERZ, C.S.; KRAMER, C.; FORMAN, M. et al. Comparison of Four Commercially Available Rapid Enzyme Immunoassays with Cytotoxin Assay for Detection of

Clostridium difficile Toxin from Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.5, p. 1142-1147, 1994.

NAGY, J.; BILKEI, G. Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit. **The Veterinary Journal**, v.166, p. 98-100, 2003.

POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p. 258-259, 2002.

POST, K.W.; SONGER, J.G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. **Anaerobe**, v.10, p. 47-50, 2004.

RELLER, M.E.; LEMA, C.A.; PERL, T.M. et al. Yield of Stool Culture with Isolate Toxin Testing versus a Two-Step Algorithm Including Stool Toxin Testing for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.11, p. 3601-3605, 2007.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. Bacterioses. In: BARCELLOS, D.; OLIVEIRA, S.J. **Doenças dos Suínos**. 2th ed., Cãnone, Brasil. cap. 3, 2007, p. 103-104.

SONGER, J.G.; JONES, R.; ANDERSON, M.A. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. **Veterinary microbiology**, v.124, p. 358-361, 2007.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 528-536, 2005.

SONGER, J.G.; POST, W.P.; LARSON, D.J. et al. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. **Swine Health and Production**, v.8, n.4, p. 185-189, 2000.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal Health Research Reviews**, v.5, n.2, p. 321-326, 2004.

WATERS, E.H.; ORR, J.P.; CLARK, E.G. et al. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p. 104-108, 1998.

YAEGER, M. Clostridial enteritis: diagnosis, significance, control. In: 33th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, **Proceedings**, Iowa, p. 261, 2002.

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

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

7. DISCUSSÃO GERAL

As principais doenças que afetam os leitões neonatais são causadas pelas diarréias que determinam grandes prejuízos econômicos para a suinocultura intensiva, como a redução do ganho de peso diário e baixo peso ao desmame, aumento da mortalidade na maternidade e maiores gastos com medicamentos. Geralmente os principais agentes envolvidos fazem parte da microbiota normal do intestino do leitão e somente causam danos ao animal quando por algum motivo ocorre uma alteração nessa microbiota.

As formas mais comuns de diarréias em leitões na maternidade são causadas principalmente pela *Escherichia coli*, pelo vírus da Gastroenterite Transmissível (TGE) e pelo *Clostridium perfringens* tipo A. Porém devido ao investimento em pesquisas de vacinas e antimicrobianos, esses tipos de diarréias estão mais controladas, enquanto que o diagnóstico de diarréias causadas por outros patógenos como pelo *Clostridium difficile* vem aumentando principalmente na última década. Nos EUA o *C. difficile* é considerado o principal agente etiológico em responsável por 35% das diarréias neonatais (MASARIKOVÁ et al., 2008).

O uso indiscriminado dos antibióticos de amplo espectro como promotores de crescimento ou utilizados como medicação preventiva é a principal hipótese para o aumento do diagnóstico da CDAD, pois esses antimicrobianos alteram a microbiota dos leitões, favorecendo o crescimento do agente.

O primeiro isolamento do *C. difficile* em leitões no Brasil foi obtido neste trabalho. Vinte três colônias foram isoladas de leitões submetidos à antibioticoterapia

na primeira semana de vida. Como este agente faz parte da microbiota intestinal normal dos leitões somente o isolamento da colônia não confirma o diagnóstico da doença, então foi realizado o teste de ELISA para a verificação da produção das toxinas A e B. Das 69 amostras de fezes analisadas 31 foram positivas comprovando assim a toxicidade das mesmas.

Diferente do que foi visto na literatura nenhuma colônia do *C. difficile* produziu as toxinas A e B, sendo considerada um material melhor que as fezes para a detecção das toxinas. Esse resultado pode ter dito a interferência do congelamento das amostras, já que muitos trabalhos citam a perda da atividade citotóxica das colônias após o congelamento desta.

8. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nessa dissertação pode concluir:

- 1- Foi possível verificar a ocorrência do *C. difficile* no Estado de Santa Catarina, isolando o agente de leitões de 1 a 7 dias de idade submetidos a antibioticoterapia.
- 2- Nenhuma amostra isolada do *C. difficile* produziu as toxinas A e B, quando submetidos ao teste de ELISA.
- 3- Foi possível detectar a produção das toxinas A e B pelas amostras de fezes e suabes retais de leitões com até 4 dias de idade.
- 4- É necessário pesquisar muito mais a fundo esse agente aqui no Brasil, fazendo trabalhos correlacionando lesões macroscópicas e microscópicas e sinais clínicos com a produção de toxinas e para se fazer um levantamento mais aprofundado dessa doença.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, P.S. Utilização de simbióticos em suínos. **Revista Porkworld**, v.44, p. 44-47, 2008.

ABIPECS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **Relatório anual de 2007**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 08/09/2008.

ANDERSON, M.A.; SONGER, J.G. et al. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in Swine. **Veterinary Microbiology**, v.128, p. 204-206, 2008.

BARBUT, F.; KAJZER, C.; PLANAS, N. et al. Comparison of Three Enzyme Immunoassays, a Cytotoxicity Assay, and Toxigenic Culture for Diagnosis of *Clostridium difficile*-associated Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.4, p. 963-967, 1993.

BARBUT, F.; PETIT, J.C. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, p. 405-410, 2001.

BUGGY, B.P.; WILSON, K.H.; FEKETY. Comparison of Methods for Recovery of *Clostridium difficile* from an Environment Surface. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.2, p. 348-352, 1983.

BORRIELLO, S.P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.41, p. 13-19, 1998.

DELMEÉ, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, p. 411-416, 2001.

DUARTE, C.S. *Clostridium difficile*: um grande problema ainda pouco conhecido. **Suinocultura em foco**, v.5, n.14, p.4, 2005.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, 1ed, Editora da UFMS, v.1 p. 50-53, 2007.

GEORGE, W.L.; SUTTER, V.L.; CITRON, D. et al. Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, n.2, p. 214-219, 1979.

GLOCK, S.P.; KOLLER, F.L.; SONGER, J.G. et al. *Clostridium difficile*-associated disease in neonatal swine. In: IPVS CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...**Hamburg 2004, p. 261.

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

LEENGOED, L.V.; DEBAST, S.B.; BERGWERFF, A.A. et al. Neonatal Diarrhoea in Piglets Caused by *Clostridium difficile*. In: IPVS CONGRESS, 20., 2008, Durban. **Proceedings...**Durban, 2008, v.3, p. 134.

LIPPKE, R.T. **Estudo caso controle avaliando a frequência dos principais agentes causadores de diarréia neonatal em suínos**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado de Ciências Veterinárias) Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LOO, V.G.; POIRIER, L.; MILLER, M.A. et al. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile*-associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.23, p. 2442-2449, 2005.

LYERLY, M.D.; KRIVAN, H.C.; WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n.1, p. 1-18, 1988.

MARTINS, A.D.; MENDONÇA, R.C.S.; PEREIRA, J.A.M. et al. Perfil Antimicrobiano de Microorganismos passíveis de uso como Probiótico em suínos. **Anais do II Congresso Latino Americano de Suinocultura**. Disponível em <http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=1111>. Acesso em 10/09/2008.

MASARIKOVÁ, M. *Clostridium difficile*-Associated Disease (CDAD) in Czech Piglet Production. In: IPVS CONGRESS, 20., 2008, Durban. **Proceedings**...Durban, 2008, v.3, p. 251.

McDONAL, L.C.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A. et al. An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.23, p. 2433-2441, 2005.

MERZ, C.S.; KRAMER, C.; FORMAN, M. et al. Comparison of Four Commercially Available Rapid Enzyme Immunoassays with Cytotoxin Assay for Detection of *Clostridium difficile* Toxin from Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.5, p. 1142-1147, 1994.

NAGY, J.; BILKEI, G. Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit. **The Veterinary Journal**, v.166, p. 98-100, 2003.

NORMAND, V.A.J. Impact of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae bouladii* on *Clostridium difficile* in neonatal diarrhea in piglets. In: IPVS CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings**...Hamburg 2004, p. 723.

PERFUMO, C.J.; SANGUINETTI, H.R.; SANZ, M. et al. Neonatal piglets mesocolon edema and colitis: pathology and etiology. In: IPVS CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings**...Hamburg 2004, p. 467.

POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p. 258-259, 2002.

POST, K.W.; SONGER, J.G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. **Anaerobe**, v.10, p. 47-50, 2004.

POXTON, I.R.; McCOUBREY, J.; BLAIR, G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, p. 421-427, 2001.

RELLER, M.E.; LEMA, C.A.; PERL, T.M. et al. Yield of Stool Culture with Isolate Toxin Testing versus a Two-Step Algorithm Including Stool Toxin Testing for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.11, p. 3601-3605, 2007.

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.; LIMA, A.A.M. O *Clostridium difficile* como agente indutor de diarreia inflamatória. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Uberaba**, v.32, n.1, p. 47-42, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. Bacterioses. In: BARCELLOS, D.; OLIVEIRA, S.J. **Doenças dos Suínos**. 2th ed., Cãnone, Brasil. cap. 3, 2007, p. 103-104.

SONGER, J.G.; JONES, R.; ANDERSON, M.A. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxicogenic organisms. **Veterinary microbiology**, v.124, p. 358-361, 2007.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 528-536, 2005.

SONGER, J.G.; POST, W.P.; LARSON, D.J. et al. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. **Swine Health and Production**, v.8, n.4, p. 185-189, 2000.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal Health Research Reviews**, v.5, n.2, p. 321-326, 2004.

SUNENSHINE, R.H.; McDONALD, L.C. *Clostridium difficile*-associated disease: New challenges from an established pathogen. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.73, n.2, p. 187-197, 2006.

WARNY, M.; PEPIN, J.; FANG, A. et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **The New England Journal of Medicine**, v.366, p. 1079-1084, 2005.

WATERS, E.H.; ORR, J.P.; CLARK, E.G. et al. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p. 104-108, 1998.

WILSON, K.H.; KENNEDY, M.J.; FEKETY, E.R. Use of Sodium Taurocholate to Enhance Spore Recovery on a Medium Selective for *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, n.3, p. 443-446, 1982.

YAEGER, M. Clostridial enteritis: diagnosis, significance, control. In: 33th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, **Proceedings**, Iowa, p. 261, 2002.

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

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