

Artigo Original

Yone Caroline Silva¹
Maria Carolina Sousa Brito¹
Airton Mendes Conde Junior¹
Christianne Maria Tinoco-Veras¹

Prevalência de Clostridioides difficile em animais domésticos de um Hospital Veterinário**Universitário em Teresina – PI**

Prevalence of Clostridioides difficile in domestic animals at a University Veterinary Hospital in Teresina - PI, Preliminary results

ABSTRACT

Clostridium difficile is a gram-positive anaerobic bacillus, spore-forming and responsible for the production of toxins A (TcdA) and / or B (TcdB) that cause intestinal changes in humans and animals, emerging in recent years as the main cause of infectious diarrhea in a hospital setting. Risk factors for C. difficile infection (CDI) include antibiotic therapy, advanced age, hospitalization and immunosuppression, which, in general, is quite nonspecific, and can result in pseudomembranous colitis, sepsis and even death. However, in the Northeast region, studies on C. difficile are incipient, especially with regard to the manifestation of CDI in animals. The present study verified the prevalence of C. difficile and its toxins in domestic animals, dogs and cats, admitted to a University Veterinary Hospital in Teresina - PI, through an immunoenzymatic assay. 25.71% of the 35 fecal samples analyzed were positive for the Glutamate Dehydrogenase antigen (GDH). It was possible to isolate C. difficile in all genera, species and in diarrheal and non-diarrheal samples, which demonstrated that the CDI can manifest asymptotically, raising the possibility of cross-infection between the animal and its owner.

RESUMO

O Clostridium difficile é um bacilo gram positivo anaeróbio, formador de esporos e responsável pela produção das toxinas A (TcdA) e/ou B (TcdB), que causam alterações intestinais em humanos e animais, despontando, nos últimos anos, como a principal causa de diarreia infecciosa em ambiente hospitalar. Os fatores de risco para a infecção por C. difficile (CDI) incluem antibioticoterapia, idade avançada, hospitalização e imunossupressão que, em geral, é bastante inespecífica e pode resultar em quadros de colite pseudomembranosa, em sepse e até na morte. Todavia, na região Nordeste, estudos sobre o C. difficile são incipientes, principalmente no que concerne a manifestação da CDI em animais. O presente trabalho verificou a prevalência do C. difficile e suas toxinas em animais domésticos, cães e gatos, internados em um Hospital Veterinário Universitário em Teresina – PI, através de um Ensaio Imunoenzimático. 25,71% das 35 amostras fecais analisadas foram positivas para o antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH). Foi possível isolar o C. difficile, em todos os gêneros, espécies e em amostras diarreicas e não diarreicas, o que demonstrou que a CDI pode se manifestar de maneira assintomática, levantando a possibilidade de infecção cruzada entre o animal e seu proprietário.

¹. Universidade Federal do Piauí

KEYWORDS

Clostridium Difficile; Domestic Animals; Immunoenzymatic Assay

PALAVRAS-CHAVE

Clostridium Difficile; Animais Domésticos; Ensaio Imunoenzimático

AUTOR CORRESPONDENTE:

Christianne Maria Tinoco Veras
<chris.tveras@hotmail.com>
Departamento de Morfologia (DMOR) - Campus
Universitário Ministro Petrônio Portella - UFPI,
Bairro Ininga, CEP 64049550 Teresina – PI, Brasil.

INTRODUÇÃO

O *Clostridioides difficile* (CD), anteriormente conhecido como *Clostridium difficile* (LAWSON et al., 2016), é um bacilo gram-positivo, anaeróbio estrito, capaz de formar esporos e produzir as toxinas tcdA e tcdB, que são nocivas para o homem e outros animais (COHEN, 2010; YUTIN; GALPERIN, 2013; BROWN; WILSON; 2018). Essas toxinas produzidas pelo patógeno causam diarreia, que pode evoluir para colite pseudomembranosa, levando à dilatação de cólon, à sepse e até a morte (CARRICO et al., 2008; SMITS et al., 2016). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento dos casos de Infecção por *C. difficile* (CDI) nos hospitais e na comunidade, especialmente entre populações mais suscetíveis, como mulheres grávidas, idosos e pessoas imunocomprometidas, que apresentam maiores complicações e mortalidade (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

A infecção por *C. difficile*, em geral, ocorre pela via fecal-oral, através da ingestão dos esporos, que se encontram disseminados no ambiente, especialmente nas unidades de saúde, tornando a CDI a principal causa de diarreia infecciosa em hospitais em todo mundo (LYERLY; KRIVAN; WILKINS, 1988; BARTLETT, 2002; LEFFLER; LAMONT, 2015). Dessa forma, as medidas de proteção contra o patógeno consistem na higienização frequente das mãos dos profissionais e visitantes, das superfícies e equipamentos hospitalares e desinfecção do ambiente com hipoclorito de sódio (COHEN, 2010).

A patogenia do *C. difficile* não é clara, mas acredita-se que ao adentrar no trato gastrointestinal do portador, os esporos iniciam um processo de germinação no duodeno e vegetam no íleo e cólon. Em geral, a microbiota de pacientes saudáveis, humanos ou animais, impede a colonização do patógeno, visto que alguns fatores são essenciais na expressão clínica da doença, como idade avançada (> 65 anos), imunossupressão, hospitalização e exposição a antibióticos (BALASSIANO et al., 2010; BROWN; WILSON, 2018).

Em relação à infecção em animais, a partir da década de 1980, pesquisadores obtiveram êxito no isolamento de cepas toxigênicas de *C. difficile* a partir de suínos, equinos e cães (JONES; HUNTER, 1983). Hoje em dia, o patógeno tem sido apontado como causa de doença entérica em muitas outras espécies, incluindo potros, bezerros jovens e até mesmo em cobaias de laboratório, como hamsters e coelhos. (SILVA et al., 2011). Além disso, *C. difficile* emergiu, nos últimos anos, como um problema importante em leitões, nos quais representa a principal origem de diarreia neonatal não controlada nos EUA e na Europa (SONGER, 2010).

No Brasil, alguns poucos estudos relatam o isolamento do *C. difficile*, a partir de fezes de felinos e caninos, animais domésticos, que são considerados parte da família e que, portanto, compartilham dos mesmos ambientes e pertencem de seus proprietários. Ao analisar fezes diarreicas e não diarreicas de cães em Minas Gerais, Silva e colaboradores (2013) observaram positividade em 36,8% de todas as amostras, dados superiores aos até então encontrados na literatura, e demonstraram que existe uma associação positiva entre *C. difficile* e diarreia. Em algumas regiões, observou-se 80% de semelhança entre cepas da bactéria presentes em leitões e bezerros às encontradas em

humanos (SONGER, 2010). Outros estudos demonstram que estirpes semelhantes de *C. difficile* podem estar presentes em animais, alimentos e ambientes recreativos (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2013). Tais achados sugerem que os animais podem atuar como disseminadores de esporos no meio ambiente, o que faria da CDI uma zoonose; entretanto, ainda cabem maiores evidências para se chegar a tal conclusão.

Comumente, os sintomas clínicos da CDI são inespecíficos e variáveis, podendo ser identificados por meio de fezes aquosas, dor abdominal, lesões intestinais, sinais facilmente atribuídos a outras condições mais comuns na clínica. Na medicina veterinária, o diagnóstico é ainda menos preconizado e os clínicos não têm o hábito de pesquisar o agente etiológico de quadros diarreicos não sanguinolentos em cães (DINIZ, 2016). Além disso, existe a limitação dos métodos de diagnóstico, pouco disponíveis em hospitais e clínicas, sobretudo no Brasil, e o alto custo relacionado aos testes comprobatórios para *C. difficile* (BARTLETT; GERDING, 2008).

Tradicionalmente, os testes de referência utilizados para o diagnóstico desse patógeno, incluem ensaios de citotoxicidade celular e cultura citotoxigênica, que apresentam alta sensibilidade e especificidade (WILCOX, 2012). Nos últimos anos, métodos de detecção mais rápidos foram introduzidos no mercado, na forma de ensaios imunoenzimáticos (EIA), voltados à identificação da Glutamato Desidrogenase (GDH) e/ou das toxinas tcdA e tcdB, ou ambas, do *C. difficile*. O ensaio de imunoabsorção (ELISA) também é considerado padrão ouro para identificação de *C. difficile*, mas ainda não é uma técnica viável em todos os ambientes, por isso, o EIA tem sido o procedimento mais realizado para detecção do *C. difficile* (LEGARIA et al., 2018).

No Brasil, estudos sobre a infecção promovida por *C. difficile* em humanos e, principalmente, em animais domésticos, são raros e questões como apresentação clínica, fatores de risco, formas de diagnóstico e métodos de prevenção são pouco descritos na literatura. As pesquisas sobre o tema são ainda mais escassas nas regiões Norte e Nordeste, sobretudo em relação à epidemiologia e manifestação da doença. Diante disso, o presente estudo investigou a prevalência do *C. difficile* e suas toxinas em amostras fecais de cães e gatos internados em um Hospital Veterinário Universitário.

METODOLOGIA

Delineamento do estudo, local e população

Trata-se de um estudo experimental, do tipo transversal, analítico, utilizando fezes de animais domésticos, cães e gatos, atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU), localizado no Centro de Ciências Agrícolas da Universidade Federal do Piauí, sendo realizado desde Agosto de 2019, com a finalidade de verificar a presença de *C. difficile* e as toxinas produzidas por este enteropatógeno.

Coleta e armazenamento das amostras

As amostras utilizadas foram compostas de fezes diarreicas, ou não diarreicas, provenientes da evacuação

espontânea dos animais, dispostas em coletores estéreis com boca larga e tampa ajustável, e transportadas em recipiente com gelo. Em seguida, armazenadas sob refrigeração à temperatura média de 4°C até a realização da análise do material.

Detecção do *C. difficile* e suas toxinas

A detecção do *C. difficile* e suas toxinas nas fezes coletadas, foi realizada através da utilização dos kits de ensaio imunoenzimático (EIA), denominados **C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TECHLAB)**, conforme as recomendações do laboratório fabricante. O teste é formado por um dispositivo de membrana, capaz de detectar ao mesmo tempo o antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH), confirmando a presença do *C. difficile* e suas toxinas.

Análise estatística

Após a coleta das amostras, recolheu-se também informações dos animais, como idade, peso e endereço, além do seu histórico clínico, observando os fatores de risco para a CDI. Os dados foram agrupados em planilhas do Excel® e posteriormente analisados por meio de tabelas de contingência a 5% de significância, pelo teste exato de Fisher, calculado com auxílio do programa VassarStats (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 35 amostras fecais de 33 pacientes atendidos e/ou internados no Hospital Veterinário Universitário da UFPI, uma vez que foi realizada uma segunda coleta das fezes de dois animais que apresentaram *C. difficile* e que permaneceram internados no hospital, a fim de monitorar a colonização desses animais pelo bacilo. Desse total, observou-se que 54,28% pertenciam a gatos (felinos) e 45,71% a cães (caninos). Também é importante destacar que as amostras eram de fezes diarreicas e/ou fezes normais, conforme mostra a **Figura 1**. Em relação à faixa etária, 21 animais tinham de zero a 24 meses, sete entre 25 e 48 meses, e cinco possuíam mais de 48 meses de idade (**Tabela 1**). Todas amostras coletadas foram

submetidas ao ensaio imunoenzimático **C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TECHLAB)** para a detecção simultânea do antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH) e Pode-se perceber que o *C. difficile* esteve presente em nove amostras (25,71%), das quais seis (66,66%) delas eram provenientes de cães e três (33,34%) de gatos, conforme **Tabela 2**, estando em conformidade com estudos semelhantes realizados por Weese (2020), no qual cães hospitalizados apresentaram o bacilo em cerca de 22% dos casos. No entanto, nenhuma amostra foi positiva para as toxinas deste enteropatógeno. Alguns estudos mostram que a colonização por *C. difficile* não toxigênico em animais confere proteção frente às estirpes toxigênicas. Desse modo, essas cepas que não apresentam a toxina têm potencial para, no futuro, tornarem-se vacinas para humanos e animais (NAGARO et al., 2013 *apud* DINIZ, 2016). Esse resultado pode ainda ser justificado devido à baixa sensibilidade do teste imunoenzimático para a presença da toxina, ou seja, seria necessária uma grande concentração de toxinas nas amostras para que o teste as detectasse o que talvez possa ter acarretado resultados falsos negativos (LEGARIA et al., 2018).

O *C. difficile* foi encontrado em todas as faixas etárias, gêneros e espécies estudadas. Sendo que 66,66% (6/9) dos resultados positivos pertenciam a cães, enquanto 33,33% (3/9), a felinos, o que demonstra maiores taxas de isolamento do bacilo em cães do que em gatos. Além disso, neste estudo, só foi possível obter resultados positivos em felinos, cujas fezes apresentavam-se diarreicas. Quanto ao gênero, 55,55% (5/9) das amostras positivas eram de animais do sexo feminino e 44,45% (4/9) pertenciam ao sexo masculino. Conforme mostra a **Figura 2**, de acordo com a faixa etária, a maior prevalência de *C. difficile* estava em amostras de animais com idade entre zero a 24 meses, o que corrobora com os estudos de Diniz (2016), que observou que animais mais jovens são considerados imunodeprimidos, encontrando-se protegidos apenas pelos anticorpos maternos, e Weese (et al., 2020), ao demonstrar que a microbiota dos filhotes é menos desenvolvida e por isso mais susceptível à colonização pelo bacilo.

Observou-se também que a maioria dos animais positivos para *C. difficile* estavam fazendo uso de antibioticoterapia de amplo espectro, especialmente das Cefalosporinas, às quais praticamente todas as cepas de *C.*

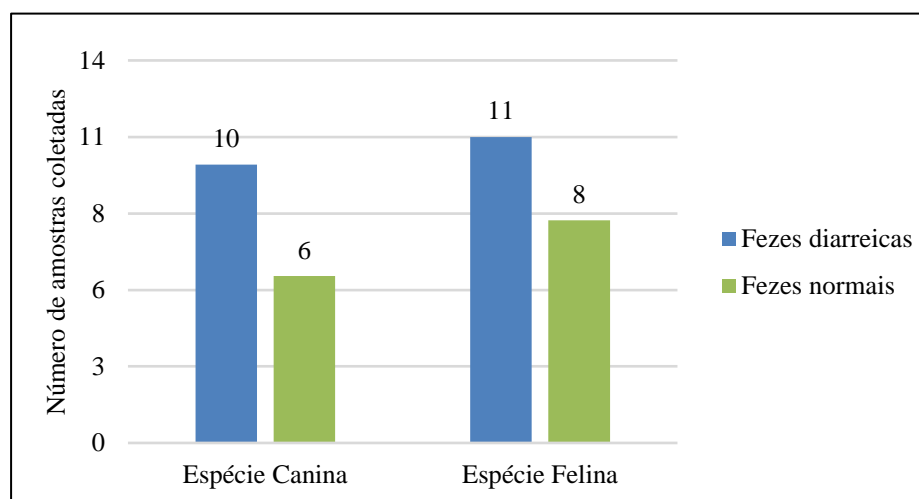


Figura 1. Amostras coletadas no Hospital Veterinário Universitário. Teresina – PI, 2020.

Idade (Meses)				
	0 a 24	25 a 48	> 48	Total
Cães	7	4	4	15
Gatos	14	3	1	18
Total	21	7	5	33

Tabela 1. Faixa etária dos animais. Teresina – PI, 2020.

difficile são resistentes, e do Metronidazol que, embora seja a primeira escolha para o tratamento da CDI, alguns estudos demonstram a existência de cepas isoladas em cavalos e humanos resistentes a este antimicrobiano (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Diante disso, foi possível inferir que a utilização desses medicamentos potenciaizou a contaminação pela bactéria, pois, de acordo com Saldanha (2019), o uso de antibióticos de amplo espectro provoca alterações na microbiota, contribuindo para desestabilizar a eficiência das barreiras intestinais.

É importante ressaltar que, dentro do nosso estudo, ao menos dois animais que apresentaram o bacilo em suas fezes compartilhavam do mesmo canil e estavam sob os mesmos cuidados. Essa evidência confirma a hipótese de que os esporos de *C. difficile* são amplamente distribuídos no ambiente nosocomial (SONGER, 2010) e levanta a possibilidade de que ocorra transmissão entre os animais hospitalizados. Ademais, existe o risco da existência do patógeno em humanos e animais estar relacionado, sugerindo que tal bacilo é responsável pela contaminação de ambos e, portanto, não se conhece ainda o perfil do agente em animais (KNETSCH et al., 2018). Em consequência do ambiente carregado de esporos, a higiene adequada das mãos dos profissionais e a limpeza das gaiolas, dos canis e gatis, são medidas fundamentais para controle da disseminação deste patógeno. Entretanto, não se pode constatar se a colonização do microrganismo precedia sua entrada no Hospital ou se a aquisição da bactéria ocorria durante a admissão do animal.

Após a realização do ensaio, uma vez obtido diagnóstico confirmatório da presença de *C. difficile*, os médicos veterinários responsáveis pelos animais foram notificados e realizou-se monitoramento dos casos em que o animal ainda se encontrava internado. Uma segunda amostra foi então obtida e, em seguida, analisada pela mesma metodologia. Em um caso particular, de um felino, sob uso de Metronidazol, Ceftriaxona e Clindamicina, cujas fezes apresentavam-se diarreicas, depois do resultado do exame e da realização da notificação junto ao profissional responsável, os antibióticos administrados foram substituídos por Amoxicilina + Clavulanato de Potássio e, 3 (três) dias após a primeira coleta, constatou-se o desaparecimento do antígeno nas fezes do animal, comprovando assim, a importância do exame diagnóstico para *C. difficile*.

No presente estudo, não se pode observar associação entre diarreia e a presença do antígeno comum GDH do *C. difficile* ($p > 0,05$), possivelmente em razão do pequeno espaço amostral utilizado. Ressalta-se a importância da utilização de um maior número de amostras fecais, a fim de se obter uma análise mais robusta. Os resultados obtidos demonstram que cães e gatos podem carregar o antígeno comum do *C. difficile* em sua microbiota intestinal. O bacilo foi observado nas fezes de animais domésticos com diarreia, mas também em amostras sólidas de cães e gatos sem sinais clínicos de CDI, de maneira assintomática, o que levanta a questão de que os animais possam atuar como reservatório para os seres humanos (RABOLD et al., 2018), que costumam apresentar maiores taxas de

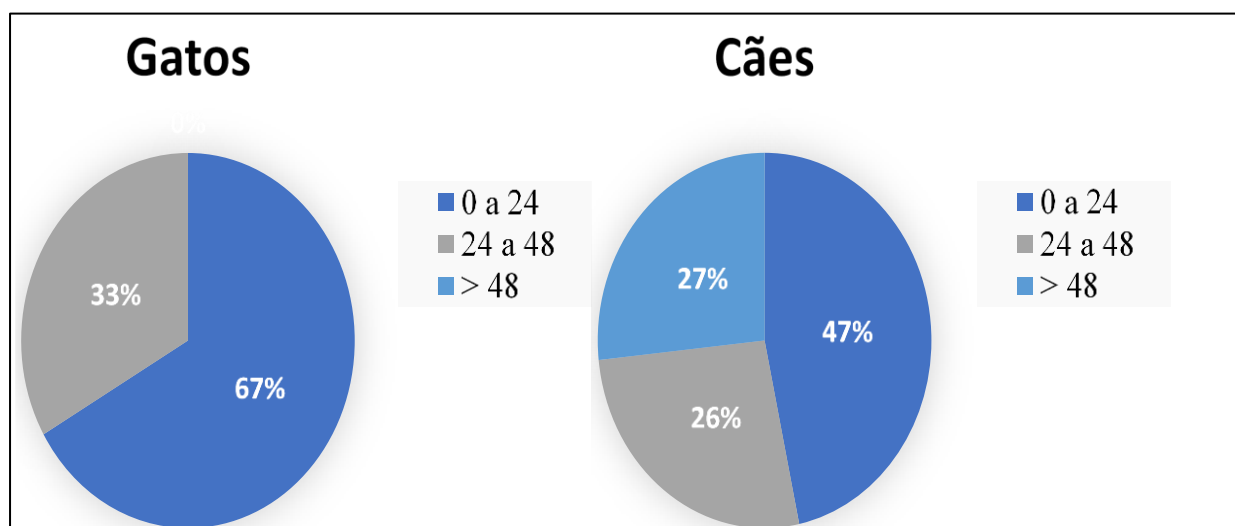


Figura 2. Detecção de *C. difficile* em cães e gatos de acordo com a faixa etária. Teresina – PI, 2020.

Resultado	Diarreico (%)	Não diarreico (%)	Total (%)	Valor p	ODDS RATIO (O.R.)
Ag + (GDH)	28,57	21,42	25,71	0.71	1.46
Toxinas +	0	0	0	N.S.A*	N.S.A*

Tabela 2. Resultados do ensaio para GDH e toxinas nas amostras diarreicas e não-diarreicas. Teresina – PI, 2020.

*N.S.A: A análise não se aplica ao dado apresentado

prevalência.

CONCLUSÃO

No presente trabalho, observou-se a presença do *C. difficile* em 25,71% de amostras fecais de animais internados em um Hospital Veterinário Universitário, tanto em amostras diarreicas como não diarreicas de cães e gatos. Dentre as amostras testadas, nenhuma apresentou as toxinas do patógeno. Neste estudo, verificou-se ainda que os animais jovens, do sexo masculino e da espécie canina, apresentaram maiores taxas do bacilo. Esses resultados indicam que os animais domésticos podem carregar *C. difficile* de maneira assintomática, reforçando a hipótese de que possam atuar como reservatórios do patógeno e, desse modo, transmitir a infecção para hospedeiros suscetíveis. Reforça-se ainda a necessidade da realização de exames diagnósticos para o *C. difficile*, com o intuito de uma prescrição medicamentosa mais adequada. Ressalta-se também a necessidade de métodos que visem ao isolamento da cepa para que seja possível analisar o perfil toxigênico; dessa forma, sendo necessário maiores investigações e cuidados clínicos acerca da CDI.

REFERÊNCIAS

- BALASSIANO, I. T. et al. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 4, p. 449-455, 2010.
- BARTLETT, J. G. Antibiotic-associated diarrhea. **New England journal of medicine**, v. 346, n. 5, p. 334-339, 2002.
- BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Supplement_1, p. 12-18, 2008.
- BROWN, A. W. W.; WILSON, R. B. *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—a narrative review. **Gastroenterol Rep (Oxf)**, v. 6; n. 3; p. 157–166, 2018.
- CARRICO, R. M. et al. Guide to the elimination of *Clostridium difficile* in healthcare settings. **Association for Professionals in Infection Control & Epidemiology**, p. 1-66, 2008.
- COHEN. et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 05, p. 431-455, 2010.
- DINIZ, A. N. *Clostridium perfringens e Clostridium difficile em relação a outros enteropatógenos em cães diarreicos*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- JONES, M. A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. **Vet. Rec.** 112: 253, 1983.
- KNETSCH C. W et al, Transferência zoonótica de *Clostridium difficile* que abriga resistência antimicrobiana entre animais de fazenda e humanos. **Journal of Clinical Microbiology**, 2018
- LAWSON, P. A. et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95-99, 2016.
- LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 16, p. 1539-1548, 2015.
- LEGARIA, M. C., et al. Detection of toxigenic *Clostridioides [Clostridium] difficile*: Usefulness of two commercially available enzyme immunoassays and a PCR assay on stool samples and stool isolates. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 50, n. 1, p. 36-44, 2018.
- LYERLY, D. M.; KRIVAN, H C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 1988.
- RABOLD, D. et al. The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. **PLoS One**, v. 13, n. 2, 2018.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. **Animal health research reviews**, v. 14, n. 1, p. 11-29, 2013.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 526-536, 2009.
- SALDANHA, G. Z. *Caracterização molecular e fatores de virulência de Clostridium difficile em estudo*

epidemiológico multicêntrico no Brasil. 2019. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVA, R. O. S. et al. Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1430-1435, 2011.

SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. C.; LOBATO, F. C. F. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 73-80, 2013.

SMITS, W. K.; LYRAS, D.; LACY, D. B.; WILCOX, M. H.; KUIJPER, E. J. *Clostridium difficile* infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16020, 2016.

SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 399-404, 2010.

TECHLAB. Disponível em <<https://www.techlab.com/diagnostics/c-difficile/c-diff-quick-chek-complete-30525c-30550c-t30525c-t30550c/>>. Acessado em 20 dez 2019.

WILCOX, M. H. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, p. 13-20, 2012.

YUTIN, N.; GALPERIN, M. Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 10, p. 2631-2641, 2013.