

Clostridioides difficile*: achados epidemiológicos em animais domésticos em um Hospital Veterinário Universitário em – Teresina, PI

***Clostridioides difficile*: epidemiological findings in domestic animals in a University Veterinary Hospital in Teresina, PI**

Maria Carolina Sousa Brito,** Pedro Arthur Gomes dos Santos,** Yone Caroline Silva,** Airtton Mendes Conde Júnior,**
Ludmila Tolstenko Nogueira,*** Christianne Maria Tinoco Veras****

Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar a prevalência de *Clostridioides difficile* e suas toxinas (A/B) nas fezes de animais domésticos de um Hospital Veterinário Universitário de Teresina - PI. A detecção de *C. difficile* e suas toxinas foi realizada por meio de um ensaio imunoenzimático, denominado C. Diff Quik Chek Complete® (TECHLAB), capaz de detectar antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH) e as toxinas A/B produzidas pelo bacilo, realizado em amostras fecais de cães (*C. lupus*) e e gatos (*Felis catus*) coletadas entre agosto de 2019 a setembro de 2020. Um total de 54 amostras fecais foram analisadas, das quais 16 foram positivas para *C. difficile* (29,63%). 68,75% (11/16) pertenciam a caninos, enquanto 31,25% (5/16) a felinos. Amostras diarreicas e não diarreicas foram utilizadas para o estudo e uma maior prevalência do bacilo pôde ser identificada em amostras diarreicas (33%). Nenhuma das amostras apresentou toxinas do patógeno. Os achados deste estudo evidenciam que *C. difficile* está presente no estado do Piauí. Foi possível identificá-lo em todas as espécies e em amostras diarreicas ou não, demonstrando que essa infecção pode se manifestar de forma sintomática e assintomática, levantando a possibilidade de infecção cruzada entre o animal e seu tutor.

Palavras-chave: Gatos, *C. difficile*, cães, prevalência

Abstract

The aim of this study was to analyze the prevalence of *Clostridioides difficile* and its toxins (A/B) in the feces of domestic animals at a University Veterinary Hospital in Teresina - PI. The detection of *C. difficile* and its toxins was performed by an immunogenic enzyme, called C. Diff Quik Chek Complete® (TECHLAB), capable of detecting antigen glutamate dehydrogenase (GDH) and A/B toxins produced by this bacillus, performed in fecal samples of dogs (*C. lupus*) and cats (*Felis catus*) collected between August 2019 and September 2020. 54 stools were analyzed, of which 16 were positive for *C. difficile* (29.63%). 68.75% (11/16) belonged to canines, while 31.25% (5/16) to felines. Diarrheal and non-diarrheal diseases are used for the study and a higher prevalence of bacillus can be identified in diarrheal diseases (33%). None of the samples present pathogen toxins. The results of this study show that *C. difficile* is present in the state of Piauí. It can be identified in all species and in diarrheal or non-diarrheic samples, demonstrating that this infection can be symptomatic and asymptomatic, giving the possibility of cross-infection between the animal and its owner.

Keywords: Cats, *C. difficile*, dogs, prevalence

Introdução

O *Clostridioides difficile* (CD), conhecido como *Clostridium difficile* (LAWSON et al., 2016), é um bacilo gram-positivo, anaeróbico estrito, capaz de formar esporos e produzir as toxinas tcdA e tcdB, que são nocivas para o homem e outros animais (COHEN et al., 2010; YUTIN e GALPERIN, 2013). Essas toxinas produzidas pelo patógeno causam diarreia, que pode evoluir para colite pseudomembranosa, levando à dilatação de cólon,

sepsis e até morte (CARRICO et al., 2008; TINOCO-VERAS et al., 2017; RUPNIK et al., 2009). 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 (RUPINK et al., 2009).

A partir da década de 1980, pesquisadores obtiveram êxito no isolamento de cepas toxicogênicas de *C. difficile* a partir

*Recebido em 24 de janeiro de 2022 e aceito em 3 de abril de 2022.

**Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

***Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

****Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI. Autor correspondente: Endereço: Rua Dra. Alaíde Marques, 1336. Ininga. Teresina - Piauí. Cep.: 64049-790, telefone: (86) 99434.2866, e-mail: chris.tveras@ufpi.edu.br.

de suínos, equinos e cães (JONES e HUNTER, 1983). Atualmente, o patógeno tem sido apontado como causa de doença entérica em muitas outras espécies, incluindo potros, bezerras 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 tutores. 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. 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.

Não obstante, 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 teve como objetivo analisar a prevalência do *C. difficile* em amostras fecais de cães e gatos atendidos em um Hospital Veterinário Universitário em Teresina – PI.

Métodos

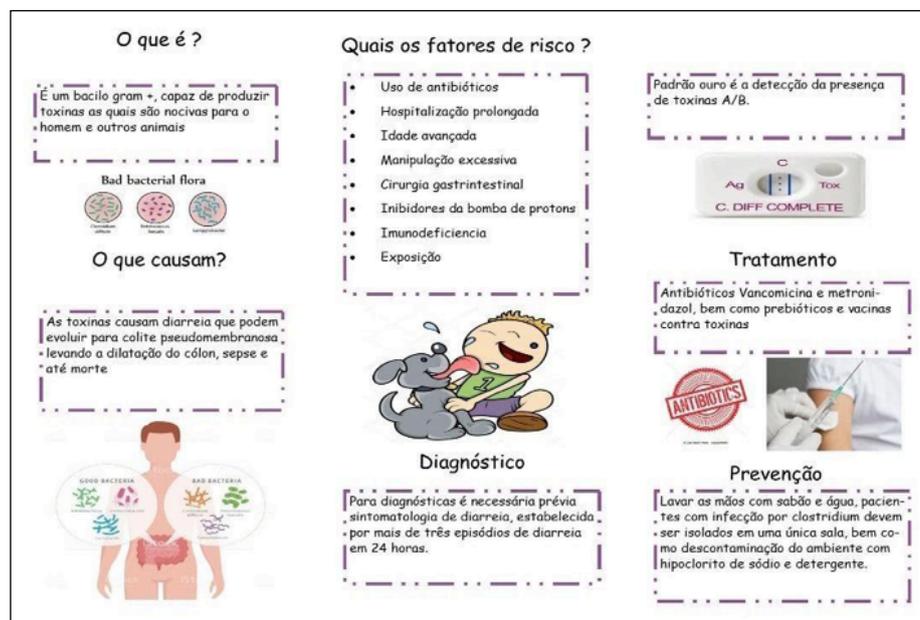
Delineamento do estudo, local e população

Para os experimentos de detecção do *C. difficile*, foram utilizadas fezes de animais domésticos, cães e gatos, atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU), localizado no Centro de Ciências Agrícolas da Universidade Federal do Piauí, no período de agosto de 2019 à setembro de 2020, com a finalidade de verificar a prevalência desse Clostridióide, por meio da detecção do antígeno glutamato desidrogenase.

Coleta e armazenamento das amostras

Após esclarecimentos aos proprietários dos animais, acerca dos objetivos da pesquisa (Figura 1) e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, as amostras eram coletadas. Foram utilizadas 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, e em seguida armazenadas sob refrigeração à temperatura média de 4°C até a realização da análise do material.

Figura 1: Folder informativo distribuído aos proprietários dos animais.



Detecção do *C. difficile* e suas toxinas

A detecção do *C. difficile* nas fezes coletadas foi realizada através da utilização dos kits de ensaio imunoenzimático (EIA), denominado *C. Diff Quik Chek Complete*® (TECHLAB), conforme as recomendações do laboratório fabricante. O teste é formado por um dispositivo de membrana, capaz de detectar o antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH), confirmando a presença do *C. difficile* (Figura 2).

Figura 2: Kit de Ensaio Imunoenzimático *C. Diff Quik Chek Complete*.



Figura 3: Controle Positivo (A), positivo para GDH (B) e resultado negativo (C).



Análise estatística e aspectos éticos

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>).

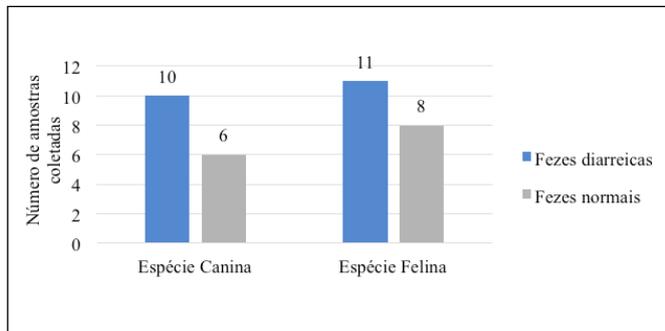
A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal - CEUA/UFPI sob o número: nº 473/18.

Resultados

Trata-se do primeiro estudo desenvolvido no estado e cujo resultado tem interesse epidemiológico ímpar visto que, por se tratar de uma zoonose, reveste-se de grande importância.

Em razão do início da pandemia provocada pelo Sars-CoV-2 no ano de 2020 e decorrente diminuição do número de atendimentos promovidos pela unidade hospitalar, o número correspondente de amostras obtidas foi de 54 amostras fecais de 52 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, pelo bacilo. Além disso, acrescenta-se a necessidade de autorização dos tutores para realização da coleta, o que reduziu o espaço amostral. Do total de amostras observou-se que 48,15% (26) pertenciam a gatos (felinos) e 51,85% (28) a cães (caninos) (**Gráfico 1**).

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



É importante destacar que as amostras eram de fezes diarreicas e/ou normais, conforme Gráfico 1. Em relação à faixa etária, 21 animais tinham de 0 a 24 meses, 7 estavam entre 25 e 48 meses, 5 possuíam mais de 48 meses de idade e 19 não foram informadas (**Tabela 1**).

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

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

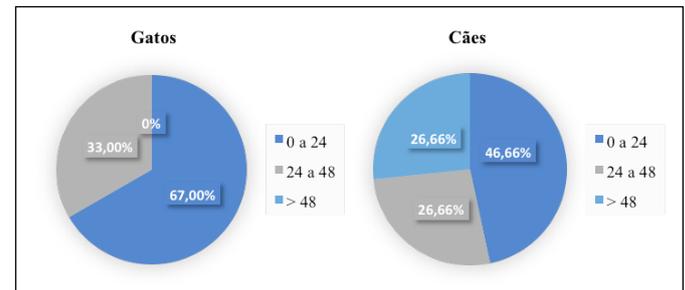
Foi possível perceber que o *C. difficile* esteve presente em 16 (29,63%) amostras, das quais (68,75%) delas eram provenientes de cães e (31,25%) de gatos, conforme **Tabela 2** e **Gráfico 2**.

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

Resultado	Diarreico (%)	Não diarreico (%)	Total (%)	Valor p	ODDS RATIO (O.R.)
Ag + (GDH)	33,33	22,22	29,63	0.53	1.75
Toxinas +	0	0	0	N.S.A*	N.S.A*

A faixa etária com maior prevalência do bacilo foi a dos animais entre 0 e 24 meses (**Gráfico 2**). Todas as amostras coletadas foram submetidas ao ensaio imunoenzimático *C. Diff* Quik Chek Complete® (TECHLAB) para a detecção simultânea do antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH), conforme **Figura 3**.

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



Discussão

Entre as espécies analisadas, as amostras positivas eram em sua maioria caninas, estando em conformidade com estudos semelhantes realizados por Weese (2020), onde cães hospitalizados apresentaram o bacilo em cerca de 22% dos casos. Apesar de o teste utilizado ser capaz de detectar ao mesmo tempo e na mesma membrana, o antígeno GDH do *C. difficile* e as toxinas A e B, nenhuma amostra foi positiva para tais toxinas. Fato esse que pode ser explicado devido à ausência ou níveis insuficientes de toxina para a detecção, de acordo com o item: valores esperados, página 90 do catálogo de instruções e Data Sheet, presentes no Kit. Além disso, alguns estudos, como o de Legaria (et al., 2018) e Rupnik (et al., 2009), demonstram que a colonização por *C. difficile* não toxicogênico em animais confere proteção frente às estirpes toxigênicas, desse modo, essas cepas que não apresentam a toxina têm potencial para no futuro se tornarem vacinas para humanos e animais.

O *C. difficile* foi encontrado em todas as faixas etárias, gêneros e espécies estudadas. Entretanto, os dados para faixa etária corresponderam a um número menor de amostras (35), visto que nas demais amostras não houve possibilidade de obter essa informação em razão de que alguns animais eram resgatados nas ruas por seus protetores e levados até o hospital. Conforme o **Gráfico 2** de acordo com a faixa etária, a maior prevalência de *C. difficile* foi em amostras de animais com idade entre 0 a 24 meses, o que corrobora com os estudos de Weese (2020), que

demonstrou que a microbiota dos filhotes é menos desenvolvida e por isso mais suscetível 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. difficile* são resistentes, e do Metronidazol que, embora seja a primeira escolha para o tratamento da CDI, alguns estudos demonstraram a existência de cepas isoladas em cavalos e humanos resistentes a este antimicrobiano (RUPNIK et al., 2009). Diante disso, foi possível inferir que a utilização desses medicamentos potencializou a contaminação pelo bacilo.

É importante ressaltar que dentro do nosso estudo, pelo 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 relacionada, 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 demonstraram 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, que costumam apresentar maiores taxas de prevalência (RABOLD et al., 2018)

Desse modo, os resultados da presente pesquisa indicaram a existência do *Clostridium difficile* no estado do Piauí em ambiente hospitalar veterinário, além disso, evidenciou 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. Por se tratar de uma zoonose, possivelmente, esteja presente em outros ambientes, inclusive em hospitais humanos e leitos de terapia intensiva, sendo responsável pelo agravamento do quadro desses pacientes, principalmente, no estado de pandemia atual.

Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de uma pesquisa detalhada em humanos hospitalizados para evidenciar tal infecção. Reforça-se ainda, a necessidade da realização de exames diagnósticos para o *C. difficile*, com o intuito de uma prescrição medicamentosa mais adequada e a necessidade de métodos que visem o isolamento da cepa para que seja possível analisar o perfil toxicogênico.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a toda a equipe de funcionários do Hospital Veterinário Universitário pelo suporte e auxílio na coleta das amostras. Agradecemos também à Universidade Federal do Piauí pela concessão de bolsa de iniciação científica a discente envolvida na pesquisa. Além disso, somos gratos ao laboratório TECHLAB pela doação dos kits de ensaio imunoenzimático, sem os quais não seria possível realizar este estudo.

Referências

CARROLL, K.C.; MIZUSAWA, M. Laboratory tests for the diagnosis of clostridium difficile. *Clinics in colon and rectal surgery*, v. 33, n. 2, p. 73–81, 2020.

CARRICO, R.M., ARCHIBALD, L.K., BRYANT, K., DUBBERKE, E., FAUERBACH, L.L., GARCIA, J.G. Guide to the elimination of *Clostridium difficile* in healthcare settings. *Association for Professionals in Infection Control & Epidemiology*, p. 1-66, 2008.

COHEN, S.H.; GERDING, D.N.; JOHNSON, S.; KELLY, C. P.; LOO, V.G.; MCDONALD, L. C.; WILCOX, M.H. 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. 5, p. 431-455, 2010.

JONES, M.A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *Veterinary Record*, v. 112, n. 11, 1983.

KNETSCH, C.W.; KUMAR, N.; FORSTER, S.C., CONNOR, T.R., BROWNE, H.P., HARMANUS, C.; LAWLEY, T.D. Zoonotic transfer of *Clostridium difficile* harboring antimicrobial resistance between farm animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 3, p. e01384-17, 2018;

LAWSON, P.A., CITRON, D.M.; TYRRELL, 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.
- LEGARIA, M.C.; ROLLET, R.; DI MARTINO, A.; CASTELLO, L.; BARBERIS, C.; ROSSETTI, M.A. 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, 2018;
- RABOLD, D.; ESPELAGE, W.; ABU SIN, M.; ECKMANN, T.; SCHNEEBERG, A.; NEUBAUER, H.; LUBKE-BECKER, A. The zoonotic potential of Clostridium difficile from small companion animals and their owners. *PLoS One*, v. 13, n. 2, p. e0193411, 2018.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A. BORGMANN, S.; KLINE, T.R.; LEJEUNE, J.T. 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.
- SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CRUZ JÚNIOR, E.C.D.C.; PIRES, P.S.; SANTOS, R.L.R.; ASSIS, R.A.D. 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.
- 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-check-complete-30525c-30550c-t30525c-t30550c/>. Acesso em 21 de julho de 2021.
- TINOCO-VERAS, C.M.; SANTOS, A.A.Q.A.; STIPURSKY, J.; MELONI, M.; ARAUJO, A.P.B.; FOSCHETTI, D.A.; GOMES, F.C.A. TGF- β 1/SMADs signaling pathway activation protects intestinal epithelium from Clostridium difficile toxin A-induced damage. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 10, p. 1-13, 2017.
- WEESE, J. S. Clostridium (Clostridioides) difficile in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 32, n. 2, p. 213-221, 2020.
- 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, 2013.