



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ANA CLAUDIA TSUCHIYA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS E OCORRÊNCIA DE
Clostridium difficile EM CARNES**

Prof. Dr. ARNALDO YOSHITERU KUAYE

Orientador

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Ana Claudia Tsuchiya aprovada pela comissão julgadora em 09/04/2012 e orientado pelo Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye.

***Campinas* – SP**

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

T789a Tsuchiya, Ana Claudia, 1987-
Avaliação de métodos e ocorrência de *Clostridium difficile* em carnes / Ana Claudia Tsuchiya. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Toxinas. 2. Patógeno. 3. Esporos. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Diarréia. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of methods and occurrence of *Clostridium difficile* in meats

Palavras-chave em inglês:

Toxins

Pathogen

Spores

Polymerase Chain Reaction

Diarrhoea

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Arnaldo Yoshiteru Kuaye [Orientador]

José Luiz Pereira

Luciana Maria Ramires Esper

Data da defesa: 09/04/2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

Este exemplar corresponde a redação final da dissertação:

Avaliação de métodos e ocorrência de *Clostridium difficile* em carnes

Defendida em ___/___/___ por **Ana Claudia Tsuchiya** e aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
(Membro)

Dra. Valeria Christina Amstalden Junqueira
(Membro)

Dedico os meus queridos pais Isao e Irma, por serem meus grandes incentivadores, pelos ensinamentos valiosos, pela ótima educação que recebi e por sempre acreditarem em mim, aos meus irmãos André e Ander pela amizade, preocupação e grande auxílio quando muito precisei.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye e Dra. Dirce Yorika Kabuki pela orientação e confiança na realização desse trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper, Prof. Dr. José Luiz Pereira, Profa. Dra. Lucia Regina Durrant, Dra. Valeria Christina Amstalden Junqueira, pelas correções e sugestões na redação dessa dissertação;

Aos meus pais, Isao e Irma por serem os responsáveis por minha vida e todas as minhas conquistas até hoje, pelo amor, carinho e confiança de sempre;

À bacham por ser minha grande amiga e meu porto seguro de força, calma e paciência;

Aos meus irmãos André e Ander e as minhas cunhadas Nági e Lu pelo incentivo e preocupação, pelas dicas e ajudas, pela amizade, companheirismo em diversos momentos;

À Dra. Dirce Yorika Kabuki, por estar presente em todos os momentos, por ter paciência, pela amizade acima de tudo, pelas conversas, preocupações, risadas, apoio durante o mestrado, por ser minha principal professora e um grande exemplo a ser seguido;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela confiança e orientação;

Aos meus queridos tios Shigueru e Zelma, pelo companheirismo e grande incentivo no mestrado;

À Dona Denir, pelo companheirismo no dia a dia laboratorial, pela amizade e por ser um exemplo de força;

Às amigas de convívio no Laboratório de Higiene Meg, Gra, Marcília, Maria Amélia e Isa pessoas incríveis que passaram por minha vida e me ensinaram muitas coisas, foram companheiras, queridas, prestativas e, acima de tudo, amigas;

À amigas da pensão, Vanesa, Angela, Rafa, Day, Liciane, Dani, Monique, Karol, Carol Bottura, Dina, Miriam, Grazi e Lívia que se tornaram mais que amigas, uma família. Obrigada pelo convívio durante este ano, pela amizade conquistada, pelo apoio, pela paciência nos meus dias de estresse e por aguentarem e escutarem minhas reclamações freqüentes;

A Tabata Kumom, por ter um coração tão bonito e caridoso, por ser uma pessoa incrível e ter sido mais do que amiga em tantos momentos em que precisei.

As minhas amadas e queridas amigas, ou melhor, mais que amigas, simplesmente contornaram a genética e hoje faz parte da minha família, Karina, Lets e Cecília.

Aos grandes amigos que conquistei em Campinas, Diogo, Gui, Erick, Simone, Gra, Ligia, Laís e Talita, espero que continuem presentes em minha vida, deixaram as melhores lembranças e que espero que essa amizade permaneça viva para sempre!

Aos colegas dos laboratórios vizinhos do DTA: Veri, Wellington, Clarice, Mirian, Bruna e Miguel pelos bons momentos que passamos juntos;

A família Barrese de Godoi, Tereza, Lu, Ga, Ti, Adolfo e Carol, pelo apoio e momentos de alegria que passamos juntos em Bragança Pta e a família Guimarães, Naná, Sr. Carlos, Luis, Dudu, Rakél e Flavinho, pelos inúmero momentos de alegria,

descontração, pelo incentivo com o mestrado, por confiarem em mim e pela grande amizade que levarei por toda a vida!

Aos meus grandes e queridos amigos Zamky, Ana da Graça, Mari, Henrique, Thiago e Ricardo que mesmo distantes sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente.

Tenho muita sorte de ter conhecido vocês!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- pelo financiamento do projeto;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida;

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade para realização deste trabalho;

Acima de tudo agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e força a mim proporcionada para vencer dificuldades.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS DA PESQUISA	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Aspecto microbiológico da carne	4
3.2 Histórico e características do <i>Clostridium difficile</i>	6
3.3 Manifestações clínicas da doença associada ao <i>C. difficile</i> e suas toxinas	8
3.4 <i>Clostridium difficile</i> em animais e alimentos	13
3.5 Métodos de isolamento de <i>Clostridium difficile</i>	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Avaliação de métodos de detecção de <i>C. difficile</i> em carnes	18
4.1.1 Amostras.....	20
4.1.2 Cepa padrão de <i>Clostridium difficile</i>	21
4.1.3 Preparo da suspensão de esporos de <i>C. difficile</i>	21
4.1.4 Contagem de esporos de <i>C. difficile</i>	22
4.1.5 Contaminação artificial das amostras.....	23
4.1.6 Identificação dos isolados por <i>Polymerase Chain Reaction</i>	24

4.1.7 Avaliação estatística	26
4.2 Ocorrência de <i>Clostridium difficile</i> em carnes resfriadas comerciais.....	27
4.2.1 Amostras.....	27
4.2.2 Detecção e isolamento de <i>C. difficile</i>	27
4.2.3 Identificação dos isolados	27
4.3 Avaliação do perfil toxigênico dos isolados de <i>C. difficile</i>	28
4.3.1 Detecção dos genes codificadores de toxina A (<i>tcdA</i>), toxina B (<i>tcdB</i>) dos isolados.	28
4.3.2 Detecção de toxinas.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Avaliação de métodos de detecção de <i>Clostridium difficile</i> em carnes.....	30
5.2 Ocorrência de <i>Clostridium difficile</i> em amostras de carnes resfriadas comerciais	42
5.3 Avaliação do perfil toxigênico dos isolados de <i>C. difficile</i>	49
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colonização de <i>C. difficile</i> no intestino, com conseqüente produção de toxinas A e B (cepas toxigênicas). Atuação das toxinas originando colite pseudomembranosa ou seguindo para corrente sanguínea.....	10
Figura 2. a) Toxina A e B, codificada pelo gene de patogenicidade (<i>PaLoc</i>) que compreende 5 genes: <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>tcdC</i> , <i>tcdD</i> ou <i>tcdR</i> e <i>tcdE</i> . b) Toxina binária é codificada numa região separada do cromossomo (<i>cdtLoc</i>) e é composta por 3 genes e 2 proteínas desvinculadas CdtB e CdtA. A CdtB tem função de ligação e a CdtA é um componente enzimático.....	11
Figura 3. Fluxograma da metodologia de detecção de <i>C. difficile</i>	20
Figura 4. Número de amostras positivas com <i>C. difficile</i> em carnes comerciais de acordo com os procedimentos utilizados, plaqueamento direto e tratamento com álcool.	44
Figura 5. Distribuição de amostras positivas com <i>C. difficile</i> em carnes comerciais de acordo com os meios seletivos utilizados, CDMNA (ágar <i>Clostridium difficile</i> moxatactam norfloxacin) e CCFA (ágar cicloserina cefoxitina frutose).	45
Figura 6. Amostras positivas para <i>C. difficile</i>	49
Figura 7. Produtos de amplificação dos genes <i>tpi</i> (230 bp), <i>tcdA</i> (252 bp) e <i>tcdB</i> (204 bp) nas cepas de referência de <i>C. difficile</i> através da técnica da PCR.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos para identificação de <i>C. difficile</i>	26
Tabela 2. Quantidade de esporos de <i>C. difficile</i> (baixo e alto nível) inoculadas em amostras de carne bovina moída e carne de frango.	31
Tabela 3. Recuperação de <i>C. difficile</i> após plaqueamento direto e tratamento com álcool em amostras de carne bovina moída inoculada com alto e baixo nível de <i>C. difficile</i>	33
Tabela 4. Recuperação de <i>C. difficile</i> em meios seletivos CDMNA e CCFA após plaqueamento direto, em 40 amostras de carne bovina moída, com baixo e alto nível de inoculação.	35
Tabela 5. Recuperação de <i>C. difficile</i> em meio seletivo CDMNA e CCFA para tratamento com álcool, em 40 amostras de carne bovina moída, com baixo e alto nível de inoculação.	36
Tabela 6. Recuperação de <i>C. difficile</i> no tratamento com álcool e direto em 20 amostras de carne de frango, inoculada com baixo e alto nível de <i>C. difficile</i>	38
Tabela 7. Recuperação de <i>C. difficile</i> em meio seletivo CDMNA e CCFA pelo plaqueamento direto, em 40 amostras de frango, com baixo e alto nível de inoculação.	39
Tabela 8. Recuperação de <i>C. difficile</i> em meio seletivo CDMNA e CCFA para tratamento com álcool, em 40 amostras de frango, com baixo e alto nível de inoculação.	41
Tabela 9. Ocorrência de <i>C. difficile</i> em amostras comerciais de carne bovina moída, carne de frango, carne bovina, carne suína.	43
Tabela 10. Ocorrência de <i>C. difficile</i> em carne bovina moída, carne bovina peça, frango e suína, de acordo com os procedimentos (plaqueamento direto e tratamento com álcool) e meios seletivos (CDMNA e CCFA) utilizados.	48

Tabela 11. Presença dos genes responsáveis pela produção da toxina A (*tcdA*) e B (*tcdB*) nos isolados de *C. difficile* obtidos em amostras de carnes.....51

Tabela 12. Comparação dos dados de detecção das toxinas A e B pelo teste RIDASCREEN toxina A/B e presença de gene codificadores de toxinas através da PCR de isolados de *Clostridium difficile* de amostras de carnes.52

RESUMO

Clostridium difficile é um bacilo anaeróbio responsável por doença intestinal associada ao tratamento prévio com antibióticos, manifestando desde uma diarreia leve até casos graves de colite pseudomembranosa causada principalmente pelas toxinas A (TcdA) e B (TcdB). Os casos de infecção estão relacionados à contaminação em hospitais, porém pesquisas recentes sugerem possível associação ao consumo de alimentos contaminados, pois *C. difficile* já foi isolado de bovinos, suínos e aves e suas carnes sugerindo os animais como reservatórios. Desta forma, os estudos são de suma importância para o entendimento da transmissão da doença causada por *C. difficile*. Diante de poucas pesquisas de *C. difficile* e da inexistência de método padronizado para seu isolamento a partir dos alimentos, o trabalho consistiu em três etapas: 1) avaliação de metodologia [utilizando dois procedimentos (tratamento com álcool e plaqueamento direto) e dois meios seletivos (ágar *Clostridium difficile* moxalactan norfloxacin – CDMNA e ágar cicloserina cefoxitina frutose – CCFA)] de detecção de *C. difficile* em carnes (bovina moída e peito de frango [*Peitoralís profundus* e *superficialis*]); 2) avaliação da ocorrência de *C. difficile* em amostras de carnes resfriadas (bovina moída, bovina peça [*Semimembranosus*], suína [*Longissimus dorsi*] e frango [*Peitoralís profundus* e *superficialis*]), compreendendo detecção, isolamento e identificação dos isolados; 3) avaliação do perfil toxigênico dos isolados através da detecção de genes *tcdA* e *tcdB* codificadores de TcdA e TcdB e respectivamente avaliação de produção do toxinas pelos isolados. A partir da comparação de dois procedimentos, observou-se que o plaqueamento direto foi mais eficaz e recuperou uma maior quantidade de *C. difficile* se comparado com o tratamento com álcool e o ágar *Clostridium difficile* moxalactan norfloxacin (CDMNA) apresentou maior taxa de recuperação em relação ao ágar cicloserina cefoxitina frutose (CCFA). A ocorrência de *C. difficile* foi observada em 11,5% (17/147) das amostras analisadas, totalizando 80 isolados, destes 41,2% (33/83) apresentaram positivo para pelo menos um gene de virulência (A-B+), ou para ambos os genes (A+B+). Houve concordância de 70,5% entre os testes fenotípicos e

genotípicos utilizados para detecção de toxinas. Desta forma, sugere-se que alimentos de origem animal são uma potencial fonte de transmissão de *C. difficile* para humanos.

Palavras-chave: Toxinas, Patógeno, Esporos, Reação em cadeia da polimerase (PCR), Diarreia.

ABSTRACT

Clostridium difficile is an anaerobic bacillus responsible for intestinal diseases in individuals previously treated with antibiotics, who can manifest from a mild diarrhea to severe cases of pseudomembranous colitis, mainly caused by toxins A (TcdA) and B (TcdB). The infections are related to contamination in hospitals, but recent researches suggest a possible association with the consumption of contaminated foods as *C. difficile* has been isolated from bovines, swines and poultry and their meat, suggesting animals as reservoirs. Thus, studies are extremely important to elucidate the transmission of the disease caused by *C. difficile*. Faced with few researches about this bacteria and the lack of a standard method for its isolation from food, this work is divided in three steps: 1) Evaluation of the methodology for *C. difficile* detection in meat (commercial bovine mince and chicken breast – [*Peitoralis superficialis* and *Peitoralis profundus*] [using two procedures (treatment with alcohol and direct plating) and two selective mediums (agar *Clostridium difficile* moxalactan norfloxacin – CDMNA and cycloserine cefoxitin fructose agar– CCFA)]; 2) Assessing of the occurrence of *C. difficile* in samples of chilled meat (bovine: commercial mince and the whole *Semimembranosus*; swine: whole *Longissimus dorsi*; chicken: *Peitoralis profundus* and *Peitoralis superficialis*) by detection, isolation and identification of the isolated; 3) Evaluation of the toxicogenic profile of the isolated by the detection of the genes *tcdA* and *tcdB*, which are encoding of TcdA and TcdB respectively, and the capacity of toxin production by the isolated bacteria. From the comparison of the two proceeding above it was observed that the direct plating was more efficient and recovered a larger amount of *C. difficile* than the treatment with alcohol. Furthermore, the CDMNA agar presented a higher recovery rate compared to CCFA agar. It was observed the occurrence of *C. difficile* in 11,5% (17/147) of the analyzed samples, comprising 80 isolates, of which 41,2% (33/83) showed a positive response for at least one virulence gene (A-B+), or for both genes (A+B-). In addition, there was a 70,5% concordance between the phenotypic

and genotypic tests used to detect toxins. In this way, it is suggested that foods of animal origin are a potential source of transmission of *C. difficile* for humans.

Key Words: Toxins, Pathogen, Spores, Polymerase Chain Reaction (PCR), Diarrhoea.

1 INTRODUÇÃO

A carne resfriada é um excelente meio para o desenvolvimento microbiano, por apresentar condições como: elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento e elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas. Devido a essas características tornam a carne altamente perecível onde a contaminação microbiológica ocorrida durante o abate, processamento, manipulação e armazenamento, favorecendo a multiplicação de uma microbiota extremamente variada, desde micro-organismos patogênicos a deteriorantes, transmitindo doenças e alterando em um curto espaço de tempo, as características organolépticas.

Dentre os principais micro-organismos deteriorantes encontram-se *Pseudomonas*, *Flavobacterium* sp. , *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Micrococcus* e *Streptococcus*, e os patogênicos, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium* sp.

Dentre as inúmeras espécies de *Clostridium* disseminadas na natureza, as principais causadoras de doença são *Clostridium tetani*, causador do tétano, *Clostridium perfringens*, causador de gangrena gasosa e toxinfecção alimentar, *Clostridium botulinum*, responsável pelo botulismo e *Clostridium difficile*, causador de doença intestinal associada ao tratamento prévio com antibióticos.

Desde o reconhecimento de *Clostridium difficile* como o principal causador de colite pseudomembranosa na década de 70, esta bactéria anaeróbia formadora de esporos emergiu como um importante enteropatógeno (BARTLETT et al., 1978; LARSON et al., 1978). *C. difficile* é responsável por quase todos os casos de colite pseudomembranosa e 10-25% dos casos de diarreia associada ao tratamento prévio com antibióticos (KELLY et al., 1994).

Recentemente, a doença associada ao *C. difficile* (CDAD – *Clostridium difficile* – associated disease) tem preocupado profissionais da área de saúde devido ao

aumento no número e severidade dos casos, bem como a sua associação ao uso indiscriminado de antimicrobianos, desta forma levando ao aumento na taxa de fatalidade principalmente entre idosos.

Após o tratamento com antibióticos e a alteração da microbiota intestinal, esporos de *C. difficile* germinam e passam a colonizar o intestino, as células vegetativas multiplicam-se e passam a produzir toxinas, dentre elas a toxina A, codificada pelo gene *tcdA*, que atua como uma enterotoxina causadora de diarreia e inflamação do cólon; e a toxina B codificada pelo gene *tcdB*, que produz efeitos citotóxicos nas membranas celulares e a toxina binária também importante na patogenicidade de *C. difficile*.

C. difficile assim como todas as outras espécies de *Clostridium* estão amplamente distribuídos na natureza, estando presentes em ambientes hospitalares, onde os reservatórios são os doentes e portadores assintomáticos. O micro-organismo já foi isolado de animais destinado a alimentação humana (aves, suínos e bovino) e animais domésticos (gato, cães).

Embora haja indícios da possível transmissão por alimentos, uma vez que animais são portadores deste micro-organismo, pesquisas ainda são escassas em todo o mundo. No Brasil, ainda não são encontrados na literatura trabalhos científicos com *C. difficile* em alimentos. Essa situação está justificada em parte pelas características anaeróbias do micro-organismo e relativa complexidade da metodologia empregada em seu isolamento e detecção. As propostas deste trabalho são avaliar diferentes metodologias de isolamento, verificar sua ocorrência em carnes e verificar o perfil toxigênico dos isolados.

2 OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes metodologias para detecção de *Clostridium difficile* e a possível contribuição de carnes como veículo na transmissão de doença associada ao micro-organismo através da presença de fatores de virulência.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes metodologias para a detecção de *C. difficile*.
- Avaliar ocorrência de *C. difficile* em carne bovina moída, carne bovina, peito de frango e carne suína.
- Detectar genes *tcdA* e *tcdB*, codificadores de toxinas A e B, respectivamente, através da técnica da PCR.
- Verificar a capacidade dos isolados produzir as toxina A (TcdA) e B (TcdB).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspecto microbiológico da carne

A carne é um dos alimentos mais nutritivos consumidos pelo homem, constitui uma excelente fonte de proteína, minerais essenciais e vitaminas do complexo B. Contém todos os aminoácidos essenciais necessários ao bem estar físico, desenvolvimento mental e intelectual do homem (PARDI, 2001).

É um alimento de excelente qualidade nutricional. Na sua composição encontram-se proteínas de alto valor biológico, associadas a teores significativos de vitaminas, especialmente do complexo B, apresenta importantes minerais, principalmente Fe^{++} , que apresenta maior biodisponibilidade. Contém todos os aminoácidos essenciais em proporções adequadas para atender as necessidades do organismo humano (PENSEL, 1998; SAUCIER, 1999).

Os alimentos de origem animal, especificamente a carne pela sua composição rica em nutrientes e sua elevada atividade de água são bastantes susceptíveis a deterioração microbiana. A carne é um excelente meio de cultura para desenvolvimento de micro-organismos e frequentemente está envolvida na disseminação de micro-organismos patogênicos causadores de enfermidades ao homem e a outros animais (BRASIL, 1997).

A incidência de diferentes micro-organismos encontrados na carne fresca é muito variada, principalmente porque a microbiota inicial da carne é profundamente afetada pelas condições pré abate, bem como pelas fontes de contaminação, incluindo facas, mesas de corte, couro e material fecal (PINTO NETO, 2003).

A microbiota inicial da superfície de carcaças de animais abatidos para consumo humano é derivada, principalmente do solo, pele e pêlos. As bactérias potencialmente patogênicas podem estar presentes na carne, mesmo que sejam

aplicadas as boas práticas de produção seguida das condições higiênico-sanitárias satisfatórias durante o abate e a evisceração dos animais. As práticas higiênicas devem acompanhar a trajetória da carne, nas câmaras frias, na desossa, no processamento, na armazenagem, no transporte, na distribuição ou no âmbito doméstico (SARANTÓPOULOS, 1983; PARDINI, 1995).

A contaminação da carne bovina pode ocorrer por via endógena (quando o animal está vivo) ou exógena, desde o abate do animal até o consumo de seus produtos. Porém, sua principal meio de contaminação ocorre pelo meio externo. A prática dos princípios básicos de higiene é fator essencial na obtenção de carnes e derivados com menor índice de contaminação, melhor qualidade sensorial e nutricional (EVANGELISTA, 2000).

Com exceção da superfície externa, o trato gastrointestinal e as vias respiratórias, os tecidos de animais saudáveis contêm poucos micro-organismos, devido principalmente aos mecanismos de defesa do próprio animal, controlando a proliferação microbiana. É comprovado a possibilidade de obter amostras estéreis de tecido muscular, desde que empreguem técnicas apropriadas de assepsia, porém, após o abate, a carne passa a obter uma microbiota muito variável (LEITÃO, 1994).

A microbiota da carne fresca é composta tanto de bactérias Gram negativas como Gram positivas. Dentre os mais comuns destacam-se: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia* e *Listeria*. Entre os bolores e leveduras, encontram-se *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Oospora*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Candida* (LEITÃO, 1995).

3.2 Histórico e características do *Clostridium difficile*

Uma das primeiras descrições da colite pseudomembranosa foi feita por Finney, em 1893, a partir da observação de uma pseudomembrana, presente no cólon de uma paciente que apresentou uma colite fatal depois de uma cirurgia. Contudo, o agente causador desta enfermidade não foi elucidado nesta época (LYERLY et al., 1988).

Somente em 1935, Hall e Toole, estudando a flora intestinal de recém-nascidos saudáveis, descreveram um micro-organismo, até então desconhecido, que recebeu inicialmente a denominação de *Bacillus difficilis* e logo em seguida de *Clostridium difficile*, refletindo exatamente a dificuldade encontrada para isolar e manter esse micro-organismo em cultura pura. Nesse mesmo ano, Hall e Toole demonstraram que o *C. difficile* era extremamente toxigênico em cultura. Essa evidência foi baseada nos achados de lesões, parada respiratória e morte quando da injeção de cultura líquida ou filtrado do meio que continha esse micro-organismo, em animais experimentais (LYERLY et al., 1988).

Depois de sua descoberta, o *C. difficile* passou por uma relativa obscuridade, haja visto que a colite pseudomembranosa foi uma condição rara na era pré-antibiótica. No entanto, em meados dos anos de 1970 e início da década de 1980, essa enfermidade atingiu proporções epidêmicas, tornando-se uma complicação comum ao uso de antibióticos (KELLY et al., 1994).

Somente por volta de 1970, as bactérias anaeróbias começaram a ser implicadas como importantes agentes causadores de doenças (ROCHA et al., 1999). Por conseguinte, surgiram vários estudos em busca de antimicrobianos ativos contra esse agente infeccioso emergente e a lincomicina foi um dos primeiros sucessos (LYERLY et al., 1988; KELLY et al., 1994).

Entretanto, logo foi observado que muitos dos pacientes tratados com a lincomicina e seus congêneres frequentemente apresentavam diarreia e uma severa

inflamação da mucosa. Dessa forma, esse antibiótico mostrava-se eficaz não somente contra as bactérias anaeróbias, mas também como um fator desencadeante da colite pseudomembranosa, possivelmente favorecendo o *C. difficile* que se encontrava inócuo apenas como um micro-organismo da microbiota intestinal (LYERLY et al., 1988).

A partir de então há numerosos estudos laboratoriais e clínicos demonstrando que o *C. difficile* é o principal agente causador de doenças intestinais associadas ao uso de antimicrobianos, que variam desde diarreia auto-limitada, relativamente benigna, a colite pseudomembranosa grave, que, muitas vezes, pode ser fatal (LYERLY et al., 1988; KELLY et al., 1994; SEARS e KAPER, 1996; STARR et al., 1997).

Clostridium difficile é um bacilo anaeróbio de 0,5-1,9 x 3,3-16,9 µm, Gram positivo, formador de esporos oval, subterminal, geralmente móvel em caldo e a temperatura de crescimento varia de 25 a 45°C com ótima 30-37°C. A prolina, ácido aspártico, serina, leucina, alanina, treonina, valina, fenilalanina, metionina e isoleucina são utilizados pelo micro-organismo durante seu crescimento. O *C. difficile* fermenta a frutose e o manitol, bem como hidrolisa a esculina (CATO et al., 1986). Sais biliares, particularmente o taurocolato de sódio tem se mostrado essencial para a germinação de esporos de *C. difficile*, portanto são incluídos na formulação de meios seletivos (CURRY, 2010).

Estudos comprovam que a forma vegetativa de *C. difficile* resiste pouco tempo em condições aeróbicas no ambiente. Os esporos, porém, podem permanecer viáveis por períodos prolongados e resistir à maioria dos desinfetantes. Essas características tornam *C. difficile* um expressivo contaminante ambiental, especialmente em hospitais (BUGGY et al., 1983). De acordo com Macleod-Glover e Sadowski (2010) a aplicação de produtos contendo cloro ativo e a higienização das mãos são as duas estratégias mais eficientes para eliminação de *C. difficile* e diminuição da transmissão de esporos, respectivamente.

3.3 Manifestações clínicas da doença associada ao *C. difficile* e suas toxinas

C. difficile é o principal micro-organismo responsável pelos casos de infecções nosocomiais, incluindo desde casos de diarreias leves a casos mais severos de colite pseudomembranosa (LYERLY et al., 1988).

A sequência de eventos que culmina na CDAD é: i. exposição do intestino aos antibióticos, ii. Alteração da microbiota e iii. Colonização pelo *C. difficile*. O micro-organismo é adquirido, em muitos casos, a partir de origem exógena: de um indivíduo contaminado, ou de pessoas que cuidam do paciente, ou indiretamente a partir de ambiente contaminado (POXTON et al., 2001).

É importante ressaltar o fato de que, com o advento do uso indiscriminado de antimicrobianos, as doenças relacionadas ao *C. difficile* têm se tornado cada vez mais frequentes e, dessa maneira, têm aumentado os índices de mortalidade por doenças diarréicas causadas por esse micro-organismo (ANGLIM e FARR, 1994; BARTLETT, 1990).

Alguns casos de CDAD tem sido associados ao uso de clindamicina (VOTH e BALLARD, 2005) e ceftriaxona (MARCON et al., 2006). E recentemente um estudo evidenciou uma alta porcentagem de isolados de *C. difficile* de hospitais resistentes à clindamicina, ceftriaxona, moxifloxacina e eritromicina e sensíveis aos dois agentes comumente utilizados no tratamento de CDAD, metronidazole e vancomicina (MUTLU et al., 2007). A susceptibilidade a metronidazole e vancomicina e resistência a clindamicina, gentamicina e colistina também foi observado por Cattoir et al. (2008).

Em humanos, após o tratamento com antibióticos e a eliminação da microbiota, os esporos ingeridos germinam e passam a colonizar o cólon (KELLY et al., 1994; KELLY e LAMONT, 1998). As células vegetativas multiplicam-se rapidamente, produzindo as toxinas.

Esse agente produz toxinas denominadas toxina A (enterotoxina), toxina B (citotoxina) e a toxina binária. Contudo, foram isoladas, em portadores humanos e

animais, cepas que não produzem toxinas (KELLI et al., 1994; POTHOUKAKIS et al., 1993).

Algumas cepas de *C. difficile* são capazes de produzir toxina A (TcdA, 308 kDa) e B (TcdB, 270 kDa), ambas são 45% idênticas em relação ao nível de aminoácidos. Dentre os aminoácidos que compõem essas toxinas, a aspargina, glicina e glutamina são os que se apresentam em maiores quantidades (BANNO et al., 1984; BARROSO et al., 1990). Enquanto a toxina A é enterotoxigênica, a toxina B é citotóxica (ALFA et al., 2000; LIMAYE et al., 2000; MONCRIEF et al., 2000; POXTON et al., 2001). A toxina A ativa os macrófagos e células “mast”, causando a produção de mediadores de processo inflamatório, o que leva a secreção de fluídos e aumento da permeabilidade da mucosa (JOHNSON et al., 1999). As toxinas A e B também causam quimiotaxia em leucócitos e a elevação da regulação de citocinas e outros mediadores inflamatórios. A infecção se agrava, ocorrendo ulceração local e um acúmulo de material purulento e necrótico, formando a típica colite pseudomembranosa (SCHROEDER, 2005).

Devido ao fato da toxina A ser uma enterotoxina e a B ser uma citotoxina, a lesão no intestino se inicia com a toxina A, que possui receptores na lâmina basal das células epiteliais. Ocorre quebra das junções celulares, permitindo a ação da toxina B, cujos receptores, encontram-se na região baso-lateral do epitélio, aumentando a lesão (Figura 1). Ambas, depois de internalizadas por endocitose, causam condensação da actina, culminando com a desorganização do citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose (LYERLY et al., 1988). Com a lesão, as toxinas podem ganhar a circulação, agindo também outros órgãos. Ainda como consequência, há uma migração leucocitária intestinal que resulta na formação da pseudomembrana (HOOKMAN et al., 2009).

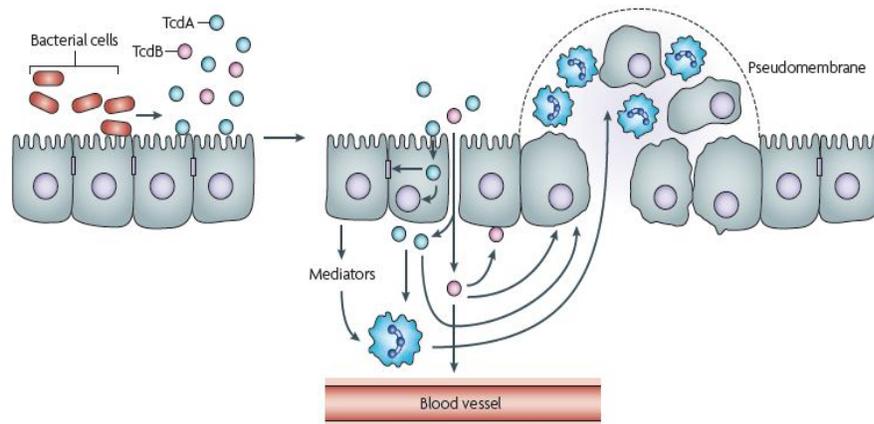


Figura 1. Colonização de *C. difficile* no intestino, com conseqüente produção de toxinas A e B (cepas toxigênicas). Atuação das toxinas originando colite pseudomembranosa ou seguindo para corrente sanguínea. (Adaptado de RUPNIK, 2009).

Os genes *tcdA* e *tcdB* responsáveis pela produção das toxinas A e B, respectivamente encontram-se em um locus de patogenicidade denominado *Paloc* (Figura 2). Este locus é constituído de cinco genes: *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdD* ou *tcdR* e *tcdE*. Acredita-se que os outros três genes são responsáveis pela regulação da produção das toxinas. O gene *tcdD* ou *tcdR* atua como um regulador positivo, sendo inclusive muito semelhante aos genes *tetR* e *botR*, que possuem esta mesma ação na produção das toxinas tetânica e botulínica, respectivamente. Já *tcdC* atua como regulador negativo. Por último, acredita-se que o *tcdE* facilite a liberação das toxinas A e B através da permeabilização da parede celular. Com isso, pesquisadores acreditam que a expressão das toxinas de *C. difficile* é regulada positivamente pela expressão do *tcdD*, dependente da queda na expressão do *tcdC* e a liberação das toxinas é mediada pela expressão do *tcdE* (VOTH e BALLARD, 2005).

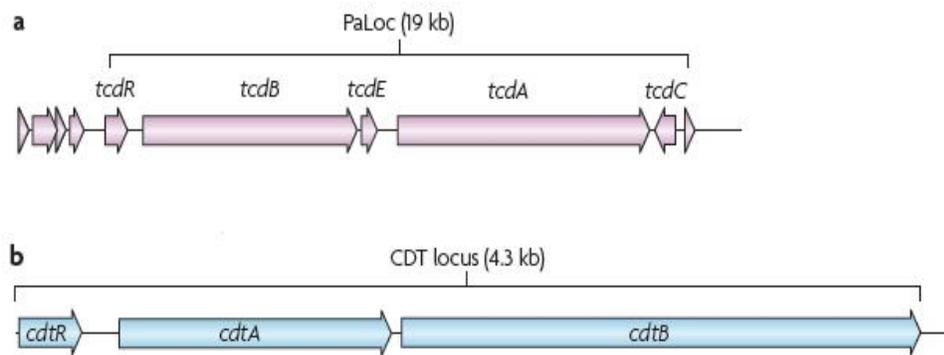


Figura 2. a) Toxina A e B, codificada pelo gene de patogenicidade (*PaLoc*) que compreende 5 genes: *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdD* ou *tcdR* e *tcdE*. b) Toxina binária é codificada numa região separada do cromossomo (*cdtLoc*) e é composta por 3 genes e 2 proteínas desvinculadas CdtB e CdtA. A CdtB tem função de ligação e a CdtA é um componente enzimático. (Adaptado por RUPNIK, 2009).

O *C. difficile* também é responsável pela produção da toxina binária que foi descrita pela primeira vez em 1988 (POPOFF et al., 1988). Composta por dois componentes codificado pelos genes *cdtA* e *cdtB*, as proteínas foram denominadas CdtA e CdtB, respectivamente (VOTH e BALLARD, 2005). A CdtA é um componente enzimático e CdtB é um componente de ligação, que tem a função de reconhecer o receptor na superfície da célula resultando na internalização do componente enzimático no citosol, o qual catalisa a ADP-ribosilação (adenosina difosfato) da actina monomérica e leva a desorganização do citoesqueleto (BARBUT et al., 2005).

A prevalência de genes da toxina binária em isolados humanos varia de 1,6 a 20,8% (BARBUT et al., 2005; GERIC et al., 2004; RUPNIK et al., 2003). No entanto, o papel da toxina binária associada a infecções em humanos ainda é desconhecida.

Porém, alguns pesquisadores acreditam que a toxina binária pode agir sinergicamente com as toxinas A e B, aumentando a despolimerização do citoesqueleto por um mecanismo complementar, agravando o quadro clínico e

exacerbando os sintomas. Além da desorganização celular, a toxina binária parece formar também protusões nas células alvos com conseqüente extravasamento de material do citosol, formando uma malha densa na superfície celular que facilitaria a adesão e multiplicação de *C. difficile* no intestino (Schwan et al., 2009; Gonçalves et al., 2004)

A partir de amostras de fezes de pacientes em tratamento com antibióticos e que apresentavam diarreia, Alonso et al. (2005) isolaram 4,5% cepas de *C. difficile* produtoras de toxina binária. Outros autores estimam proporções que variam de 4,0 a 12,0% (STUBBS et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004; INDRA et al., 2008).

Em trabalho realizado por Persson et al. (2008) isolados de *Clostridium difficile* de 159 pacientes internados que apresentavam diarreia foram analisados para verificar se apresentavam os genes codificadores das toxinas TcdA, TcdB, CdtA e CdtB. A pesquisa revelou quatro perfis toxigênicos diferentes, onde 36 isolados apresentaram *tcdA+*, *tcdB+*, *cdtA+/cdtB+*; 1 isolado apresentou *tcdA+*, *tcdB-*, *cdtA+/cdtB+*; 98 isolados apresentaram *tcdA+*, *tcdB+*, *cdtA-/cdtB-*; e 24 eram cepas não toxigênicas apresentando *tcdA-*, *tcdB-*, *cdtA-/cdtB-*.

Em trabalho realizado por Alonso et al. (2005), dos 220 isolados, 95% (209/220) apresentaram *tcdA+*, *tcdB+*, 5% (11/220) apresentaram *tcdA-*, *tcdB+*, nenhuma cepa apresentou *tcdA+*, *tcdB-* e *tcdA-*, *tcdB-*, portanto, todas as cepas eram toxigênicas e 4,5% (10/220) apresentaram gene da toxina binária (*cdtA+/cdtB+*).

É importante ressaltar que cepas de *C. difficile* que não produzem toxinas são incapazes de desenvolver as doenças diarréicas relacionadas com este micro-organismo, tanto no homem como nos animais experimentais (BARTLETT, 1990).

Os principais reservatórios são pacientes com CDAD ou portadores assintomáticos. Os esporos podem persistir por meses em superfícies de ambientes hospitalares (BARBUT e PETIT, 2001).

Apenas 3% a 15% dos adultos saudáveis e não hospitalizados são colonizados com *C. difficile*, e estudos têm mostrado que a colonização é transiente

(NAKAMURA et al., 1981; OZAKI et al., 2004). Em contraste, uma pesquisa constatou que 26% dos 428 pacientes internados adquiriram *C. difficile* em uma unidade hospitalar. Neste estudo, apenas 38% desenvolveram sintomas compatíveis com o CDAD por 11 meses, indicando que 62% dos pacientes que adquiriram *C. difficile* foram assintomáticos (McFARLAND et al., 1989).

Em trabalho realizado por Barbut et al. (2007) com 411 isolados de pacientes que apresentavam suspeita de CDAD em 38 hospitais de 14 diferentes países europeus, do total de isolados, 345 eram toxigênicas. Todas as cepas toxigênicas foram totalmente sensíveis ao metronidazol e vancomicina, e apresentam resistência à eritromicina, clindamicina, tetraciclina e moxifloxacina.

Em Quebec, no Canadá, o número de pacientes com CDAD graves tem aumentado ao longo dos anos, a incidência aumentou de 35,6 por 100.000 habitantes em 1991 para 156,3 por 100.000 em 2003 e entre pacientes idosos 65 anos ou mais, o aumento foi maior, de 102,0 para 866,5 por 100.000 (PEPIN et al., 2004). A alta mortalidade também foi observada entre os pacientes com 65 anos ou mais: 13,8% morreram dentro de 30 dias após diagnóstico em 2003, comparado a 4,7% em 1991 (PEPIN et al., 2005).

3.4 *Clostridium difficile* em animais e alimentos

C. difficile tem sido isolado de uma variedade de produtos alimentícios e em animais. Os primeiros estudos foram focados principalmente em animais de estimação (cães e gatos) e cavalos (BORRIELLO et al., 1983; O'NEILL et al., 1993; WEESE et al., 2001; BAVERUD, 2002; MARKS e KATHER, 2003; TORRES et al., 2011).

C. difficile também foi isolado de amostras de animais vivos como leitões, bezerros e aves (SONGER, 2004; PIRS et al. 2008; SIMANGO e MWAKURUDZA, 2008; HOPMAN et al., 2011). Yager et al. (2007) detectou *C. difficile* em 50% dos 129

leitões analisados. Segundo Songer (2004) a taxa de mortalidade de suínos com CDAD esta entre 16-20%.

Rodriguez-Palacios et al. (2006) descrevem a presença de *C. difficile* em bovinos do Canadá. Neste estudo, foram examinadas fezes de 144 bezerros com diarreia, e 134 bezerros saudáveis para presença de *C. difficile*. *C. difficile* foi isolado a partir de 31/278 animais (11 de animais com diarreias e 20 de animais saudáveis).

Outra forma de transmissão deste micro-organismo é por alimentos contaminados, uma vez que os animais são portadores de *C. difficile*.

Um caso ocorrido em 1979, onde uma mulher sadia, sem tratamento prévio com antibióticos, ingeriu salmão enlatado e apresentou colite pseudomembranosa, os sintomas apareceram cerca de 12 horas após a ingestão do alimento contaminado, sugerindo a existência de toxina pré formada no alimento (GURIAN et al., 1982).

Rodriguez-Palacios et al. (2007) analisaram um total de 60 amostras de carne moída no Canadá e 20% (12/60) foram positivos para *C. difficile* e 11 dos isolados eram toxigênicos. Num estudo mais recente, Rodriguez-Palacios et al. (2009) constataram *C. difficile* em 6,7% (10/149) das amostras de carne moída e em 4,6% (3/65) das amostras de costeletas de vitela e *C. difficile* toxigênica foi encontrada em 10 amostras positivas.

Na Áustria, Jöbstl et al. (2010) analisaram 100 amostras de carne moída e 50 amostras de leite cru. Três amostras de carne moída apresentaram cepas de *C. difficile* e nenhum isolado em amostras de leite. Porém, esses resultados não excluem que produtos lácteos possa ser uma grande fonte de contaminação de *C. difficile*, neste caso, o número de micro-organismo poderia estar abaixo do limite de detecção do método.

Em outros estudos, Weese et al. (2010) no Canadá, isolaram *C. difficile* de 12,8% (26/203) de amostras de carne de frango (coxas, sobre-coxas e asas), concluindo-se que o micro-organismo pode ser encontrado em carnes de frango do varejo mesmo que em baixos níveis.

C. difficile também já foi encontrados em frutos do mar e peixes (METACALF et al., 2011) e em alimentos de origem vegetal (METCALF et al., 2010), Bakri et al. (2009) avaliaram 40 amostras de saladas processadas (espinafre, alface e mista) oriundas de supermercados de Glasgow, Escócia. Três (7,5%) amostras foram positivas para *C. difficile*, porém o micro-organismo só foi isolado quando se utilizava um método de enriquecimento, indicando o baixo nível de contaminação.

Em estudo recente realizado por Boer et al. (2011), analisaram 500 amostras de carne in natura (carne de frango, suíno, bovino, vitelo e cordeiro). Do total de amostras analisadas, apenas 1,6% (8/500) foram positivas para *C. difficile*. O micro-organismo foi isolado através de enriquecimento por caldo CDMN, após submetidos a tratamento com álcool e semeados em meio seletivo.

A contaminação de produtos cárneos e dos demais alimentos com cepas toxigênicas de *C. difficile* levanta preocupações sobre o alimento como fonte de *C. difficile*.

3.5 Métodos de isolamento de *Clostridium difficile*

Na inexistência de um método padrão para detecção e isolamento de *C. difficile* em alimentos ou em fezes, cada pesquisador utiliza meios seletivos e enriquecimentos diferenciados.

Nas primeiras pesquisas com *C. difficile*, pesquisadores propuseram um meio seletivo para o seu isolamento, primeiramente utilizado para amostras clínicas, denominado CCFA (ágar cicloserina cefoxitina frutose). A composição apresentava solução de gema de ovo, que poderia ser substituído por sangue, e incubação das placas em meio anaeróbico que melhorava a taxa de recuperação dos esporos. As colônias neste meio apresentava coloração amarela fluorescente, com borda filamentosa, com alteração de cor do meio de alaranjado para amarelo (GEORGE et al., 1979).

Outro meio também utilizado é o CDMN (ágar sangue - *Clostridium difficile* moxalactam norfloxacin) – ágar sangue, aonde as colônias apresentam-se com coloração acizentada ou branca, opacas, chatas ou pouco convexas, rizóides ou circulares e de tamanho variando de 2-5 mm (GEORGE et al., 1979), apresentam odor característico de esterco de cavalo (DELMÉE, 2001).

Algumas modificações têm sido propostas para melhorar a germinação e crescimento do micro-organismo. Levett (1985) propôs a redução de antimicrobianos no meio seletivo CCFA. Além disso, a adição de taurocolato de sódio tem sido proposta para melhorar a germinação dos esporos no caldo de enriquecimento e o tratamento com etanol (1:1) para eliminação de células vegetativas presentes nas amostras (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007; WEESE et al., 2010).

Na literatura, encontram-se algumas pesquisas com alimentos em que utilizam ambos os meios seletivos (CCFA e CDMN).

Para confirmar as colônias de *C. difficile* alguns pesquisadores avaliam a produção da enzima chamada proline-aminopeptidase, por meio de discos comercialmente disponíveis. Outros autores utilizam a fermentação de açúcares, manose, sacarose, glicose, maltose e lactose, para confirmação da identidade do *C. difficile* (FERREIRA et al., 2003). Outra técnica também utilizada é a PCR.

Songer et al. (2009) avaliaram a presença de *C. difficile* em alimentos de origem animal, processados e *in natura*, utilizaram caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com extrato de levedura, cisteína e taurocolato de sódio. A partir do caldo foi realizado dois procedimentos, um com choque térmico (80°C/10 min) e o outro sem choque. Após, ambos foram incubados por 37°C/72 horas e posterior inoculação em CCFA. Do total de amostras positivas (37/88), todas foram positivas para choque térmico e sem choque térmico, as amostras negativas foram negativas para ambos os tratamentos.

Em outro estudo, Weese et al. (2010) avaliaram a presença de *C. difficile* através de duas metodologias, inoculação direta em meio CDMNA e com

enriquecimento prévio em caldo CDMN suplementado com taurocolato de sódio a 37°C/48 horas e posterior tratamento alcoólico. Após a centrifugação o sedimento foi inoculado em meio CDMNA. Do total de amostras positivas (26/203), todas foram provenientes da cultura com enriquecimento prévio. Desta forma conclui-se que o enriquecimento auxilia na recuperação de células injuriadas, bem como o uso de taurocolato de sódio para melhorar a germinação de esporos.

Jöbstl et al. (2010) compararam quatro diferentes meios de enriquecimento, (i) meio RCM (*Reinforced clostridial medium*), (ii) caldo soja triptona, (iii) tioglicolato e (iv) caldo *Clostridium difficile* norfloxacin moxalactam (CDMN). As amostras de carne bovina moída e leite *in natura* foram inoculados com uma cultura de aproximadamente 10⁸ UFC/g de *C. difficile*. Alíquotas do enriquecimento foram semeadas em ágar Schädler e CCFA. O caldo CDMN é um meio seletivo pra *C. difficile*, apresenta dois agentes antimicrobianos, moxalactam e norfloxacin, que inibem o crescimento de células competidoras, desta forma apresentou maior recuperação do micro-organismo inoculado.

O enriquecimento das amostras de alimentos em caldo CDMN é um procedimento que tem sido usado por vários pesquisadores (JÖBSTL et al. 2010; WEESE et al. 2010; BOER et al., 2011).

A presença e o possível desenvolvimento de *C. difficile* em alimentos ainda não foram totalmente explorados nas pesquisas. Desta forma, verifica-se a importância de avaliar o real papel de produtos cárneos como fonte de transmissão das infecções por *C. difficile*, uma vez que animais vivos são portadores do micro-organismo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Higiene e Legislação situado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

O desenvolvimento do trabalho ocorreu em 3 etapas: 1) avaliação de metodologia de detecção de *C. difficile* em carnes (bovina moída e peito de frango [*Peitoralis profundus* e *superficialis*]); 2) avaliação da ocorrência de *C. difficile* em amostras de carnes resfriadas (bovina moída, bovina peça [*Semimembranosus*], suína [*Longissimus dorsi*] e frango [*Peitoralis profundus* e *superficialis*]), compreendendo detecção, isolamento e identificação dos isolados; 3) avaliação do perfil toxigênico dos isolados através da detecção de genes *tcdA* e *tcdB* codificadores de TcdA e TcdB e respectivamente avaliação de produção de toxinas pelos isolados.

As etapas de avaliação da metodologia, detecção e isolamento de *C. difficile* foram realizadas em câmara anaeróbia (Shell lab™ modelo Bactron II Chamber), As lavagens dos sistemas foram realizadas com gás nitrogênio pureza 99,99% (White Martins, São Paulo, BR) e a atmosfera final era composta por uma mistura gasosa de 5% Hidrogênio +10% Dióxido de Carbono + 85% Nitrogênio (White Martins). Para verificar o sistema foram utilizados indicadores de anaerobiose (Gaspak Anaerobic Indicator, BBL, USA). A etapa de incubação foi realizada utilizando-se jarras de anaerobiose com geradores de anaerobiose e indicadores.

4.1 Avaliação de métodos de detecção de *C. difficile* em carnes

A proposta de avaliação dos métodos foi elaborada baseando-se no artigo de Feldsine et al. (2002). Os métodos (esquematizados na Figura 3) foram avaliados

através da inoculação de esporos de *C. difficile* em 20 gramas de amostra de carne bovina moída e peito de frango resfriadas.

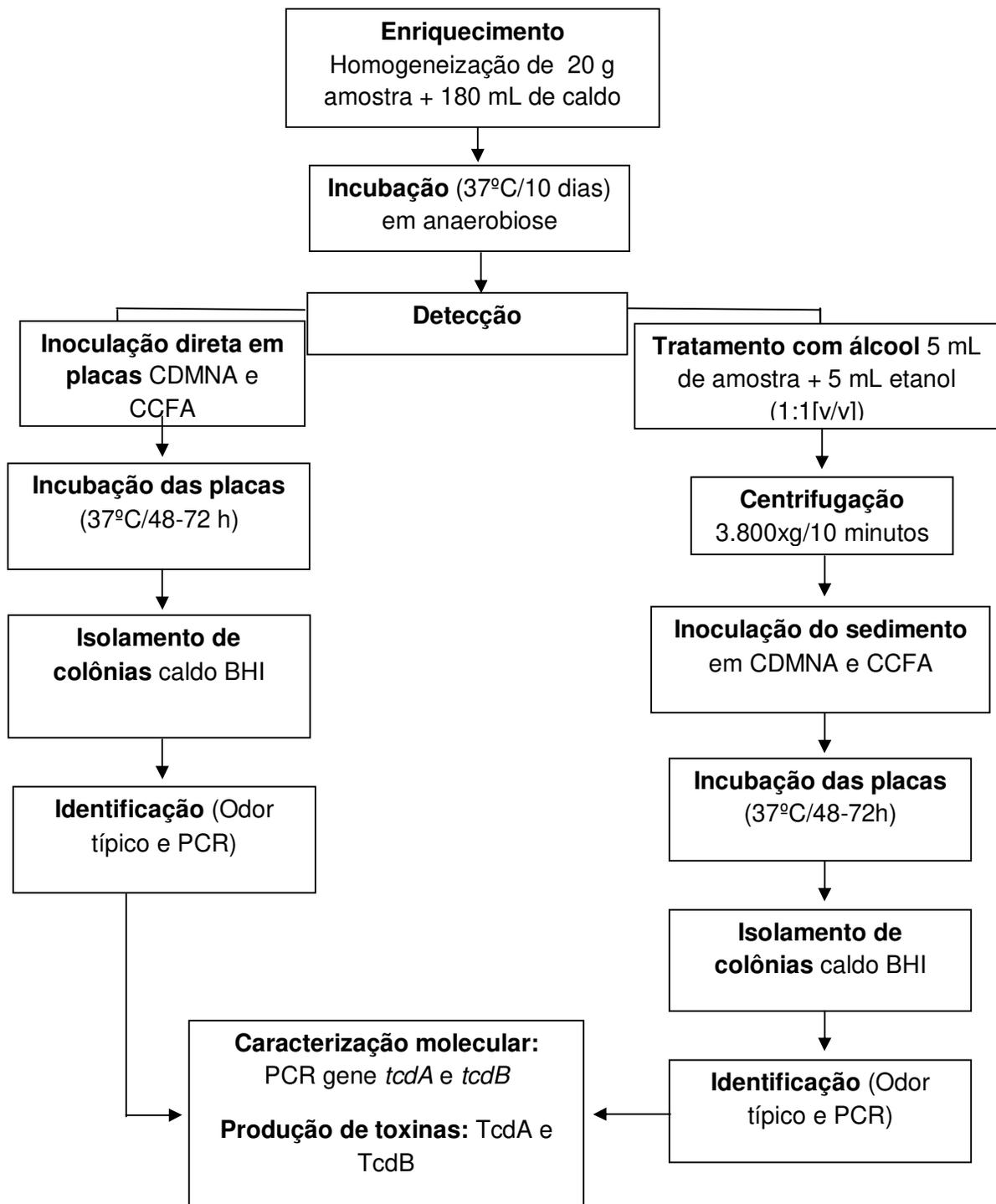


Figura 3. Fluxograma da metodologia de detecção de *C. difficile*.

4.1.1 Amostras

Para avaliação das metodologias foram adquiridas 80 amostras, 40 amostras de carne bovina moída, e 40 amostras de peito de frango (*Peitoralis profundus* e *superficialis*). As amostras foram adquiridas de 24 estabelecimentos comerciais, incluindo supermercados e açougues do município de Campinas-SP. Foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo.

As amostras adquiridas apresentavam diferentes embalagens: as amostras de carne bovina moída apresentavam embalagem de isopor cobertas com policloreto de polivinila (PVC) eram armazenadas em embalagens plásticas flexíveis, ou mesmo envoltas somente de filme PVC. Essas amostras foram adquiridas moídas no expositor, ou eram moídas no momento da compra.

As amostras de peito de frango eram apresentadas com embalagem de isopor cobertas com filme PVC ou em embalagens plásticas flexíveis.

4.1.2 Cepa padrão de *Clostridium difficile*

Como referência foi utilizada a cepa de *Clostridium difficile* VPI 10463. A cultura foi doada pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantida com carne (HOLDEMAN et al., 1977) a 4-8°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Sparks, EUA). É uma cepa patogênica, produtora de toxina TcdA e TcdB.

4.1.3 Preparo da suspensão de esporos de *C. difficile*

A suspensão de esporos foi preparada conforme descrito por Wullt et al. (2003). A partir da cultura estoque de *Clostridium difficile* (cepa VPI 10463), 0,1 mL foi

transferida e cultivada em 10 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (Difco) previamente reduzido e incubado a 35°C em anaerobiose. Após 24 horas de incubação, 0,5 mL foi transferido a 100 mL de BHI e incubados a 37°C/72 horas. A esporulação foi verificada por microscopia de contraste de fase e coloração de verde malaquita. O caldo foi submetido a centrifugação (Centrífuga, J2-21, Beckman, EUA) a 3.000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, os esporos (*pellet*) foram suspensos e lavados 2 vezes por centrifugação (3000xg/20 minutos) em água estéril e então mantidos em suspensão à 4°C.

4.1.4 Contagem de esporos de *C. difficile*

A contagem dos esporos na suspensão foi realizada adicionando-se 1 mL de suspensão em 9 mL de água peptonada salina [0,1% peptona (Difco, Detroit Michigan, USA), 0,85% m/v NaCl (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)] e posterior adição de 10 mL de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) (concentração final de etanol igual a 50%) por 50 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 3.800xg/10 minutos (tratamento com álcool). O sobrenadante foi desprezado e os esporos suspensos em 10 mL em água peptonada salina. Foram realizadas diluições decimais e inoculação de 1mL de cada diluição em meio *Reinforced clostridial (RCM, Difco)* com 1,5% de Agar (Merck, Darmstadt, Alemanha). As placas foram incubadas em anaerobiose a 35°C por 48 horas, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro).

4.1.5 Contaminação artificial das amostras

Os experimentos foram conduzidos em dois tipos de produtos resfriados (bovina moída e peito de frango [*Peitoralís profundus e superficialis*]). Porções de 20 g de amostra foram inoculadas com a suspensão de esporos de *C. difficile*.

Para avaliação da metodologia dois níveis de contaminação foram utilizados: baixo nível (1-10 UFC/20g) e alto nível (10-100 UFC/20g). Vinte amostras de cada nível por tipo de produto totalizando 80 amostras inoculadas (40 amostras para cada produto), além de 80 amostras controle negativos (não inoculados) foram analisados.

Conforme fluxograma apresentado na Figura 3, uma unidade analítica de 20 g de amostra foi homogeneizada com 180 mL de caldo *Clostridium difficile* moxalactam norfloxacina (CDMN) com a seguinte formulação: proteose peptona [40g/L (Difco)], fosfato dissódico [5g/L, (Merck)], fosfato de potássio [1g/L (Merck)], sulfato de magnésio [0,1g/L (Merck)] cloreto de sódio [2,0g/L (Merck)], frutose [6g/L (Inlab)], cisteína [0,5 g/L (Inlab)], taurocolato de sódio [1g/L (Inlab)], adicionados de moxalactam [16 mg/L (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)] e norfloxacina [6 mg/L (Sigma)], pré reduzidos. Após 10 dias de incubação a 37°C em anaerobiose foram realizados os procedimentos:

a) Detecção após tratamento alcoólico para eliminação de células vegetativas presentes. O tratamento com álcool realizou-se da seguinte forma: adicionou-se 5 mL de etanol (99%) em 5mL da amostra homogeneizada (1:1 [v/v]) e mantido a temperatura ambiente por 50 minutos. Após, realizou-se uma centrifugação a 3.800xg por 10 minutos. O sedimento (*pellet*) foi estriado em cicloserina cefoxitina frutose ágar [(CCFA), (Sigma-Aldrich, Alemanha)] com 5mL/L de solução de gema de ovo a 50% suplementado com cicloserina e cefoxitina [(250 mg/L) e (8 mg/L) - Sigma-Aldrich, Alemanha] (LEVETT, 1985), e em ágar *Clostridium difficile* moxalactam norfloxacina [(CDMNA), (Sigma-Aldrich, Alemanha)] com 5% de sangue equino desfibrinado estéril (BBV, Campinas, Brasil), suplementado com moxalactam e norfloxacina conforme descrito

previamente (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007) pré-reduzidos. As placas foram incubadas a 37°C por 48-72 horas em anaerobiose. Entre 3 a 5 colônias típicas de cada meio seletivo foram transferidas para caldo BHI pré-reduzido e incubados em anaerobiose a 35°C por 24-48 horas em anaerobiose para posterior identificação.

b) Detecção por inoculação direta (sem tratamento alcoólico) através de plaqueamento por estrias em CCFA e CDMNA seguindo de incubação a 37°C por 48 horas em anaerobiose para posterior isolamento e identificação.

4.1.6 Identificação dos isolados por *Polymerase Chain Reaction*

Após a incubação, selecionou-se entre 3 a 5 colônias. Os isolados foram identificados como *C. difficile* através das características morfológicas (odor típico e característica das colônias) e pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) para o gene *tpi* (*housekeeping – triose phosphato isomerase*), codificador da triose fosfato isomerase.

4.1.6.1 Extração de DNA

As colônias selecionadas foram inoculadas separadamente em 10 mL de caldo BHI pré-reduzidos e incubadas a 37°C por 24-48 horas em anaerobiose. Em seguida, para realização da extração de DNA, foi coletado uma alíquota de 600 µL de cultura e foi centrifugado a 13.000xg por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5415D, Alemanha), o sobrenadante foi desprezada e as células foram suspensas em 100 µL de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1mM, pH 7,5). As células então foram submetidas à fervura por 20 minutos, resfriadas e centrifugadas a 13.000xg por 2 minutos. O

sobrenadante (contendo DNA) foi separado e armazenado a -20°C para posterior realização da PCR (LEMEE et al., 2004).

4.1.6.2 PCR para gene *tpi*

Para detecção de *C. difficile*, foram utilizadas as sequências de *primers* complementares da região do gene *tpi*.

Foram utilizados os oligonucleotídeos *tpi-F* (*forward*) 5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3' e *tpi-R* (*reverse*) 5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3' (Tabela 1), que anela nas posições 148-374 respectivamente no gene *tpi* de *C. difficile*, amplificando um produto final de aproximadamente 230 pb.

Para a PCR foi utilizado uma solução que continha 2,5 µL tampão PCR 10X (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá), 0,6 µL de dNTPs a 10 mM (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá); 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá); 1 µL de cada primer a 12,5 µM (Invitrogen Life Technologies, EUA), 0,2 µL de *Taq* polimerase a 5 U/µL (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá) e 1 µL de DNA em um volume total de 25 µL.

A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador (Eppendorf 5345, Alemanha) com ciclo inicial de 95°C/3min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C/30 s, anelamento a 55°C/30s, extensão a 72°C/30s e ciclo final a 72°C/2min (Lemee et al., 2004).

Os produtos do gene *tpi* foram separados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, Carlsba, USA) por 40-45 minutos a 110V. Ao final da corrida, o gel foi corado com SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsba,CA), visualizados por luz ultravioleta e fotodocumentados.

A cepa padrão de *C. difficile* (VPI-10463) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos para identificação de *C. difficile*.

Primer	Sequência 5'→3'	gene	Produto (bp*)	Referência
<i>tpi-F</i>	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	<i>tpi</i>	230	Lemme et al., 2004
<i>tpi-R</i>	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC			
NK3	GGAAGAAAAGAACTTCTGGCTCACT CAGGT	<i>tcdA</i>	252	Kato et al., 1991
NK2	CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCT T			
NK104	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTA CGC	<i>tcdB</i>	204	Kato et al., 1998
NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT			

* pares de bases

4.1.7 Avaliação estatística

O teste de McNemar (Qui-quadrado – X^2) foi utilizado para comparar: a) as proporções de positivos confirmados pelos procedimento de plaqueamento direto e tratamento com álcool e b) a proporção de positivos para o ágar CDMN com a proporção de positivos pelo ágar CCFA, para cada tipo de alimento e cada nível de inoculação.

Devido o número de amostras serem inferiores a 40, utilizou-se a correção de Yates.

4.2 Ocorrência de *Clostridium difficile* em carnes resfriadas comerciais

Nesta etapa, amostras de carnes resfriadas “*in natura*” foram analisadas quanto à presença de *C. difficile* através da metodologia apresentados na Figura 3.

4.2.1 Amostras

Um total de 147 amostras de carne resfriada “*in natura*” foram analisadas durante o período de julho de 2010 a agosto de 2011, compreendendo: 32 amostras de carne moída bovina, 30 amostras de coxão mole (*Semimembranosus*), 35 amostras de lombo suíno (*Longissimus dorsi*) e 50 amostras de peito de frango (*Peitoralis profundus* e *superficialis*) adquiridas em estabelecimentos comerciais, incluindo supermercados e açougues do município de Campinas – SP e transportadas em caixas isotérmicas com gelo.

4.2.2 Detecção e isolamento de *C. difficile*

Uma unidade analítica de 20 g de amostra foi homogeneizada com 180 mL de caldo CDMN e após incubação a 37°C em anaerobiose por 10 dias seguiram os mesmos procedimentos apresentados previamente (Figura 3).

4.2.3 Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada conforme anteriormente descrito (item 4.1.6).

4.3 Avaliação do perfil toxigênico dos isolados de *C. difficile*

O perfil toxigênico foi verificado através da detecção de genes *tcdA* e *tcdB* e produção de toxinas pelas culturas isoladas de amostras de carnes.

4.3.1 Detecção dos genes codificadores de toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) dos isolados

Após a realização da extração conforme o item 4.1.6.1, será realizada a PCR, onde o gene codificador enterotoxina (TcdA), *tcdA*, foi detectado através dos oligonucleotídeos NK3 (*forward*) 5'-GGAAGAAAAGAACTTCTGGCTCACTCAGGT-3' e NK2 (*reverse*) 5'-CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT-3' (tabela 1). Amplificando um produto final de 252 bp (Kato et al., 1991).

A presença do gene codificador da citotoxina (TcdB), *tcdB*, foi analisada utilizando-se os oligonucleotídeos NK104 5'-GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC-3' (*forward*) e NK105 5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT-3' (tabela 1), amplificando uma região de 204 bp do gene, como descrito por Kato et al., 1998.

Para a PCR do gene *tcdA* e *tcdB* foram utilizadas uma solução que continha 2,5 µL tampão PCR 10X (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá), 0,6 µL de dNTPs a 10 mM (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá); 2,0 µL de MgCl₂ a 25 mM (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá); 1 µL de cada primer a 12,5 µM (Invitrogen, Carlsba, USA), 0,2 µL de *Taq* polimerase a 5 U/µL (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá) e 1 µL de DNA em um volume total de 30 µL.

A amplificação do gene *tcdA* foi realizada em um termociclador (Eppendorf 5345, Alemanha) com ciclo inicial de 95°C/3min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C/20 s, anelamento a 58,8°C/2min, extensão a 72°C/30s e ciclo final a 72°C/5min (Kato et al., 1998).

Para amplificação do gene da toxina B, utilizou-se um ciclo inicial de 95°C/3min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C/20 s, anelamento a 55°C/2min, extensão a 72°C/30s e ciclo final a 72°C/5min (Kato et al., 1998).

Os produtos do gene *tcdA* e *tcdB* foram separados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, Carlsba, USA) por 40-45 minutos a 100V.

Ao final da corrida, o gel foi corado com SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsba, CA), visualizados por luz ultravioleta e fotodocumentados.

A cepa padrão de *C. difficile* (VPI-10463) foi utilizada como controle positivo.

4.3.2 Detecção de toxinas

Os isolados de *C. difficile* foram avaliados quanto a produção de toxinas A (TcdA) e B (TcdB) utilizando-se o kit “RIDASCREEN *Clostridium difficile* toxin A/B” (r-biopharm, Alemanha). O teste baseia-se em ensaio imunoenzimático. O ensaio foi conduzido conforme as instruções do fabricante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação de métodos de detecção de *Clostridium difficile* em carnes

O desempenho de métodos de isolamento de *C. difficile* foi avaliado através da inoculação de esporos de *C. difficile* em 80 amostras de carne bovina moída e carne de frango e posterior recuperação. Dois níveis de inoculação nas amostras foram utilizados representando baixo nível (1-10 UFC/20g) e alto nível (10-100 UFC/20g) de contaminação com os valores experimentais apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de esporos de *C. difficile* (baixo e alto nível) inoculadas em amostras de carne bovina moída e carne de frango.

Amostra	Nível de inoculação em amostras de carnes	Valores inoculados (UFC/20g)*
Carne bovina moída	Baixo nível	4,3 ± 2,08
		7,3 ± 2,30
		6,4 ± 2,07
	Alto nível	17,4 ± 1,14
		43,2 ± 4,20
		41,0 ± 7,77
Peito de frango	Baixo nível	5,0 ± 1,26
		6,2 ± 1,92
		1,2 ± 0,70
	Alto nível	74,3 ± 10,30
		54,6 ± 2,70
		35,6 ± 5,00

*3 repetições por nível e por alimento, em quintuplicata.

O enriquecimento das amostras em caldo CDMN (*Clostridium difficile* moxalactan norfloxacin) por 10 dias teve por objetivo recuperar células injuriadas de *C. difficile*. Após o enriquecimento, dois procedimentos foram realizados, o plaqueamento direto e o tratamento com álcool, cujo objetivo era eliminar células vegetativas constituintes da microbiota do alimento. Após estes procedimentos foram realizadas as

inoculações em meio CDMNA (ágar *Clostridium difficile* moxalactan norfloxacina) e CCFA (ágar cicloserina cefoxitina frutose)

As colônias de *C. difficile* em função dos meios de isolamento apresentava características distintas. No meio seletivo CDMNA observavam-se colônias com coloração acizentada ou branca, opacas, chatas ou pouco convexas, rizóides ou circulares e de tamanho variando de 2-5 mm (GEORGE et al., 1979), com odor característico de esterco de cavalo (DELMÉE, 2001). Por sua vez, em meio CCFA apresentavam-se com coloração amarela, borda filamentosa e com alteração de cor do meio de alaranjado para amarelo (DELMÉE, 2001).

Neste trabalho, comprovou-se, mediante a técnica da PCR (gene *tpi*) que todas as colônias selecionadas das amostras de carne (de acordo com a seletividade dos meios) pertenciam à cepa padrão inicial. E todas as amostras utilizadas como controle foram negativas.

No estudo para verificar a influência dos procedimentos (plaqueamento direto e tratamento com álcool) na recuperação de micro-organismos, realizaram-se ensaios com amostras de carne bovina moída, com alto nível de inoculação ($17,4 \pm 1,14$; $43,2 \pm 4,20$; $41,0 \pm 7,77$ UFC/20g) e amostras com baixo nível de inoculação ($4,3 \pm 2,08$; $7,3 \pm 2,30$; $6,4 \pm 2,07$ UFC/20g). Na Tabela 3, estão dispostas as proporções de *C. difficile* recuperadas no plaqueamento direto e tratamento com álcool.

Tabela 3. Recuperação de *C. difficile* após plaqueamento direto e tratamento com álcool em amostras de carne bovina moída inoculada com alto e baixo nível de *C. difficile*.

	Tratamento com álcool	Plaqueamento direto		Total
		Positivo	Negativo	
Baixo nível n=20	Positivo	5 (25,0%)	1 (5,0%)	6 (30,0%)
	Negativo	10 (50,0%)	4 (20,0%)	14 (70,0%)
	Total	15 (75,0%)	5 (25,0%)	20 (100,0%)
Alto nível n=20	Positivo	5 (25%)	2 (10,0%)	7 (35,0%)
	Negativo	11 (55,0%)	2 (10,0%)	13 (65,0%)
	Total	16 (80,0%)	4 (20,0%)	20 (100,0%)

n= número de amostras

Observando os resultados apresentados na Tabela 3, verificamos que o tratamento com álcool recuperou 30,0% (6/20) e 35,0% (7/20) para baixo e alto nível de inoculação, respectivamente. O plaqueamento direto recuperou 75,0% (15/20) e 80,0% (16/20), para baixo e alto nível de inoculação, respectivamente, resultados maiores do que o tratamento com álcool.

Observando quais dos procedimentos (plaqueamento direto e tratamento com álcool) recuperaram um maior número de *C. difficile*, em amostras, inoculadas com baixo nível de esporos de *C. difficile*. Este micro-organismo foi recuperado em 50,0% (10/20) das amostras pelo plaqueamento direto (sem que a mesma fosse recuperada pelo tratamento com álcool), por outro lado, o método de tratamento com álcool recuperou apenas 5,0% (1/20) do micro-organismo inoculado. Em 25,0% (5/20) das amostras o micro-organismo foi recuperado em ambos os tratamentos. *C. difficile* não

foi isolado em nenhum dos tratamentos em 20,0% (4/20) das amostras. Na análise estatística o valor de $X^2_{\text{calculado}} = 6,56$ foi maior que o valor de $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$. Desta forma, apresenta-se diferença entre os tratamentos, a nível de 5% de significância (Tabela 3). O plaqueamento direto foi mais eficaz na recuperação de *C. difficile*.

Nas amostras inoculadas com alto nível de esporos de *C. difficile*, o micro-organismo foi recuperado em 55,0% (11/20) das amostras pelo plaqueamento direto, porém, o método de tratamento com álcool recuperou apenas 10,0% (2/20) – (somente pelo tratamento com álcool) do micro-organismo inoculado (Tabela 3). Desta forma, na análise estatística obteve-se o valor de $X^2_{\text{calculado}} = 2,81$, este sendo menor que o valor de $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$. Não apresentando diferença entre os procedimentos, ao nível de 5% de significância.

De acordo com Broda et al. (1998) a probabilidade de isolar esporos de *Clostridium* spp. presentes em uma população de micro-organismos é muito maior através da aplicação de tratamento térmico ou com álcool, pois esta etapa é capaz de eliminar células vegetativas de outros micro-organismos competidores. Porém elimina também células do micro-organismo alvo não esporulado.

Nos ensaios com baixos níveis de inoculação, o plaqueamento direto foi mais eficaz na recuperação de *C. difficile* inoculados nas amostras de carne bovina moída. Assim, pressupõe que o micro-organismo no caldo CDMN após incubação por 10 dias apresentava-se na forma vegetativa e não na forma esporulada.

A eficiência de dois meios seletivos, CCFA e CDMNA, para isolamento de *Clostridium difficile* em amostras de carne bovina moída foram avaliados. Os resultados da taxa de recuperação de *C. difficile* após plaqueamento direto e tratamento com álcool, respectivamente em ambos meios seletivos estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Recuperação de *C. difficile* em meios seletivos CDMNA e CCFA após plaqueamento direto, em 40 amostras de carne bovina moída, com baixo e alto nível de inoculação.

CCFA	CDMNA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	3 (7,5%)	0 (0,0%)	3 (7,5%)
Negativo	30 (75,0%)	7 (17,5%)	37 (92,5%)
Total	33 (82,5%)	7 (17,5%)	40 (100,0%)

Observando os resultados apresentados na Tabela 4, verificamos que os meios seletivos CDMNA e CCFA recuperaram 82,5% (33/40) e 7,5% (3/40), respectivamente, após plaqueamento direto, para ambos os níveis de inoculação.

Para os experimentos com plaqueamento direto e ambos níveis de inoculação, *C. difficile* foi recuperado em 75,0% (30/40) das amostras pelo meio seletivo CDMNA (sendo recuperado apenas no CDMNA). Em apenas 3 amostras (7,5%) o micro-organismo foi recuperado em ambos os meios. Em 17,5% (7/40) das amostras, *C. difficile* não foi recuperado de nenhum meio seletivo (Tabela 4).

Na análise estatística o valor de $X^2_{\text{calculado}} = 29,00$, foi maior que o valor de $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$. Desta forma, apresenta-se diferença significativa entre os meios seletivos, ao nível de 5% de significância. O meio seletivo CDMNA apresentou maior eficácia para isolamento de *C. difficile* em relação ao meio CCFA.

Os meios seletivos CDMNA e CCFA recuperaram 30,0% (12/40) e 17,5% (7/40), respectivamente, após tratamento com álcool, para ambos os níveis de inoculação (Tabela 5).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a proporção de recuperação de *C. difficile* em meio seletivo CDMNA e CCFA, para tratamento com

álcool, para ambas as inoculações, o micro-organismo foi recuperado em 17,5% (7/40) das amostras para ambos os meios seletivos, por outro lado, somente para o CDMNA, *C. difficile* foi recuperado em apenas 12,5% (5/40) das amostras inoculadas, e não foi recuperado utilizando apenas o meio CCFA. *C. difficile* não foi recuperado em 70% (28/40) das amostras de carne bovina moída. Na análise estatística o $X^2_{\text{calculado}} = 4,05$, apresentando diferença significativa entre os meios seletivos, a nível de 5% de significância.

Tabela 5. Recuperação de *C. difficile* em meio seletivo CDMNA e CCFA para tratamento com álcool, em 40 amostras de carne bovina moída, com baixo e alto nível de inoculação.

CCFA	CDMNA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	7 (17,5%)	0 (0,0%)	7 (17,5%)
Negativo	5 (12,5%)	28 (70,0%)	33 (82,5%)
Total	12 (30,0%)	28 (70,0%)	40 (100,0%)

Observa-se que houve diferença significativa entre os meios seletivos para as amostras de carne bovina moída, submetidas ao plaqueamento direto e com álcool, tanto para amostras com alto e baixo nível de inoculação. O meio seletivo CDMNA apresentou maior taxa de recuperação comparada com o CCFA.

Algumas pesquisas afirmam que o uso de agentes seletivos (cefotaxima e cicloserina) utilizados no CCFA inibem algumas cepas de *C. difficile* de amostras de fezes. Desta forma Levett (1985) utilizou metade da concentração de cefotaxima e cicloserina, a mesma utilizada no presente estudo (250 µg de cicloserina e 8 µg de cefotaxima), e conseqüentemente reduziu a seletividade do CCFA, sendo necessário um

pré-tratamento térmico ou com álcool (LEVETT, 1985) para melhor selecioná-lo. Com a modificação do meio seletivo e o uso de tratamento com álcool o pesquisador conseguiu aumentar em 30% a taxa de isolamento de *C. difficile*.

Em um estudo com meios seletivos para isolamento de *C. difficile*, Aspinall et al. (1992) verificou que o meio CDMNA é mais seletivo em comparação com o meio CCFA, isolando 20% a mais de *C. difficile*. O pesquisador concluiu que o uso dos agentes seletivos (moxalactam e norfloxacin) reduziu o número de micro-organismos contaminantes em até 30%. Desta forma não necessitando de pré-tratamento (tratamento com álcool ou térmico), aumentando ainda mais sua seletividade.

É importante salientar que para as análises realizadas com a carne bovina moída, os suplementos utilizados (antimicrobianos) nos meios seletivos CDMNA e CCFA não foram padronizados, pois no início dos experimentos as soluções de antimicrobianos eram preparados no laboratório, e posteriormente as soluções foram adquiridos na forma de suplementos, o que, poderia ter ocasionado nas diferenças de resultados entre as amostras de carne bovina moída e frango.

Para comparação de métodos para isolamento de *C. difficile* em carne de frango, avaliaram-se 20 amostras com alto nível ($74,3 \pm 10,30$; $54,6 \pm 2,70$; $35,6 \pm 5,00$), e 20 amostras com baixo nível de inoculação ($5,0 \pm 1,26$; $6,2 \pm 1,92$; $1,2 \pm 0,70$) para o plaqueamento direto e tratamento com álcool. Os resultados dos experimentos estão expostos na tabela 6.

Tabela 6. Recuperação de *C. difficile* no tratamento com álcool e direto em 20 amostras de carne de frango, inoculada com baixo e alto nível de *C. difficile*.

	Tratamento com álcool	Plaqueamento direto		Total
		Positivo	Negativo	
Baixo nível n=20	Positivo	12 (60,0%)	0 (0,0%)	12 (60,0%)
	Negativo	4 (20,0%)	4 (20,0%)	8 (40,0%)
	Total	16 (80,0%)	4 (20,0%)	20 (100,0%)
Alto nível n=20	Positivo	16 (80,0%)	2 (10,0%)	18 (90,0%)
	Negativo	2 (10,0%)	0 (0,0%)	2 (10,0%)
	Total	18 (90,0%)	2 (10,0%)	20 (100,0%)

n= número de amostras

Observando os resultados apresentados na Tabela 6, verificamos que o tratamento com álcool recuperou 60,0% (12/20) e 90,0% (18/20) para baixo e alto nível de inoculação, respectivamente. O plaqueamento direto recuperou 80,0% (16/20) e 90,0% (18/20), para baixo e alto nível de inoculação, respectivamente.

Avaliando a taxa de recuperação de *C. difficile* em amostras de frango inoculados com baixo nível, observa-se que o micro-organismo foi recuperado em 20,0% (4/20) das amostras somente pelo plaqueamento direto, e nenhuma amostra foi positiva para *C. difficile* em carne de frango somente pelo tratamento com álcool. Porém, o micro-organismo foi recuperado em 12 (60,0%) amostras pelos dois procedimentos utilizados. Não foi observado diferença significativa, ao nível de 5%, entre os procedimentos, pois, na análise estatística o valor de $X^2_{\text{calculado}} = 3,06$, foi menor que o valor de $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$ (Tabela 6).

Nas amostras com alto nível de inoculação *C. difficile* foi recuperado em apenas 10,0% (2/20) das amostras somente pelo plaqueamento direto e 10,0% (2/20) das amostras somente pelo tratamento com álcool. Por outro lado, o micro-organismo foi recuperado em 80,0% (16/20) das amostras utilizando ambos os tratamentos. Na análise estatística o valor de $X^2_{\text{calculado}} = 0,06$, foi menor que o valor de $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$, desta forma, não houve diferença significativa entre os procedimentos (plaqueamento direto e tratamento com álcool), a nível de 5% de significância.

Embora o plaqueamento direto seja o procedimento que mais recuperou *C. difficile*, o tratamento com álcool é uma etapa que elimina a microbiota contaminante facilitando o isolamento do micro-organismo, pois observa-se que no plaqueamento direto houve um grande crescimento da microbiota do alimento, e conseqüentemente poucas colônias características de *C. difficile*.

Para avaliar a eficiência dos meios seletivos no isolamento de *Clostridium difficile* em amostras de frango, foram utilizados dois meios seletivos CDMNA e CCFA. Os resultados da taxa de recuperação de *C. difficile* pelo plaqueamento direto, com baixo e alto nível de inoculação, em ambos meios seletivos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Recuperação de *C. difficile* em meio seletivo CDMNA e CCFA pelo plaqueamento direto, em 40 amostras de frango, com baixo e alto nível de inoculação.

CCFA	CDMNA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	17 (42,5%)	6 (15,0%)	23 (57,5%)
Negativo	11 (27,5%)	6 (15,0%)	17 (42,5%)
Total	28 (70,0%)	12 (30,0%)	40 (100,0%)

Os meios seletivos CDMNA e CCFA recuperaram 70,0% (28/40) e 57,5% (23/40), respectivamente, após plaqueamento direto, para ambos os níveis de inoculação (Tabela 7).

Avaliando a taxa de recuperação dos meios seletivos em amostras de frango inoculados com ambos níveis de *C. difficile* e submetidos ao plaqueamento direto, observa-se que o micro-organismo foi recuperado de 27,5% (11/40) e 15,0% (6/40) das amostras inoculadas em meio CDMNA e CCFA, respectivamente (somente para CDMNA ou CCFA). Em 40 amostras analisadas, 42,5% (17/40) foram recuperadas em ambos os meios seletivos. O valor de $X^2_{\text{calculado}} = 1,19$, valor inferior ao $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$. Desta forma, não apresenta diferença significativa entre os meios seletivos, a nível de 5% de significância.

Os meios seletivos CDMNA e CCFA após tratamento com álcool, para ambos os níveis de inoculação recuperaram 72,5% (29/40) e 65,0% (26/40), respectivamente (Tabela 8).

C. difficile foi recuperado em 62,5% (25/40) das amostras analisadas em ambos os meios seletivos, CCFA e CDMNA, submetidos ao tratamento com álcool, sendo que em 10% (4/40) foram recuperadas somente pelo meio CDMNA, e em 25% (10/40) não foi recuperado em nenhum dos dois meios seletivos. Desta forma, obteve-se o valor de $X^2_{\text{calculado}} = 1,25$, foi inferior ao $X^2_{\text{tabelado}} = 3,84$. Não apresentando diferença significativa entre os procedimentos (tratamento com álcool e plaqueamento direto), ao nível de 5% de significância.

Tabela 8. Recuperação de *C. difficile* em meio seletivo CDMNA e CCFA para tratamento com álcool, em 40 amostras de frango, com baixo e alto nível de inoculação.

CCFA	CDMNA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	25 (62,5%)	1 (2,5%)	26 (65,0%)
Negativo	4 (10,0%)	10 (25,0%)	14 (35,0%)
Total	29 (72,5%)	11 (27,5%)	40 (100,0%)

De acordo com os resultados obtidos o plaqueamento direto apresentou maior eficácia em relação ao tratamento com álcool para isolamento do micro-organismo e entre os meios seletivos, o CDMNA apresentou maior taxa de recuperação comparada ao meio CCFA em amostras de carne bovina moída.

Porém, o uso de ambos os procedimentos e meios de cultura aumentou o número de recuperação de *C. difficile*.

Para as amostras de frango, não houve diferença entre os procedimentos e os meios seletivos, caracterizando que ambos os procedimentos e meios seletivos permitem a mesma eficácia de recuperação.

Jobstl et al. (2010) a fim de encontrar uma forma mais adequada de detectar *C. difficile* em carnes resfriada e leite “*in natura*”, compararam quatro diferentes meios de enriquecimento, dentre eles: caldo de soja triptona, caldo CDMN, caldo tioglicolato e caldo RCM. As amostras foram inoculadas com 10^8 UFC/g. Observaram que o caldo de enriquecimento CDMN, foi o mais eficaz, pois além de favorecer o crescimento do micro-organismo alvo, eliminou células competidoras, devido aos agentes seletivos. Este estudo determinou que a detecção limiar do micro-organismo em meio de enriquecimento poderia ser muito baixa, em torno de 10 esporos por grama de carne.

Em pesquisa semelhante ao presente estudo, Weese et al. (2009) avaliaram dois tratamentos, ambos com enriquecimento em caldo CDMN, o direto (plaqueamento direto sem tratamento com álcool) e o tratamento com álcool. Verificaram que 12% (28/230) das amostras analisadas apresentaram cultura positiva para *C. difficile* (115/230 carne suína moída e 115/230 carne bovina moída). Do total de amostras positivas, 71% (20/28) foram isoladas somente pelo tratamento com álcool, 14% (4/28) foram positivas para tratamento direto e 14% (4/28) foram recuperadas através de ambos os tratamentos. Desta forma, observa-se que esta metodologia com enriquecimento em caldo CDMN seguido de tratamento com álcool é um método mais sensível que a cultura direta, onde o caldo em questão recuperaria células injuriadas e o tratamento com álcool eliminaria células vegetativas competidoras.

5.2 Ocorrência de *Clostridium difficile* em amostras de carnes resfriadas comerciais

Das 147 amostras de carne “*in natura*” adquiridas em 24 estabelecimentos comerciais, 32 amostras eram referentes à carne bovina moída, 30 carne bovina peça (*Semimembranosus*), 35 de carne suína (*Longissimus dorsi*) e 50 de carne de frango (*Peitoralis profundus e superficialis*).

Do total de amostras analisadas, 11,5% (17/147) apresentaram contaminação por *Clostridium difficile*. A distribuição de amostras de carnes positivas, considerando os dois tratamentos, para o micro-organismo *C. difficile* é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Ocorrência de *C. difficile* em amostras comerciais de carne bovina moída, carne de frango, carne bovina, carne suína.

Tipo de alimento	Amostras positivas
Carne bovina moída	21,8% (7/32)
Carne de frango	18,0% (9/50)
Carne bovina peça	3,3% (1/30)
Carne suína	0,0% (0/35)
Total	11, 5% (17/147)

Dentre as amostras de carne moída bovina, 21,8% (7/32) foram positivas para *C. difficile*. Em relação aos tratamentos utilizados, 6 (85,7%) amostras foram positivas utilizando apenas o plaqueamento direto, e em apenas 1 (14,3%) amostra foi detectado *C. difficile* utilizando ambos os tratamentos, direto e com álcool. *C. difficile* foi detectado em 6 (85,7%) das amostras utilizando-se o meio CDMNA e em apenas 1 (14,3%) amostra o micro-organismo foi isolado utilizando-se ambos os meios seletivos.

C. difficile foi isolado em 18,0% (9/50) das amostras de carne de frango. Em relação aos tratamentos utilizados, *C. difficile* foi detectado em 6 (66,7%) amostras utilizando apenas plaqueamento direto, em 2 (22,2%) amostras utilizando ambos os tratamentos (direto e com álcool) e 1 (11,1%) amostra com tratamento com álcool. Em relação aos meios seletivos CDMNA e CCFA, observa-se que em 6 (66,7%) amostras, *C. difficile* foi isolado no meio CDMNA, em 3 (33,3%) amostras em ambos os meios seletivos (CDMNA e CCFA).

No presente estudo, o micro-organismo foi isolado em apenas 1 amostra de carne bovina peça, ou seja, em 3,3% (1/30), *C. difficile* foi detectado pelo tratamento com álcool em ambos os meios seletivos (CDMN e CCFA).

C. difficile não foi encontrado em amostras de carne suína, entretanto, Weese et al. (2009) detectaram a presença de *C. difficile* em 12% (14/115) das amostras de carne suína analisadas.

Na Figura 4, apresentam-se a distribuição das amostras positivas para *C. difficile* em amostras de carnes em função do procedimento utilizado (tratamento com álcool e plaqueamento direto).

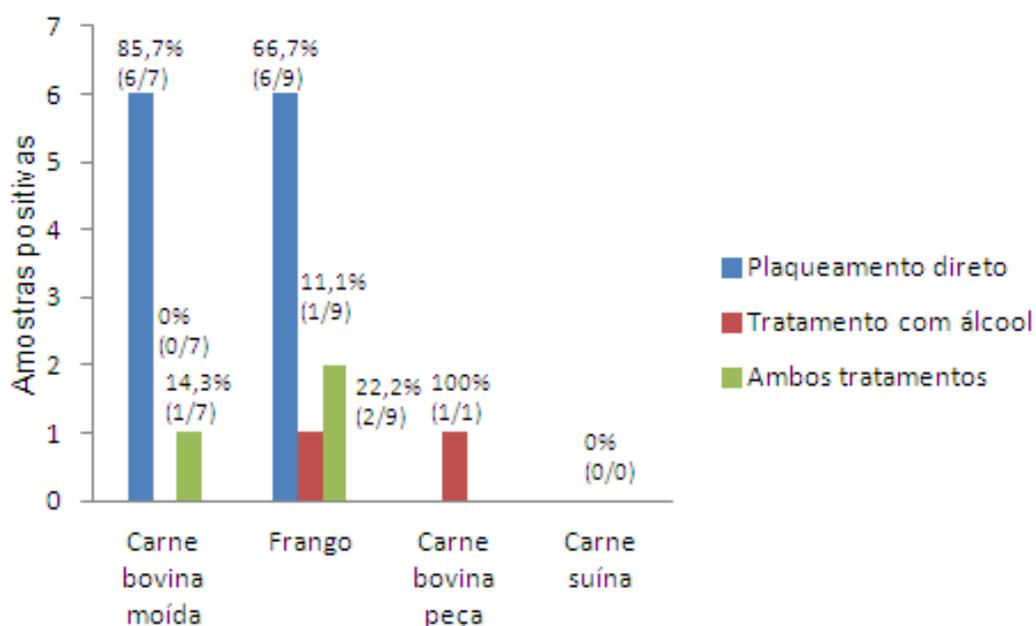


Figura 4. Número de amostras positivas com *C. difficile* em carnes comerciais de acordo com os procedimentos utilizados, plaqueamento direto e tratamento com álcool.

Na Figura 5, apresentam-se a distribuição das amostras positivas para *C. difficile* em amostras de carnes em função do meio seletivo utilizado (CDMNA e CCFA).

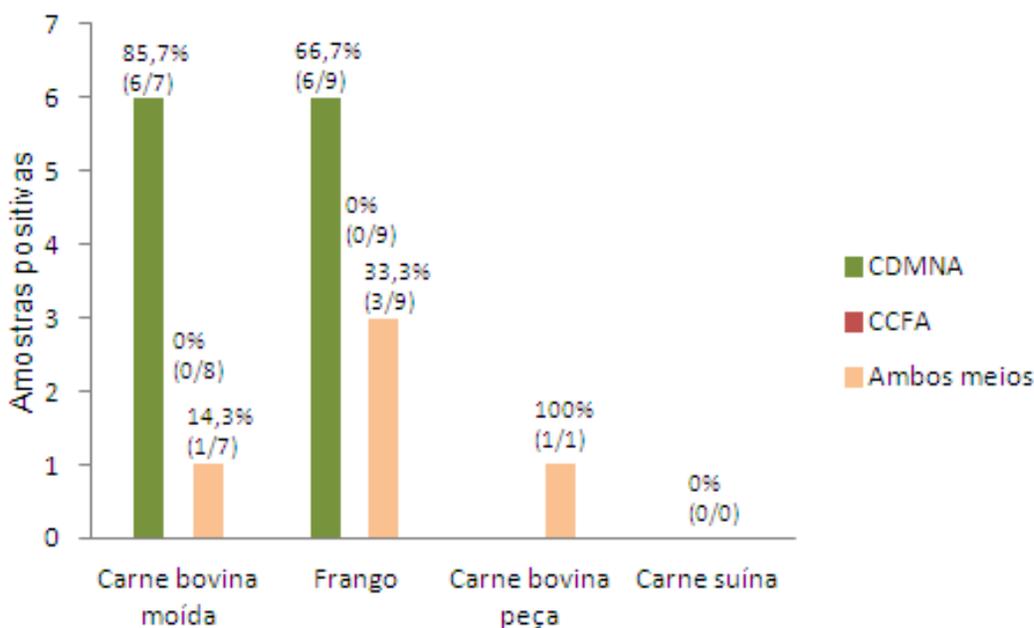


Figura 5. Distribuição de amostras positivas com *C. difficile* em carnes comerciais de acordo com os meios seletivos utilizados, CDMNA (ágar *Clostridium difficile* moxatactam norfloxacina) e CCFA (ágar cicloserina cefoxitina frutose).

Pelo fato das 85,7% e 66,7% das amostras serem positivas para *C. difficile* utilizando o plaqueamento direto em amostras de carne bovina moída e frango, respectivamente (Figura 4), significa que o micro-organismo apresentava-se na forma não esporulada após o enriquecimento em caldo CDMN, pois o tratamento com álcool tem por objetivo eliminar as células vegetativas presentes.

Em relação aos meios de isolamento (CDMNA e CCFA), observa-se que em 85,7% e 66,7% dos isolados de carne bovina moída e carne de frango, respectivamente foram positivos para o meio CDMNA (Figura 5).

Clostridium difficile é um patógeno adquirido em hospitais, causador de infecções intestinais, ocorrendo frequentemente em pacientes com tratamento intensivo com antibióticos, causando casos graves de colite pseudomembranosa. O micro-organismo já foi isolado em animais domésticos (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2006). Em estudos realizados em animais vivos destinados a alimentação humana, onde avaliaram a presença de *C. difficile* em aves de granja, detectou a presença em 62% das fezes de aves, observando uma grande variação de acordo com a idade do animal (ZIDARIC et al., 2008). Em um estudo similar Simango e Mwakurudza (2008) isolaram de amostras de solo, fezes e de frangos vivos vendidos em mercados do Zimbabuwe.

As fontes de contaminação de *C. difficile* em alimentos ainda não é muito clara, entretanto há pesquisas onde encontraram ribotipos idênticos em isolados de *C. difficile* provenientes de animais e do homem, sugerindo a potencial transmissão de *C. difficile* de animais para o alimento (ARROYO et al., 2005).

Clostridium difficile já foi isolado de animais destinados a alimentos, como porcos, bovinos e aves (RODRIGUES-PALACIOS et al., 2006; SIMANGO, 2006; KEEL et al., 2007; HAMMITT et al., 2008; PIRS et al., 2008; SIMANGO e MWAKURUDZA, 2008; ZIDARIC et al., 2008). Desta forma gerando uma grande preocupação pois, durante o abate e processamento podem chegar ao alimento, tornando uma fonte de infecção.

Em estudo similar ao desenvolvido aqui, Wesse et al. (2010) avaliaram a presença de *C. difficile* em diversas amostras de carne de frango e detectaram a presença em aproximadamente 13% das amostras. Nesse estudo utilizou-se o tratamento com álcool, para eliminação de possíveis concorrentes vegetativos e posteriormente inoculou-se em ágar CDMN.

Rodriguez-Palacios et al. (2007) isolaram *C. difficile* em 20,8% (11/53) de amostras de carne moída, o micro-organismo foi isolado seguindo os seguintes procedimentos semelhantes aos utilizados no presente trabalho; as amostras foram enriquecidas em caldo CDMN suplementado com taurocolato de sódio, após incubados

a 37°C por 10-15 dias. Realizou-se o tratamento com álcool e foram inoculados em meio CDMNA suplementado com sangue equino.

Em outro estudo Rodriguez-Palacios et al. (2009) detectaram *C. difficile* em 6,7% (10/149) das amostras de carne bovina moída e 4,6% (3/65) de costeletas de vitela. Em estudo mais recente, Jobstl et al. (2010) avaliou a presença de *C. difficile* em 100 amostras de carne bovina moída, onde 3% das amostras foram positivas.

Wesse et al. (2009) avaliaram 230 amostras de carne bovina e suína, do total de amostras avaliadas, 12% (28/230) foram positivas para *C. difficile*. Sendo 14 isolados provenientes de carne bovina e 14 isolados provenientes de carne suína.

Songer et al. (2009) verificaram a presença de *C. difficile* em alimentos *in natura* e processados, dentre eles, carne moída (bovina, suína e peru) e salsichas, coletadas em supermercados em Tucson, Arizona. Do total de 88 amostras, 37 (42%) foram positivas para o micro-organismo, sem significativa diferença na prevalência entre as amostras.

Outro estudo realizado com carnes *in natura*, Boer et al. (2011) analisaram 500 amostras (cordeiro, suíno, bovino, vitelo e frango) e apenas 8 apresentaram cultura positiva para *C. difficile*.

De modo geral, observando os resultados apresentados na Tabela 10, verifica-se que em apenas 3 amostras foram positivas nos dois procedimentos (plaqueamento direto e tratamento com álcool) e em ambos meios seletivos (CDMNA e CCFA).

O plaqueamento direto foi melhor (13/17), quando comparado a amostras recuperadas apenas no tratamento com álcool (1/17), porém o uso de ambos os procedimentos aumentou o número de amostras positivas (17/17).

Tabela 10. Ocorrência de *C. difficile* em carne bovina moída, carne bovina peça, frango e suína, de acordo com os procedimentos (plaqueamento direto e tratamento com álcool) e meios seletivos (CDMNA e CCFA) utilizados.

Número de amostras	Tratamentos			
	Plaqueamento direto		Tratamento com álcool	
	CCFA	CDMN	CCFA	CDMN
Frango n= 9				
06		x		
02	x	x	x	x
01		x		
Bovina moída n= 7				
06		x		
01	x	x	x	x
Bovina peça n= 1				
01			x	x

- Não foi encontrado *C. difficile* em amostras de carne suína.

n= número de amostras

O baixo número de amostras positivas pode ser devido a reduzida seletividade do meio, bem como dos procedimentos e distribuição não homogênea ou ainda ao baixo número de esporos/células vegetativas. A presença de *C. difficile* em alimentos de origem animal *in natura* é causada principalmente por contaminação cruzada durante o abate e manipulação da carcaça.

5.3 Avaliação do perfil toxigênico dos isolados de *C. difficile*

Avaliou-se o perfil toxigênico dos 80 isolados de *C. difficile*, provenientes de 17 amostras de carnes (Figura 6). Verificou-se que as cepas apresentavam o gene *tcdA* (codificador da toxina A) e *tcdB* (codificador da toxina B). O perfil da eletroforese dos fragmentos dos genes obtidos por PCR das cepas utilizadas como controle positivo é apresentado na Figura 7.

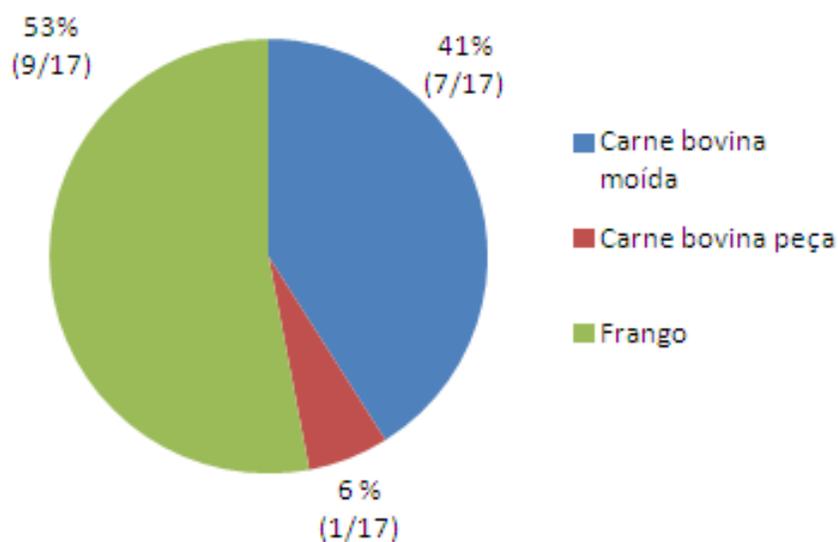


Figura 6. Amostras positivas para *C. difficile*.

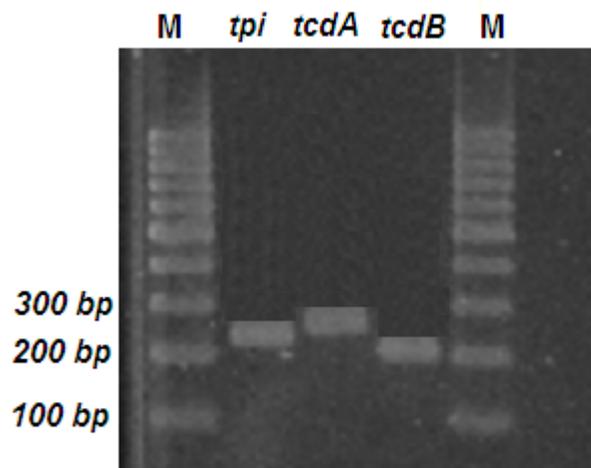


Figura 7. Produtos de amplificação dos genes *tpi* (230 bp), *tcdA* (252 bp) e *tcdB* (204 bp) nas cepas de referência de *C. difficile* através da técnica da PCR.

Nota: Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder).

Observa-se na Tabela 11 que a distribuição dos determinantes genotípicos de virulência deste estudo revela que em 6,25% (5/80) dos isolados apresentam resultado positivo para pelo menos um gene de virulência avaliado (A-B+), e com ambos determinantes genotípicos de virulência (A+B+) observadas em 35,0% (28/80) desses isolados, ou seja, 58,75% (47/80) não apresentaram genes *tcdA* e *tcdB* (A-B-).

Os 33,75% (27/80) dos isolados oriundos das amostras de carne bovina moída não apresentaram perfil toxigênico (A-B-) e os provenientes das amostras de frango (peito de frango) apresentaram 3 perfis diferentes, 28,75% (23/80) A+B+, 6,25% (5/80) A-B+, 25,0% (20/80) A-B-. Todos os isolados provenientes da carne bovina peça (coxão mole) apresentaram perfil A+B+. Nenhum isolado apresentou o perfil A+B- (0/80).

Tabela 11. Presença dos genes responsáveis pela produção da toxina A (*tcdA*) e B (*tcdB*) nos isolados de *C. difficile* obtidos em amostras de carnes.

Amostras	Números de isolados de <i>C. difficile</i> (%)				
	A+B+	A-B+	A+B-	A-B-	Total
Carne bovina moída	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	27 (33,75%)	27 (33,75%)
Peito de frango	23 (28,75%)	5 (6,25%)	0 (0,0%)	20 (25,0%)	48 (60,0%)
Carne bovina peça	5 (6,25%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (6,25%)
Total	28 (35,0%)	5 (6,25%)	0 (0,0%)	47 (58,75%)	80 (100,0%)

Positivo (+) = Presença

Negativo (-) = Ausência

Segundo os resultados apresentados na tabela 11, 58,75% (47/80) dos isolados de *C. difficile* avaliados pela técnica da PCR não apresentaram os genes *tcdA* e *tcdB* não foram consideradas toxigênicas pelo perfil genético com relação a presença dos genes *tcdA* e *tcdB*.

Do total de isolados, 44 cepas foram avaliadas quanto a expressão gênica (perfil fenotípico) através do teste RIDASCREEN *C. difficile* A/B (não diferencia as toxinas presentes). Observou-se que não houve expressão gênica em 22,7% (10/44) dos isolados (Tabela 12), onde o isolado apresentou os genes *tcdA* e *tcdB*, porém, não houve a expressão das toxinas, podemos afirmar que mesmo sem a detecção da toxina, a cepa não poderia ser considerada não toxigênica, pois as condições de crescimento poderiam estar desfavorecendo a expressão gênica.

A presença de gene codificador das toxinas e expressão gênica foi detectado em 9,1% (4/44) dos isolados de *C. difficile* (Tabela 12). Apenas 1 isolado

predominou somente a presença do gene *tcdB* e conseqüentemente houve a expressão através da produção de sua respectiva toxina detectado através do teste fenotípico.

Comparando os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos (Tabela 12), quanto a produção de toxinas pelos isolados de *C. difficile*, obteve-se uma concordância de 70,5% (31/44) entre os resultados, pois 61,4% (27/44) dos isolados apresentou resultados negativos tanto para produção de toxinas como para detecção dos seus genes codificadores e 9,1% (4/44) dos isolados apresentaram presença de gene codificador e expressão gênica.

Em 29,5% (13/44) das amostras houve discordância entre os testes, pois 6,8% (3/44) dos isolados não apresentaram genes referentes a produção de toxina A e B, mas houve a expressão gênica. Em 22,7% (10/44) dos isolados, apresentaram os genes *tcdA* e *tcdB*, porém não houve expressão gênica das toxinas.

Tabela 12. Comparação dos dados de detecção das toxinas A e B pelo teste RIDASCREEN toxina A/B e presença de gene codificadores de toxinas através da PCR de isolados de *Clostridium difficile* de amostras de carnes.

Número de Isolados (%)	Kit Ridascreen Toxina A/B		Total	
	Positivo	Negativo		
PCR	Positivo	4 (9,1%)	10 (22,7%)	14 (31,8%)
	Negativo	3 (6,8%)	27 (61,4%)	30 (68,2%)
	Total	7 (15,9%)	37 (84,1%)	44 (100,0%)

O gene *tcdA* e *tcdB* encontram-se em um locus de patogenicidade denominado *Paloc*, ele é constituído por 5 genes : *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* e *tcdE*. Os genes *tcdA* e *tcdB* são responsáveis pela codificação das toxinas A e B, respectivamente. Acredita-se que os outros três genes são responsáveis pela regulação

da produção das toxinas. O *tcdR* atua como um regulador positivo. O *tcdC* é altamente expresso durante a fase exponencial de crescimento da bactéria, diminuindo porém ao passo que o crescimento aproxima-se da fase estacionária. Esse declínio da expressão do *tcdC* é acompanhado de um incremento na produção das toxinas A e B, o que sugere que este gene atue como um regulador negativo. Por último, especula-se que o *tcdE* facilite a liberação das toxinas A e B através da permeabilização da parede celular. Com isso, pesquisadores acreditam que a expressão das toxinas de *C. difficile* é regulada positivamente pela expressão do *tcdR*, dependente da queda na expressão do *tcdC* e a liberação das toxinas é mediada pela expressão do *tcdE* (VOTH e BALLARD, 2005).

Bouvet et al. (2008) observaram que cepas que apresentam exclusões do gene *tcdC*, conseqüentemente apresentavam um aumento na produção de toxinas A e B, ou seja, a expressão da toxina A e B só aumenta na medida do declínio da expressão do *tcdC*, desta forma atuando como regulador negativo.

Em 10 isolados do trabalho exposto, observa-se a presença de gene *tcdA* e *tcdB*, mas não houve a expressão gênica, desta forma, não podemos afirmar que estes isolados são toxigênicos, e como não foi realizado outro teste imunológico confirmatório, apenas a presença dos genes, não chegou a uma conclusão definitiva quanto ao seu perfil toxigênico. De acordo com Vernozy-Rozand et al. (1996) para provar a toxicidade seria necessário uma confirmação da produção de toxinas através de pelo menos 2 métodos e a identificação das respectivas toxinas.

É importante salientar que o teste da PCR com *primers* específicos para as toxinas pode ser utilizado para identificar bactérias portadoras de cópias desses genes, todavia, não podem ser utilizados para determinar se os genes estão codificando proteínas, ou seja, suas toxinas.

Em 3 isolados, foi detectado as toxinas através do teste fenotípico RIDASCREEN, porém não houve a detecção dos genes. Este fato pode ser justificado por alguns pesquisadores que afirmam que poderia haver variações nas sequências dos genes analisados onde dificultaria a correta ligação dos *primers* para a reação da

PCR, assim como no caso de toxina estafilocócica, onde poderia haver uma possível toxina ainda não descrita que possui reação imunológica semelhante às das toxinas A e B (MCLAUHLIN et al. 2000; JORGENSEN et al. 2005).

Desta forma analisar sequências de DNA poderia ser uma solução para revelar as possíveis diferenças nos genes dos isolados do presente estudo.

Outro fator determinante seria o número de isolados analisados, este fato poderia explicar a ausência de resultados positivos na detecção de genes codificadores (BECKER et al., 2001). No presente estudo foram avaliados apenas 80 isolados, e poderia ter sido um fator limitante na detecção dos genes codificadores, bem como da sua expressão, para uma maior precisão dos resultados, além dos *primers* utilizados, seria necessário um número mais elevado de isolados de *C. difficile*.

Em pesquisa realizada por Rodriguez-Palacios et al. (2009), os pesquisadores detectaram *C. difficile* em 6,7% (10/149) das amostras de carne bovina moída e 4,6% (3/65) de costeletas de vitela. Do total de isolados, 77% (10/13) apresentaram perfil toxigênico. Em estudo mais recente, Jobstl et al. (2010) avaliou a presença de *C. difficile* em 100 amostras de carne bovina moída, onde 3% das amostras foram positivas, dentre elas apenas 1 amostra obteve perfil toxigênico.

Wesse et al. (2009) avaliaram 230 amostras de carne bovina e suína. Do total de amostras avaliadas, 12% (28/230) das amostras foram positivas para *C. difficile*. Todos os isolados eram TcdA+/TcdB+.

Em estudo mais recente, Boer et al. (2011) avaliaram o perfil toxigênico dos isolados provenientes de 1,6% (8/500) de amostras positivas para *C. difficile*, do total de isolados, 62,5% (5/8) apresentaram perfil toxigênico TcdA+/TcdB+, e 37,5% (3/8) não foram toxigênicos.

6 CONCLUSÃO

No isolamento do micro-organismo, o plaqueamento direto apresentou maior eficácia em relação ao tratamento com álcool e o meio CDMNA apresentou maior número de recuperação comparada ao meio CCFA em amostras de carne bovina moída. Porém, o uso simultâneo de ambos os procedimentos e meios de cultura aumentou o número de recuperação de *C. difficile*.

O micro-organismo foi isolado de carne bovina moída, carne de frango (*Peitoralís profundus* e *superficialis*) e carne bovina peça (*Semimembranosus*).

O perfil de virulência foi positivo para pelo menos um gene de virulência (A-B+/A+B+) em 41,2% dos isolados de *C. difficile*.

Houve concordância de 70,5% entre os testes fenotípicos e genotípicos utilizados para detecção de toxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFA, M. J. A.; KABANI.; LYERLY, D.; MONCRIEF, S.; NEVILLE, L. M.; AL-BARRAK, A.; HARDING, G. K.; DYCK, B.; OLEKSON, K.; EMBIL, J. M. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology** 38: 2706–2714, 2000.

ALONSO, R.; MARTIN, A.; PELÁEZ, T.; RODRÍGUEZ-CREIXÉMS, M.; BOUZA, E. Toxigenic status of *Clostridium difficile* in large Spanish teaching hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 159-162, 2005.

ANGLIM, A. M.; FARR, B. M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Current Opinion in Infectious Diseases**: 7:602-608, 1994.

ASPINALL, S. T., HUTCHINSON, D. N. New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. **Journal of Clinical Pathology**. Vol 45:812-814, 1992.

BAKRI, M. M.; BROWN, D. J.; BUTCHER, J. P.; SUTHERLAND, A. D. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. **Emerging Infections Diseases**, 15(5): 817-818, 2009.

BANNO, Y.; KOBAYASHI, T.; KONO, H.; WATANABE, K.; VENO, K.; NOZAWA, Y.; Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. **Review of Infectious Diseases** 6: S11-S20, 1984

BARBUT, F.; DECRÉ, D.; LALANDE, V.; BURGHOFFER, B.; NOUSSAIR, L.; GIGANDON, A.; ESPINASSE, F.; RASKINE, L.; ROBERT, J.; MANGEOL, A.; BRANGER, C.; PETIT, J. C. Clinical features of *Clostridium difficile* – associated diarrhea due to binary toxin (action-specific ADP-ribosyltransferase)- producing strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 181-185, 2005.

BARBUT, F.; MASTRANTONIO, P.; DELMEE, M.; BRAZIER, J.; KUIJPER, E.; POXTON, I. European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. **Clinical Microbiology Infectious**. 13:1048–57. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01824, 2007.

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

BARROSO, L. A.; WANG, S. Z.; PHELPS, C. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS, T. D. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. **Nucleic Acid Research** 18:4004, 1990

BARTLETT, J. G. *Clostridium difficile*: Clinical considerations. **Emerging Infectious Diseases**; 12:243-251, 1990.

BARTLETT J.G.; CHANG T.W. et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. **The New England Journal of Medicine**, v.298, n.10, p.531-4, 1978.

BAVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. **Vet Q** 24, 203–219, 2002.

BECKER, K., HAVERKAMPER, G., VON EIFF, C., ROTH, R., PETERS, G. Survey of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene in Non-*Staphylococcus aureus* Species. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, p.407-409, 2001.

BOER, E. ZWARTKRUIS-NAHUIS, A. E. HARMANUS, C. KUIJPER, E. J. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**. Volume 144, Issue 3,, Pages 561-564, 2011.

BOUVET, J. M. P. POPOFF, M. R.. Journal Of Clinical Microbiology. Vol. 46, Nov. 11, P. 3703–3713, 2008.

BORRIELLO, S. P.; HONOUR, P.; TURNER, T.; BARCLAY, F. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. **Journal Clinical Pathology**; 36, 84–87, 1983.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº368, de 04/09/1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 1997. p.60.

BUGGY, B.P.; WILSON, K.H.; FEKETY, R. Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. **Journal Clinical Microbiology**. v.18, n.2, p.348- 352, 1983.

BRODA, D.M.; DELACY, K.M.; BELL, R.G. Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. **International Journal of Food Microbiology**. V.39, p. 69-78. 1998.

CATO, P. E.; GEORGE, L. W.; FINEGOLD, S. M. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N. S.; Sharp, M. E.; J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. vol. 2, p. 1141 – 1200, 1986.

CATTOIR, V.; OULD-HOCINE, Z. F.; LEGRAND, P. Étude de la sensibilité aux antibiotiques de souches cliniques de *Clostridium difficile* isolées de 2001 à 2007 au CHU Henri-Mondor, Créteil. **Pathologie Biologie**, v. 56, p. 407-411, 2008.

CURRY, S. *Clostridium difficile*. **Clinical Laboratory Medicine**, 30, 329-342, 2010

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

EVANGELISTA, J. *Tecnologia de Alimentos*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 652 p. 2000.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. H. AOAC International Methods Committee Guidelines for validation of quantitative and qualitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, v. 85, n.5, p. 1187-1200, 2002.

GEORGE, W. L.; SUTTER, V. L.; CITRON, D.; FINEGOLD, S.M. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 214-219, 1979.

GERIC, B.; RUPNIK, M.; GERDING, D. N.; GRABNAR, M.; JOHNSON, S. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. **Journal of Medical Microbiology**; 53: 887–894, 2004.

GONÇALVES, C.; DECRE, D.; BARBUT, F.; BURGHOFFER, B.; PETIT, J.C. Prevalence and characterization of a binary toxin (actinspecific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. **Journal of Medical Microbiology**; 42: 1933–1939, 2004.

GURIAN, L.; WARD, T. T.; KATON, R. M. Possible foodborne transmission in a case of pseudomembranous colitis due to *Clostridium difficile*. **Gastroenterology**, v. 83, p. 465-469, 1982.

HALL, I.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. **Am Journal Disease Child**; 49:390–402, 1935.

HAMMITT, M. C., BUESCHEL, D. M., KEEL, M. K., GLOCK, R. D., CUNEO, P., DEYOUNG, D. W., REGGIARDO, C., TRINH, H. T., SONGER, J. G. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Veterinary Microbiology*.127 (3–4):343–352, 2008.

HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. **World Journal Gastroenterology**, v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. Anaerobe laboratory manual. V.P.I Anaerobe Laboratory. Virginia, 4. Edição, 1977.

HOPMAN, N. E. M.; KEESSEN, E. C.; HARMANUS, C.; SANDERS, I.M.J.G.; VAN LEENGOED, L.A.M.G.; KUIJPER, E.J.; LIPMAN, L.J.A. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. **Veterinary Microbiology**. Volume 149, Issues 1-2, 21 April, Pages 186-192, 2011.

INDRA, A.; SCHMID, D.; HUHULESCU, S.; GATTRINGER, M. H. R.; HASENBERGER, P.; FIELDER, A.; WEWALKA, G.; ALLERBERGER, F. Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006-2007. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 702-708, 2008.

JOBSTL, M.; HEUBERGER, S.; INDRA, A. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. **Journal Food Microbiology**; 138(1–2):172–5, 2010.

JOHNSON, S.; SAMORE, M. H.; FARROW, K. A. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. **New England Journal of Medicine**: 341: 1645–1651, 1999.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; ROVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 158-167, 2005.

KATO, N., KATO, H., BARTLEY, S. L., BROWN, V. K., DOWELL, V. R., UENO, U. Identification of Toxigenic *Clostridium difficile* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal of clinical microbiology**, Vol. 29, No. 1 p. 33-37. 1991.

KATO, H.; KATO, N.; WATANABE, K.; IWAI, N.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, T.; SUZUKI, K.; KIM, S. M.; CHONG, Y.; WASITO, E. B. Identification of toxin A – negative, toxin B – positive *Clostridium difficile* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.8, p.2178-2182. 1998.

KELLY, C. P.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* colitis. **The New England Journal of Medicine**; 330:257-262, 1994.

KELLY, C.P.; LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* infection. **Annual Review of Medicine**; 49: 375–390, 1998.

KEEL, K., BRAZIER, J. S., POST, K, W., WEESE, S., SONGER, G. Prevalence of PCR Ribotypes among *Clostridium difficile* Isolates from Pigs, Calves, and Other Species. **Journal of clinical microbiology**,, p. 1963–1964. Vol. 45, No. 6, 2007.

LARSON, H.E. PRICE, A.B. HONOUR, P. BORRIELO, S.P.. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. **The Lancet**, Volume 311, Issue 8073, Pages 1063-1066, 20 May 1978.

LEITÃO, M. F. F. Controle microbiológico da qualidade no processamento industrial de bovinos. Ciência e Tecnologia da carne/Instituto de Tecnologia e Alimentos, Campinas, p. 89-92, 1994.

LEITÃO, M.F.F, Controle microbiológico da qualidade no processamento industrial de bovinos. In: **Ciência e tecnologia de carne bovina**. Campinas: CTC/ITAL, p.89-96, 1995.

LEMEE, L.; DHALLUIN, A.; TESTELIN, S.; MATTRAT, M. A.; MAILLARD, K.; LEMELAND, J. F.; PONS, J. L. Multiples PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (toxin A), and tcdB (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.12, p. 5710-5714, 2004.

LEVETT, P. N. Effect of antibiotic concentration in a selective medium on the isolation of *clostridium difficile* from faecal specimens. **Journal of Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 233-234, 1985.

LIMAYE, A. P.; TURGEON, D. K.; COOKSON, B. T.; FRITSCH, T. R. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**: 38: 1696–1697, 2000.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: It's Disease and Toxins. **Clinical Microbiology Reviews** 1:1-18, 1988.

MACLEOD-GLOVER, N.; SADOWSKI, C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. **Canadian Family Physician**, v. 56, n.5, p.417-23, 2010.

MARCON, A. P.; GAMBA, M. A.; VIANNA, L. A. C. Nosocomial diarrhea in the care unit. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**. V. 10, n. 6, p. 384-389, 2006.

MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. **Vet Microbiol.**, 94, 39–45, 2003.

MCFARLAND, L. V.; MULLIGAN, M. E.; KWOK, R. Y. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. **The New England Journal of Medicine**; 320(4):204–10, 1989.

MCLAUCHLIN, J., NARAYANAN, G.L., MITHANI, V., O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.63, p.479–488, 2000.

METCALF, D.; AVERY, B. P.; JANECKO, N. MATIC, N.; REID-SMITH, R.; WESSE, J. S. *Clostridium difficile* in seafood and fish. **Anaerobe**. Volume 17, Issue 2, April, Pages 85-86, 2011.

METCALF, D. S.; COSTA, M. C.; DEW, W. M. V.; WEESE, J. S. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. **Letters in Applied Microbiology**. V. 51, 600–602, 2010.

MONCRIEF, J.S.; ZHENG, L.; NEVILLE, L. M.; LYERLY, D. M. Genetic characterization of toxin A–negative, toxin B–positive *Clostridium difficile* isolates by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**: 38: 3072–3075, 2000.

MUTLU, E.; WHOE, A. J.; SANCHES-HURTADO, K.; BRAZIET, J. S.; POXTON, I. R. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 921-929, 2007.

NAKAMURA, S.; MIKAWA, M.; NAKASHIO, S. Isolation of *Clostridium difficile* from the feces and the antibody in sera of young and elderly adults. **Microbiol Immunol**. 25(4):345–51, 1981.

O'NEILL, G.; ADAMS, J. E.; BOWMAN, R. A.; RILEY, T. V. A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. **Epidemiology Infection**; 111, 257–264, 1993.

OZAKI, E.; KATO, H.; KITA, H. *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. **Journal of Medical Microbiology** 2004;53(Pt 2):167–72.

PARDINI, M. C. et al. *Ciência, Higiene e Tecnologia da carne*. 2 ed. Goiânia: CEGRAF – UFG/Niterói: EDUFF, 586 p., v. 1, 1995.

PARDI, M. C. et al. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. 2ª edição rev. Goiânia: Editora UFG, v. 2, 2001.

PENSEL, L. The future of red meat in human diets. **Nutrition Abstracts & Reviews**. (Serie A), Oxford, v. 68, p.1-4, 1998.

PEPIN, J.; VALIQUETTE, L.; ALARY, M. E.; VILLEMURE, P.; PELLETIER, A.; FORGET, K.; PEPIN, K. Chouinard D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. **Canadian Medical Association Journal**; 171(5):466-72, 2004.

PEPIN, J.; VALIQUETTE, L.; COSSETTE, B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*- associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. **Canadian Medical Association Journal**: 173(9): 1037-42, 2005.

PERSSON, S.; TORPDAHL, M.; OLSEN, K.E.P. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. **Clin Microbiol Infect**; 14:1057-1064, 2008.

PINTO NETO, M. Embalagem da carne vermelha. **Revista Nacional da Carne**, n. 318. Agosto. 2003.

PIRS, T.; OCEPEK, M.; RUPNIK, M. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. **Journal of Medical Microbiology**. V. 57, p. 790-792, 2008.

POPOFF, M. R.; RUBIN, E. J.; GILL, D. M.; BOQUET, P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. **Infection and Immunity**; 56: 2299–2306, 1988.

POTHOULAKIS, C.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. **Gastroenterology Clinics of North America** 22:623-637, 1993.

POXTON, I. R.; MCCOUBREY, J.; BLAIR, G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**: 7: 421–427, 2001.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; LIMA, A. A. M. O *Clostridium difficile* como agente indutor de diarréia inflamatória. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 32:47-52, jan-fev, 1999.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; REID-SMITH, R. J.; STAEMPFLI, H. R.; DAIGNAULT, D.; JANECKO, N.; AVERY, B. P.; MARTIN, H.; THOMPSON, A. D.; MCDONALD, L.C.; LIMBAGO, B.; WEESE, J.S. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. **Emerging Infections Diseases**, 15(5): 802-805, 2009.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STAEMPFLI, H. R.; DUFFIELD, T. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. **Emerging Infectious Diseases**;13(3):485–7. PMID: 2725909, 2007.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STÄMPFLI, H. R.; DUFFIELD, T.; PEREGRINE, A. S.; TROTZ-WILLIAMS, L. A.; ARROYO, L. G.; BRAZIER, J. S.; WEESE, J. S. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. **Emerging Infections Diseases**; 12(11): 1730-1736, 2006.

RUPNIK, M.; KATO, N.; GRABNAR, M.; KATO, H. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. **Journal of Medical Microbiology**; 41: 1118–1125, 2003.

RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; DALE, N. Gerding. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. v.7, p.526-536, 2009.

SAUCIER, L. Meat safety: challenges for the future. **Nutrition Abstracts & Reviews**. (Serie A),Oxford, v. 69, p.705-708, 1999.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; SOLER, M. R. Embalagens com atmosfera modificada/controlada. In: ITAL. **Novas tecnologias de acondicionamento de alimentos**. São Paulo, 1983. cap.5, p. 104-140.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubulebased protrusions and increases adherence of bacteria. **PLoS Pathog**, v.5, n.10, e1000626, 2009.

SIMANGO, C., MWAKURUDZA, S. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. **International Journal of Food Microbiology**, 124 pag.268–270, 2008.

SIMANGO C. Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and hygiene**; 100: 1146-1150, 2006.

SCHROEDER, M. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **American Family Physician**, v. 71, n.5, p. 921-928, 2005.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal Secretion. **Microbiological Reviews** 60:167-215, 1996.

SONGER, J. G.; TRINH, H. T.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A. D.; MCDONALD, L.C.; LIMBAGO, B. M. *Clostridium difficile* in Retail meat products, USA 2007. **Emerging Infectious Diseases**. 15(5): 819-82, 2009.

SONGER, J.G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal health research reviews**; 5(2): 321-326, 2004.

STARR, J. M.; ROGERS, T. R.; IMPALLOMENI, M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhoea and herd immunity. **The Lancet** 349:426-428, 1997.

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B.; POPOFF, M.; Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. **FEMS Microbiol Lett**; 186: 307–312, 2000.

TORRES, E. M. C., WESSE, J. S., STAEMPFLI, H. R. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. **Veterinary Microbiology**. Volume 152, Issues 1-2, 26 August, Pages 212-215, 2011.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUYA, C.; PREVOSTB, G.; LAPEYREC, C.; BESD, M.; BRUND, Y.; FLEURETTED, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.271-280, 1996.

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D.; *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n.2, p. 247-263, 2005).

WEESE, J. S.; REID-SMITH, R. J.; AVERY, B. P. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. **Letters Applied Microbiology**; 50(4):362–5, 2010.

WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. **Equine Vet Journal**: 33, 403–409, 2001.

WEESE, J. S.; AVERY B.; ROUSSEAU J.; REID-SMITH, R. 2009. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. **Applied and environmental microbiology**. Aug, p. 5009 – 5011, 2009.

WULLT, M.; ODENHOLT, I.; WALDER, M. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. **Infection Control and Hospital Epidemiology**; v.24, n.10, p. 765-768, 2003.

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**; 19: 52-59, 2007.

ZIDARIC, V., ZEMLJIC, M., JANEZIC, S., KOCUVAN, A., RUPNIK, M. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. **Anaerobe** 14, 325–327, 2008.