

Padronização de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*

Standardization of a model of *Clostridium difficile* infection in syrian hamsters *Mesocricetus auratus*

Rodrigo Otávio Silveira Silva^{*} Roberto Maurício Carvalho Guedes¹
Michelle de Paula Gabardo¹ Carlos Augusto Oliveira Junior¹ Felipe Masiero Salvarani¹
Prhiscylla Sadanã Pires¹ Guilherme Guerra Alves¹ Francisco Carlos Faria Lobato¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi padronizar um modelo de infecção por *Clostridium difficile* (ICD) em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*). Para seleção dos isolados capazes de causar letalidade, cinco animais por grupo receberam uma dose de clindamicina (30mg kg⁻¹) por gavagem. Após 48 horas, administraram-se 10⁷ unidades formadoras de colônia (UFC), por animal, de quatro diferentes isolados toxigênicos de *C. difficile*. Selecionou-se um dos isolados capazes de causar diarreia e letalidade e administrou-se 4x10²; 4x10⁴; 4x10⁶; 4x10⁸UFC por animal, novamente com cinco hamsters por grupo. Em todas as diluições testadas, foi possível observar a ocorrência de diarreia e morte. A maior concentração testada (4x10⁸UFC por animal) causou óbito de 100% dos hamsters do grupo. Todos os animais que vieram a óbito apresentaram tíflite hemorrágica, foram positivos para as toxinas A/B e foi possível isolar *C. difficile* do conteúdo intestinal, confirmando a reprodução experimental da doença. A dose letal para 50% da população foi estabelecida em 6,3x10⁴UFC por animal. O modelo de indução de ICD em hamsters descritos no presente estudo passa a ser uma ferramenta valiosa para estudos relativos à patogénia, tratamento e controle dessa doença.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, diarreia nosocomial, modelo animal, infecção hospitalar.

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize a model of *Clostridium difficile* infection (CDI) in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). In order to evaluate strains capable of causing lethality, five hamsters per group received clindamycin (30mg kg⁻¹) by gavage. After 48 hours, 10⁷ colony forming units (CFU) of spores' solution of four strains were administered per animal. One strain capable of causing diarrhea and death was selected and administered at the following concentrations: 4x10²; 4x10⁴; 4x10⁶; 4x10⁸ CFU per animal. All dilutions tested were able to cause diarrhea and death. The highest concentration showed 100% of mortality. Post mortem evaluation revealed hemorrhagic

typhlitis in all death animals. In addition, all intestinal contents were positive for A/B toxins, and toxigenic *C. difficile* strains were isolated, confirming the induction of infection by this microorganism. The dose lethal to 50% of the population was calculated: 6.3x10⁴ CFU per animal. The standardized model of CDI in hamster is now available for studies on pathogenesis, treatment and control of this disease.

Key words: *Clostridium difficile*, nosocomial diarrhea, animal model, hospital infection.

INTRODUÇÃO

Considerando um patógeno emergente, *Clostridium difficile* é responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos (BALASSIANO et al., 2011). Em animais, a infecção por *C. difficile* (ICD) foi recentemente confirmada no Brasil em potros, cães e descrita em uma jaguatirica criada em cativeiro (SILVA et al., 2013a; SILVA et al., 2013b; SILVA et al., 2013c). Em suínos, estudos recentes sugerem uma grande disseminação da doença em granjas brasileiras com elevado número de matrizes (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011), dado semelhante ao relatado nos últimos anos em países da Europa e nos Estados Unidos, onde a ICD é considerada a principal causa não controlada de diarreia em leitões (SONGER, 2010).

Apesar da crescente importância de *C. difficile* como enteropatógeno para animais domésticos e humanos, não existem produtos

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com. *Autor de correspondência.

imunoprolifáticos para a doença. Em animais, somado aos prejuízos causados pelo agente, especialmente na suinocultura e equinocultura, pesquisas sugerem ainda que a infecção por *C. difficile* seja uma possível zoonose (ARROYO et al., 2005; JHUNG et al., 2008). Caso essa hipótese seja confirmada, a prevenção da doença e até mesmo da colonização por *C. difficile* no trato gastro intestinal de animais domésticos passará a ser uma prioridade (SILVA et al., 2013d).

Para o desenvolvimento e avaliação de métodos de controle e tratamento da infecção por *C. difficile*, faz-se necessário a utilização de modelos animais de indução da doença. A principal espécie utilizada para tal são os hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), devido a sua alta sensibilidade a ICD, fazendo com que seja possível realizar a indução com diversas classes de antimicrobianos e sem a necessidade de obtenção de animais livres de patógenos. Porém, a maioria dos trabalhos sobre modelos animais de ICD são pouco descritivos e deixam em aberto pontos essenciais para reprodução do protocolo de indução, tais como estirpe utilizada, dose de antimicrobiano e forma de administração (BEST et al., 2012). Além disso, a maioria dos estudos relata o uso de amostras de *C. difficile* não disponíveis no Brasil, dificultando a reprodução em nosso meio (HOWERTON et al., 2013; NAGARO et al., 2013). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi padronizar um protocolo de infecção por *C. difficile* em hamsters sírios, disponibilizando-o para futuros estudos sobre patogenia, tratamento e métodos de controle da ICD no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados cinco fêmeas de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), com quatro a oito semanas de idade, por grupo experimental. Água, maravalha, ração e gaiolas foram esterilizadas por autoclavagem (121°C por 20 minutos). Os animais foram acondicionados em estantes ventiladas, equipadas com filtros absolutos (Alesco Co., Inglaterra) para minimizar a contaminação do ambiente e entre os grupos experimentais.

Estirpes avaliadas

Quatro estirpes toxigênicas (A⁺B⁺) de *C. difficile*, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, foram pré-selecionadas para avaliação quanto à toxigenicidade *in vivo*, sendo elas: ATCC 9689, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz;

EQ5, estirpe isolada de um potro com ICD (PREIS et al., 2012); Z14, estirpe isolada de um cão aparentemente saudável; I4, estirpe isolada de um suíno com ICD.

Produção dos esporos das estirpes de *C. difficile*

Os esporos de *C. difficile* foram produzidos de acordo com YANG et al. (2009). As estirpes de *C. difficile* foram inoculadas em erlenmeyer contendo 250mL de BHI (Difco Laboratories, EUA), seguindo de incubação a 37°C por 72 horas em ambiente de anaerobiose. Após esse período, as culturas foram mantidas por cinco dias em temperatura ambiente para induzir a esporulação. O conteúdo foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos e ressuspenso com 10mL de salina esterilizada 0,85% por duas vezes. Posteriormente, a suspensão foi submetida ao aquecimento de 80°C por 30 minutos, e repetição do protocolo de centrifugação. As soluções foram alíquotadas em microtubos esterilizados, contendo 300µL, e armazenadas a -20°C até a utilização.

Uma semana após a produção, as soluções de esporos foram avaliadas por meio de coloração de Gram, coloração de esporos (Wirtz-Conklin) e teste respiratório em ágar sangue, constituído de ágar Muller-Hinton (Difco Laboratories, EUA) suplementado com 5% de sangue ovino. Para determinação da concentração de unidades formadoras de colônia por mL, diluições seriadas na base 10 (variando de 10⁻³ a 10⁻⁸) foram inoculadas em ágar sangue. Após incubadas por 48 horas em ambiente de anaerobiose produzido por mistura gasosa (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂), placas com 30 a 300 colônias foram contadas e calculou-se a média de UFC/mL.

Para determinação da viabilidade da solução de esporos armazenada à -20°C, uma alíquota da solução da estirpe ATCC9689 foi descongelada mensalmente, durante um período total de seis meses, e submetida à contagem de UFC/mL, como descrito anteriormente. As contagens obtidas ao longo do período de avaliação foram comparadas pelo teste do qui-quadrado e pelo teste de Fisher, em um nível de significância de 95% (P<0,05) (STATA, College Station, Texas, EUA).

Avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*

O objetivo desta etapa foi avaliar quais estirpes eram capazes de infectar os hamsters e, conseqüentemente, causar diarreia e óbito desses. A avaliação de toxigenicidade *in vivo* foi realizada segundo SAMBOL et al. (2002). Dois dias após uma dose de clindamicina (30mg kg⁻¹), administrou-

se 100µL de solução de esporos contendo 10⁷UFC das estirpes toxigênicas em cada animal. As administrações foram realizadas por gavagem. Os grupos, contendo cinco hamsters em cada, foram divididos da seguinte forma: no grupo 1 (G1), os animais receberam esporos da estirpe ATCC9689; no grupo 2 (G2), foram administrados esporos da estirpe EQ5; no grupo 3 (G3), os animais receberam esporos da estirpe Z14; no grupo 4 (G4), administrou-se a estirpe I4; no grupo 5 (C1), os animais receberam apenas a dose de clindamicina e, 48 horas depois, uma dose de 100µL de salina esterilizada 0,85%; no grupo 6 (C2), os animais receberam apenas esporos da estirpe toxigênica ATCC9689, sem a administração prévia de clindamicina.

Os animais foram observados diariamente por 30 dias quanto à ocorrência de diarreia (presença de fezes amolecidas na gaiola, cauda e focinho com sujidades indicativas) e morte. Após o término do experimento ou quando ocorria o óbito, os animais eram necropsiados e fragmentos do ceco eram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, foi feito o processamento pela técnica de desidratação, diafanização, inclusão, secção de 5 micras e coração pela hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e avaliação histológica, realizada em microscópio de luz clara. Coletou-se ainda o conteúdo intestinal para detecção das toxinas A/B pelo teste de citotoxicidade celular (CTA) e isolamento de *C. difficile*, como descrito por SILVA et al. (2013d).

Determinação da dose mínima mortal (DMM) e da dose letal para 50% (DL₅₀)

Dentre as estirpes capazes de causar infecção e letalidade, selecionou-se uma para avaliação da DMM e cálculo da DL₅₀. Foram formados

cinco grupos contendo cinco hamsters em cada. Administrou-se uma solução de esporos contendo 4x10² (grupo A1), 4x10⁴ (grupo A2), 4x10⁶ (grupo A3) e 4x10⁸ (grupo A4) UFC por animal. No quinto grupo (grupo controle), houve administração de apenas 100µL de salina esterilizada 0,85%. Utilizou-se mesmo esquema de indução e acompanhamento descrito para a avaliação da toxigenicidade *in vivo*. O total de óbitos ocorridos em cada grupo ao final do período de avaliação foi comparado pelo teste de Fisher, em um nível de significância de 95% (P<0,05) (STATA, College Station, Texas, EUA).

RESULTADOS

Na produção das soluções de esporos, a contagem de unidades formadoras de colônia variou de 2,0x10⁸ a 4,0x10⁹UFC mL⁻¹ entre as estirpes trabalhadas. A contagem inicial da estirpe ATCC9689 foi de 2,2x10⁹UFC mL⁻¹, sendo que a média das sete contagens foi de 2,1x10⁹UFC mL⁻¹ e o desvio padrão de ±1,2x10⁸UFC mL⁻¹, não havendo alteração significativa da contagem bacteriana ao longo do tempo testado.

Na avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*, todas as amostras testadas foram consideradas toxigênicas, uma vez que foram capazes de causar diarreia e morte dos animais (Tabela 1). No exame *post mortem*, a mucosa e a serosa do ceco dos animais que vieram a óbito encontravam-se extensamente hemorrágicas e com conteúdo líquido de aspecto sanguinolento (Figura 1: B1). Na avaliação histopatológica, foi possível observar uma extensa destruição da mucosa intestinal com infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrócíticas, caracterizando uma tíflite necro-hemorrágica (Figura 1: B2).

Tabela 1 - Ocorrência de diarreia, morte, lesões intestinais e resultado de isolamento e detecção das toxinas A/B por CTA nos grupos inoculados (G1 a G4) e nos grupos controle (C1 e C2) com diferentes estirpes toxigênicas de *Clostridium difficile*.

Grupo (Estirpe)	-----Ocorrência (%)-----		Lesões ¹	Isolamento ²	Toxinas A/B
	Diarreia	Morte			
G1 (ATCC)	4/5 (80)	5/5 (100)	Sim	Positivo	Positivo
G2 (EQ5)	3/5 (60)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
G3 (Z14)	4/5 (80)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
G4 (I4)	3/5 (60)	4/5 (80)	Sim	Positivo	Positivo
C1 (Nenhuma)	0/5 (0)	0/5 (0)	Não	Negativo	Negativo
C2 (ATCC)	0/5 (0)	0/5 (0)	Não	Negativo	Negativo

¹Presença de lesões macroscópicas e microscópicas nos animais que vieram a óbito. ²Isolamento de estirpes de *C. difficile* toxigênicas.

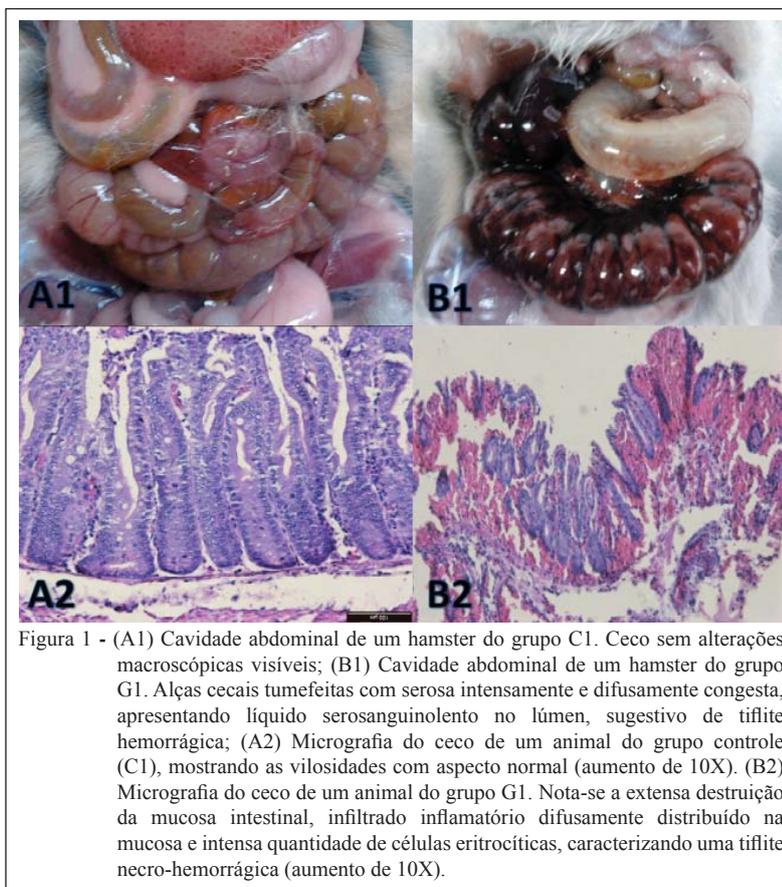


Figura 1 - (A1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo C1. Ceco sem alterações macroscópicas visíveis; (B1) Cavidade abdominal de um hamster do grupo G1. Alças cecais tumefeitas com serosa intensamente e difusamente congesta, apresentando líquido serosanguinolento no lúmen, sugestivo de tífite hemorrágica; (A2) Micrografia do ceco de um animal do grupo controle (C1), mostrando as vilosidades com aspecto normal (aumento de 10X). (B2) Micrografia do ceco de um animal do grupo G1. Nota-se a extensa destruição da mucosa intestinal, infiltrado inflamatório difusamente distribuído na mucosa e intensa quantidade de células eritrocíticas, caracterizando uma tífite necro-hemorrágica (aumento de 10X).

A partir do conteúdo intestinal, coletado durante a necropsia dos hamsters que vieram espontaneamente a óbito, foi possível detectar as toxinas A/B e isolar *C. difficile* de todos os animais avaliados (Tabela 1). Já nos grupos controle (C1 e C2), nenhum animal desenvolveu diarreia ou veio a óbito durante o período de observação. Tais hamsters foram eutanasiados 30 dias pós-desafio e nenhuma alteração *post mortem* significativa foi observada (Figura 1: A1 e A2). O conteúdo do ceco encontrava-se com consistência pastosa a sólida e não foi possível detectar as toxinas A/B ou isolar *C. difficile* de nenhum animal dos grupos controle (Tabela 1).

Selecionou-se a estirpe ATCC9689 para prosseguimento do trabalho. A figura 2 mostra o tempo de sobrevivência nos 30 dias de observação dos animais inoculados com diferentes concentrações da estirpe ATCC9689 durante a determinação da DMM e DL₅₀. Comparando com o grupo controle, foi possível perceber uma diferença significativa na ocorrência de morte nos grupos A2, A3 (P=0,038) e no grupo A4 (P=0,001). Todos os hamsters que vieram a óbito possuíam lesões hemorrágicas no ceco e foram positivos para as toxinas A/B de *C. difficile*, confirmando novamente a indução da doença.

DISCUSSÃO

O protocolo de produção de esporos permitiu a obtenção de uma suspensão rica de esporos livres (sem a presença do corpo celular), com alto grau de pureza e sem contaminação no teste respiratório. Resultados semelhantes de pureza e concentração foram relatados por YANG et al. (2009) para obtenção de esporos de *Clostridium sporogenes* e *Clostridium hungatei*, sugerindo que esse protocolo, apesar de simples, é suficiente para a obtenção de uma solução de esporos de alta concentração e de elevada pureza.

Enquanto alguns trabalhos com modelos de ICD em hamsters não especificam a forma bacteriana administrada (ANTON et al., 2004), outros autores relatam o uso de apenas células vegetativas (MCVAY & ROLFE, 2000; KOKKOTOU et al., 2008), apenas esporos (SAMBOL et al., 2002; NAGARO et al., 2013) ou proporções estimadas de ambos (OCHSNER et al., 2009). No presente estudo, optou-se por trabalhar com soluções de esporos livres que, devido à alta resistência típica dessa forma bacteriana, sofrem menos alterações na concentração de UFC após armazenamento. Como o esperado, as

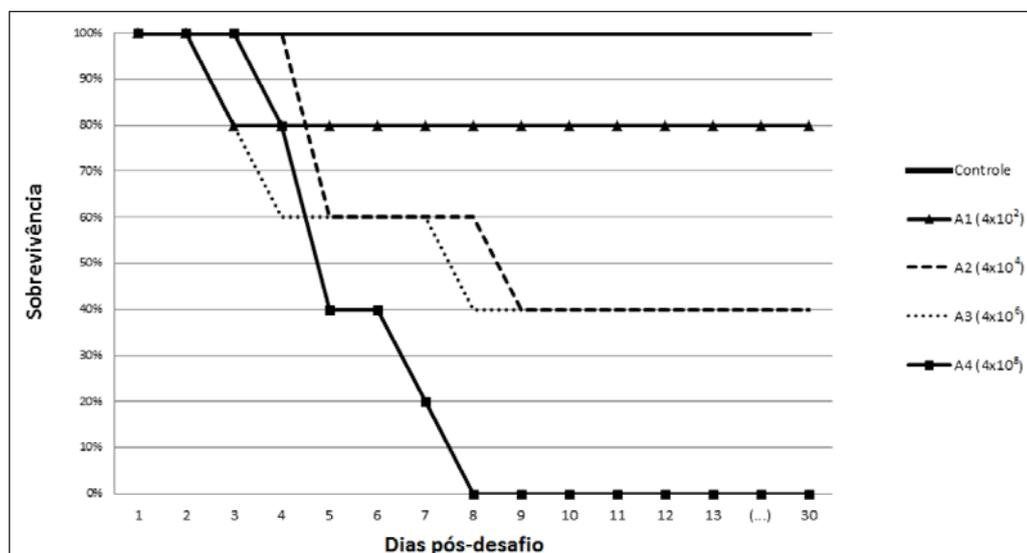


Figura 2 - Sobrevivência de hamsters durante o período de observação de 30 dias dos grupos de animais inoculados com diferentes concentrações de esporos da estirpe ATCC9689 (A1 a A4) de *Clostridium difficile* e do grupo controle.

contagens seguintes à inicial apresentaram resultados semelhantes em todos os sete tempos avaliados, totalizando seis meses de armazenagem sem alteração significativa da contagem. Tal resultado demonstra a resistência dos esporos de *C. difficile* armazenados a -20°C e confirma a possibilidade de armazenamento da solução nessas condições, facilitando o protocolo de indução, devido à não necessidade de contínua produção e dosagem da estirpe a ser utilizada.

Na avaliação da toxigenicidade *in vivo* das estirpes de *C. difficile*, as lesões observadas foram similares às comumente relatadas em infecções por *C. difficile* em hamsters e outros roedores de laboratório (SAMBOL et al., 2002; BEST et al., 2012; HOWERTON et al., 2013; NAGARO et al., 2013). Tais alterações foram ainda encontradas em todos os animais que vieram a óbito durante o experimento, incluindo aqueles que não apresentaram diarreia previamente. Além das lesões características, o isolamento e detecção das toxinas A/B nesses animais confirmam a indução da doença (Tabela 1).

Nos grupos controle (C1 e C2), não foram observados indícios de colonização ou infecção por *C. difficile* (Tabela 1). Tais resultados confirmam que não houve infecção cruzada no grupo C1, uma vez que tais animais receberam antimicrobiano e estariam susceptíveis à colonização por *C. difficile*. No grupo C2, a ausência de infecção demonstra que não houve colonização pela estirpe ATCC9689, provavelmente, devido ao “efeito barreira” da microbiota íntegra (BÅVERUD, 2002).

Três animais, dos grupos G1, G2 e G4, vieram a óbito antes que o quadro clínico de diarreia

pudesse ser observado. A infecção por *C. difficile* em hamsters é comumente fulminante, culminando com um quadro hiperagudo da doença, que é caracterizado por extensa necrose intestinal e toxemia, podendo ocorrer óbito dos animais antes mesmo da visualização do quadro clínico de diarreia (CHEN et al., 2008; BEST et al., 2012; HOWERTON et al., 2013).

Nos três animais que sobreviveram, dos grupos G2, G3 e G4, não foram observadas alterações *post mortem* significativas e não foi possível detectar as toxinas A/B. Além disso, *C. difficile* não foi isolado do conteúdo intestinal, semelhante aos animais dos dois grupos controle. Acredita-se que a falha de indução possa ter ocorrido pela administração de uma dose insuficiente de esporos de *C. difficile* ou a microbiota não tenha sido suficientemente agredida pela dose de antibiótico administrada, permanecendo o efeito barreira (BÅVERUD, 2002).

Como todas as estirpes trabalhadas foram capazes de induzir a diarreia, optou-se por prosseguir o trabalho com a estirpe ATCC9689, por tratar-se de uma estirpe de referência certificada, internacionalmente reconhecida e fornecida gratuitamente pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), as universidades e órgãos de pesquisa brasileiros. Na figura 2, percebe-se que os óbitos iniciaram 24 horas após a administração dos esporos, mas concentraram-se principalmente entre 72 e 96 horas pós-desafio, resultado semelhante ao relatado em trabalhos anteriores com hamsters (SAMBOL et al., 2002; NAGARO et al., 2013). Além da utilização de diferentes estirpes de *C. difficile*, o grande número de

diferentes protocolos de administração em modelos de ICD dificulta comparações. Em geral, as doses variam de 10^7 a 10^4 UFC por animal, porém a via de administração (gavagem, via oral), o tempo após antibioticoterapia que a estirpe é administrada e até mesmo a forma bacteriana utilizada (esporos, células vegetativas) variam, impedindo conclusões. Por outro lado, independente da forma e estirpe utilizada, a grande maioria dos trabalhos utilizam doses que causam entre 60 e 100% de letalidade (SAMBOL et al., 2002; CHEN et al., 2008; BEST et al., 2012; HOWERTON et al., 2013; NAGARO et al., 2013). Considerando a diferença estatística apresentada entre os grupos desafiados, quando comparados com o grupo controle, seria possível utilizar qualquer dose entre 4×10^4 e 4×10^8 UFC da estirpe ATCC9689, por animal, para estudos de avaliação de métodos de proteção ou de tratamento. Alguns trabalhos de indução de infecções para outros micro-organismos utilizam também a DL_{50} . No presente estudo, a DL_{50} calculada segundo REED & MUENCH (1938) foi de $6,3 \times 10^4$ UFC por animal.

O protocolo padronizado no presente estudo permitiu a utilização de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) como modelo de indução da infecção por *C. difficile*, disponibilizando-o como uma ferramenta valiosa para estudos relativos à patogenia, tratamento e controle dessa doença no Brasil.

APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Protocolo número 142/2012, CEUA-UFGM.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT). FCFL e RMCG possuem bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

- ANTON, P.M. et al. Rifalazil treats and prevents relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n.10, p.3975-3979, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388461>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1128/AAC.48.10.3975-3979.2004.
- ARROYO, L.G. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, p.163-6, 2005. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673511>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1099/jmm.0.45805-0.
- BALASSIANO, I.T. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, n.2, p.249-255, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20623188>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1007/s10482-010-9483-8.
- BÄVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse: a review. *Veterinary Quarterly*, v.24, n.4, p.203-219, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540137>>. Accessed: May 04, 2013.
- BEST, E.L. et al. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, v.2, p.145-167, 2012. doi: 10.4161/gmic.19526.
- CHEN, X. et al. A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, v.135, p.1984-1992, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848941>>. Accessed: May 04, 2013.
- HOWERTON, A. et al. A new strategy for the prevention of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Infectious Diseases*, v.207, p.1498-504, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420906>>. Accessed: Dec. 04, 2013. doi: 10.1093/infdis/jit068.
- JHUNG, M.A. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.7, p.1039-1045, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598622>>. Accessed: May 04, 2013.
- KOKKOTOU, E. et al. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.52, n.3, p.1121-1126, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598622>>. Accessed: May 04, 2013. Doi: 10.1128/AAC.01143-07.
- LIPPKE, R.T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.6, p.505-510, 2011. doi: 10.1590/S0100-736X2011000600008.
- LUNA, L.G. Routine staining procedures. In: LUNA, L.G. (Ed). *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. New York: McGraw- Hill Book, 1968. p.32-29.
- MCVAY, C.S.; ROLFE, R.D. *In vitro* and *in vivo* activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p.2254-2258, 2000. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90054>>. Accessed: May 04, 2013.
- NAGARO, K.J. et al. Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57, p.5266-5270, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939887>>. Accessed: Dec. 01, 2013. doi: 10.1128/AAC.00580-13.
- OCHSNER, U.A. et al. Inhibitory effect of REP3123 on toxin and spore formation in *Clostridium difficile*, and *in vivo* efficacy in a hamster gastrointestinal infection model. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v.63, p.964-971, 2009. doi:10.1093/jac/dkp042.

- PREIS, I.S. et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5, n.1, p.7-11, 2012.
- REED, L.J; MUENCH, H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.494-497, 1938.
- SAMBOL, S.P. et al. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. **Journal of Infection Diseases**, v.186, n.12, p.1781-1789, 2002. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447764>>. Accessed: May 04, 2013.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n1, p.131-137, 2013a. doi:10.1590/S1517-83822013005000008.
- SILVA, R.O.S. et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). **Anaerobe**, v.20, p.82-84, 2013b. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467074>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.02.007.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. **Equine Veterinary Journal**, v.45, p.671-675, 2013c. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452044>>. Accessed: May 04, 2013. doi: 10.1111/evj.12046.
- SILVA, R.O.S. et al. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. **Ciência Rural**, v.43, n.1, p.73-80, 2013d. doi:10.1590/S0103-84782012005000137.
- SILVA, R.O.S. et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. **Ciência Rural**, v.41 n.8, p.1130-1135, 2011. doi:10.1590/S0103-84782011005000100.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.399-404, 2010. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.003.
- YANG, W. et al. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p-27-33, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120612>>. Accessed: May 04, 2013. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03931.x.