



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA CLAUDIA TSUCHIYA

Comportamento de *Clostridium difficile* em diferentes meios de cultivo e carne embalada a vácuo, capacidade de formação de biofilmes e controle por sanitizantes

CAMPINAS

2017

ANA CLAUDIA TSUCHIYA

Comportamento de *Clostridium difficile* em diferentes meios de cultivo e carne embalada a vácuo, capacidade de formação de biofilmes e controle por sanitizantes

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Coorientadora: Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Ana Claudia Tsuchiya, e orientada pelo Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

T789c Tsuchiya, Ana Claudia, 1987-
Comportamento de *Clostridium difficile* em diferentes meios de cultivo e carne embalada a vácuo, capacidade de formação de biofilmes e controle por sanitizantes / Ana Claudia Tsuchiya. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye.

Coorientador: Dirce Yorika Kabuki.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Clostridium difficile*. 2. Biofilme. 3. Multirresistência. 4. Esporos. 5. Sanitizantes. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Kabuki, Dirce Yorika. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Behavior of *Clostridium difficile* in different culture media and vacuum packed meat, biofilm formation capacity and control by sanitizers

Palavras-chave em inglês:

Clostridium difficile

Biofilm

Multiresistance

Spores

Sanitizers

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Arnaldo Yoshiteru Kuaye [Orientador]

Maristela da Silva do Nascimento

Nathália Cristina Cirone Silva

Renata Bromberg

Valéria Christina Amstalden Junqueira

Data de defesa: 18-09-2017

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Universidade Estadual de Campinas
Orientador

Profa. Dra. Maristela da Silva do Nascimento
Universidade Estadual de Campinas
Titular

Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva
Universidade Estadual de Campinas
Titular

Dra. Renata Bromberg
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Titular

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Titular

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos Membros Titulares encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna Ana Claudia Tsuchiya.

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

Leonardo da Vinci

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

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me acompanha em todos os momentos, me dando forças para encarar todos os desafios da vida;

Ao Prof. Dr. Arnaldo e a Profa. Dra. Dirce pela orientação e confiança na realização desse trabalho; principalmente pelo carinho, respeito e ética que demonstraram ao longo destes anos de trabalho e amizade. Levarei estes exemplos para o resto da minha vida;

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;

Aos meus irmãos André, Anderson, Marcelo e Kenzo pelo incentivo e preocupação, pelas dicas e ajudas, pela amizade, companheirismo em diversos momentos;

Ao Marcelo, por ser meu maior incentivador durante essa jornada; Agradeço especialmente pelo carinho, apoio e amor que me deu em todos os momentos, bons ou ruins. Sem você, eu não teria conseguido realizar este trabalho de forma tão bonita;

Aos amigos de convívio no Laboratório de Higiene, pessoas incríveis que passaram por minha vida e me ensinaram muitas coisas, foram companheiras, queridas, prestativas e, acima de tudo, amigas;

Aos amigos da pós, obrigada pelo convívio durante este período, pela amizade conquistada, pelo apoio, pela paciência nos meus dias de estresse e por aguentarem e escutarem minhas reclamações frequentes;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

À empresa Sandet® pela doação dos sanitizantes utilizados para a realização deste trabalho;

À empresa Spel por ter fornecido a embalagem utilizada na realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões na conclusão deste trabalho;

A todos os amigos que conquistei aqui em Campinas e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

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

Muitíssimo obrigada!

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. 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 animais de produção. *C. difficile* é um micro-organismo capaz de aderir e formar biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de carnes, causando um elevado risco de contaminação de alimentos. Desta forma, os objetivos do estudo foram: a) avaliar o comportamento de cepas de *C. difficile* isoladas de carnes em diferentes meios de cultura, PYG (*Peptone yeast extract glucose*) e BHI (*Brain heart infusion*), a 4 °C e 7 °C por 28 dias e, a 15 °C por 10 dias e em carnes embaladas a vácuo a 7 °C e 15 °C por 35 e 15 dias, respectivamente; b) avaliar a capacidade de adesão e/ou formação de biofilme de *C. difficile* (VPI 10463 e LHCD 809) em diferentes matrizes, BHI, BHI modificado com cisteína e BHI modificado para pH 5,6-5,8 sob duas temperaturas, 15 °C e 25 °C por até 10 dias, em superfície de cupons de aço inoxidável AISI 304; c) avaliar estratégias para controle e inibição de *C. difficile*, dentre elas aplicação de sanitizantes em biofilmes formados após 6 dias de contato e sobre suspensão de esporos de *C. difficile*; d) avaliar o perfil de susceptibilidade de cepas isoladas de carnes a 8 antimicrobianos (ampicilina, clindamicina, ceftizoxime, moxifloxacina, metronidazol, tetraciclina, ceftriaxone e vancomicina). Os resultados revelaram o efeito bacteriostático da estocagem às temperaturas de 4 °C e 7 °C, no entanto, um abuso de temperatura (15 °C) proporcionou a multiplicação de *C. difficile*. O desenvolvimento de *C. difficile* VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo é favorecido pelo aumento de temperatura. Tanto a cepa de *C. difficile* padrão VPI 10463, quanto a cepa LHCD 809 isolada de carne de frango foram capazes de aderir e formar biofilmes multiformes em superfície de aço inoxidável. Embora o sanitizante a base de hipoclorito de sódio tenha apresentado maior redução do biofilme de *C. difficile* a sua eliminação não foi total, indicando a necessidade de um processo mais efetivo de higienização. Para eliminação de esporos de *C. difficile* o hipoclorito de sódio foi o agente com maior efeito esporicida, seguido do ácido peracético. A biguanida e o quaternário de amônio não apresentaram nenhuma atividade sobre os esporos de *C. difficile*. A multirresistência a pelo menos três agentes antimicrobianos foi encontrada em 36,4 % dos isolados, o que evidencia a importância do monitoramento periódico para avaliar o

surgimento de cepas resistentes. Dessa forma, os alimentos in natura e os processados representam um risco para saúde pública, agindo como possíveis veículos para transmissão de *C. difficile*, portanto, estratégias adequadas para reduzir a contaminação de alimentos são extremamente recomendadas.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, biofilmes, multirresistência, esporos, sanitizantes.

ABSTRACT

Clostridium difficile is an anaerobic bacillus responsible for intestinal disease associated with previous treatment with antibiotics, ranging from mild diarrhea to severe cases of pseudomembranous colitis. Infection cases are related to contamination in hospitals, but recent research suggests a possible association with the consumption of contaminated foods, since *C. difficile* has already been isolated from production animals. *C. difficile* is a microorganism capable of adhering and forming biofilms on surfaces of equipment and utensils used in meat processing, causing a high risk of food contamination. In this way the objectives of this study were: a) to evaluate the behavior of *C. difficile* strains isolated from meat in different culture media, PYG (Peptone yeast extract glucose) and BHI (Brain heart infusion) at 4 °C and 7 °C for 28 days and at 15 °C for 10 days and in vacuum packed meats at 7 °C and 15 °C for 35 and 15 days, respectively; b) to evaluate the adhesion and/or biofilm formation capacity of *C. difficile* (VPI 10463 and LHCD 809) in different matrices, BHI, cysteine-modified BHI and BHI modified to pH 5.6-5.8 under two temperatures, 15 °C and 25 °C for up to 10 days, on stainless steel AISI 304 coupon surfaces; c) to evaluate strategies for *C. difficile* control and inhibition, among them application of sanitizers in biofilms formed after 6 days of contact and on spore suspension of *C. difficile*; d) to evaluate the susceptibility profile of strains isolated from meat to 8 antimicrobials (ampicillin, clindamycin, ceftizoxime, moxifloxacin, metronidazole, tetracycline, ceftriaxone and vancomycin). The results revealed the bacteriostatic effect of storage at temperatures of 4 °C and 7 °C, however, a temperature abuse (15 °C) resulted in the multiplication of *C. difficile*. The development of *C. difficile* VPI 10463 in vacuum packed meats is favored by the increase in temperature. Both the *C. difficile* strain VPI 10463 and the LHCD 809 strain isolated from chicken meat were able to adhere and form multiform biofilms on stainless steel surfaces. Although the sanitizer based on sodium hypochlorite showed a greater reduction of *C. difficile* biofilm, its elimination was not complete, indicating the need for a more effective hygienization process. For elimination of *C. difficile* spores sodium hypochlorite was the agent with the highest sporicidal effect, followed by peracetic acid. Biguanide and quaternary ammonium showed no activity on *C. difficile* spores. The multiresistance of at least three antimicrobial agents was found in 36.4 % of the isolates, evidencing the importance of periodic monitoring to evaluate the emergence of resistant strains. Thus, in natura and processed foods represent a risk to public health, acting

as possible vehicles for transmission of *C. difficile*, therefore, adequate strategies to reduce food contamination are highly recommended.

Keywords: *Clostridium difficile*, biofilms, multiresistance, spores, sanitizers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colonização de <i>C. difficile</i> no intestino, com consequente produção de toxinas A e B (cepas toxigênicas). Atuação das toxinas originando a colite pseudomembranosa ou seguindo para corrente sanguínea.	25
Figura 2. a) Toxina A e B, codificada pelo gene de patogenicidade (lôcus <i>PaLoc</i>) que compreende 5 genes: <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>tcdC</i> , <i>tcdD</i> e <i>tcdE</i> . b) Toxina binária é codificada numa região separada do cromossomo (<i>cdtLoc</i>) e é composta por 3 genes: <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtR</i>	26
Figura 3. Etapas do desenvolvimento de um biofilme bacteriano. 1) Adesão reversível; 2) Adesão irreversível; 3) Crescimento do biofilme; 4) Maturação do biofilme; 5) Dispersão. (STOODLEY et al., 2002).....	31
Figura 4. Etapas da formação de biofilme baseada na capacidade adaptativa de micro-organismos proposta por Monds e O'Toole (2009).	33
Figura 5. Câmara de anaerobiose Shell lab™, modelo Bactron II Chamber utilizada nos experimentos.....	42
Figura 6. Planejamento experimental para avaliação do comportamento de <i>C. difficile</i> em meios de culturas.	45
Figura 7. Planejamento experimental para avaliação do comportamento de <i>C. difficile</i> em amostras de carne embaladas a vácuo.	48
Figura 8. Planejamento experimental para avaliação da adesão e formação de biofilme de <i>C. difficile</i> em superfície de aço inoxidável.	52
Figura 9. Planejamento experimental para avaliação da ação de sanitizantes em biofilmes de <i>C. difficile</i>	55
Figura 10. Desenvolvimento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 15 °C.	62
Figura 11. Comportamento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 7°C.....	63
Figura 12. Contagens de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 4 °C.....	64
Figura 13. Médias das contagens (log UFC ou esporos/g) do desenvolvimento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo mantidas a 7 °C.	66
Figura 14. Médias das contagens (log UFC ou esporos/g) do desenvolvimento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo mantidas a 15 °C.	67

Figura 15. Médias de contagens de <i>C. difficile</i> (VPI 10463 e LHCD 809): (A) células vegetativas e (B) esporos (log UFC ou esporos/cm ²) aderidas à superfície de aço inoxidável.	71
Figura 16. Médias de contagens de <i>C. difficile</i> (VPI 10463 e LHCD 809) células vegetativas (A) e esporos (B) (log UFC ou esporos/cm ²) aderidos à superfície de aço inoxidável utilizando três meios de culturas.	73
Figura 17. Médias das contagens de células vegetativas (A) e esporos (B) (VPI 10463 e LHCD 809) (log UFC ou esporos/cm ²) aderidos na superfície do aço inoxidável a duas temperaturas de incubação.....	76
Figura 18. Médias das contagens de esporos de <i>C. difficile</i> (log esporos/cm ²) aderidas em superfícies de aço inoxidável ao longo de um período de 10 dias a duas temperaturas de incubação, considerando todos os fatores do planejamento experimental.	79
Figura 19. Médias das contagens de células vegetativas e esporuladas de <i>Clostridium difficile</i> VPI 10463 (A) e LHCD 809 (B) (log UFC ou esporos/cm ²) aderidas em superfícies de aço inoxidável ao longo de 10 dias de exposição.	81
Figura 20. Efeito esporicida de sanitizantes sobre esporos de <i>C. difficile</i> VPI 10463 (A) e LHCD 809 (B).	92
Figura 21. Efeito esporicida de sanitizantes a base de hipoclorito de sódio sobre esporos de <i>C. difficile</i> VPI 10463 (A) e LHCD 809 (B).	96

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Perfil dos isolados de <i>C. difficile</i> provenientes de amostras de carnes testadas para avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos.	57
Tabela 2. Médias e desvios padrões das contagens de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 4 °C, 7 °C e 15 °C.	61
Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do comportamento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em meios de cultura armazenados sobre temperaturas diferentes.	62
Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para avaliação do comportamento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 (células vegetativas e esporuladas) em carne bovina acondicionada a vácuo e armazenada a 7 °C e 15 °C.....	65
Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação da formação de biofilme de <i>C. difficile</i>	69
Tabela 6. Médias das contagens de células vegetativas de <i>Clostridium difficile</i> (log UFC/cm ²) aderidas na superfície do aço inoxidável utilizando três meios de cultura em diferentes temperaturas de incubação.....	78
Tabela 7. Média e desvio padrão da contagem de células vegetativas e esporos em biofilmes da cepa de <i>C. difficile</i> VPI 10463 formados em superfícies de aço inoxidável condicionados em caldo BHI modificado com cisteína, mantidos a 15 °C e 25 °C por 6 dias e submetidos a ação de sanitizantes.	85
Tabela 8. Média e desvio padrão da contagem de células vegetativas e esporos de biofilmes da cepa de <i>C. difficile</i> LHCD 809 formados em superfícies de aço inoxidável, condicionados em caldo BHI modificado com cisteína, mantidos a 15 °C e 25 °C por 6 dias e submetido a ação de sanitizantes.....	87
Tabela 9. Fatores de inativação (log esporos/mL) de esporos de <i>C. difficile</i> VPI 10463 e LHCD 809 por ação dos sanitizantes ácido peracético, hipoclorito de sódio, biguanida e quaternário de amônia.	94
Tabela 10. Fatores de inativação (log esporos/mL±DP) de esporos de <i>C. difficile</i> VPI 10463 e LHCD 809 por ação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.....	98
Tabela 11. Susceptibilidade de 22 isolados de <i>C. difficile</i> de amostras de carnes (bovina e frango) a antimicrobianos.	100
Tabela 12. Discriminação dos isolados de <i>C. difficile</i> multirresistentes.	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 <i>Clostridium difficile</i> e suas características.....	22
3.2 Fatores de virulência e epidemiologia de <i>C. difficile</i>	23
3.3 Tratamento da doença relacionada ao <i>C.difficile</i>	26
3.4 <i>C.difficile</i> em animais e alimentos.....	28
3.5 Adesão e formação de biofilmes bacterianos	30
3.6 Controle da formação de biofilmes	35
3.6.1 Hipoclorito de sódio	36
3.6.2 Ácido peracético	38
3.6.3 Compostos quaternário de amônio	39
3.6.4 Biguanida.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Isolados bacterianos.....	43
4.2 Comportamento de <i>C. difficile</i> em diferentes substratos.....	43
4.2.1 Comportamento de <i>C. difficile</i> em diferentes meios de cultura a diferentes temperaturas	43
4.2.1.1 Preparo e inoculação da suspensão de <i>C. difficile</i>	44
4.2.1.2 Contagem de <i>C. difficile</i>	44
4.2.1.3 Análise estatística	45
4.2.2 Comportamento de <i>C. difficile</i> em carnes embaladas a vácuo armazenadas em duas temperaturas.....	45
4.2.2.1 Preparo da suspensão de <i>C. difficile</i>	46

4.2.2.2 Preparo das amostras de carnes	46
4.2.2.3 Inoculação de <i>C. difficile</i>	47
4.2.2.4 Contagem de células vegetativas de <i>C. difficile</i> em amostras de carnes embaladas a vácuo.....	47
4.2.2.5 Contagem de células esporuladas de <i>C. difficile</i> em amostras de carnes embaladas a vácuo.....	48
4.2.2.6 Análise estatística	48
4.3 Capacidade de formação de biofilme por <i>C. difficile</i>	49
4.3.1 Cepas utilizadas e forma de cultivo	49
4.3.2 Superfície de aço inoxidável.....	49
4.3.4 Formação do biofilme sobre a superfície de aço inoxidável	50
4.3.5 Determinação de células sésseis	50
4.3.6 Contagem de esporos de <i>C. difficile</i>	51
4.3.7 Análise estatística	51
4.4 Estratégias para controle e inibição de <i>C. difficile</i>	53
4.4.1 Avaliação da ação de sanitizantes em biofilme de <i>C. difficile</i>	53
4.4.1.1 Análise estatística	54
4.4.2 Avaliação da atividade esporicida de sanitizantes sobre cepas de <i>C. difficile</i>	55
4.4.2.1 Preparo da suspensão de esporos de <i>C. difficile</i>	55
4.4.2.2 Atividade esporicida dos sanitizantes.....	56
4.4.3 Avaliação da resistência a agentes antimicrobianos.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Comportamento do <i>C. difficile</i> VPI 10463 em diferentes substratos	60
5.1.1 Avaliação do comportamento de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em meios de cultura incubados sob diferentes temperaturas	60
5.1.2 Avaliação das contagens de <i>C. difficile</i> VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo	65

5.2 Capacidade de formação de biofilme por <i>C. difficile</i>	68
5.3 Estratégias para controle e eliminação de <i>C. difficile</i>	84
5.3.1 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilmes de <i>C. difficile</i>	84
5.3.2 Avaliação da atividade esporicida de sanitizantes sobre cepas de <i>C. difficile</i>	91
5.3.2.1 Avaliação da eficiência de sanitizantes a base de hipoclorito de sódio, ácido peracético, biguanida e quaternário de amônia sobre esporos de <i>C. difficile</i>	91
5.3.2.2 Influência do pH e da concentração na atividade esporicida de hipoclorito de sódio sobre <i>C. difficile</i>	95
5.3.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>C. difficile</i> ..	99
6. CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1. INTRODUÇÃO

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), sendo 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).

A doença associada ao *C. difficile* (CDAD – *Clostridium difficile* – associated disease) tem preocupado profissionais da área de saúde devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, aumento da severidade dos casos pelo surgimento de cepas hipervirulentas e surtos associados à comunidade, ocasionando um aumento na taxa de fatalidade principalmente entre idosos (ANGLIM; FARR, 1994; MOOYOTTU et al., 2015).

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, que atua como uma enterotoxina causadora de diarreia e inflamação do cólon; e a toxina B que produz efeitos citotóxicos nas membranas celulares e a toxina binária também importante na patogenicidade de *C. difficile* (POXTON et al., 2001; RUPNIK et al., 2003).

C. difficile é o principal micro-organismo responsável pelos casos de infecções nosocomiais (LYERLY et al., 1988; MOOYOTTU et al., 2015) e já foi isolado de animais domésticos como cães e gatos e de animais de produção e consequentemente em alimentos destinados ao consumidor final (SIMANGO; MWAKURUDZA, 2008; JOBSTL et al., 2010; WEESE et al., 2010; HOPMAN et al., 2011). *C. difficile* é um micro-organismo capaz de aderir a superfícies de equipamentos e utensílios de aço inoxidável com possível formação de biofilmes, o que pode, desta forma, apresentar um elevado risco de contaminação de alimentos. Os mecanismos de adesão e formação de biofilmes bacterianos têm sido estudados nos últimos anos na tentativa de compreender e controlar os processos, pois além de aumentar a resistência à ação de sanitizantes, podem constituir um foco de contaminação dos alimentos. Os objetivos do presente estudo foram de verificar, de forma inédita, o comportamento de *C. difficile* em diferentes substratos, a capacidade de formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável por cepas de *C. difficile* isoladas de carnes, avaliar a eficiência de sanitizantes

na redução da contaminação e avaliar o perfil de resistência dos isolados de *C. difficile* a antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

O estudo consistiu na avaliação do comportamento de *C. difficile* inoculado em diferentes meios de cultura e amostras de carne bovina, bem como na avaliação da formação de biofilmes e seu controle, destacando-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o comportamento de *C. difficile* em diferentes temperaturas em meios de cultura e em carnes embaladas a vácuo inoculadas artificialmente;
- Avaliar a influência de diferentes matrizes e temperaturas na formação de biofilme de *C. difficile* em superfície de aço inoxidável;
- Avaliar a eficiência de sanitizantes frequentemente utilizados na indústria de alimentos na remoção do biofilme de *C. difficile* formado na superfície de aço inoxidável;
- Avaliar a ação esporicida dos sanitizantes hipoclorito de sódio, ácido peracético, cloridrato de polihexametileno biguanida e quaternário de amônio (cloreto de alquil amido propil dimetil benzil amônio) em esporos de *C. difficile*;
- Avaliar a influência da concentração e do pH das soluções de hipoclorito de sódio na atividade esporicida;
- Avaliar o perfil de resistência e susceptibilidade de cepas isoladas de carnes a oito agentes antimicrobianos (ampicilina, clindamicina, ceftizoxime, moxifloxacina, metronidazol, tetraciclina, ceftriaxone e vancomicina).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Clostridium difficile* e suas características

Estudando a microbiota intestinal de recém-nascidos saudáveis, Hall; Toole (1935), 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. A partir dessa data, os pesquisadores demonstraram que o *C. difficile* era extremamente toxigênico. Essa evidência foi baseada nos achados de lesões, parada respiratória e morte quando analisaram cultura líquida ou filtrado do meio que continha esse micro-organismo, em animais experimentais (LYERLY et al., 1988).

Somente por volta de 1970, as bactérias anaeróbias começaram a ser implicadas como importantes agentes causadoras de doenças e atingiram proporções epidêmicas, tornando-se uma complicação comum ao uso de antibióticos (ROCHA et al., 1999). Por conseguinte, surgiram vários estudos em busca de antimicrobianos ativos contra esse agente infeccioso emergente e a lincomicina constitui-se foi um dos primeiros agentes de 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 apresentava inócuo apenas como um micro-organismo da microbiota intestinal (LYERLY et al., 1988).

A partir de então, diversos estudos laboratoriais e clínicos foram realizados demonstrando que o *C. difficile* era o principal agente causador de doenças intestinais associadas ao uso de antimicrobianos, que variavam desde diarreia auto-limitada, a uma colite pseudomembranosa grave, muitas vezes podendo ser fatal (LYERLY et al., 1988; KELLY et al., 1994; SEARS; KAPER, 1996; STARR et al., 1997).

C. difficile é um bacilo anaeróbio de 0,5-1,9 x 3,3-16,9 µm, Gram positivo, formador de esporos ovais, subterminais, geralmente móveis em caldo e a temperatura de crescimento varia de 25 a 45 °C com ótima a 30-37 °C. A prolina, ácido aspártico, serina, leucina, alanina, treonina, valina, fenilalanina, metionina e isoleucina são utilizados pelo micro-organismo durante seu crescimento. *C. difficile* fermenta a frutose e o manitol, bem como hidrolisa a esculina (RAINEY et al., 2009). 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 aeróbias 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; 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 disseminação de esporos.

3.2 Fatores de virulência e epidemiologia de *C. difficile*

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; HENSGENS et al., 2012; JANEZIC et al., 2016).

Quando um indivíduo susceptível faz uso de antimicrobianos, ocorre uma alteração da microbiota, resultando no favorecimento para colonização de *C. difficile*. O micro-organismo é adquirido, em muitos casos, a partir de origem exógena: de um indivíduo contaminado, portadores assintomáticos, ou indiretamente a partir de ambiente contaminado e alimentos (POXTON et al., 2001; JOBSTL et al., 2010).

É importante salientar que com o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos (atualmente, todos os antibióticos estão relacionados ao desenvolvimento do CDAD – *Clostridium difficile* – associated disease) as doenças relacionadas ao *C. difficile* têm se tornado cada vez mais frequentes, e desta forma, tem aumentado os índices de mortalidade

por doenças diarreicas causadas por este micro-organismo (ANGLIM; FARR, 1994; MOOYOTTU et al., 2015).

Após o tratamento com antibióticos e a eliminação da microbiota, os esporos ingeridos germinam devido à ação de sais biliares (KELLY et al., 1994; KELLY; LAMONT, 1998). As células vegetativas multiplicam-se e colonizam rapidamente o intestino por causa da ação das proteínas de superfície. Em seguida os enterócitos são danificados pela ação das toxinas produzidas, resultando em mudanças no citoesqueleto, liberação de fluidos, e processo inflamatório (RUPNIK et al., 2003).

Alguns dos principais fatores de virulência do *C. difficile* incluem: proteínas de superfície, as quais são importantes na aderência do micro-organismo à mucosa intestinal, podendo induzir a resposta inflamatória e a produção de anticorpos no hospedeiro (AUSIELLO, 2006). Foi demonstrado que a proteína de camada superficial (SlpA) desempenha um papel importante tanto na colonização inicial, quanto na reação inflamatória (CALABI et al., 2002).

Outros fatores de virulência são as toxinas denominadas toxina A (TcdA – enterotoxina), toxina B (TcdB – citotoxina) e a toxina binária (CdtA e CdtB) produzidas por cepas toxigênicas de *C. difficile*.

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 as 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 citoquinas 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

em outros órgãos. Ainda como consequência, há uma migração leucocitária intestinal que resulta na formação da pseudomembrana (HOOKMAN et al., 2009).

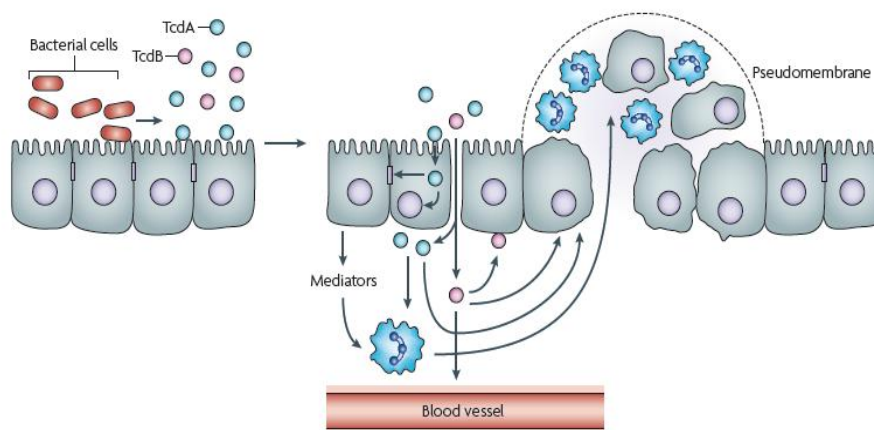


Figura 1. Colonização de *C. difficile* no intestino, com consequente produção de toxinas A e B (cepas toxigênicas). Atuação das toxinas originando a colite pseudomembranosa ou seguindo para corrente sanguínea.

Adaptado de RUPNIK et al. (2009).

Os genes *tcdA* e *tcdB* responsáveis pela produção das toxinas A e B, respectivamente, encontram-se em um locus de patogenicidade denominado *PaLoc*, situados no cromossomo (RUPNIK et al., 2009) (**Figura 2**). Este locus é constituído de cinco genes: *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdD* e *tcdE*. Acredita-se que os outros três genes são responsáveis pela regulação da produção das toxinas. O gene *tcdD* 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; BALLARD, 2005). A montante e a jusante do locus de patogenicidade estão situados os genes *cdu-2* e *cdd-3*, denominados genes de integração. A função destes genes ou seu papel na virulência de *C. difficile* não é conhecido, geralmente estão presentes em cepas não toxigênicas (COHEN et al., 2000; CLAYTON et al., 2012).

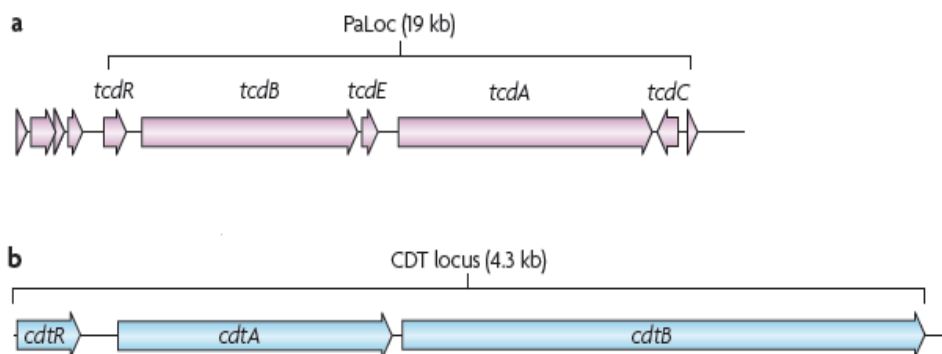


Figura 2. a) Toxina A e B, codificada pelo gene de patogenicidade (lócus *PaLoc*) que compreende 5 genes: *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdD* e *tcdE*. b) Toxina binária é codificada numa região separada do cromossomo (*cdtLoc*) e é composta por 3 genes: *cdtA*, *cdtB* e *cdtR*.

Adaptado por RUPNIK et al. (2009).

C. difficile também é responsável pela produção da toxina binária (CDT) que foi descrita pela primeira vez em 1988 (POPOFF et al., 1988). Composta por dois componentes codificados pelos genes *cdtA* e *cdtB*, as proteínas foram denominadas CdtA e CdtB, respectivamente (VOTH; 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 (BARBUT et al., 2005). Muito tem sido discutido em relação à importância clínica da toxina binária, mas o real significado da CDT ainda é desconhecido. Em humanos, estudos reportam uma maior severidade da doença em pacientes que possuem estirpes CDT+ (RUPNIK et al., 2009). É importante ressaltar que cepas de *C. difficile* que não produzem toxinas são incapazes de desenvolver as doenças diarreicas relacionadas com este micro-organismo, tanto no homem como nos animais experimentais (BARTLETT, 1990).

3.3 Tratamento da doença relacionada ao *C.difficile*

A colite pseudomembranosa e a diarreia são reconhecidas como importantes efeitos adversos dos antimicrobianos no tratamento de doenças.

C. difficile é responsável por um espectro de infecções que pode variar de diarreia leve, a casos mais graves de colite pseudomembranosa (LYERLY et al., 1988). As toxinas A e B de *C. difficile* são os principais fatores que iniciam a CDAD. Ambas as toxinas induzem a lesão da mucosa e colite (VOTH; BALLARD, 2005).

A presença das toxinas de *C. difficile* pode ser demonstrada em 95 % dos pacientes com colite pseudomembranosa. A diarreia causada por *C. difficile* é vista quase que exclusivamente como uma complicação da terapia com antibióticos (FREEMAN; WILCOX, 1999).

A clindamicina e a lincomicina foram os primeiros antimicrobianos associados a doença (LYERLY et al., 1988).

A maioria dos antibióticos tem sido implicada na infecção por *C. difficile*, mas os agentes de amplo espectro estão particularmente associados com a doença (KELLY et al., 1994), como a clindamicina (FREEMAN; WILCOX, 1999; VOTH; BALLARD, 2005), cefalosporinas (GERDING et al., 1995; FREEMAN; WILCOX, 1999; LOO et al., 2005; BARTLETT, 2006), amoxilina e ampicilina (GERDING et al., 1995, GROSCHELL, 1996) e as quinolonas e fluoroquinolonas também estão associadas como agentes causadores de CDAD (LOO et al., 2005; PEPIN et al., 2005; BARTLETT, 2006; SPIGAGLIA et al., 2008).

O metronidazol e a vancomicina são os fármacos de primeira escolha para o tratamento do CDAD, mas há uma alta incidência de infecções recorrentes (COCANOUR, 2011). Vários estudos provaram que estes dois antimicrobianos são os principais antibióticos utilizados para o tratamento de doença leve a moderada (COCANOUR, 2011; DONG et al., 2013).

Embora na maioria dos estudos se comprovem a susceptibilidade de *C. difficile* ao metronidazol e à vancomicina, alguns estudos descreveram resistência e sensibilidade reduzida a estes fármacos (PELAEZ et al., 2002; PELAEZ et al., 2008; PELAEZ, 2005; LIAO et al., 2012).

Desta forma, o tratamento eficaz do CDAD tem se mostrado um grande desafio devido ao surgimento de novas cepas epidêmicas resistentes a múltiplas drogas. O monitoramento do desenvolvimento da resistência antimicrobiana em bactérias e em humanos é necessário para avaliar o risco e facilitar o uso adequado de antimicrobianos.

3.4 *C.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; 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; MWAKURUDZA, 2008; HOPMAN et al., 2011). Yaeger et al. (2007) detectaram *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) descreveram a presença de *C. difficile* em bovinos do Canadá. Neste estudo, foram examinadas fezes de 144 bezerros com diarreia, e 134 bezerros saudáveis e *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*.

Rodriguez-Palacios et al. (2007) analisaram um total de 60 amostras de carne moída no Canadá e 20 % (12/60) foram positivas para *C. difficile* e 11 dos isolados eram toxigênicos. Em outro estudo, Rodriguez-Palacios et al. (2009) constataram a presença de *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 possam ser uma grande fonte de contaminação de *C. difficile*, neste caso, o número de micro-organismos poderia ser inferior ao limite de detecção do método.

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

Ainda em Ontário, no Canadá, *C. difficile* foi isolado em peixes e frutos do mar, onde foi constatado a prevalência de *C. difficile* em 4,8 % (5/119) das amostras analisadas (METCALF et al., 2011) e, em alimentos de origem vegetal *C. difficile* foi detectada em 4,5 % (5/111) das amostras (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 realizado por Boer et al. (2011), na Holanda, foram analisadas 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*.

No Brasil, Tsuchiya et al. (2012) isolaram *C. difficile* de 11,5 % (17/147) de amostras de carnes resfriadas. Em carne bovina moída *C. difficile* foi isolado em 21,8 % (7/32) das amostras, em carne de frango, *C. difficile* foi isolado em 18,0 % (9/50) das amostras e em cortes bovinos, em apenas uma amostra (1/30). O micro-organismo não foi encontrado em amostras de carne suína (0/35). No total, originou-se 80 isolados, destes 6,25 % (5/80) apresentaram pelo menos um gene de virulência (A-B+), 35,0 % (28/80) para ambos os genes (A+B+) e 58,75 % (47/80) não apresentaram nenhum gene de virulência (A-B-) (TSUCHIYA et al., 2012).

Esfandiari et al. (2014), no Irã, isolaram *C. difficile* de uma planta de processamento de hambúrgueres, sendo que, em um total de 211 amostras, o micro-organismo foi isolado de carne bovina “*in natura*” (3/54), do ambiente (2/56) e do hambúrguer após a moldagem (4/56). *C. difficile* não foi isolado de condimentos e outros ingredientes (0/45), sugerindo que a carne *in natura* possa ser considerada uma possível fonte de contaminação.

Em um estudo realizado por Kouassi et al. (2014), os autores verificaram a prevalência de 12,4 % (49/395) de *C. difficile* em amostras de carne bovina e rins cozidos comercializados por vendedores ambulantes nas ruas da cidade de Abidjan, Costa do Marfim.

Em um estudo mais recente, Mooyottu et al. (2015), nos Estados Unidos, avaliaram 300 amostras de carnes (suína, bovina e frango) sendo que *C. difficile* foi isolado em apenas duas amostras de carne suína. Rodriguez et al. (2015) avaliando alimentos preparados em residências, verificou que apenas 1/188 amostras analisadas foi positiva para *C. difficile*, a refeição era composta de salada de cenoura, molho de mostarda e salsicha suína.

Contudo, como foram analisadas em conjunto, a contaminação poderia ter sido originária de qualquer um dos ingredientes ou como resultado da manipulação.

Recentemente, Janezic et al. (2016), na Eslovênia, avaliaram a presença de *C. difficile* em amostras ambientais, e o micro-organismo foi isolado em 36,7 % (29/79) das amostras de solo e 14,4 % (15/104) das amostras de água de poço, sugerindo que o ambiente é um potencial reservatório de *C. difficile*.

As bactérias patogênicas, assim como *C. difficile* são amplamente distribuídas nos alimentos. A contaminação de produtos cárneos e dos demais alimentos com cepas toxigênicas de *C. difficile* levanta preocupações sobre a incriminação de alimentos como fonte de *C. difficile*, uma vez que a carne “*in natura*” pode se tornar contaminada durante o processo de abate, já que os clostrídios são membros da microbiota intestinal de animais.

3.5 Adesão e formação de biofilmes bacterianos

Na natureza e nos alimentos, os micro-organismos aderem às superfícies e crescem como uma comunidade (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

A contaminação destas superfícies por micro-organismos tem gerado uma crescente preocupação às indústrias. Quando em condições favoráveis, as bactérias podem aderir às superfícies e se não forem removidas de forma eficiente, estas podem promover a formação de biofilmes bacterianos (BOWER et al., 1996).

A primeira descrição de biofilmes foi realizada por Zobell (1943), que estudando a preferência de bactérias marinhas em crescer em superfícies, verificou que a presença de matérias orgânicas e outras partículas adsorvidas nessas superfícies favoreciam o processo de adesão bacteriana.

Segundo Andrade et al. (1998), durante o processo de adesão as células que se fixam são denominadas sésseis, enquanto as que permanecem livres são denominadas de planctônicas. Schneider (2007) propôs uma definição para biofilmes microbianos que permite a diferenciação das células planctônicas e inclui todas as formas de vida microbiana com características de biofilme. Segundo o autor “biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidas às superfícies ou suspensas em solução, cujas células podem ou não estar

envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes”.

Em geral, o mecanismo de adesão e consequente formação de biofilme (**Figura 3**), é um processo dinâmico envolvendo uma série de etapas: a) adesão inicial a uma superfície (reversível), b) produção de exopolissacarídeos (EPS) que além de auxiliar na ancoragem de outras células, criando uma adesão irreversível, protege a colônia da flutuação do ambiente, c) formação de microcolônias, d) maturação das microcolônias, e) dispersão de algumas células bacterianas do biofilme (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990; DAVEY; O'TOOLE, 2000; STOODLEY et al., 2002).

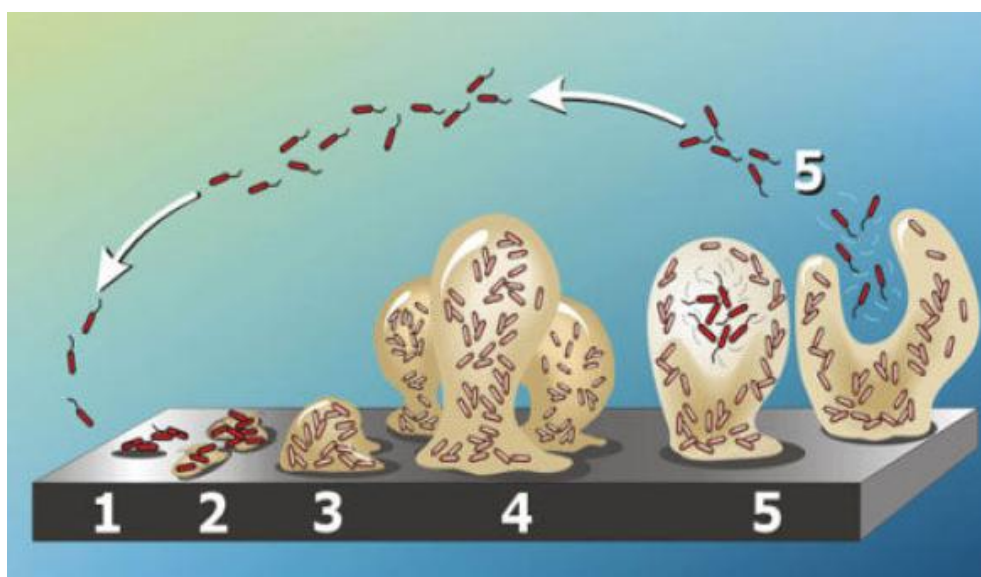


Figura 3. Etapas do desenvolvimento de um biofilme bacteriano. 1) Adesão reversível; 2) Adesão irreversível; 3) Crescimento do biofilme; 4) Maturação do biofilme; 5) Dispersão. (STOODLEY et al., 2002).

A adesão é a primeira etapa do processo de formação de um biofilme, onde as células planctônicas, ou seja, não aderidas, se fixam ao substrato. O processo inicial de adesão bacteriana pode ser considerado ativo ou passivo, dependendo da motilidade das células. A adesão, quando passiva, é influenciada pela gravidade, difusão e dinâmica de fluídos. Na adesão ativa, as estruturas presentes na superfície celular como flagelo, pili, adesina e cápsula facilitam a adesão. Como esta adesão inicial das células à superfície ocorre por meio de

interações fracas, o seu controle pode ser realizado pelos procedimentos de higienização (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ALLISON, 2003; PALMER et al., 2007).

Na etapa da adesão irreversível, inicia-se a produção de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias e as forças atuantes neste estágio são mais potentes (ligações covalentes e hidrogênio) tornando sua remoção mais difícil e a necessidade de utilizar métodos químicos e físicos mais complexos nos processos de higienização (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ALLISON, 2003; PALMER et al., 2007). Após a fixação inicial das células bacterianas, as etapas seguintes definem a estrutura e a atividade do biofilme. Esses processos dependem de fatores físicos e biológicos como crescimento, divisão celular, produção e excreção de EPS (XAVIER et al., 2002), além da presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (PUMBWE et al., 2008).

Dentre os vários fatores relacionados à formação de biofilmes, a produção de EPS tem grande importância na fisiologia e manutenção do biofilme (KIVES et al., 2006). A composição e quantidade de EPS dependem do micro-organismo envolvido, da temperatura, disponibilidade de nutrientes e biomassa. Os EPS são capazes de proteger os micro-organismos de condições adversas como variações de temperatura e umidade, irradiações, oxidação, presença de agentes antimicrobianos e sanitizantes (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SIMOES et al., 2010).

Na etapa de desenvolvimento ou maturação, o biofilme apresenta uma estrutura tridimensional complexa com áreas densas, poros e canais. Esta estrutura é definida pelo crescimento e divisão das células, excreção de EPS e também fatores externos como forças de atrito de processos mecânicos de higienização (STOODLEY et al., 2002). A presença de poros e canais permite a circulação de nutrientes e água para as células do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A etapa de dispersão ou desagregação corresponde à liberação das células individuais ou microcolônias do biofilme ou do substrato onde se encontram. Nesse momento, as células podem ser transferidas aos alimentos ocasionando prejuízos à qualidade dos produtos e trazer riscos à saúde dos consumidores. Esses micro-organismos livres continuam mantendo as suas características genéticas de resistência, e poderão colonizar outros substratos (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

Estudos propõem que durante a formação de um biofilme, células bacterianas podem adotar medidas adaptativas, criando microambientes durante o crescimento

microbiano sobre uma superfície, resultando na formação de comunidades complexas e fenotipicamente heterogêneas (**Figura 4**) (KLAUSEN et al., 2006; MONDS; O'TOOLE, 2009).

Monds; O'Toole (2009) descrevem as seguintes etapas de formação de uma comunidade bacteriana complexa: a) duas células bacterianas aderem-se independentemente na superfície; b) cada célula tem acesso a níveis de oxigênio e nutrientes suficientes para se multiplicar e dar início à formação de microcolônias; c) com a multiplicação celular e o crescimento vertical da colônia, a difusão de oxigênio e carbono é restrita às células da base (em vermelho); estas se adaptam ao ambiente, alterando seu metabolismo e criando um ambiente anaeróbico; d) células do topo da macrocolônia, por sofrerem grande ação de força mecânica, produzem mais EPS, que auxiliam na ancoragem e protegem outras células do estresse ambiental; e) macrocolônias desenvolvem-se, formando uma comunidade complexa com diferentes microrregiões. Estas etapas estão ilustradas na **Figura 4**.

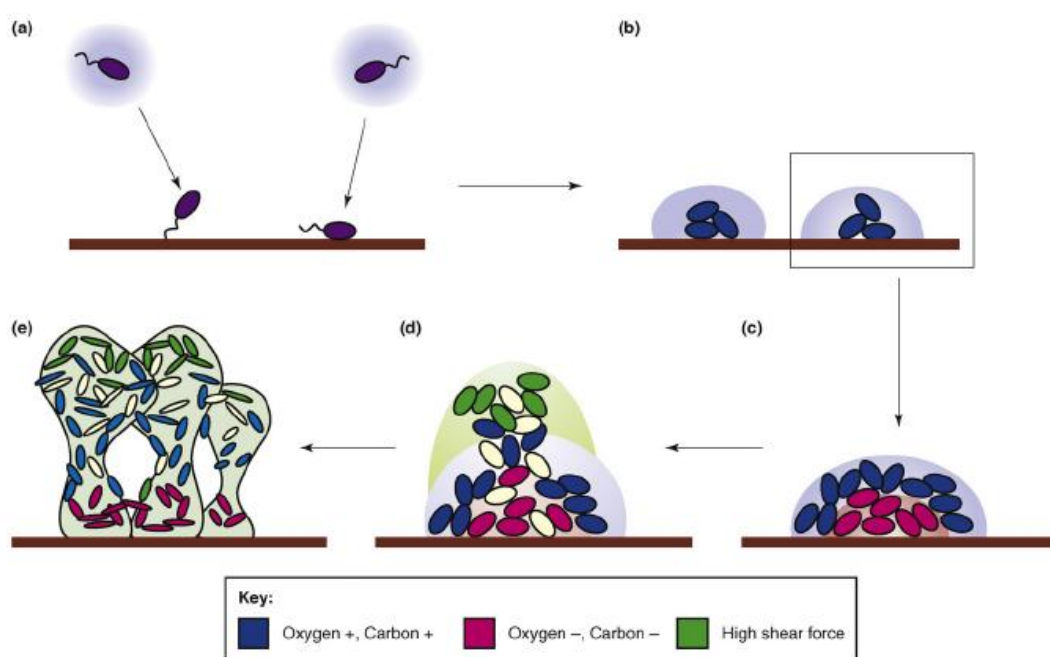


Figura 4. Etapas da formação de biofilme baseada na capacidade adaptativa de micro-organismos proposta por Monds e O'Toole (2009).

O desenvolvimento de gradientes químicos, devido às diferenças de difusão de nutrientes, produtos metabólicos e oxigênio através do biofilme, geram microrregiões que permitem a associação de micro-organismos com diferentes propriedades fisiológicas e físico-químicas (HUNTER; BEVERIDGE, 2005). Costerton et al. (1994) com o auxílio de um microeletrodo, avaliaram os diferentes níveis de oxigênio dissolvido (OD) ao longo da estrutura de biofilme e observaram que os valores de OD diminuíram no sentido da superfície para o centro, alcançando níveis quase totalmente anaeróbios no centro das microcolônias, sugerindo que micro-organismos anaeróbios também podem associar-se aos biofilmes formados em ambientes aeróbios.

Micro-organismos anaeróbios obrigatórios geralmente possuem mecanismos de resposta ao estresse ambiental (presença de oxigênio, dessecação e compostos antimicrobianos), entre elas, a formação de endósporos (COLLINS et al., 1992; JEFFERSON, 2004; VARGA et al., 2008). Porém estas formas existem em estado de dormência, não podendo adaptar-se rapidamente às alterações das condições ambientais (VARGA et al., 2008).

Dawson et al. (2012) verificaram a capacidade de *C. difficile* em produzir biofilmes *in vitro* em superfícies abióticas e a capacidade do micro-organismo em produzir EPS. No estudo, avaliaram o gene regulador mestre de esporulação, *spo0A*, que desempenha um papel fundamental na formação do biofilme, visto que com a inativação genética do *spo0A* ocorre uma diminuição da formação do biofilme em relação à cepa que apresenta o gene íntegro. O biofilme formado apresentava um grande número de células vegetativas e esporos. Apresentando $1,6 \times 10^7$ UFC/mL de células vegetativas e $2,3 \times 10^6$ UFC/mL de esporos em três dias de incubação e ao final do sexto dia o biofilme apresentava contagens de $1,7 \times 10^6$ UFC/mL de vegetativas e $7,0 \times 10^6$ UFC/mL de esporos. Desta forma, observou-se que o número de esporos aumentou ao longo do tempo.

Células de um biofilme maduro podem ser liberadas e consequentemente aderir em outra superfície de contato com alimentos ou podem ser transferidas para os produtos causando prejuízos econômicos ou doenças aos consumidores.

Os micro-organismos presentes em um biofilme apresentam maior resistência aos sanitizantes devido à dificuldade de remoção e a proteção que a estrutura do biofilme proporciona aos micro-organismos.

3.6 Controle da formação de biofilmes

Logo após o processamento, os equipamentos e utensílios que entraram em contato com o alimento, apresentarão uma elevada carga de resíduos, como consequência da presença de carboidratos, gordura, proteína e minerais. Estes resíduos orgânicos e minerais devem ser rapidamente removidos para evitar a multiplicação de micro-organismos sobre as superfícies (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

Os procedimentos de higienização consistem no uso combinado de detergentes e sanitizantes, no qual os detergentes, embora diminuam a carga bacteriana das superfícies, têm como função principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais, enquanto a sanitização visa à redução dos micro-organismos deteriorantes e a eliminação dos patogênicos a níveis seguros (MORAES et al., 1997).

A sanitização finaliza o procedimento de higienização, e irá assegurar a qualidade microbiológica das superfícies. Esta deverá ser realizada após a limpeza, e sempre que possível, também imediatamente antes do uso do equipamento, já que após as etapas de limpeza, os micro-organismos sobreviventes poderão se multiplicar, ou mesmo a recontaminação ambiental pode levar a contaminação do alimento (ANDRADE et al., 2008). Assim, torna-se muito importante o conhecimento dos sanitizantes disponíveis, suas funções, formas de uso, concentrações recomendadas, formas de atuação, para a melhor escolha de acordo com a superfície e micro-organismos possivelmente presentes (TROLLER, 1993).

O uso correto de detergentes e sanitizantes geralmente eliminam os micro-organismos aderidos aos equipamentos, contudo procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam estes micro-organismos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). A não remoção de bactérias e sujidades favorece, portanto a adesão nos equipamentos e utensílios e assim os alimentos poderão ser contaminados (FIGUEIREDO, 2000).

Células estruturadas em um biofilme apresentam maior resistência à ação de sanitizantes e antimicrobianos do que as células planctônicas em suspensão (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007; TOMIHAMA et al., 2007). Esta resistência é devido à diminuição da difusão dos agentes sanitizantes por meio da complexa estrutura de EPS, presença de enzimas que degradam as substâncias antimicrobianas e alterações no meio (pH, presença de matéria orgânica) que afetam a atividade dos sanitizantes (MORTON et al., 1998). Embora os micro-

organismos aderidos se mostrem mais resistentes aos sanitizantes do que células livres, isso não significa que os esforços para reduzir a presença de células livres não sejam relevantes.

A ação dos sanitizantes pode ser afetada por características das superfícies, pelo tempo e temperatura de contato, pela concentração de uso, pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH da solução, propriedades físico-químicas da água, por substâncias inativadoras e pelo tipo e concentração de micro-organismos contaminantes. Assim, para selecionar um sanitizante é necessário verificar se este apresenta aprovação para uso pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura. Este deve apresentar amplo espectro de ação antimicrobiana com capacidade de destruir rapidamente os micro-organismos, serem estáveis as várias condições de uso e apresentar baixa toxicidade e corrosividade. No entanto, não existe um único sanitizante capaz de atender a todos esses requisitos, assim torna-se necessário conhecer as propriedades, vantagens e desvantagens de cada sanitizante, antes da seleção (ANDRADE et al., 2008).

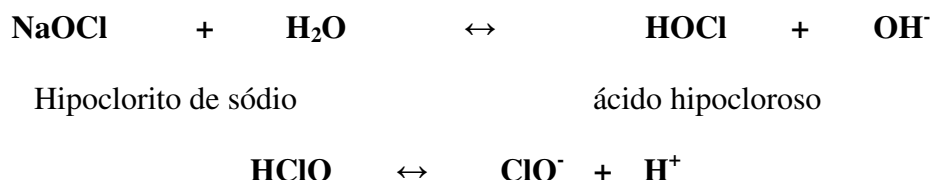
3.6.1 Hipoclorito de sódio

Dentre os sanitizantes, os compostos clorados são utilizados em grande escala como agentes de sanitização e desinfecção de pisos e utensílios pelas indústrias de alimentos e residências, com o objetivo de controlar patógenos presentes na água e alimentos, assim como no tratamento de água para abastecimento público (MEYER, 1994).

O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, é o composto mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica e aumentar a segurança de alimentos processados (NASCIMENTO et al., 2005). O hipoclorito é comercializado sob a forma líquida, com concentrações variando de 2 a 10 % de cloro residual total, expressos em Cl_2 . Apresenta diversas vantagens como rápida ação, resistencia a dureza da água, efetividade em baixas concentrações, baixa toxicidade nas condições de uso e facilidade de aplicação (ANDRADE et al., 2008).

As substâncias a base de cloro possuem um amplo espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus. As atividades biocida e oxidante destes compostos são aumentadas significativamente com a formação do ácido hipocloroso (HClO), em sua forma não dissociada, quando em solução aquosa pura (RIBEIRO et al., 2008) (**Equação 1**). O ácido

hipocloroso possui a capacidade de penetrar através da membrana celular, oxidar os grupos sulfidrilas de certas enzimas que participam da via glicolítica, e, desta forma, eliminar a célula (ANDRADE et al., 2008).



Equação 1. Reação de dissociação do hipoclorito de sódio em solução aquosa.

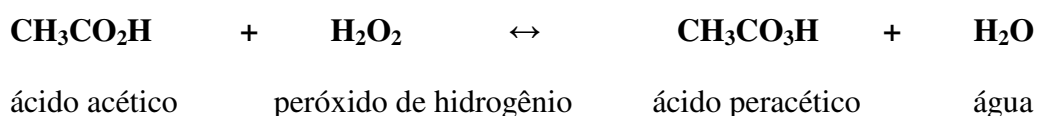
Entre todos os compostos clorados, o hipoclorito de sódio é o mais utilizado (KUAYE, 2017). Alguns autores demonstraram a eficiência do hipoclorito de sódio na remoção de biofilmes (SPRATT et al., 2001; CABEÇA et al., 2006; GIARDINO et al., 2007; TOTÉ et al., 2010).

Os esporos bacterianos são mais resistentes do que as células vegetativas, o tempo requerido para reduzir 90 % da população microbiana pode variar de 7 segundos a mais de 20 min. A quantidade de cloro livre necessária para inativar esporos de bactérias (1000 mg/L) é mais elevada do que a requerida para células vegetativas (0,6 a 13 mg/L) (MARIOTT, 1999).

Odlaug; Pflug (1976) mostraram que soluções contendo 100 mg/L de cloro residual, em pH 8,0, a partir do hipoclorito de sódio, causou uma redução decimal na população de esporos de *Bacillus subtilis* em 60 min. Por outro lado, Alvarenga et al. (1991) e Andrade e Serrano (1993), utilizaram 105 mg/L de cloro residual, a partir do hipoclorito de sódio, em pH 8,0 a 30 °C e concluíram que para obter 5 reduções logarítmicas na população dos esporos de *B. subtilis* sob avaliação foi necessário um tempo de 5 min.

3.6.2 Ácido peracético

O sanitizante ácido peracético é composto de uma mistura do ácido peracético contendo ainda peróxido de hidrogênio, ácido acético e uma substância estabilizadora em equilíbrio, conforme apresentada na **equação 2** (MARTINS; KUAYE, 1996).



Equação 2. Reação de formação do ácido peracético.

O ácido peracético é um agente oxidante não específico, que reage em locais ricos em elétrons, na di-hidroxilação de ligações duplas C-C e na formação de radicais livres, o que significa que a célula microbiana será altamente danificada após o contato com a molécula de ácido peracético (WESSELS; INGMER, 2013), pois o oxigênio liberado pelo peróxido inativa os sistemas enzimáticos, essenciais para a sobrevivência e reprodução dos micro-organismos (BLOCK, 1991).

Dentre os aspectos positivos do uso, o ácido peracético apresenta excelente ação sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras, vírus, esporos e cistos de protozoários (WESSELS; INGMER, 2013). Age em baixas temperaturas, permanece ativo em presença de matéria orgânica, não é afetado pela dureza da água (ANDRADE et al., 2008), não produz compostos tóxicos ou carcinogênicos, já que não reage com as proteínas dos alimentos e apresenta baixo impacto ambiental (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). No entanto, pode ser corrosivo ao aço inoxidável, possui baixa estabilidade ao armazenamento, é incompatível com ferro, alumínio e cobre, é irritante à pele e às mucosas, por isso na forma concentrada, deverá ser manuseado de forma adequada, com utilização de equipamentos de proteção individual pelos manipuladores (KITIS, 2004; ANDRADE et al., 2008).

Na indústria de alimentos é bastante utilizado nos procedimentos de limpeza e sanitização em concentrações que geralmente variam de 0,25 a 0,45 %, em temperaturas entre

7 °C e 40 °C, já que quando submetido às temperaturas superiores de 43 °C pode ter reduzida a ação do sanitizante, como resultado de sua decomposição (TROLLER, 1993).

Alguns estudos mostram a efetividade destes sanitizantes a base de peróxido em biofilmes (HOLAH et al., 1990; ROSADO, 2009).

3.6.3 Compostos quaternário de amônio

Os compostos quaternário de amônio são detergentes catiônicos sintéticos que possuem em sua estrutura um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos alquil ou aril, o que resulta na formação de carga positiva no átomo de nitrogênio. A modificação dos radicais dá origem a derivados que apresentam atividade germicida, dentre eles o cloreto benzalcônio, que possui alta solubilidade em água é o mais utilizado na indústria de alimentos (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

De acordo com Germano e Germano (2008), os compostos quaternário de amônio apresentam maior eficiência sobre bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas e apresentam uma excelente atividade sobre fungos filamentosos e leveduras. Porém, não são eficientes contra bacteriófagos e não apresentam atividade esporicida (WESSELS; INGMER, 2013).

A ação bactericida destas substâncias ocorre por meio da inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, pela desnaturação de proteínas celulares e pela ruptura da membrana celular (ROMÃO, 1996). Esses compostos, além de apresentarem atividade antimicrobiana, possuem boa estabilidade, solubilidade em água, toxicidade relativamente baixa e alto poder de penetração (PELCZAR, 1980), por outro lado, necessitam de enxágue, para remoção de seus resíduos (MARTINS; KUAYE, 1996).

Os quaternários de amônio são geralmente utilizados para sanitização de pisos, paredes e equipamentos e no controle microbiológico de ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos (ANDRADE et al., 2008).

3.6.4 Biguanida

A biguanida é comumente conhecida como Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) e vem sendo estudada há décadas como um composto ativo em formulações de sanitizantes para indústrias alimentícias, possuindo uma excelente atividade no controle de micro-organismos patogênicos, tais como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como endosporos de bactérias termorresistentes (SANTOS; FERNANDES, 2010).

O mecanismo de ação do PHMB vem sendo estudado por vários cientistas ao longo de décadas. O mecanismo se inicia com uma rápida atração do PHMB catiônico na superfície bacteriana negativamente carregada provocando uma falha no mecanismo de defesa da célula e a ruptura da parede celular. A PHMB é então atraída para a membrana citoplasmática, onde causa a perda de substâncias de baixo peso molecular, tais como íons de potássio, cálcio e ocasiona a inibição de enzimas responsáveis pela união da membrana, tais como o ATPase. A grande ruptura subsequente da membrana citoplasmática pode então levar à perda de substâncias macromoleculares e à precipitação das substâncias celulares (SANTOS; FERNANDES, 2010; WESSELS; INGMER, 2013).

Como característica positiva desse polímero, o PHMB, é possível citar: efetiva ação contra bactérias Gram-positivas e negativas, baixa toxicidade e formação de espuma, atividade minimamente afetada quando em presença de água dura e resíduos orgânicos, além de poder ser utilizado em procedimentos de higienização manuais e/ou automatizados (GERMANO; GERMANO, 2008).

Alguns estudos mostram a efetividade do PHMB em biofilmes constituídos de *E. coli* e *Salmonella Enteritidis* (UEDA; KUWABARA, 2007); entretanto, outros estudos verificaram que a biguanida foi o sanitizante menos eficiente na remoção de biofilme de *L. monocytogenes* (CABEÇA et al., 2006).

Ferreira et al. (2013) avaliaram a atividade esporicida de cinco desinfetantes de uso hospitalar (monopersulfato de potássio, hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina, orto-ftalaldeído e ácido peracético com peróxido de hidrogênio) sobre esporos de *C. difficile* (cepa hiper-virulenta BI/NAP1/027 e esporos de cepas isoladas no Brasil). Os agentes eficientes para eliminação de esporos de *C. difficile* foram os sanitizantes a base de hipoclorito de sódio (1,2 %) e orto-ftalaldeído (0,55 %).

Wullt et al. (2003), avaliaram a ação esporicida de três desinfetantes (glutaraldeído 2 %, ácido peracético 0,2 % e isopropanol 70 %) e nitrito acidificado, e mantiveram em contato com esporos de *C. difficile* por 5, 15 e 30 min. O ácido peracético apresentou elevada atividade esporicida nos 3 tempos avaliados, mostrando ser muito eficaz para eliminação de esporos do ambiente hospitalar.

Como já descrito na revisão, a contaminação por *C. difficile* ocasiona casos graves de doenças gastrointestinais, com prejuízos econômicos e sociais. Sendo assim, uma das formas de controlar essa contaminação é por meio da remoção de biofilmes de *C. difficile* formados em superfícies de aço inoxidável. Considerando a resistência dos esporos a fatores ambientais, outra forma de controle seria a avaliação de diferentes agentes sanitizantes sobre esporos de *C. difficile*. Além disso, estudos referentes ao comportamento do *C. difficile* em diferentes matrizes e carnes embaladas a vácuo são de suma importância uma vez que são escassos trabalhos científicos nesta área.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Higiene e Legislação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

O trabalho foi desenvolvido em três etapas distintas, cada uma constituída de experimentos em triplicatas, segundo delineamento experimental e análise estatística dos dados.

Os experimentos foram realizados em câmara anaeróbia (Shell lab™, modelo Bactron II Chamber) (**Figura 5**). As mangas e a pré-câmara, onde o material é inserido, foram lavados por três vezes para substituir o oxigênio presente por uma mistura de gases. Duas das lavagens foram realizadas com gás nitrogênio pureza 99,99 % e a terceira lavagem foi realizada com uma mistura de gases composta de 5 % hidrogênio + 10 % dióxido de carbono + 85 % nitrogênio. No interior da câmara de anaerobiose a composição dos gases foi a mesma utilizada na terceira lavagem (5 % hidrogênio + 10 % dióxido de carbono + 85 % nitrogênio). Para verificar a condição do sistema foram utilizados indicadores de anaerobiose. As etapas de incubação foram realizadas em jaras de anaerobiose com geradores de anaerobiose e indicadores.



Figura 5. Câmara de anaerobiose Shell lab™, modelo Bactron II Chamber utilizada nos experimentos.

4.1 Isolados bacterianos

Foi utilizada a cepa de referência de *C. difficile* VPI 10463 (isolado de humanos), gentilmente doada pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e a cepa LHCD 809 isolada de carne de frango *in natura* (TSUCHIYA et al., 2012). A cultura VPI 10463 e LHCD 809 são cepas toxigênicas (TcdA +, TcdB + e CDT –) (RUPNIK et al., 2003a; STABLER et al., 2006; TSUCHIYA et al., 2012). Os isolados foram mantidos em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Sparks, EUA) com carne cozida (HOLDEMAN et al., 1977) a 4 – 8 °C.

4.2 Comportamento de *C. difficile* em diferentes substratos

Para avaliar o comportamento de *C. difficile* em diferentes substratos utilizou-se a cepa de referência de *C. difficile* VPI 10463.

4.2.1 Comportamento de *C. difficile* em diferentes meios de cultura a diferentes temperaturas

A avaliação do comportamento de *C. difficile* em diferentes meios de cultura foi conduzida nos caldos BHI (*Brain heart infusion*, BHI, Difco, Sparks, MD, USA) com carne cozida (HOLDEMAN et al., 1977) – BHicc e PYG [*Peptone yeast extract glucose* - peptona (Difco, Detroit Michigan, USA), extrato de levedura (Difco), glicose (Merck), cisteína (Inlab, Alamar Tecno-científica Ltda.), resazurina (Inlab) e solução de sais – CaCl₂, MgSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃ e NaCl] (LUND et al., 1990), com carne cozida (HOLDEMAN et al., 1977) – PYGcc, pré – reduzidos. Ambos os meios foram utilizados como meio de enriquecimento para avaliar o comportamento do *C. difficile* em baixas temperaturas.

As matrizes foram inoculadas com suspensão de cultura de *C. difficile* (10⁴-10⁵ UFC/mL) e armazenadas a 4 °C e 7 °C ± 1 °C por 28 dias (tempos avaliados foram 0, 7, 14, 21 e 28 dias) e a 15 °C ± 1 °C por 10 dias (tempos avaliados foram 0, 3, 5, 7 e 10 dias). O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.1.1 Preparo e inoculação da suspensão de *C. difficile*

A cepa foi cultivada em caldo BHI pré-reduzido e incubada a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ em anaerobiose. Após 24 h de incubação, uma alçada foi transferida para caldo BHI pré-reduzido e incubado a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18 h. Uma suspensão de *C. difficile* foi preparada em solução salina peptonada (NaCl 0,85 % e peptona 0,1 %) pré reduzida e a concentração de células foi ajustada até 10^5 - 10^6 UFC/mL. A contagem de *C. difficile* na suspensão foi realizada pela técnica de profundidade em ágar RCM (*Reinforced Clostridial Media*, Difco, Detroit Michigan, USA, suplementado com 1,5 % de ágar). As placas foram incubadas em anaerobiose a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 48 h.

A cada tempo, 1 mL de suspensão de *C. difficile* foi inoculado em 100 mL de cada meio de cultura (BHIcc e PYGcc), com 25 g de carne pré-reduzido. As matrizes foram armazenadas a 4 °C , 7 °C e $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

4.2.1.2 Contagem de *C. difficile*

O comportamento de *C. difficile* em meios de cultura foi analisado nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias nas amostras armazenadas a 4 °C e $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e nos tempos 0, 3, 5, 7, e 10 dias em amostras armazenadas a $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. A cada tempo, duas amostras de cada grupo foram analisadas.

A cada tempo, alíquota de 1 mL foi retirada e homogeneizada em 9 mL de solução salina peptonada pré - reduzida, em seguida foram efetuadas diluições decimais seriadas e 1 mL de cada diluição foi inoculado em profundidade em ágar RCM (*Reinforced Clostridial Media* suplementado com 1,5 % de ágar). As placas foram incubadas em anaerobiose a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 48 h. As contagens das colônias foram realizadas e o resultado foi expresso em log UFC/mL (log unidades formadoras de colônias por mL).

4.2.1.3 Análise estatística

Um delineamento do tipo *split-plot* foi adotado para avaliação do comportamento de *C. difficile* em meios de cultura (PYGcc e BHIcc) em três temperaturas diferentes ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), conforme a **Figura 6**. As variáveis estudadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e os níveis significativos dos fatores envolvidos, foram comparados por meio do teste de Tukey à nível de 95 % de significância usando o programa STATISTICA versão 7.0 Statsoft®.

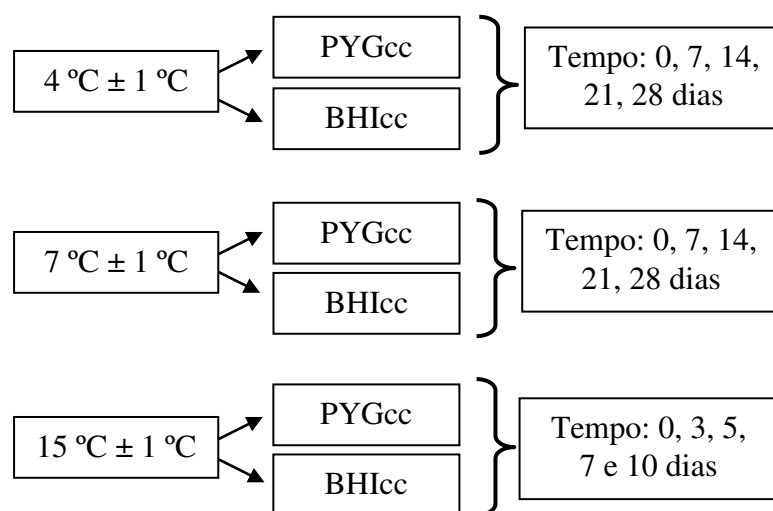


Figura 6. Planejamento experimental para avaliação do comportamento de *C. difficile* em meios de culturas.

BHIcc: *Brain Heart Infusion* com carne cozida; PYGcc: *Peptone yeast extract glucose* com carne cozida.

4.2.2 Comportamento de *C. difficile* em carnes embaladas a vácuo armazenadas em duas temperaturas

Uma suspensão contendo 10^5 - 10^6 UFC/g de *C. difficile* foi inoculada em amostras de carne bovina embaladas a vácuo e armazenadas sob duas diferentes condições de temperatura, $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de 35 e 15 dias, respectivamente. A cada

tempo, duas amostras de cada grupo foram analisadas. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.2.1 Preparo da suspensão de *C. difficile*

Nesta etapa do experimento utilizou-se a cepa de referência de *C. difficile* VPI 10463.

A cepa foi cultivada em caldo BHI pré-reduzido e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em anaerobiose. Após 24 h de incubação, uma alçada foi transferida para caldo BHI pré-reduzido e este foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h. Uma suspensão de *C. difficile* foi preparada em solução salina peptonada pré reduzida e a concentração de células foi ajustada até as concentrações de 10^5 - 10^6 UFC/mL. A contagem de *C. difficile* na suspensão foi realizada pela técnica de profundidade em ágar RCM (*Reinforced Clostridial Media* suplementado com 1,5 % de ágar). As placas foram incubadas em anaerobiose a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

4.2.2.2 Preparo das amostras de carnes

Os cortes de carne bovina crua e resfriada (lagarto - *M. semitendinosus*) foram adquiridos no comércio de Campinas - SP, a gordura aparente foi retirada e as peças foram submetidas ao cozimento a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Porções de 25 g foram preparadas assepticamente e embaladas individualmente a vácuo (19 x 24 x 0,18 cm, Spelvac CS, Spel, Atibaia – SP, Brasil). A espessura da embalagem variava de 0,14 a 0,20 mm (70 a 100 microns por parede). A taxa de permeabilidade ao oxigênio -TPO₂ variava de 50 a 70cm³/m²/dia.

Após essa etapa, septos de silicone confeccionados utilizando-se uma bisnaga de vedante de silicone comercial de base acética foram fixados em cada amostra de carne (SAIKI, 2002).

4.2.2.3 Inoculação de *C. difficile*

Um mL de suspensão de *C. difficile* (concentração de 10^5 - 10^6 UFC/mL) foi inoculado em cada porção de 25 g de carne embalada a vácuo através do septo, o qual prevenia a perda de vácuo, com auxílio de uma seringa de 1 mL (BD – Becton Dickinson, Argentina). As amostras inoculadas foram armazenadas a 7 °C e 15 °C $\pm$ 1 °C, por um período de 35 e 15 dias, respectivamente.

4.2.2.4 Contagem de células vegetativas de *C. difficile* em amostras de carnes embaladas a vácuo

O comportamento de *C. difficile* em carnes embaladas a vácuo e mantidas a 7 °C $\pm$ 1 °C foi analisado nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias e as armazenadas a 15 °C $\pm$ 1 °C foram analisadas nos tempos 0, 3, 5, 7, 10 e 15 dias. A cada tempo, duas amostras expostas a cada temperatura foram analisadas.

A superfície da embalagem das amostras de carne foi desinfetada com álcool 70 % e estas foram assepticamente abertas, com o auxílio de tesoura estéril, dentro da câmara de anaerobiose.

As amostras de 25 g de carne foram homogeneizadas com 225 mL de solução salina peptonada [0,85 % NaCl (Merck) e 0,1 % peptona (Difco)] pré-reduzida. Para a pré-redução dos meios de cultura e soluções usados, estes foram mantidos dentro da câmara de anaerobiose por um período de no mínimo de 48 h antes de seu uso. Em seguida foram efetuadas diluições decimais seriadas e 1 mL de cada diluição foi inoculado em profundidade em ágar RCM. As placas foram incubadas a 37 °C $\pm$ 1 °C por 48 h em anaerobiose. As colônias foram contadas e o resultado expresso em log UFC/g.

4.2.2.5 Contagem de células esporuladas de *C. difficile* em amostras de carnes embaladas a vácuo

Ao mesmo tempo em que foram realizadas as contagens de células vegetativas, realizaram-se também as contagens de esporos deste micro-organismo, nos mesmos intervalos de tempo, para verificar se estes voltavam a esporular durante o armazenamento.

A contagem dos esporos foi realizada adicionando-se 1 mL da diluição 10^{-1} em 9 mL de solução salina peptonada e posterior adição de 10 mL de etanol (concentração final de etanol igual a 50 %) por 50 min em temperatura ambiente e centrifugação a 3800g/10 min (tratamento com álcool). Descartou-se o sobrenadante e os esporos foram suspensos em 10 mL em solução salina peptonada (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007). Realizaram-se diluições decimais e 1 mL de cada diluição foi inoculado em ágar RCM. As placas foram incubadas em anaerobiose a $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 48 h, as colônias foram contadas e os resultados expressos em log esporos/mL.

4.2.2.6 Análise estatística

A influência das temperaturas ($7\text{ e }15 \pm 1\text{ °C}$) e o tempo de armazenamento no desenvolvimento de *C. difficile* (**Figura 7**) foram analisados pela ANOVA. As comparações entre os níveis significativos dos fatores envolvidos foram analisadas pelo teste de Tukey, ao nível de 95 % de significância com o programa STATISTICA versão 7.0 Statsoft®.

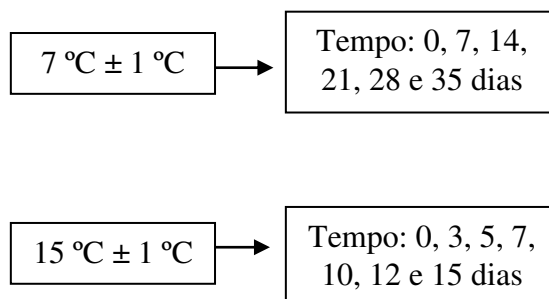


Figura 7. Planejamento experimental para avaliação do comportamento de *C. difficile* em amostras de carne embaladas a vácuo.

4.3 Capacidade de formação de biofilme por *C. difficile*

4.3.1 Cepas utilizadas e forma de cultivo

Para avaliação da formação de biofilmes usou-se a cepa de referência de *C. difficile* VPI 10463 e LHCD 809.

As cepas foram cultivadas em anaerobiose em caldo BHI pré-reduzido e incubadas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Após 24 h de incubação, uma alçada do inóculo ativo foi transferido para caldo BHI pré-reduzido e incubado a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18 h. Uma suspensão de *C. difficile* foi preparada em solução salina peptonada pré-reduzida e a concentração de células foi ajustada até 10^4 - 10^5 UFC/mL. A inoculação em profundidade foi realizada em ágar RCM. As placas foram incubadas em anaerobiose a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 48 h.

4.3.2 Superfície de aço inoxidável

Para a avaliação de formação de biofilme bacteriano, foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 (*American Iron and Steel Institute*) na dimensão de 1 cm^2 (ROSADO, 2009). Os cupons na dimensão de 1 cm^2 foram confeccionados pelo Centro de Tecnologia da UNICAMP e a determinação da rugosidade do material foi realizada em seu Laboratório de Metrologia, utilizando-se rugosímetro (modelo S8P, Perthen, Mahr, Alemanha). O resultado de 0,366 qm de rugosidade foi obtido a partir da média de nove medições realizadas à temperatura de $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Este resultado condiz com a rugosidade para o acabamento número 4 (#4), que pode variar de 0,15 a 0,40 μm , obtido a partir de lixamento em uma direção com abrasivos de grana que variam de 120 a 150 mesh (CARBO, 2001).

4.3.3 Preparação dos corpos de prova

Para manter os cupons suspensos e imersos nos meios de cultivo durante os experimentos, foram utilizados fios de poliamida (Nylon®), de 0,2 mm de diâmetro.

Primeiramente, os cupons foram limpos com auxílio de esponja de poliuretano, água destilada e detergente líquido neutro, e enxaguados com água destilada. Após esse procedimento, os fios de poliamida foram colocados no orifício dos cupons que foram mergulhados em álcool etílico 70 % por 1 h e enxaguados com água destilada. Após esse procedimento, os cupons foram esterilizados a 121 °C durante 15 min (PARIZZI, 2004).

4.3.4 Formação do biofilme sobre a superfície de aço inoxidável

Para os estudos de formação de biofilmes, foram avaliados três matrizes diferentes: caldo BHI (BHI), BHI modificado para pH 5,6-5,8 (BHIpH) e BHI modificado com cisteína (BHIC). Os cupons teste foram imersos assepticamente em recipientes contendo 60 mL de caldo pré-reduzidos acrescidos de um volume de suspensão de *C. difficile* (solução salina peptonada), para obtenção de concentração final de aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC/mL. Como controle negativo foram utilizados frascos contendo as matrizes sem a adição de suspensão bacteriana. Esta concentração final foi confirmada em todos os testes realizando plaqueamento por profundidade em ágar RCM.

Os recipientes contendo os cupons em contato com *C. difficile* e os controles negativos foram incubados a 15 °C e 25 °C $\pm$ 1 °C por até 10 dias em anaerobiose. O meio de cultivo foi trocado nos tempos 4 e 8 dias.

A exposição dos cupons a diferentes matrizes e temperaturas teve por objetivo simular um alimento altamente nutritivo, como a carne, em uma sala de desossa. Segundo a legislação (BRASIL, 1997), esses ambientes devem possuir um sistema de climatização de maneira a permitir que a temperatura da sala mantenha-se entre 14 °C e 16 °C durante o trabalho. Desta forma a temperatura utilizada no experimento foi de 15 °C e a temperatura de 25 °C foi utilizada como temperatura ambiente.

4.3.5 Determinação de células sésseis

Após 2, 4, 6, 8 e 10 dias de incubação a 15 °C e 25 °C $\pm$ 1 °C, dois cupons de cada matriz/temperatura/micro-organismo foram retirados e analisados. Cada cupom foi retirado do

meio de cultivo e imerso em 10 mL de água peptonada (0,1 % p/v) por 1 min, sem agitação, para a remoção das células planctônicas. Em seguida, estes foram imersos em 10 mL da mesma solução e submetidos à agitação constante a 2800 rpm (Vortex Lab Dancer IKA) por 2 min para remoção das células sésseis (ANDRADE et al., 1998). Diluições seriadas foram realizadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % e submetidas ao plaqueamento por profundidade em ágar RCM pré-reduzido. As placas foram incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h em anaerobiose e, em seguida, realizadas as contagens para a determinação de UFC/cm².

4.3.6 Contagem de esporos de *C. difficile*

A contagem dos esporos foi realizada inoculando-se 1 mL de suspensão de células sésseis removidas em 9 mL de solução salina peptonada e posterior adição de 10 mL de etanol (concentração final de etanol igual a 50 %) por 50 min em temperatura ambiente e centrifugação a 3800g/10 min (tratamento com álcool) (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007). Descartou-se o sobrenadante e os esporos foram suspensos em 10 mL em solução salina peptonada. Realizaram-se diluições decimais e 1 mL de cada diluição foi inoculada em ágar RCM. As placas foram incubadas em anaerobiose a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h, as colônias foram contadas e os resultados expressos em log esporos/cm².

4.3.7 Análise estatística

Um delineamento do tipo *split-split-split-plot* foi adotado para avaliação da adesão de duas cepas de *C. difficile* em aço inoxidável em três matrizes, duas temperaturas, e cinco tempos diferentes, como ilustrado na **Figura 8**. Os ensaios foram realizados em dois blocos. Todas as variáveis estudadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA). As comparações entre os níveis significativos dos fatores envolvidos foram analisadas pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de significância através do programa STATISTICA versão 7.0 Statsoft ®.

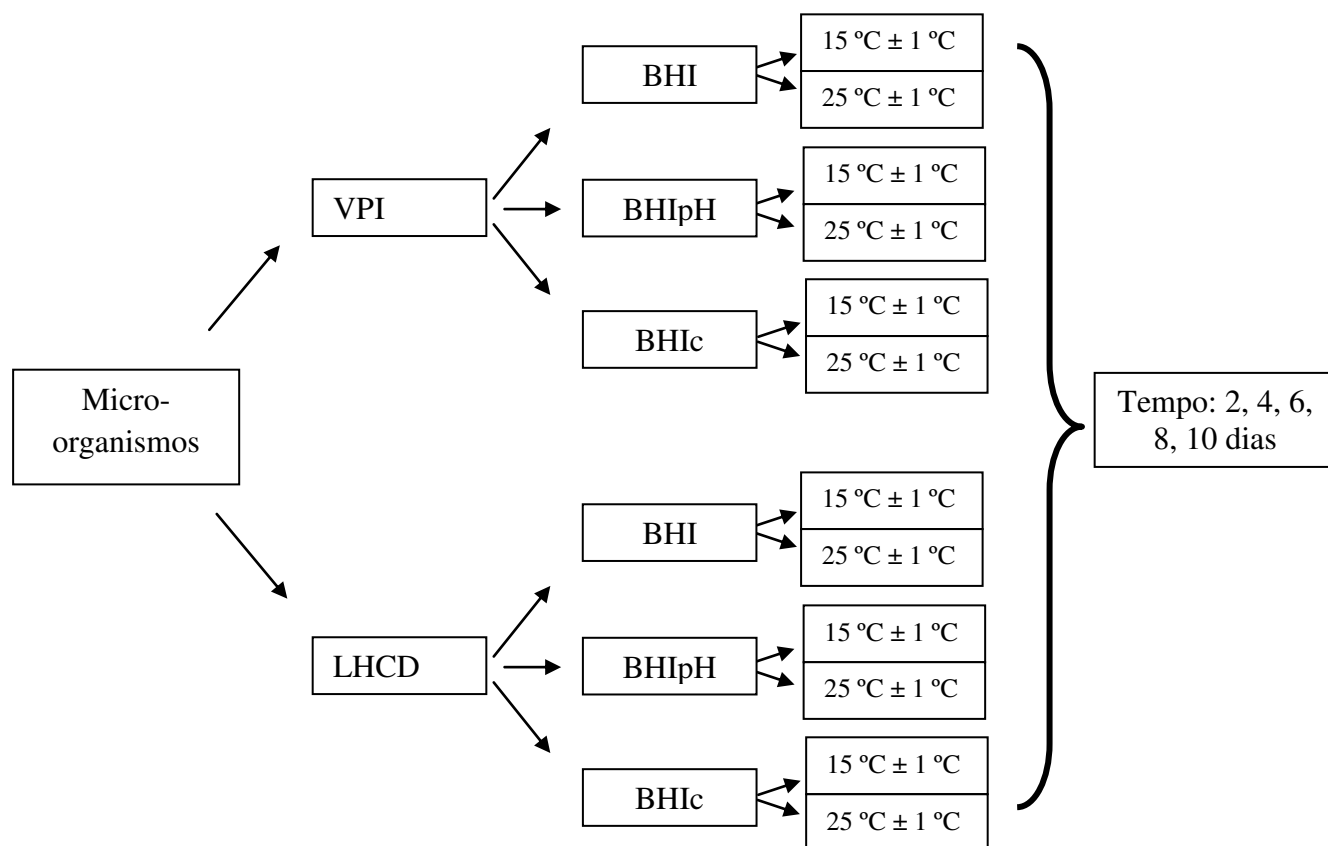


Figura 8. Planejamento experimental para avaliação da adesão e formação de biofilme de *C. difficile* em superfície de aço inoxidável.

BHI: *Brain Heart Infusion*; BHIpH: *Brain Heart Infusion* modificado para pH 5,6-5,8; BHlc: *Brain Heart Infusion* modificado com cisteína.

4.4 Estratégias para controle e inibição de *C. difficile*

4.4.1 Avaliação da ação de sanitizantes em biofilme de *C. difficile*

Para avaliação da formação de biofilmes foram usadas as cepas de referência de *C. difficile* VPI 10463 e LHCD 809.

Para avaliar a eficiência de sanitizantes em biofilme de *C. difficile* aderido na superfície de aço inoxidável, foram testados os agentes sanitizantes utilizados nos procedimentos de higienização em linha de processamento de carnes. Os sanitizantes foram avaliados em condições de maior formação do biofilme (BHlc, com 6 dias de contato) determinado previamente (item 4.3.4). As concentrações testadas e o modo de preparo dos sanitizantes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Os sanitizantes utilizados foram: 1) hipoclorito de sódio a 10,0 – 12,0 % de cloro residual total (CRT), pH 11,0 - 13,0 (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. Ltda), e a concentração utilizada foi a 1 % (p/v) (10.000 mg/L) 2) ácido peracético a 15,0 %, pH <1,5 (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. Ltda), a concentração de uso foi de 0,03 % (p/v) (300 mg/L) 3) quaternário de amônio (cloreto de alquil amido propil dimetil benzil amônio) a 15,0 %, pH 8,5 – 9,5 (Sandet® Química Ltda, São José do Rio Preto, SP), e a concentração utilizada foi 0,45 % (p/v) (4.500 mg/L) e 4) cloridrato de polihexametilena biguanida a 3,96 %, pH 9,5 – 9,9 (Sandet® Química Ltda), com a concentração de uso de 0,03 % (p/v) (300 mg/L).

Segundo os fabricantes, a concentração de hipoclorito de sódio testada no experimento (1 %) é recomendada para desinfecção de ambientes, pisos, ralos e quintais. O ácido peracético a 0,03 % é utilizado para sanitização de pisos, paredes, utensílios, equipamentos em sistemas de pulverização, imersão e CIP (*clean in place*). As concentrações recomendadas para o quaternário de amônio a 0,45 % e biguanida a 0,03 % são recomendadas para sanitização de instalações e equipamentos de indústrias alimentícias.

Como agente neutralizante do sanitizante foi utilizado solução de tiosulfato de sódio a 1 % (p/v) para sanitizantes a base de ácido peracético e hipoclorito de sódio e para neutralizar o sanitizante a base de quaternário de amônia e biguanida, utilizou-se Caldo

Letheen (Difco), que contém lecitina (0,7 g/L) e polisorbato 80 (Tween™ 80) (5,0 g/L) em sua fórmula (KUAYE, 2017, com adaptações).

Os cupons utilizados foram preparados conforme o item 4.3.3. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos em frascos esterelizados e 10 mL de cada solução foram transferidos para tubos de ensaio estéreis.

Os cupons foram transferidos para tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1 % (p/v) para retiradas de células planctônicas, em seguida estes foram imersos em 10 mL de cada solução sanitizante durante 10 min e transferidos para uma solução de 10 mL de agente neutralizante por 10 min para inativação da ação do sanitizante. Após essa etapa, os cupons foram submetidos à vortex por 2 min para remoção das células sésseis (ANDRADE et al., 1998). Em seguida, as soluções resultantes foram submetidas às diluições decimais seriadas para contagem de células vegetativas e esporuladas, conforme descrito nos itens 4.3.5 e 4.3.6, respectivamente.

Para cada tratamento, utilizou-se um total de seis cupons de aço inoxidável (dois cupons por teste, repetidos por três vezes).

A eficiência do sanitizante foi avaliada de acordo com o número de reduções (log UFC ou esporos/cm²) em relação ao biofilme não tratado com sanitizantes.

4.4.1.1 Análise estatística

Um delineamento foi adotado para avaliação da ação de sanitizantes (AP: ácido peracético, HS: hipoclorito de sódio, BG: biguanida e QA: quaternário de amônio) em biofilmes de *C. difficile*, conforme a **Figura 9**. As variáveis estudadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e os níveis significativos dos fatores envolvidos, foram comparados por meio do teste de Tukey à nível de 95 % de significância usando o programa STATISTICA versão 7.0 Statsoft®.

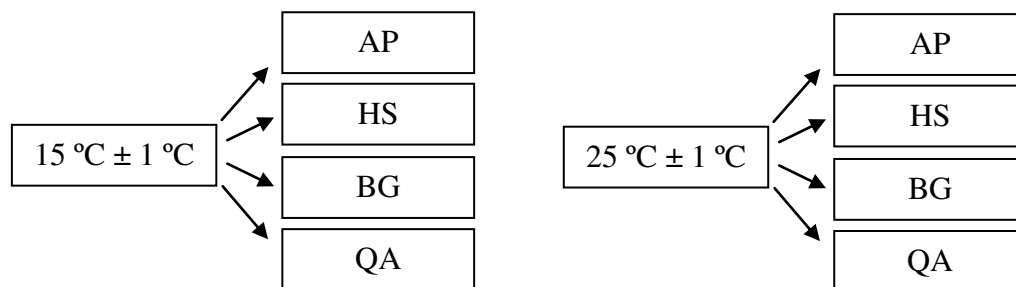


Figura 9. Planejamento experimental para avaliação da ação de sanitizantes em biofilmes de *C. difficile*.

4.4.2 Avaliação da atividade esporicida de sanitizantes sobre cepas de *C. difficile*

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

Os esporos de *C. difficile* foram produzidos de acordo com a metodologia adaptada de Ferreira et al. (2013). As cepas (VPI 10463 e LHCD 809) foram cultivadas separadamente em caldo BHI pré-reduzido e incubadas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ em anaerobiose. Após 24 h de incubação, uma alçada foi transferida para o caldo BHI pré-reduzido e este foi incubado a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18 h. Após esse período, as culturas foram inoculadas sobre a superfície de placas contendo ágar BHI suplementado com cisteína (0,5 g/L) para esporulação. As placas foram incubadas em anaerobiose a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 10 dias. Cada cepa foi inoculada individualmente em quintuplicata.

Após 7 a 10 dias de incubação avaliou-se a presença de esporos por meio de microscopia de contraste de fase e/ou coloração de esporos com verde malaquita. Uma vez observada a esporulação (cerca de 90 a 95 % de esporulação) adicionou-se a solução salina nas placas de Petri seguindo-se de raspagem da superfície do ágar com o auxílio da alça de Drigasli para a coleta dos esporos.

Os esporos das cepas VPI 10463 e LHCD 809, provenientes das cinco placas, foram coletados em tubos de centrífuga de polipropileno com tampas rosqueáveis previamente esterilizados e submetidos à centrifugação (Centrífuga Beckman J2-21, Beckman

Instruments, Palo Alto, Ca, EUA) a 3800g/20 min a 4 °C (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007). O sobrenadante de cada cultura foi descartado, o concentrado de esporos foi ressuspenso e lavado duas vezes por centrifugação em água esterelizada. Nas mesmas condições a última ressuspensão foi realizada com aproximadamente 25 mL de solução salina 0,85 %, (p/v), e mantida em aerobiose para inativar células vegetativas remanescentes e armazenadas a 4 °C $\pm$ 1 °C. A contagem dos esporos foi realizada por meio de plaqueamento em profundidade em ágar RCM. As placas foram incubadas em anaerobiose a 35 °C $\pm$ 1 °C por 48 h, as colônias foram contadas e os resultados expressos em esporos/mL.

4.4.2.2 Atividade esporicida dos sanitizantes

A atividade esporicida dos sanitizantes foi avaliada de acordo com o método da União Européia prEN14347 (2001), testando a proporção de 0,2 mL da suspensão de esporos com 0,8 mL do sanitizante (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2001).

Os sanitizantes testados foram: 1) hipoclorito de sódio a 10,0 – 12,0 % de cloro residual total (CRT), pH 11,0 - 13,0 (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. Ltda), e a concentração utilizada foi a 1 % (p/v) (10.000 mg/L), pH 11,8; 2) ácido peracético a 15,0 %, pH <1,5 (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. Ltda), a concentração de uso foi de 0,03 % (p/v) (300 mg/L); 3) quaternário de amônio (cloreto de alquil amido propil dimetil benzil amônio) a 15,0 %, pH 8,5 – 9,5 (Sandet® Química Ltda, São José do Rio Preto, SP), e a concentração utilizada foi 0,45 % (p/v) (4.500 mg/L) e 4) cloridrato de polihexametilena biguanida a 3,96 %, pH 9,5 – 9,9 (Sandet® Química Ltda), com a concentração de uso de 0,03 % (p/v) (300 mg/L).

Complementado o teste, avaliou-se diferentes concentrações e pH das soluções de hipoclorito de sódio na atividade esporicida. As concentrações avaliadas foram: hipoclorito de sódio 100 mg/L, pH 9,4; hipoclorito de sódio 200 mg/L, pH 9,9; hipoclorito de sódio 100 mg/L, pH 7,5 e hipoclorito de sódio 200 mg/L, pH 7,5. A solução clorada foi preparada e analisada de acordo com a metodologia da American Public Health Association – APHA – (WEHR; FRANK, 2004).

A suspensão ficou em contato com o sanitizante por períodos de 5, 15 e 30 min e, em seguida, foi neutralizada com solução de tiosulfato de sódio a 1 % para sanitizantes a

base de ácido peracético e hipoclorito de sódio. E para neutralizar o sanitizante à base de quaternário de amônia e biguanida, utilizou-se Caldo Lethen (Difco), que contém lecitina (0,7 g/L) e polisorbato 80 (Tween™ 80) (5,0 g/L) em sua fórmula (KUAYE, 2017, com adaptações).

Após as etapas de contato e neutralização foram realizadas as diluições decimais seriadas e o plaqueamento por profundidade em ágar RCM seguido por incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48-72 h. As colônias foram contadas e o efeito esporicida do sanitizante foi avaliado pelo fator de inativação (IF), o qual foi calculado pela redução de $\log_{10}$ esporos da contagem inicial em relação ao inóculo final (WULLT et al., 2003). Este teste foi realizado em duplicata para cada sanitizante testado.

4.4.3 Avaliação da resistência a agentes antimicrobianos

Neste experimento foram testados 22 isolados de *C. difficile* provenientes de amostras de carne bovina e frango (TSUCHIYA et al., 2012).

As características de cada isolado estão dispostas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Perfil dos isolados de *C. difficile* provenientes de amostras de carnes testadas para avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Isolado	Amostras	Características genéticas*			
		<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	Toxina binária (CDT)	
				<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>
LHCD 388	Carne bovina moída	—	—	—	—
LHCD 436	Frango	—	+	—	—
LHCD 467	Frango	—	+	—	—
LHCD 468	Frango	—	+	—	—
LHCD 537	Frango	—	—	—	—

LHCD 540	Frango	—	—	—	—
LHCD 545	Frango	—	—	—	—
LHCD 607	Frango	—	—	—	—
LHCD 611	Frango	—	—	—	—
LHCD 614	Frango	—	—	—	—
LHCD 616	Frango	—	—	—	—
LHCD 617	Frango	—	—	—	—
LHCD 619	Frango	—	—	—	—
LHCD 809	Frango	+	+	—	—
LHCD 810	Frango	+	+	—	—
LHCD 811	Frango	+	+	—	—
LHCD 841	Frango	+	+	—	—
LHCD 872	Frango	+	+	—	—
LHCD 874	Frango	+	+	—	—
LHCD 877	Frango	+	+	—	—
LHCD 966	Corte bovino	+	+	—	—
LHCD 970	Corte bovino	+	+	—	—

**tcdA*: Gene referente a TcdA; *tcdB*: Gene referente a TcdB; CDT (*cdtA* e *cdtB*): Genes referentes a toxina binária.

As culturas de *C. difficile* (n=22) foram avaliadas quanto à susceptibilidade a oito agentes antimicrobianos, por meio da determinação da concentração mínima inibitória (MIC) utilizando-se as tiras de E-test® (AB Biodisk – bioMérieux) conforme o método M11-A7 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2007).

Os antibióticos avaliados foram: tetraciclina (0,016 – 256 µg/mL), ceftriaxona (0,016 – 256 µg/mL), metronidazol (0,016 – 256 µg/mL), clindamicina (0,016 – 256 µg/mL), vancomicina (0,016 – 256 µg/mL), ampicilina (0,016 – 256 µg/mL), moxifloxacina (0,002 –

32 µg/mL), ceftizoxima (0,002 – 32 µg/mL). Estes antibióticos são utilizados na área clínica e na medicina veterinária.

C. difficile ATCC 700057 foi usado como controle e os resultados foram interpretados de acordo com o recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2017).

Os isolados foram cultivados em caldo BHI a 37 °C ± 1 °C por 24 h. Após a incubação, uma alçada foi transferida para o caldo Brucella suplementando com sangue desfribinado (Biotério BioBoavista, Campinas-SP), hemina bovina (Inlab, Alamar Tecnocientífica Ltda) e vitamina K1 (Sigma Aldrich, Brasil) e este foi incubado a 37 °C ± 1 °C por 18 h (CLSI, 2007).

Após o período de incubação, isolados foram transferidos para solução salina 0,85 % (p/v) até obter uma densidade de 0,5 na McFarland. Com auxílio de uma haste de algodão estéril o inóculo foi espalhado uniformemente sobre toda superfície da placa contendo ágar Brucella (Difco) suplementado com sangue desfribinado (Biotério BioBoavista, Campinas-SP), hemina bovina (Inlab, Alamar Tecnocientífica Ltda) e vitamina K1 (Sigma Aldrich, Brasil), recomendado pela CLSI (2007), e incubados a 37 °C ± 1 °C por 24 horas. A inibição para cada tira foi observada no ponto de interseção entre a fita e a zona de inibição do crescimento do *C. difficile*, formando uma zona elíptica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comportamento do *C. difficile* VPI 10463 em diferentes substratos

5.1.1 Avaliação do comportamento de *C. difficile* VPI 10463 em meios de cultura incubados sob diferentes temperaturas

O comportamento de *C. difficile* em meios de cultura com carne cozida nas temperaturas de 4 °C, 7 °C e 15 °C foi avaliado. Na **Tabela 2** e **Figuras 10, 11 e 12**, estão expostos os dados das contagens de *C. difficile* em caldo BHIcc e PYGcc a 4 °C e 7 °C, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28° dias e a 15 °C, nos tempos 0, 3, 5, 7 e 10 dias.

Em temperaturas de refrigeração (4 °C e 7 °C), observou a tendência de um decréscimo nas contagens de *C. difficile* ao longo do tempo. Este decréscimo, após 28 dias, ocorreu tanto em meio BHIcc (0,95-1,89 log UFC/mL) quanto em PYGcc (0,92-1,48 log UFC/mL).

No entanto, na temperatura de 15 °C, a população de *C. difficile* aumentou, atingindo o máximo de contagem no 5° dia de incubação. O incremento nas contagens foi semelhante e praticamente igual para os meios BHIcc (2,86 log UFC/mL) e PYGcc (2,60 log UFC/mL).

Tabela 2. Médias e desvios padrões das contagens de *C. difficile* VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 4 °C, 7 °C e 15 °C.

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	PYGcc (log UFC/mL±DP)	BHIcc (log UFC/mL±DP)
4	0	4,47	4,51
	7	3,01 ± 0,25	3,62 ± 0,27
	14	4,01 ± 0,25	3,99 ± 0,13
	21	3,63 ± 0,30	3,76 ± 0,23
	28	3,55 ± 0,26	3,56 ± 0,43
7	0	4,47	4,51
	7	4,30 ± 0,07	4,26 ± 0,27
	14	3,87 ± 0,03	3,75 ± 0,26
	21	3,84 ± 0,07	3,46 ± 0,34
	28	2,99 ± 0,29	2,62 ± 0,12
15	0	5,23	5,17
	3	6,95 ± 0,09	7,36 ± 0,02
	5	7,83 ± 0,15	8,03 ± 0,08
	7	6,00 ± 0,00	6,91 ± 0,78
	10	7,16 ± 1,10	7,49 ± 0,13

PYGcc - *Peptone yeast extract glucose* com carne e BHIcc - *Brain heart infusion* com carne.

Observando-se a síntese da análise de variância, na **Tabela 3**, realizada para avaliação do comportamento de *C. difficile*, em diferentes meios de cultura armazenados sob três temperaturas, 4 °C, 7 °C e 15 °C, verifica-se diferença significativa entre as contagens a 15 °C. Em caldo BHIcc observou-se o maior desenvolvimento do micro-organismo em comparação com o caldo PYGcc.

O meio BHI (*Brain Heart Infusion*) é um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio orgânico, carbono, enxofre e vitaminas. A dextrose é um carboidrato que os micro-organismos utilizam para fermentação (BECTON DICKINSON - BD, 2013).

Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do comportamento de *C. difficile* VPI 10463 em meios de cultura armazenados sobre temperaturas diferentes.

Fatores	4 °C			7 °C		15 °C	
	GL	QM	p	QM	p	QM	p
Matriz¹	1	0,174	0,091	0,227	0,023*	0,968	0,034*
Tempo²	4	1,233	0,000*	2,582	0,000*	6,543	0,000*
Matriz*Tempo	4	0,099	0,170	0,055	0,246	0,190	0,428
Erro	20	0,0557		0,0375		0,189	

GL: Graus de liberdade; QM: Quadrados médios; p: Probabilidade de significância $\leq 0,05$.

*Apresentaram diferença significativa ao nível de 0,05 ($p \leq 0,05$).

¹ Matriz: Meios PYGcc - *Peptone yeast extract glucose* com carne e BHIcc - *Brain heart infusion* com carne.

² Tempo: 4 °C e 7 °C: 0, 7, 24, 21 e 28 dias e 15 °C: 0, 3, 5, 7 e 10 dias.

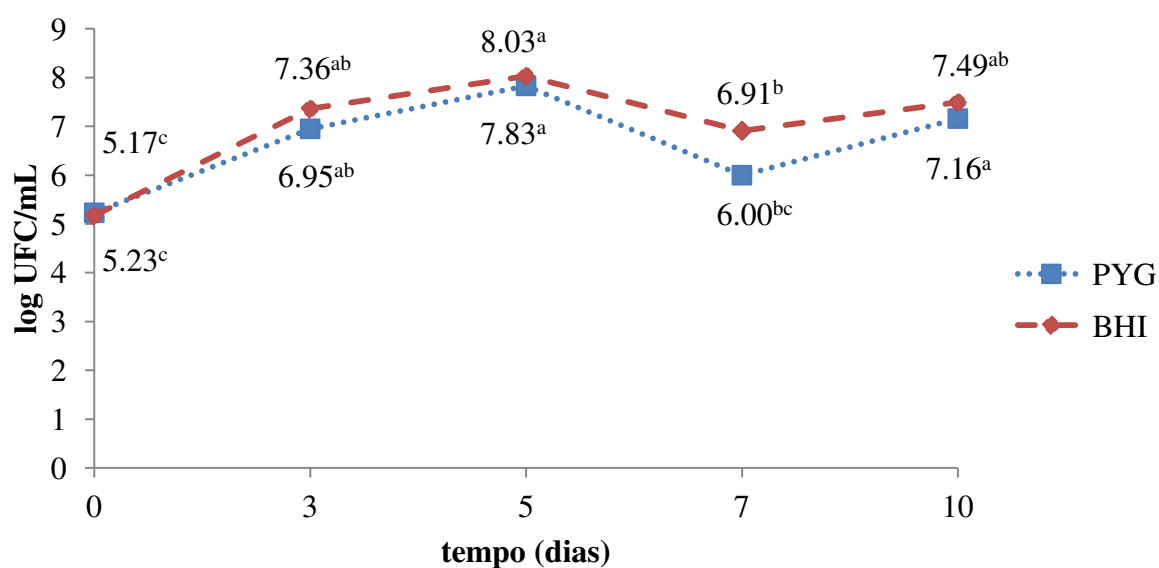


Figura 10. Desenvolvimento de *C. difficile* VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 15 °C.

^{a, b, c} Para cada matriz de condicionamento, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

PYGcc - *Peptone yeast extract glucose* com carne e BHIcc - *Brain heart infusion* com carne.

O caldo PYGcc apresentou melhor desempenho em comparação ao caldo BHIcc para a manutenção de *C. difficile* a 7 °C (**Figura 11**), diferentemente do que ocorreu a 15 °C.

Os dois meios são nutricionalmente semelhantes, porém o PYG apresenta três diferentes sais: CaCl_2 , MgSO_4 e NaHCO_3 e cisteína como agente redutor.

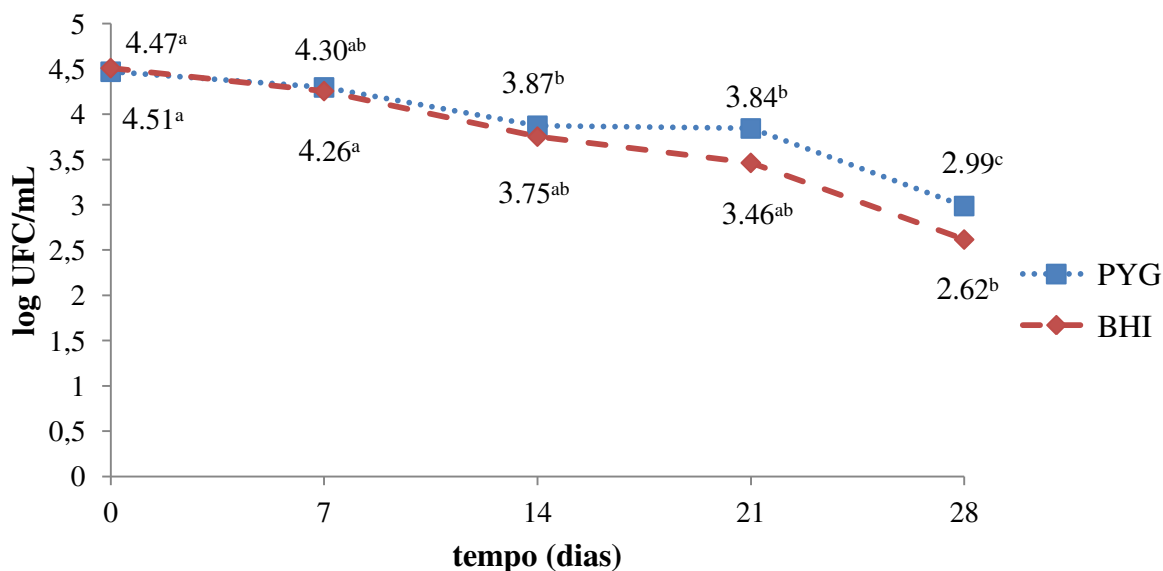


Figura 11. Comportamento de *C. difficile* VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 7°C.

a, b, c Para cada matriz de condicionamento, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

PYGcc - *Peptone yeast extract glucose* com carne e BHIcc - *Brain heart infusion* com carne.

C. difficile não se desenvolveu nas temperaturas de refrigeração testadas neste estudo (4 °C e 7 °C), porém, foi possível detectá-lo até o 28º dia de estocagem, conforme resultados apresentados nas **Figuras 11 e 12**. Uma redução de contagem foi observada nestas temperaturas.

Estes dados mostraram que em condições propícias de nutrientes, ambiente anaeróbio e temperatura de refrigeração, *C. difficile* pode se manter viável.

A 4 °C não houve diferença ($p < 0,05$) entre os meios de cultura, PYGcc e BHIcc. Outra espécie de *Clostridium*, o *C. perfringens* também não consegue se desenvolver bem a temperatura de refrigeração (inferiores a 15 °C) não se multiplicando na temperatura de 6 °C (Mc CLANE, 2001).

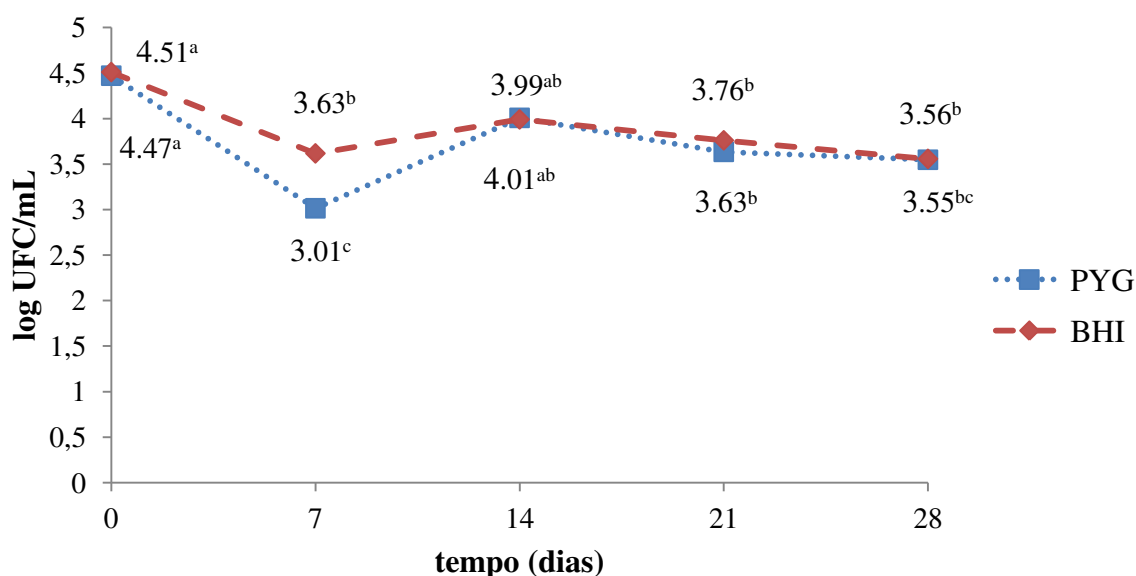


Figura 12. Contagens de *C. difficile* VPI 10463 em caldo BHIcc e PYGcc a 4 °C.

a, b, c Para cada matriz de condicionamento, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

PYGcc - *Peptone yeast extract glucose* com carne e BHIcc - *Brain heart infusion* com carne.

Trabalhos científicos sobre as condições ideais de tempo e temperatura para multiplicação e produção de toxinas de *C. difficile* em alimentos não foram encontrados na literatura.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo são bastante relevantes, pois corroboram com a premissa da necessidade de manutenção dos produtos alimentícios estocados sob temperaturas de refrigeração (4 °C e 7 °C).

O abuso de temperatura pode proporcionar a multiplicação microbiana e consequente produção de toxinas se as condições de nutrientes e potencial de oxido-redução (Eh) apresentarem favoráveis. Alimentos como os produtos cárneos podem tornar-se, desta forma, inseguros ao consumidor.

5.1.2 Avaliação das contagens de *C. difficile* VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo

O comportamento de *C. difficile* inoculado em amostras de carnes bovina embaladas a vácuo armazenadas sob duas temperaturas, 7 °C e 15 °C, foi avaliado pela contagem em placas, e o resumo da análise de variância (ANOVA) dos resultados é apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para avaliação do comportamento de *C. difficile* VPI 10463 (células vegetativas e esporuladas) em carne bovina acondicionada a vácuo e armazenada a 7 °C e 15 °C.

Temperaturas (°C)	Fatores	Vegetativas			Esporos	
		GL	QM	p	QM	p
7	Tempo ¹	5	3,3201	0,000*	0,4545	0,000*
	Erro	12	0,0489		0,0105	
15	Tempo ¹	7	1,7805	0,003*	1,2605	0,000*
	Erro	16	0,3467		0,1177	

GL: Graus de liberdade; QM: Quadrados médios; p: Probabilidade de significância < 0,05.

*Apresentam diferença significativa ao nível de 0,05 ($p \leq 0,05$).

¹Tempo: 7 °C: 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias; 15 °C: 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 15 dias.

Observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento, tanto a 7 °C como a 15 °C nas quais foram observadas uma diferença na taxa de crescimento. As amostras mantidas a 7 °C apresentaram uma redução na contagem das células e as mantidas 15 °C apresentaram crescimento de células vegetativas (log UFC/g), conforme perfil observado nas **Figuras 13 e 14**, respectivamente.

Um comportamento antagônico é observado na temperatura de 7 °C entre a população de células vegetativas – que decai ao longo do tempo, e de esporos – que aumenta. O aumento no número de células esporuladas em relação ao número das células vegetativas pode ser atribuído à temperatura de estocagem (7 °C), uma vez que *C. difficile* é um micro-

organismo mesófilo com temperatura ótima de crescimento de 30-37 °C (RAINEY et al., 2009). No caso dos clostrídios, a produção de butirato e acetato, resultantes do metabolismo anaeróbico também podem ser os responsáveis pelo início do processo de esporulação (DÜRRE; HOLLERGSCHWANDNER, 2004).

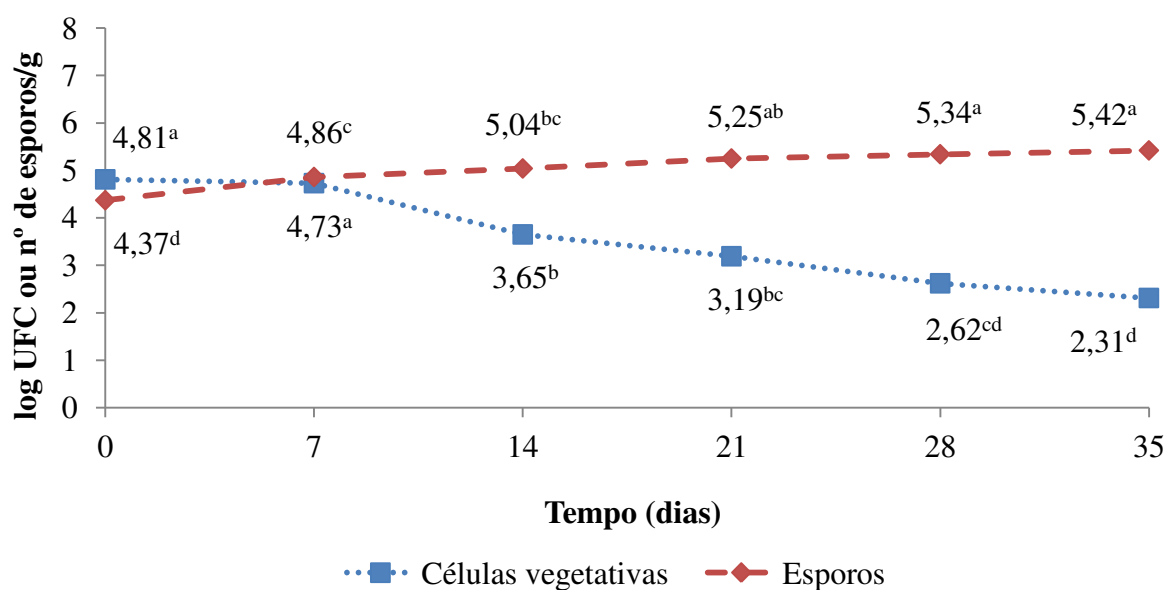


Figura 13. Médias das contagens (log UFC ou esporos/g) do desenvolvimento de *C. difficile* VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo mantidas a 7 °C.

a, b, c, d Para cada forma de célula, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A 7 °C, houve um aumento de 1,05 log esporos/g nas contagens de esporos de *C. difficile*, entre o dia da inoculação e o 35º dia, onde se atingiu um valor máximo de contagens de esporos, 5,42 log esporos/g. Em contrapartida, observamos um decréscimo na contagem de células vegetativas de 2,50 log UFC/g, sendo que as contagens de *C. difficile* se reduziram, de 4,81 log UFC/g (dia 0) sofreu uma redução, para 2,31 log UFC/g (35º dia). Pode-se observar ainda que não houve diferença significativa nas contagens entre os tempos 0 (4,81 log UFC/g) e 7 (4,73 log UFC/g) dias (**Figura 13**).

No 7º dia, o número de células vegetativas é equivalente ao número de células esporuladas, com valores de 4,73 e 4,86 log UFC ou esporos/g, respectivamente.

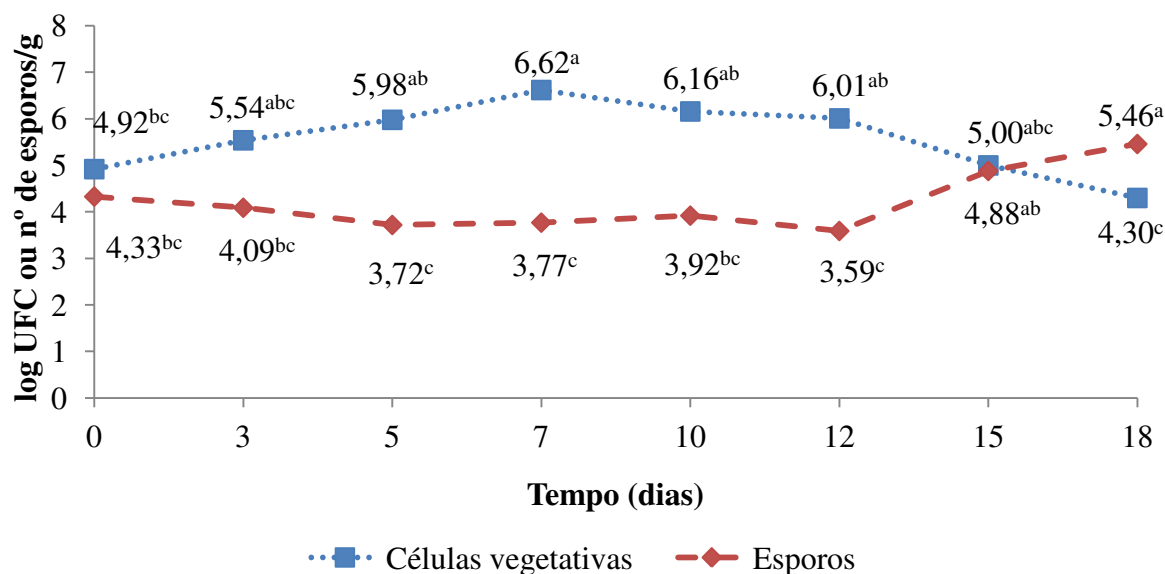


Figura 14. Médias das contagens (log UFC ou esporos/g) do desenvolvimento de *C. difficile* VPI 10463 em carnes embaladas a vácuo mantidas a 15 °C.

a, b, c Para cada forma de célula, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A 15 °C, os perfis das populações de células vegetativas e esporos de *C. difficile* apresentaram comportamento antagônico (**Figura 14**). Enquanto a população de células vegetativas cresce 1,7 log UFC/g até o 7º dia e depois decaíram 2,32 log UFC/g até o 18º dia, observa-se que a contagem de esporos apresentou um leve decréscimo; mantendo-se praticamente constante até o 12º dia (3,59 log esporos/g), a partir do qual ocorreu um aumento até o 18º dia (5,46 log esporos/g).

No 15º dia de estocagem as contagens de células vegetativas e esporuladas praticamente se igualaram com valores de 4,88 e 5,00 log UFC ou esporos/g, respectivamente. Entre o 7º e 18º dia, observamos um decréscimo de 2,32 log UFC/g na contagem de células vegetativas, à medida que o número de células esporuladas aumentou 1,69 log esporos/g no mesmo período (**Figura 14**).

C. difficile já foi isolado em carnes e rins cozidos comercializados por vendedores ambulantes na cidade de Abidjan, Costa do Marfim (KOUASSI et al., 2014), sugerindo desta forma que animais são possíveis fontes de *C. difficile* e consequentemente causando infecções gastrointestinais em humanos (RUPNIK, 2007).

Deng et al. (2015) avaliaram a capacidade de sobrevivência de esporos de *C. difficile* a baixas temperaturas utilizando duas matrizes; tampão fosfato salino e carne moída. Para a matriz de tampão fosfato salino, a viabilidade foi avaliada por 4 meses sob diferentes situações, -80 °C, -20 °C, 4 °C (temperatura de refrigeração), 23 °C (temperatura ambiente) e após múltiplos congelamentos e descongelamentos (-20 °C/23 °C). E para a matriz cárnea a viabilidade foi avaliada por 2 meses a -20 °C. Os pesquisadores observaram que, embora a viabilidade dos esporos tenha diminuído ao longo do tempo, a viabilidade significativa ainda foi observada após o tempo avaliado, sugerindo que a matriz cárnea e o tampão fosfato salino fornecem proteção a baixas temperaturas para esporos de *C. difficile*, facilitando a sua sobrevivência.

O trabalho científico sobre as condições de tempo e temperatura de multiplicação de *C. difficile* em alimentos embalados a vácuo realizado nesta pesquisa tem caráter inédito uma vez que não foi reportado na literatura. Por conseguinte, pode-se concluir que embora a baixas temperaturas (7 °C) o micro-organismo não se multiplique, pode sobreviver na forma vegetativa e produzir esporos potencialmente capazes de promover infecções humanas por pelo menos 35 dias de estocagem.

5.2 Capacidade de formação de biofilme por *C. difficile*

A influência do acondicionamento da superfície abiótica (aço inoxidável) em diferentes matrizes (BHI, BHIpH, BHIC), do tipo de inóculo (VPI 10463 e LHCD 809), do tempo de contato (2, 4, 6, 8 e 10 dias), das temperaturas (15 °C e 25 °C), bem como a interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *C. difficile*, podem ser avaliados a partir da análise de variância (ANOVA) das contagens de células vegetativas e de esporos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação da formação de biofilme de *C. difficile*.

Fatores	Células vegetativas			Células esporuladas	
	GL	QM	p	QM	p
Inóculo (I)¹	1	56,157	0,000*	25,613	0,000*
Temperaturas (T)²	1	14.884	0,000*	11,451	0,000*
Matrizes (M)³	2	5.576	0,000*	2,942	0,000*
Tempo (t)⁴	4	4.778	0,000*	8,175	0,000*
Interação (I*T)	1	0,610	0,039*	1,602	0,028*
Interação (I*M)	2	0,003	0,981	0,151	0,630
Interação (T*M)	2	1,334	0,000*	0,017	0,949
Interação (I*t)	4	1,400	0,000*	4,083	0,000*
Interação (T*t)	4	0,183	0,274	3,487	0,000*
Interação (M*t)	8	0,057	0,916	0,082	0,979
Interação (I*T*M)	2	0,073	0,597	0,468	0,241
Interação (I*T*t)	4	0,417	0,022*	1,472	0,001*
Interação (I*M*t)	8	0,072	0,846	0,222	0,707
Interação (T*M*t)	8	0,082	0,789	0,039	0,998
Interação (I*T*M*t)	8	0,087	0,760	0,111	0,948
Erro	120	0,141		0,326	

GL: Graus de liberdade; QM: Quadrados médios; p: Probabilidade de significância < 0,05.

*Apresentam diferença significativa ao nível de 0,05 ($p \leq 0,05$).

¹ Tipo de inóculo: VPI 10463 e LHCD 809.

² Temperaturas de incubação: 15 °C e 25 °C.

³ Matrizes de condicionamento do aço inoxidável: BHI, BHI modificado com pH 5,6 - 5,8 e BHI alterado com cisteína.

⁴ Tempo: 2, 4, 6, 8 e 10 dias de armazenamento.

Observa-se pelos resultados das contagens de células vegetativas e esporuladas apresentados na **Tabela 5** que as interações entre os inóculos, as matrizes, as temperaturas e o tempo de exposição afetaram significativamente a adesão e formação de biofilme por *C. difficile* ($p \leq 0,05$).

Independente das matrizes empregadas para o condicionamento dos cupons de aço inoxidável e as temperaturas de estocagem, observa-se que houve diferença significativa

entre a adesão e formação de biofilmes de células vegetativas - VPI 10463 (3,57 log UFC/cm²) e LHCD 809 (2,45 log UFC/cm²) e esporuladas VPI 10463 (3,16 log esporos/cm²) e LHCD 809 (2,43 log esporos/cm²), conforme observado na **Figura 15**. A cepa VPI 10463 apresentou maior adesão de células vegetativas e esporos.

O menor grau de adesão da cepa isolada de amostra de carne de frango *in natura* – LHCD 809 quando comparado com a cepa de *C. difficile* VPI 10463 pode estar relacionado às distintas características das cepas, afirmativa esta apoiada na literatura que sugere que a adesão ao aço inoxidável é cepa-dependente (ELHARIRY, 2011; FAILLE et al., 2001; FAILLE et al., 2010a; FAILLE et al., 2010b,; SEALE et al., 2008).

Varga et al. (2008), observaram diferenças quanto à capacidade de formação de biofilme entre algumas cepas de *C. perfringens*. Este fato foi atribuído à mutação nos genes *pilT* e *pilC* que afetaria a produção de pili na superfície da membrana bacteriana. A ausência destes pilis dificulta a ancoragem de micro-organismos em superfícies sólidas e semi-sólidas, reduzindo assim, a densidade celular em um biofilme. Os autores sugerem ainda a existência de uma complexa rede de regulação, onde a bactéria é capaz de gerenciar a resposta, de acordo com os níveis de carboidratos, e escolher a via mais vantajosa para a sua sobrevivência. Quando os carboidratos exógenos são limitados, a bactéria pode responder produzindo esporos ou utilizar os pilis para deslizar e ancorar sobre superfícies.

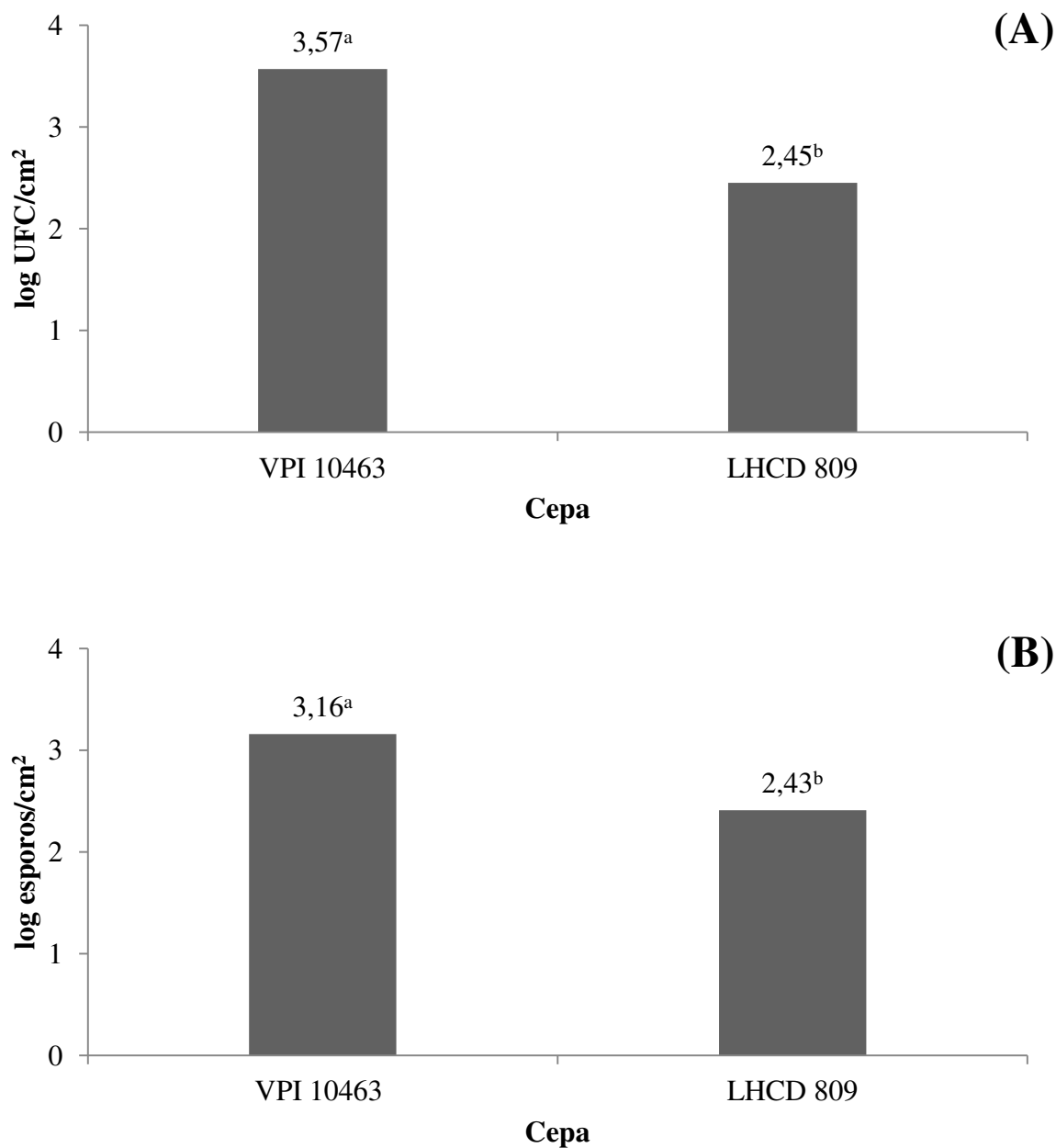


Figura 15. Médias de contagens de *C. difficile* (VPI 10463 e LHCD 809): (A) células vegetativas e (B) esporos (log UFC ou esporos/cm²) aderidas à superfície de aço inoxidável.

^{a, b} Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ainda analisando a **Figura 15**, pode-se observar que tanto a cepa proveniente de amostra de carne de frango resfriada – LHCD 809, como a cepa VPI 10463 apresentaram capacidade de adesão ao cupom de aço inoxidável acondicionados em todas as matrizes

utilizadas nos experimentos, sendo que o processo de adesão foi significativamente diferente para as matrizes utilizadas, tanto para contagens de células vegetativas como para contagem de células esporuladas (**Figura 16**). As células vegetativas (VPI 10463 e LHCD 809) apresentaram maior grau de adesão em caldo BHI modificado com cisteína (3,32 log UFC/cm²) do que em caldo BHI (2,98 log UFC/cm²) seguido de caldo BHI modificado com pH 5,6 – 5,8 (2,72 log UFC/cm²). O mesmo foi observado para células esporuladas, uma vez que os esporos apresentaram maior adesão quando condicionados em caldo BHI modificado com cisteína (3,02 log esporos/cm²) do que quando condicionados em caldo BHI (2,77 log esporos/cm²) e BHI modificado com pH 5,6 – 5,8 (2,59 log esporos/cm²). Sugerindo que o acondicionamento em meio de cultura com pH aproximado ao da carne in natura não favorece a adesão de *C. difficile* e que a presença de substâncias redutoras como cisteína favorece a adesão (**Figura 16**).

Grande parte dos micro-organismos cresce melhor em valores de pH em torno de 7,0, poucos crescem em pH inferior a 4,0, sendo as bactérias patogênicas ainda mais exigentes com as possíveis variações (JAY, 2005).

Após a morte de um animal, a quantidade normal de 1 % de glicogênio presente na carne é convertida em ácido lático, o que causa a redução do pH de 7,4 para valores de 5,6. E o pH de carnes provenientes de animais estressados deterioram mais rapidamente, pois o pH final ficará > 5,8 (TARRANT, 1989). O pH ácido (5,6-5,8) da matriz estudada não favoreceu a multiplicação e adesão de *C. difficile* em superfícies de aço inoxidável.

A cisteína é um aminoácido muito utilizado para cultivar micro-organismos estritamente anaeróbios, uma vez que a presença de radical sulfidríla em sua composição confere ao meio um abaixamento do potencial redox (FUKUSHIMA et al., 2003), proporcionando um ambiente mais favorável a multiplicação de *C. difficile* na matriz com adição de cisteína e a consequente capacidade de adesão e formação de biofilme.

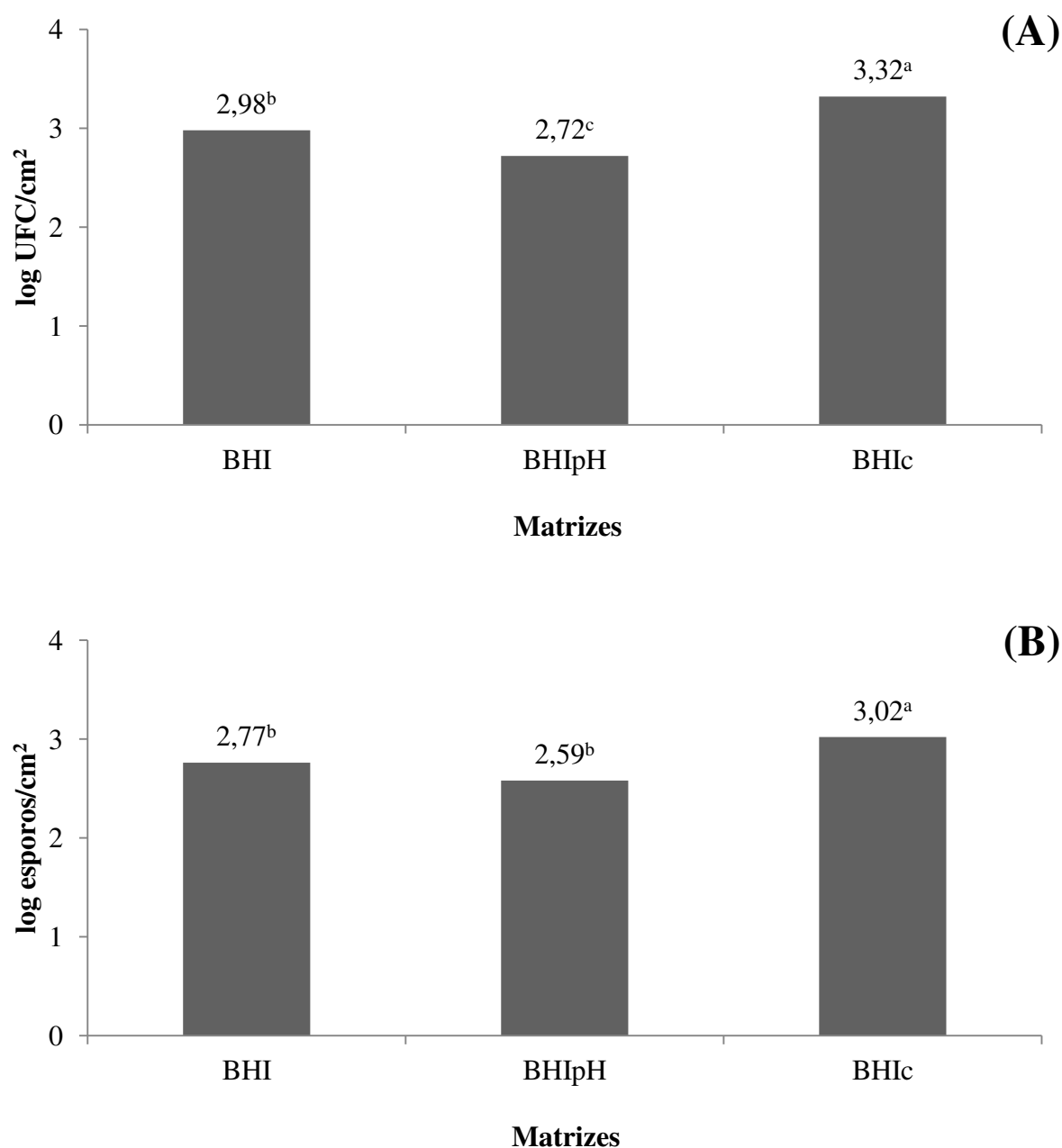


Figura 16. Médias de contagens de *C. difficile* (VPI 10463 e LHCD 809) células vegetativas (A) e esporos (B) (log UFC ou esporos/cm²) aderidos à superfície de aço inoxidável utilizando três meios de culturas.

BHI: *Brain Heart Infusion*; BHI pH: *Brain Heart Infusion* modificado para pH 5,6-5,8; BHIc: *Brain Heart Infusion* modificado com cisteína.

^{a, b} Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Observando-se os resultados da contagem de células vegetativas e células esporuladas (**Tabela 5**) pode-se verificar que a interação entre cepa e temperatura de

armazenamento foi significativa para adesão e formação de biofilmes por *C. difficile* em superfícies de aço inoxidável. A interação entre o inóculo (VPI 10463 e LHCD 809) e a temperatura de armazenamento (15 °C e 25 °C) pode ser observada na **Figura 17 (A e B)**.

Considerando todos os fatores do planejamento experimental, a cepa padrão VPI 10463, na forma vegetativa, apresentou maior capacidade de adesão à temperatura de 25 °C (3,91 log UFC/cm²) quando comparada a mantida a 15 °C (3,22 log UFC/cm²). O mesmo perfil ocorreu com a cepa LHCD 809, a qual apresentou maior grau de adesão a 25 °C (2,68 log UFC/cm²) quando comparado a adesão a 15 °C (2,22 log UFC/cm²).

De forma semelhante, a contagem de células esporuladas de *C. difficile*, a cepa VPI 10463, apresentou maior adesão à temperatura de 25 °C (3,51 log esporos/cm²) quando comparada ao armazenado a 15 °C (2,82 log esporos/cm²). O mesmo ocorreu para cepa LHCD 809, onde a 25 °C houve maior adesão (2,61 log esporos/cm²) quando comparada a armazenamento a 15 °C (2,25 log esporos/cm²). A cepa VPI 10463, tanto na forma vegetativa como na esporulada, apresentou maior capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável em temperaturas de 15 °C e 25 °C, quando comparada a cepa LHCD 809.

As contagens de *C. difficile* foram menores a temperatura de 15 °C, temperatura esta utilizada nas salas de desossa de carnes (BRASIL, 1997), esses resultados demonstraram que apesar do crescimento do micro-organismo ter sido menor a baixas temperaturas, tanto a cepa padrão como o isolado de carnes aderiram à superfície do aço inoxidável. Assim, caso ocorra um aumento na temperatura ele poderá se desenvolver rapidamente e iniciar o processo de formação de biofilme bacteriano, como foi verificado em temperaturas mais altas (25 °C) que caracterizam a temperatura ambiente.

Essa habilidade de adesão, multiplicação e formação de biofilme em aço inoxidável do *C. difficile* quando mantido a 15 °C e 25 °C, já era esperado, uma vez que o *C. difficile* é um micro-organismo mesófilo, com temperatura ótima na faixa de 30-37 °C (RAINEY et al., 2009), mas com habilidade de se multiplicar a 15 °C, como observado anteriormente.

A produção de toxinas e a esporulação são respostas da limitação de nutrientes, porém a relação entre elas é um tema a ser estudado. Existe uma relação direta entre a esporulação e a produção de toxinas, sendo que as cepas com maior produção de toxinas apresentam menor capacidade de esporulação (MERRIGAN et al., 2010).

Em outro estudo, a cepa VPI 10463 apresentou maior dificuldade de esporulação e consequente elevada produção de toxinas, ou seja, apresenta um período prolongado de produção de toxinas e resultando em morte bacteriana antes que a esporulação seja completa (MERRIGAN et al., 2010).

O gene *tcdC*, é um gene presente no *PaLoc* que atua como regulador negativo na produção de toxinas, este gene é expresso durante a fase exponencial e a expressão diminui à medida que desacelera o crescimento (COIGNARD et al., 2006) – fase estacionária, onde há maior produção de toxinas; sugerindo que o gene *tcdC* possa influenciar não apenas a produção de toxinas como também influenciar na capacidade de esporulação.

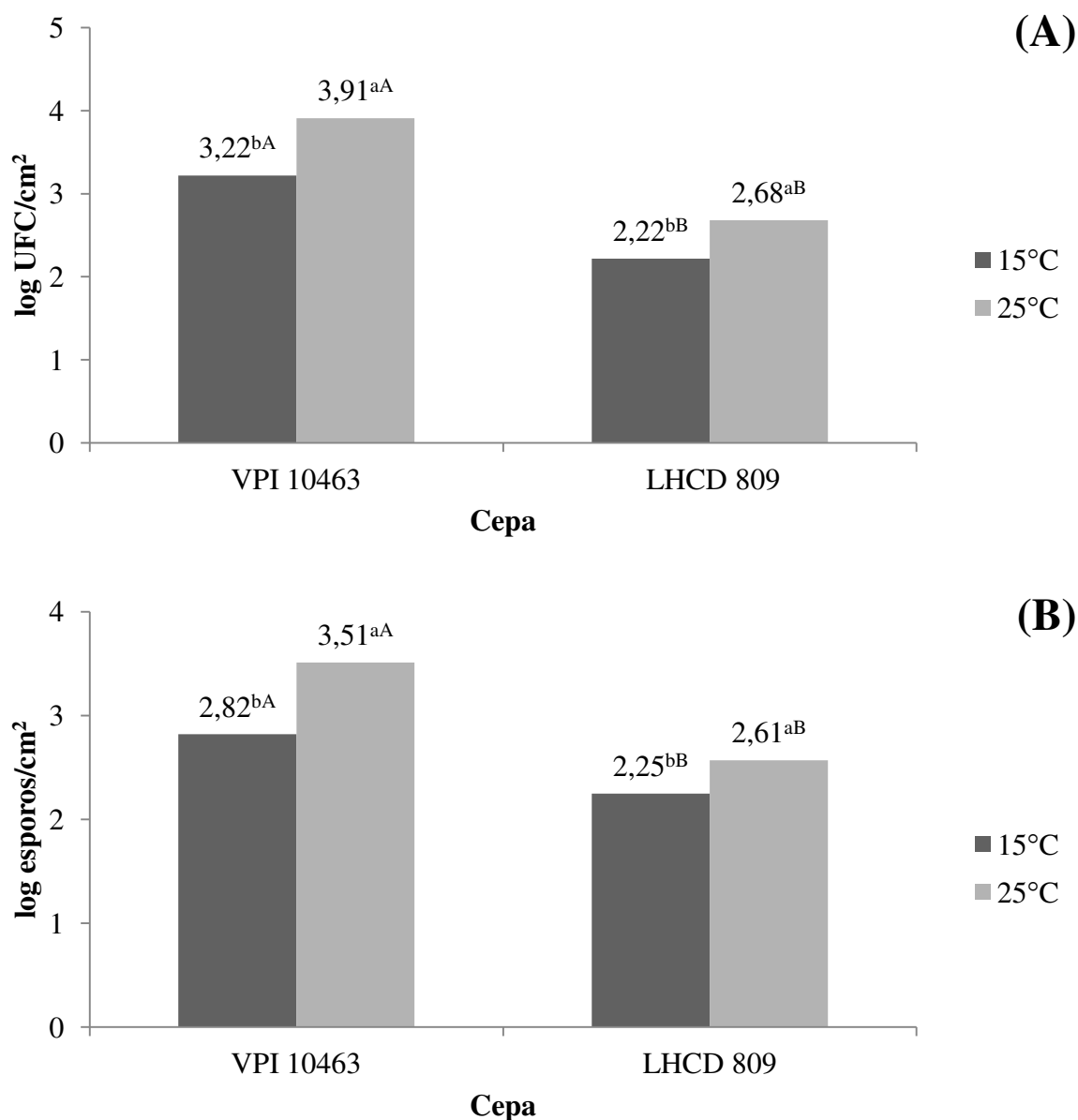


Figura 17. Médias das contagens de células vegetativas (A) e esporos (B) (VPI 10463 e LHCD 809) (log UFC ou esporos/cm²) aderidos na superfície do aço inoxidável a duas temperaturas de incubação.

^{a, b} Para cada tipo de cepa, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^{A, B} Para cada temperatura, letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Limite de detecção = 0,7 log₁₀ UFC ou esporos/cm².

Ao avaliar diferentes matrizes como meios de cultivo para adesão e formação de biofilme por *C. difficile*, pode-se observar na **Tabela 6** que as maiores contagens foram obtidas no meio BHI modificado com cisteína (BHlc), para 15 °C e 25 °C, cujos valores foram 3,20 e 3,44 log UFC/cm², respectivamente, significativamente diferentes de BHI e BHIpH.

Houve diferença significativa entre as temperaturas envolvidas no experimento, em que as maiores contagens de células vegetativas aderidas à superfície foram obtidas a temperatura de 25 °C, quando comparadas com a temperatura de 15 °C, para todas as matrizes avaliadas. Como dito anteriormente, o *C. difficile* é um micro-organismo mesófilo, anaeróbio estrito, e consequentemente para sua multiplicação e adesão de células vegetativas em superfícies, é necessário que o meio esteja reduzido, e a cisteína é capaz de manter um baixo potencial redox (FUKUSHIMA et al., 2003), desta forma, justifica-se a maior adesão de *C. difficile* em meio BHI modificado com adição deste aminoácido a temperatura de 25 °C.

As menores contagens de células vegetativas foram obtidas no meio com alteração de pH, possivelmente pela dificuldade de desenvolvimento do micro-organismo em pH 5,6 - 5,8.

Embora alguns micro-organismos, possuam mecanismos de resistência aos ambientes ácidos como alteração da composição da membrana celular, translocação de prótons para o interior do citoplasma - causando o aumento do pH intracelular, descarboxilação de alguns aminoácidos - controlando o pH do ambiente entre outros mecanismos. Estes mecanismos não estão presentes na maioria das bactérias Gram positivas (COTTER; HILL, 2003).

Para a adesão de esporos (considerando todas as variáveis do planejamento experimental), em diferentes matrizes e temperaturas de estocagem, pode-se observar pelos resultados apresentados na **Tabela 5** que não houve diferença significativa para contagens de esporos aderidas a superfície de aço inoxidável.

Tabela 6. Médias das contagens de células vegetativas de *Clostridium difficile* (log UFC/cm²) aderidas na superfície do aço inoxidável utilizando três meios de cultura em diferentes temperaturas de incubação.

Matrizes	Temperaturas	
	15 °C	25 °C
BHI	2,65 ^{bB}	3,32 ^{abA}
BHIpH	2,31 ^{cB}	3,12 ^{bA}
BHlc	3,20 ^{aB}	3,44 ^{aA}

Matrizes: BHI: *Brain Heart Infusion*; BHIpH: *Brain Heart Infusion* modificado para pH 5,6-5,8; BHlc: *Brain Heart Infusion* modificado com cisteína.

^{a, b} Médias na mesma coluna, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^{A, B} Médias na mesma linha, letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Limite de detecção = 0,7 log₁₀ UFC/cm².

Ao analisar a interação entre a temperatura de estocagem ao longo de 10 dias, observa-se pelos resultados na **Tabela 5**, que não houve diferença significativa para contagens de células vegetativas aderidas na superfície do aço inoxidável. Entretanto houve diferença significativa para contagens de esporos aderidas (**Figura 18**), considerando-se os dois micro-organismos, VPI 10463 e LHCD 809, e as três matrizes utilizadas, BHI, BHlc e BHIpH. A 25 °C observa-se maior adesão de esporos quando comparada a 15 °C com um aumento de 1,65 log esporos/cm² ao longo de 10 dias, cujos valores foram 2,18 e 3,83 log esporos/cm² nos tempos 2 e 10 dias, respectivamente.

Dawson et al. (2012) observaram que biofilmes de 6 dias apresentavam maior número de esporos em relação aos biofilmes de 3 dias, evidenciando a composição heterogenia, ou seja, presença de células vegetativas e esporuladas de *C. difficile* durante a formação e amadurecimento do biofilme.

Em relação à temperatura de 15 °C observa-se uma contagem de 2,62 log esporos/cm² de células aderidas no 2º dia, e uma ligeira queda no 4º dia. A partir do 6º dia pode-se observar um aumento de 0,87 log esporos/cm² nas contagens de esporos aderidas na superfície do aço inoxidável, e ao final de 10º dia de adesão, observamos uma contagem de 2,97 log esporos/cm², valor este significativamente igual a contagens de células aderidas no 2º dia.

A etapa de esporulação de clostrídios inicia-se no final da fase exponencial de crescimento. Em geral a privação de nutrientes disponíveis no meio, leva à formação de esporos na maioria dos micro-organismos Gram positivos esporulantes, porém no caso de clostrídios a produção de acetato e butirato, resultantes do metabolismo anaeróbio são os principais responsáveis pela esporulação (DÜRRE; HOLLERGSCHWANDNER, 2004). Tais moléculas se difundem de forma não dissociada, através da membrana citoplasmática, alterando o pH intracelular de bactérias anaeróbias, causando o colapso de proteínas transmembrana e levando os micro-organismos à morte, mesmo na presença de nutrientes. Os clostrídios possuem uma sinalização ainda desconhecida, que detecta a presença destas moléculas e inicia o processo de esporulação (DÜRRE, 2005; DÜRRE; HOLLERGSCHWANDNER, 2004). Desta forma, micro-organismos do gênero *Clostridium* mesmo na presença de nutrientes, podem iniciar a formação de esporos se proteínas ácidas específicas forem detectadas no meio.

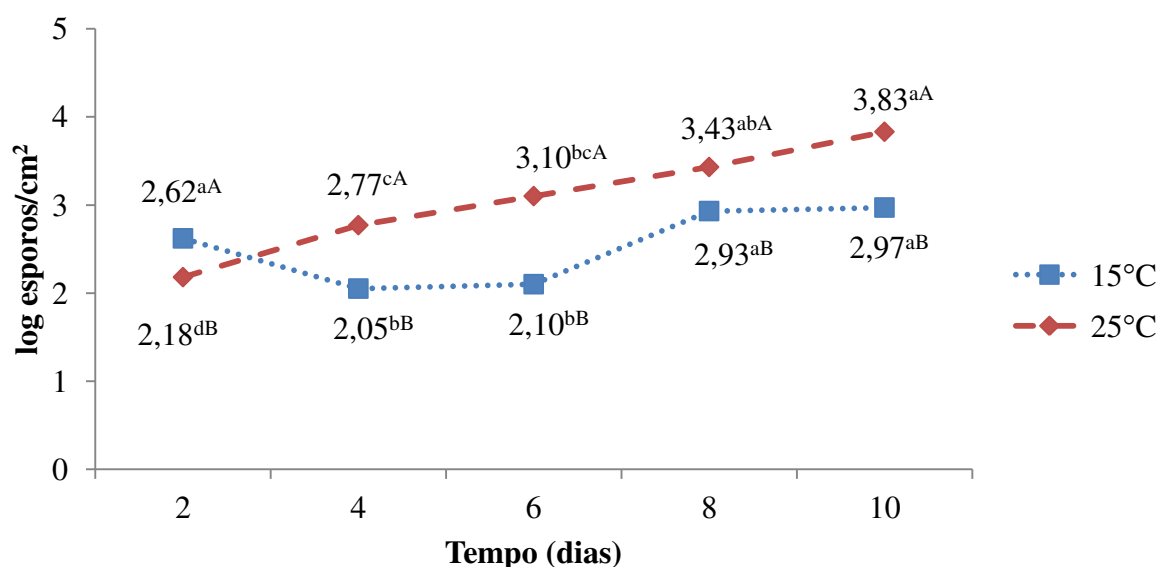


Figura 18. Médias das contagens de esporos de *C. difficile* (log esporos/cm²) aderidas em superfícies de aço inoxidável ao longo de um período de 10 dias a duas temperaturas de incubação, considerando todos os fatores do planejamento experimental.

^{A, B} Para cada tempo, letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^{a, b, c} Para cada temperatura, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Limite de detecção = 0,7 log₁₀ esporos /cm².

As médias de contagens de células sésseis de *C. difficile* em superfícies de aço inoxidável ao longo do tempo (considerando todas as matrizes e temperaturas) estão dispostas na **Figura 19**, para a cepa VPI 1063 (A) e para o isolado LHCD 809 (B).

Quanto ao tempo de exposição ao longo de 10 dias, observa-se na **Figura 19** que independentemente do inóculo houve uma diferença significativa ao longo do tempo de exposição, e aos 6 dias, constatou-se maior adesão de células vegetativas. Para a cepa VPI 10463 (**Figura 19A**) esse aumento foi de 0,95 log UFC/cm² entre tempo 2 e 6 dias, cujos valores foram de 3,10 e 4,05 log UFC/cm², e houve um decréscimo não significativo de 0,26 log esporos/cm² no número de células esporuladas aderidas durante o tempo 2 e 6 dias de exposição.

Sugerindo que os esporos podem estar germinando e/ou havendo a multiplicação de células vegetativas, resultando assim na maior contagem de células vegetativas aderidas, ou seja, o aumento de células vegetativas não é proporcional à queda de esporos.

Ainda para contagens de células vegetativas, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tempos 4 (3,86 log UFC/cm²), 6 (4,05 log UFC/cm²), e 8 dias (3,80 log UFC/cm²) de adesão e os tempos 2 (3,10 log UFC/cm²) e 10 dias (3,02 log UFC/cm²) foram estatisticamente diferentes entre os tempos 4, 6 e 8 dias. Houve um decréscimo de contagens de células vegetativas de 1,03 log UFC/cm² entre os tempos 6 (4,05 log UFC/cm²) e 10 dias (3,02 log UFC/cm²), a medida em que houve um aumento de 0,53 log esporos/cm² no número de contagens de células esporuladas entre os tempos 6 (2,95 log esporos/cm²) e 10 dias (3,48 log esporos/cm²), ou seja, quando houve um aumento no número de células vegetativas aderidas, houve um decréscimo nas contagens de células esporuladas, sugerindo que com a escassez de nutrientes nas matrizes as células vegetativas esporularam como forma de proteção e sobrevivência.

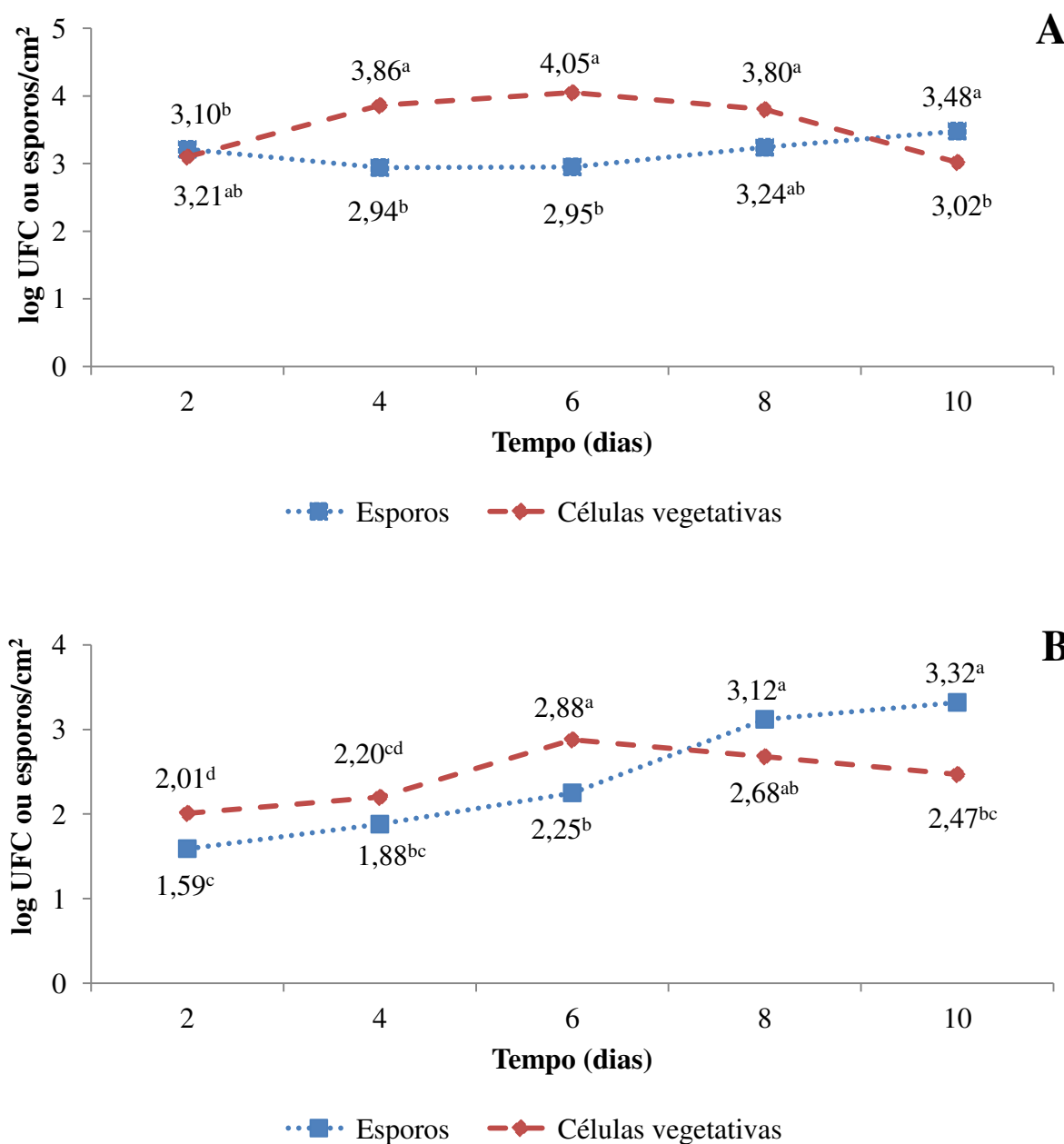


Figura 19. Médias das contagens de células vegetativas e esporuladas de *Clostridium difficile* VPI 10463 (A) e LHCD 809 (B) (log UFC ou esporos/cm²) aderidas em superfícies de aço inoxidável ao longo de 10 dias de exposição.

a, b, c Para cada forma de células, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Limite de detecção = $0,7 \log_{10}$ UFC ou esporos/cm².

O aumento do grau de adesão de esporos de LHCD 809 ocorreu de forma gradativa ao longo do tempo de exposição, sendo que aos 2 dias a adesão foi de 1,59 log esporos/cm² e aos 10 dias foi de 3,32 log esporos/cm², desta forma no período total de 10 dias o incremento maior ocorreu com a cepa LHCD 809, da ordem de 1,73 log esporos/cm².

Não existe um consenso entre pesquisadores com relação ao número de células aderidas de referência para ser considerado um biofilme, Ronner e Wong (1993) consideram que para ser denominado biofilme, o número mínimo de células aderidas deve ser de 10⁵ UFC/cm², enquanto que Wirtanen et al. (1996) consideram como biofilme 10³ células aderidas/cm².

Portanto, considerou-se a teoria de Wirtanen et al. (1996), para o nosso estudo, a cepa VPI 10463 poderia ser considerada formadora de biofilmes na superfície de aço inoxidável já no 2º dia, por apresentar 3,10 log UFC/cm² e 3,21 log esporos/cm² para células vegetativas e esporuladas, respectivamente, e atingindo contagens de 4,05 log UFC/cm² no 6º dia para células vegetativas e 3,48 log esporos/cm² no 10º dia para esporos.

Para as duas cepas avaliadas em nossa pesquisa a máxima população de células vegetativas aderidas ocorreu no 6º dia de contato. Este ponto de inflexão máximo das curvas apresentadas na **Figura 19**, a nosso ver poderia representar um valor de referência para definir uma contagem característica da formação do biofilme destes dois isolados de *C. difficile*. Neste mesmo tempo (ponto de inflexão mínimo), a população na forma esporulada retoma o crescimento, como resultado da esporulação à medida em que reduz o número de células vegetativas. Em particular, a quantidade de células vegetativas na adesão e formação do biofilme para o isolado de carnes LHCD 809 (**Figura 19B**), atingiu incrementos da ordem de 0,87 log UFC/cm² do 2º ao 6º dia, enquanto que a cepa padrão VPI 10463 observou-se um incremento de 0,95 log UFC/cm².

A cepa LHCD 809 embora não tenha atingido níveis de contagens de células vegetativas superiores a 3 ciclos log, poderia ser considerada formadora de biofilmes pela existência de uma estrutura multiforme constituída de esporos e células vegetativas. Considerando a somatórias das populações (forma vegetativa e esporos) o biofilme atinge valores em torno de 3,25 e 3,37 ciclos log no 8º e 10º dia, respectivamente. Assim, essa condição e característica multiforme devem ser consideradas nas definições e pesquisas de biofilmes de micro-organismos que apresentam capacidade de esporulação e de formação de biofilmes.

As primeiras pesquisas envolvendo a capacidade de formação de biofilmes por bactérias do gênero *Clostridium* em superfícies abióticas foram realizadas por Varga et al. (2008) que observaram pela primeira vez que as cepas de *C. perfringens*, sob condições anaeróbias, eram capazes de formar biofilmes planos com células envoltas por uma densa matriz extracelular. Observaram também que quando o biofilme formado era exposto a condições aeróbias por até 24 horas, a sobrevivência de *C. perfringens* presente no biofilme era de 76,6 %, enquanto na forma de células planctônicas a sobrevivência à exposição ao oxigênio em um mesmo período de tempo foi de 9,2 %. Mostrando que é possível um micro-organismo anaeróbio permanecer viável em condições aeróbias.

A formação de biofilmes por *C. estertheticum* já foi avaliada por Kawaichi (2010) e confirmou que o micro-organismo foi capaz de formar biofilmes a 10 °C após 7 dias de contato com a superfície de aço inoxidável.

As infecções causadas por *C. difficile* (CDAD) estão diretamente relacionados com a formação de biofilmes no intestino de animais e humanos. A primeira indicação da adesão de *C. difficile* no intestino humano foi obtida em 1979, após a recuperação de uma amostra de biópsia lavada de um paciente com colite pseudomembranosa (BORRIELO, 1979).

Crowther et al. (2014) avaliaram a formação de biofilmes *in vitro* através de um modelo de intestino projetado para facilitar a formação de biofilmes e inocularam uma emulsão fecal humana contendo *C. difficile*. Os pesquisadores observaram a formação de biofilme e que as células vegetativas eram inibidas por antibióticos, porém os esporos eram resistentes, e sua dispersão para o lúmen intestinal após a intervenção terapêutica causa infecções recorrentes.

Alguns autores, demonstraram que a formação de biofilme de *C. difficile* pode ser modulada por reguladores centrais dos genes Spo0A e LuxS, por componentes de superfícies tais como as adesinas, e por meio da regulação da motilidade (DAWSON et al., 2012; PANTALÉON et al., 2015; TASTEYRE et al., 2001). No entanto, este resultado evidencia que a aderência bacteriana ao hospedeiro é um processo multifatorial (JANOIR, 2016; PURCELL et al., 2012).

No entanto, mais estudos devem ser realizados para entender o real mecanismo de adesão e formação de biofilmes por clostrídios.

Diante do exposto, pode-se afirmar que cepas de *C. difficile* são capazes de aderir e formar biofilmes sob a superfície de aço inoxidável, e a sua estrutura multiforme pode apresentar condições viáveis de sobrevivência sobre a superfície de equipamentos e utensílios durante o processo de desossa de carnes.

5.3 Estratégias para controle e eliminação de *C. difficile*

5.3.1 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilmes de *C. difficile*

A partir dos resultados obtidos do estudo da adesão e formação de biofilme por *C. difficile* na superfície de aço inoxidável em diferentes matrizes a 15 °C e 25 °C, selecionou-se a melhor condição de formação do biofilme (BHIC, por 6 dias de contato) para avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes na remoção dos biofilmes. A eficiência dos quatro sanitizantes na remoção dos biofilmes formados pela cepa VPI 10463 e o isolado LHCD 809 estão apresentados nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7. Média e desvio padrão da contagem de células vegetativas e esporos em biofilmes da cepa de *C. difficile* VPI 10463 formados em superfícies de aço inoxidável condicionados em caldo BHI modificado com cisteína, mantidos a 15 °C e 25 °C por 6 dias e submetidos a ação de sanitizantes.

T ¹ (°C)	S ²	Controle (log UFC ou esporos/cm ²)		Contagem após tempo de contato ³ (log UFC ou esporos/cm ²)		Redução (log UFC ou esporos/cm ²)	
		Vegetativas	Esporos	Vegetativas	Esporos	Vegetativas	Esporos
15	AP			1,36±0,16 ^c	1,75±0,09 ^b	2,51±0,25	1,59±0,16
	HS	3,87±0,09	3,34±0,10	1,11±0,10 ^c	1,42±0,08 ^c	2,75±0,18	1,92±0,13
	BG			2,74±0,27 ^b	3,20±0,11 ^a	1,13±0,24	0,14±0,02
	QA			3,22±0,05 ^a	3,19±0,19 ^a	0,65±0,07	0,15±0,20
25	AP			2,33±0,16 ^b	2,21±0,17 ^b	1,97±0,08	1,40±0,15
	HS	4,30±0,09	3,61±0,17	2,03±0,38 ^b	1,99±0,09 ^b	2,27±0,30	1,62±0,17
	BG			3,94±0,07 ^a	3,45±0,13 ^a	0,37±0,08	0,16±0,27
	QA			4,01±0,07 ^a	3,36±0,21 ^a	0,29±0,14	0,25±0,22

¹Temperatura: 15 °C e 25 °C.

²Sanitizantes: AP: Ácido peracético (0,03 %); HS: Hipoclorito de sódio (1 %); BG: Biguanida (0,03 %); QA: Quaternário de amônio (0,45 %).

³Tempo de contato: 10 min.

^{a, b, c} Médias na mesma coluna e temperatura, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diante dos dados apresentados na **Tabela 7**, para contagens de células vegetativas e esporos aderidos na superfície do aço inoxidável após o tempo de contato (15 °C e 25 °C), o sanitizante ácido peracético e hipoclorito de sódio diferiram do quaternário de amônio e biguanida ($p \leq 0,05$).

Para o biofilme formado por *C. difficile* VPI 10463, observou-se que os sanitizantes à base de hipoclorito de sódio e ácido peracético, quando utilizados nas concentrações de uso recomendada pelos fabricantes e tempo de contato de 10 min obteve as maiores reduções de células viáveis (esporos e vegetativas) de biofilmes de 6 dias de

formação na superfície de aço inoxidável. A 15 °C, para o hipoclorito de sódio ocorreu a redução de $2,75 \pm 0,18 \log \text{ UFC/cm}^2$ e $1,92 \pm 0,13 \log \text{ esporos/cm}^2$ para células vegetativas e esporuladas, respectivamente. Para o ácido peracético houve uma redução de $2,51 \pm 0,25 \log \text{ UFC/cm}^2$ e $1,59 \pm 0,16 \log \text{ esporos/cm}^2$ para células vegetativas e esporos, respectivamente. A 25 °C, podemos observar que após a aplicação do hipoclorito de sódio houve uma redução de $2,27 \pm 0,30 \log \text{ UFC/cm}^2$ e $1,62 \pm 0,17 \log \text{ esporos/cm}^2$ para células vegetativas e esporuladas, respectivamente, e reduções de $1,97 \pm 0,08 \log \text{ UFC/cm}^2$ e $1,40 \pm 0,15 \log \text{ esporos/cm}^2$ para células vegetativas e esporos para contagens após a aplicação do ácido peracético sobre biofilmes de *C. difficile* formados em superfícies de aço inoxidável (**Tabela 7**).

Embora o hipoclorito utilizado na concentração de uso de 1 % apresente um teor de cloro residual total - CRT (10.000 mg/L) e pH (11,8) bastante elevados – com cloro 100 % na forma de hipoclorito, ou seja ocorre uma diminuição do efeito antimicrobiano – e devido o seu pH elevado, a sua maior participação seria como agente de limpeza com redução da população do biofilme principalmente por remoção física dos micro-organismos da superfície do aço inoxidável (KUAYE, 2017).

A aplicação dos sanitizantes biguanida e quaternário de amônio foram apresentaram menores reduções nas contagens dos micro-organismos, ou seja, os biofilmes apresentaram-se extremamente resistentes a ação desses sanitizantes.

A aplicação do sanitizante biguanida reduziu as contagens de *C. difficile* em $1,13 \pm 0,24$ e $0,37 \pm 0,08 \log \text{ UFC/cm}^2$ para células vegetativas, quando o biofilme foi formado a 15 °C e 25 °C, respectivamente. A redução de esporos foi inferior, cujos valores foram de $0,14 \pm 0,02$ e $0,16 \pm 0,27 \log \text{ esporos/cm}^2$ para biofilmes formados a 15 °C e 25 °C, respectivamente (**Tabela 7**).

O quaternário de amônio sobre biofilmes de *C. difficile*, formado a 15 °C promoveu a redução de $0,65 \pm 0,07 \log \text{ UFC/cm}^2$ para células vegetativas e $0,15 \pm 0,20 \log \text{ esporos/cm}^2$ para células esporuladas. E para biofilmes formados a 25 °C houve uma pequena redução de $0,29 \pm 0,14 \log \text{ UFC/cm}^2$ e $0,25 \pm 0,22 \log \text{ esporos/cm}^2$ para redução de células vegetativas e esporuladas, respectivamente (**Tabela 7**).

Os compostos de amônio quaternário são efetivos contra micro-organismos Gram positivos, fungos filamentosos e leveduras; a biguanida é efetiva contra micro-organismos Gram positivos e Gram negativos. Entretanto, ambos são pouco efetivos contra esporos (WESSELS; INGMER, 2013). Neste experimento, a baixa ação sobre as células vegetativas

pode ser devido a formação do biofilme, que uma vez formado confere proteção no que se refere à resistência à ação dos sanitizantes químicos, antibióticos, radiação UV e desidratação (ELASRI; MILLER, 1999; LEBERT et al., 2007; RYU; BEUCHAT, 2005).

Tabela 8. Média e desvio padrão da contagem de células vegetativas e esporos de biofilmes da cepa de *C. difficile* LHCD 809 formados em superfícies de aço inoxidável, condicionados em caldo BHI modificado com cisteína, mantidos a 15 °C e 25 °C por 6 dias e submetido a ação de sanitizantes.

T ¹ (°C)	S ²	Controle (log UFC ou esporos/cm ²)		Contagem após tempo de contato (log UFC ou esporos/cm ²)		Redução (log UFC ou esporos/cm ²)	
		Vegetativas	Esporos	Vegetativas	Esporos	Vegetativas	Esporos
15	AP	2,18±0,04	1,68±0,21	1,21±0,08 ^b	1,36±0,14 ^a	0,97±0,10	0,32±0,08
	HS			1,06±0,10 ^b	1,27±0,22 ^a	1,13±0,12	0,41±0,02
	BG			2,00±0,02 ^a	1,56±0,10 ^a	0,18±0,06	0,12±0,11
	QA			1,80±0,12 ^a	1,49±0,33 ^a	0,38±0,16	0,18±0,15
25	AP	3,37±0,03	2,72±0,80	2,23±0,23 ^b	2,11±0,25 ^a	1,14±0,23	0,61±0,57
	HS			1,95±0,37 ^b	1,56±0,26 ^a	1,42±0,35	1,16±0,60
	BG			3,05±0,15 ^a	2,73±0,74 ^a	0,32±0,15	0,01±0,08
	QA			3,00±0,19 ^a	2,62±0,86 ^a	0,37±0,21	0,10±0,07

¹Temperatura: 15 °C e 25 °C.

²Sanitizantes: AP: Ácido peracético (0,03 %); HS: Hipoclorito de sódio (1 %); BG: Biguanida (0,03 %); QA: Quaternário de amônio (0,45 %).

^{a, b} Médias na mesma coluna e temperatura, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as contagens de células vegetativas aderidas após a utilização dos sanitizantes, o sanitizante ácido peracético e hipoclorito de sódio diferiram do quaternário de amônio e biguanida. Em relação à contagem de esporos aderidos na superfície do aço inoxidável, podemos observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) os sanitizantes utilizados (**Tabela 8**).

Em relação à contagem de células vegetativas aderidas na superfície do aço inoxidável após o tempo de contato do biofilme formado pela cepa LHCD 809 (**Tabela 8**) para ambas as temperaturas, podemos observar que o sanitizante a base de ácido peracético e hipoclorito de sódio diferiram do quaternário de amônio e da biguanida ($p \leq 0,05$).

No biofilme formado a 15 °C, podemos observar que houve uma redução de $1,13 \pm 0,12 \log \text{UFC/cm}^2$ e $0,97 \pm 0,10 \log \text{UFC/cm}^2$, apresentando uma contagem de $1,06 \pm 0,10$ e $1,21 \pm 0,08 \log \text{UFC/cm}^2$ para células vegetativas, após o tempo de contato do hipoclorito de sódio e ácido peracético, respectivamente. Para o biofilme formado a 25 °C, após a aplicação do hipoclorito de sódio, houve uma redução de $1,42 \pm 0,35 \log \text{UFC/cm}^2$ e $1,14 \pm 0,23 \log \text{UFC/cm}^2$ para contagens de células vegetativas após a aplicação do hipoclorito de sódio e ácido peracético, respectivamente (**Tabela 8**).

A ação do hipoclorito de sódio em células vegetativas é devido à penetração do ácido hipocloroso através da membrana celular e oxidação dos grupos sulfidrílicos (-SH) de algumas enzimas que são importantes para a via glicolítica, e também reagem com compostos nitrogenados da membrana celular formando substâncias cloro – nitrogenadas tóxicas as células (ANDRADE et al., 2008).

A ação do hipoclorito de sódio sobre esporos é devido à alteração causada pelo ácido hipocloroso na permeabilidade da capa do esporo, levando a germinação do esporo e o cloro inativa o esporo germinado. Outra hipótese seria que após a alteração na permeabilidade da capa, o cloro oxidaria os demais constituintes do esporo até atingir o protoplasma, onde estão presentes o DNA, RNA e enzimas essenciais para a germinação do esporo (ANDRADE et al., 2008).

Desinfetantes à base de hipoclorito de sódio formam o ácido hipocloroso (HOCl, forma mais ativa) em solução e a sua atividade é drasticamente afetada pelo pH. Em pH 5, quase todo o cloro está na forma HOCl. Em pH 7,0, aproximadamente 75 % é HOCl. À medida que o pH atinge valores superiores a 10 devido a alcalinidade do meio ocorre uma diminuição do efeito antimicrobiano sendo que o cloro na forma dissociada (OCl^- , íon hipoclorito) é cerca de 80 vezes menos efetiva, quando comparada a forma não dissociada (HOCl). Porém, quanto menor o pH, maior é o efeito corrosivo sobre superfícies de aço inoxidável, limitando o seu uso em pH próximo a neutralidade (KUAYE, 2017).

A concentração recomendada pelo fabricante é de 1 % (10.000 mg/L) de cloro disponível e a concentração recomendada para tratamento de superfícies que entram em

contato com alimentos é de 0,01-0,02 % (100 -200 mg/L) (KUAYE, 2017). A concentração de 1 % é muito utilizada para superfícies da área hospitalar (FERREIRA et al., 2013). Neste experimento utilizou-se essa concentração, pois pressumia-se que a contaminação seria muito alta, principalmente quando se trata de biofilmes bacterianos.

Em relação à aplicação do ácido peracético, a redução de aproximadamente 2,51 e 1,97 ciclos log (para células vegetativas da cepa VPI 10463, a 15 °C e 25 °C, respectivamente) e 0,97 e 1,14 ciclos log (para células vegetativas aderidas da cepa LHCD 809, a 15 °C e 25 °C, respectivamente) pode ser justificado pela característica de ser um forte agente oxidante e não interagir com resíduos de matéria orgânica (ANDRADE et al., 2008).

O ácido peracético é considerado um dos sanitizantes mais efetivos no combate a biofilmes bacterianos e sua alta eficiência tem sido atribuída a grande capacidade de oxidação do material celular (MARQUES et al., 2007; ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Alguns autores demonstraram a eficiência do uso do ácido peracético na remoção de biofilmes de *Clostridium estertheticum* (KAWAICHI, 2010) e outros micro-organismos aeróbios (HOLAH et al., 1990; ROSADO, 2009). Entretanto, outros estudos demonstraram que o ácido peracético foi menos eficiente na remoção de biofilmes quando comparado a outros sanitizantes (KRÓLASIK et al., 2010; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Os sanitizantes, biguanida e quaternário de amônio promoveram uma baixa ou nenhuma redução nas contagens de esporos de *C. difficile*. A contagem de esporos do biofilme controle foi de $1,68 \pm 0,21$ e $2,72 \pm 0,80$ log esporos/cm² para biofilmes formados a 15 °C e 25 °C. Em biofilmes formados a 15 °C, a aplicação da biguanida e quaternário de amônio no biofilme formado resultaram em uma baixa redução nas contagens de esporos, cujos valores foram de $0,12 \pm 0,11$ e $0,18 \pm 0,15$ log esporos/cm², respectivamente. Nos biofilmes formados a 25 °C, a contagem de esporos após a aplicação do sanitizante foi de $2,73 \pm 0,74$ log esporos/cm² para o sanitizante biguanida e $2,62 \pm 0,86$ log esporos/cm² após a aplicação do quaternário de amônio, cujas reduções foram de $0,01 \pm 0,08$ e $0,10 \pm 0,07$ log esporos/cm² (**Tabela 8**).

Em contrapartida para células vegetativas esses sanitizantes apresentaram uma redução moderada, para o biofilme formado a 15 °C a contagem de células vegetativas do biofilme controle foi de $2,18 \pm 0,04$ log UFC/cm² e as reduções foram de $0,18 \pm 0,06$ e $0,38 \pm 0,16$ log UFC/cm² para o sanitizante biguanida e quaternário de amônio, respectivamente. Para o biofilme formado a 25 °C, a contagem do controle foi de $3,37 \pm 0,03$

log UFC/cm² e as contagens após a aplicação dos sanitizantes foram de 3,05±0,15 e 3,00±0,19 log UFC/cm², cujas reduções foram de 0,32±0,15 e 0,37±0,21 log UFC/cm² para sanitizante biguanida e quaternário de amônio, respectivamente (**Tabela 8**).

A aplicação do hipoclorito de sódio apresentou redução de células vegetativas e esporuladas aderidas na superfície de aço inoxidável, para a cepa LHCD 809, que conforme dito anteriormente ocorreu por efeito da elevada ação de limpeza devido a alcalinidade cáustica.

Por sua vez, a biguanida e o quaternário de amônio não foram eficientes para remover o biofilme de *C. difficile* formado após 6 dias de contato em temperaturas de 15 °C e 25 °C, o que possivelmente pode ser explicado pela presença de uma matriz extracelular de polissacarídeos (EPS) que conferem resistência quando expostos a escoamento de líquidos e agentes de higienização, como os sanitizantes (SIMÕES et al., 2010). Normalmente as indústrias de alimentos realizam uma avaliação laboratorial dos sanitizantes a serem utilizados. No entanto, na maioria das vezes, apenas suspensões microbianas são avaliadas, não considerando a adesão e formação do biofilme (PENG et al., 2002).

A aplicação isolada de sanitizantes não foi suficiente para a remoção total dos biofilmes, entretanto, reduziram as contagens de *C. difficile*. Isso ocorreu porque após 6 dias, o biofilme apresenta uma matriz bem estruturada e protegida, na qual os sanitizantes não conseguem penetrar e atingir todas as células viáveis (vegetativas e esporuladas) (SIMÕES et al., 2010). Desta forma, destaca-se a importância da aplicação de um processo completo de higienização, incluindo a ação de detergentes (ácidos e alcalinos), no qual tem a função de remover a matriz de nutrientes, EPS e alguns minerais caso estejam presentes, facilitando a ação de sanitizantes que poderão reduzir as contagens de micro-organismos para níveis aceitáveis tornando a superfície mais segura (FORSYTHE, 2013).

Concomitantemente ao processo de higienização deve ser empregado um sistema de ação mecânica, no qual as células fracamente ligadas ou envoltas na matriz do biofilme seriam liberadas, levando à diminuição das contagens do *C. difficile* e evitando uma nova adesão.

As células de *C. difficile* (vegetativas e esporos) aderidas ao aço inoxidável mostraram-se resistentes a ação dos sanitizantes (quaternário de amônio e biguanida). Quando se avalia os resultados encontrados no trabalho, onde os valores são expressos em log UFC ou esporos/cm², os resultados tornam ainda mais preocupantes, uma vez que ao se pensar em

uma área total de utensílios e equipamentos utilizados durante o processamento de carnes, esse valor se torna ainda mais crítico para contaminação de alimentos.

Assim a melhor forma de controle é a prevenção, como a adoção de ferramentas como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), para que se possa garantir a inocuidade dos alimentos processados.

5.3.2 Avaliação da atividade esporicida de sanitizantes sobre cepas de *C. difficile*

5.3.2.1 Avaliação da eficiência de sanitizantes a base de hipoclorito de sódio, ácido peracético, biguanida e quaternário de amônia sobre esporos de *C. difficile*

Por ser um micro-organismo anaeróbico, *C. difficile* pode estar presente nas linhas de processamento de alimentos na forma esporulada. Desta forma, esporos de *C. difficile* foram colocados em contato com diferentes sanitizantes (ácido peracético, hipoclorito de sódio, biguanida e quaternário de amônio), para verificar o efeito esporicida desses sanitizantes.

Na **Figura 20** (A e B), estão expostos os gráficos representativos do efeito esporicida de sanitizantes contra esporos de *C. difficile* cepa VPI 10463 e LHCD 809, após 5, 15 e 30 min de contato.

Para a avaliação da eficiência do ácido peracético e hipoclorito de sódio a contagem da suspensão de esporos foi de 7,38 log esporos/mL para cepa VPI 10463 e 6,73 log esporos/mL para cepa LHCD 809.

A contagem da suspensão de esporos para a avaliação do teste esporicida para biguanida e quaternário de amônia foi de 6,81 log esporos/mL para VPI 10463 e 7,00 log esporos/mL para LHCD 809.

Pelo teste da União Europeia prEN14347 o sanitizante é considerado esporicida quando apresenta um fator de inativação de no mínimo 4,0 log esporos/mL.

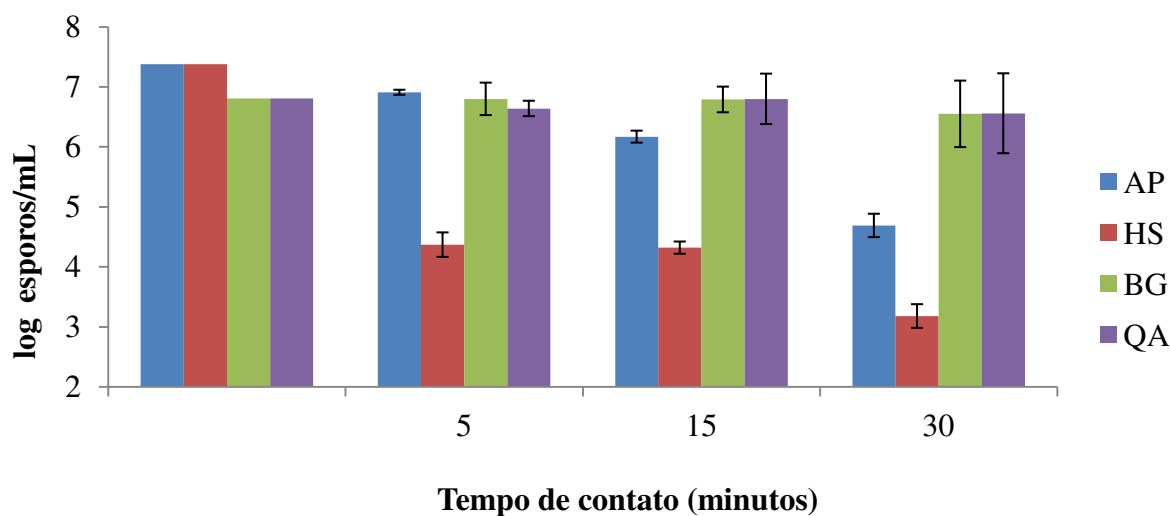
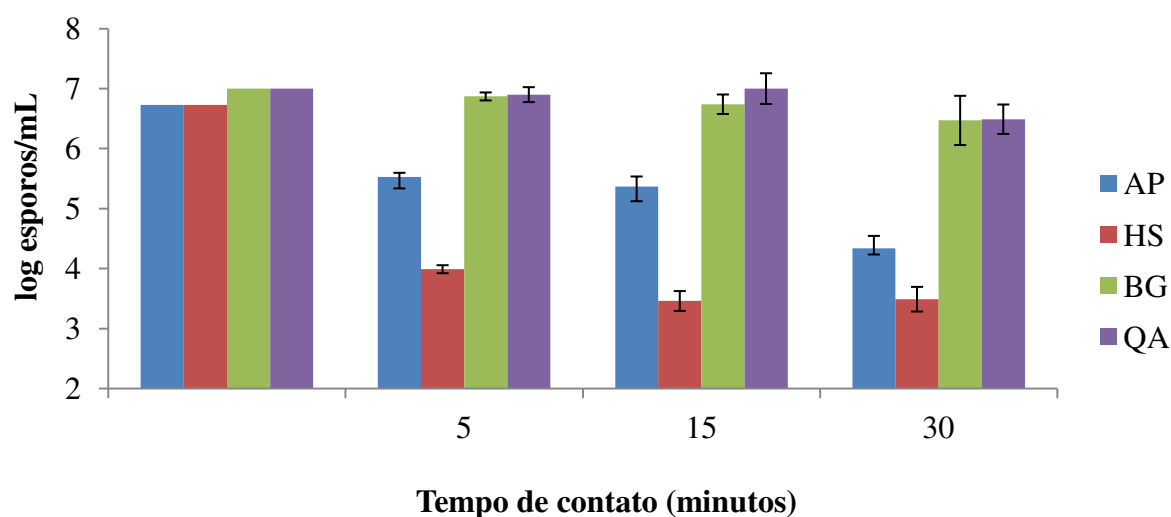
A**B**

Figura 20. Efeito esporicida de sanitizantes sobre esporos de *C. difficile* VPI 10463 (A) e LHCD 809 (B).

Sanitizantes: AP: Ácido peracético (0,03 %); HS: Hipoclorito de sódio (1 %); BG: Biguanida (0,03 %); QA: Quaternário de amônio (0,45 %).

Na **Tabela 9** estão apresentadas as médias do fator de inativação (FI) de suspensões de esporos de *C. difficile* (VPI 10463 e LHCD 809) submetidos a diferentes sanitizantes.

Para o sanitizante a base de ácido peracético, na concentração recomendada pelo fabricante, promoveu uma redução na contagem de esporos (valores de FI foram de $2,69 \pm 0,20$

e $2,39 \pm 0,11$ log esporos/mL após 30 min de contato para *C. difficile* VPI 10463 e LHCD 809, respectivamente) o que não apresentou FI de no mínimo 4,0 log esporos/mL. Em 15 min de contato com o sanitizante a base de ácido peracético o FI foi de $1,21 \pm 0,10$ e $1,36 \pm 0,25$ log esporos/mL para *C. difficile* VPI 10463 e LHCD 809, respectivamente. Portanto não pode ser considerado esporicida (**Tabela 9**).

Apenas o hipoclorito de sódio a 1 % após 30 min de contato apresentou efeito esporicida sobre a cepa *C. difficile* VPI 10463, onde o FI foi de $4,20 \pm 0,20$ log esporos/mL.

Os esporos do *C. difficile* provenientes de carne de frango (LHCD 809) foram mais resistentes ao hipoclorito de sódio quando comparados aos esporos da cepa padrão VPI 10463. O fator de inativação para os esporos do isolado LHCD 809 foi de $3,24 \pm 0,21$ log esporos/mL por 30 min de exposição (**Tabela 9**).

A redução foi muito semelhante nos tempos 15 e 30 min de contato de hipoclorito de sódio sobre esporos da cepa LHCD 809, cujos valores foram de $3,27 \pm 0,17$ e $3,24 \pm 0,21$ log esporos/mL, respectivamente (**Tabela 9**).

Interessante observar que o sanitizante a base de hipoclorito de sódio após 5 min de contato com esporos de *C. difficile* levou a uma maior redução nas contagens de esporos do que o sanitizante ácido peracético com 30 min de contato para ambas as cepas (**Tabela 9**).

Os testes realizados indicaram que as soluções de biguanida e quaternário de amônia apresentaram baixo ou insignificante efeito esporicida sobre *C. difficile* nos três tempos avaliados (5, 15 e 30 min). Os fatores de inativação (FI) variaram de $0,01 \pm 0,27$ a $0,26 \pm 0,55$ log esporos/mL para a cepa padrão de *C. difficile* (VPI 10463) e $0,13 \pm 0,07$ a $0,53 \pm 0,41$ log esporos/mL para a cepa LHCD 809, para o sanitizante biguanida. Para o sanitizante a base de quaternário de amônia foi observada uma redução de $0,01 \pm 0,42$ a $0,25 \pm 0,67$ log esporos/mL e $0,00 \pm 0,26$ e $0,27 \pm 0,25$ log esporos/mL para cepa VPI 10463 e para o isolado LHCD 809, respectivamente.

Tabela 9. Fatores de inativação (log esporos/mL) de esporos de *C. difficile* VPI 10463 e LHCD 809 por ação dos sanitizantes ácido peracético, hipoclorito de sódio, biguanida e quaternário de amônia.

Isolados	Tempo de contato (min)	Fator de inativação - FI (log esporos/mL±DP)			
		Ácido peracético	Hipoclorito de sódio	Biguanida	Quaternário de amônia
VPI 10463	5	0,47±0,04	3,01±0,20	0,01±0,27	0,17±0,13
	15	1,21±0,10	3,06±0,10	0,02±0,21	0,01±0,42
	30	2,69±0,20	4,20±0,20	0,26±0,55	0,25±0,67
LHCD 809	5	1,20±0,19	2,74±0,07	0,13±0,07	0,10±0,12
	15	1,36±0,25	3,27±0,17	0,26±0,16	0,00±0,26
	30	2,39±0,11	3,24±0,21	0,53±0,41	0,27±0,25

Sanitizantes: Ácido peracético (0,03 %); Hipoclorito de sódio (1 %); Biguanida (0,03 %); Quaternário de amônio (0,45 %).

Os compostos clorados são amplamente usados na indústria de alimentos por serem geralmente de baixo custo e efetivos na eliminação de bactérias Gram positivas e negativas, fungos filamentosos, leveduras e esporos, além de apresentarem disponibilidade imediata e facilidade de aplicação (ANDRADE et al., 2008).

Diante dos resultados, podemos afirmar que o hipoclorito de sódio é o agente sanitizante mais eficaz para eliminação de esporos de *C. difficile*.

Após o hipoclorito de sódio, o ácido peracético foi o sanitizante com maior atividade sobre os esporos das cepas VPI 10463 e LHCD 809.

O quaternário de amônio e a biguanida não tiveram nenhuma atividade sobre esporos de *C. difficile*.

Wullt et al. (2003), avaliaram a ação esporicida de três desinfetantes (glutaraldeído 2 %, ácido peracético 0,2 % e isopropanol 70 %) e nitrito acidificado, e manteve-os em contato com esporos de *C. difficile* por 5, 15 e 30 min. O ácido peracético apresentou-se altamente esporicida nos três tempos avaliados, o glutaraldeído e o nitrito

acidificado apresentaram efeito intermediário, ou seja, apenas com 30 min de contato, e o isopropanol 70 % apresentou baixa ou nenhuma inativação dos esporos. Desta forma, o nitrito acidificado, o glutaraldeído e o ácido peracético mostraram que são eficazes para a desinfecção de esporos no ambiente hospitalar.

Ferreira et al. (2013) avaliaram diferentes desinfetantes utilizados em hospitais e concluíram que os desinfetantes á base de ortoftalaldeído 0,55 % e hipoclorito de sódio 1 % foram os mais eficientes para eliminação de esporos de *C. difficile*.

A ação esporicida de *C. difficile* também foi avaliada utilizando luz UV de 405 nm em combinação de hipoclorito de sódio, Moorhead et al. (2016) verificaram que esporos de *C. difficile* foram eliminados com maior eficiência após serem submetidos a tratamento combinado de luz UV de 405 nm e baixas concentrações de hipoclorito de sódio (0,1 %). Estes autores concluíram que a ação sinérgica entre desinfetantes hospitalares e agentes físicos como a luz de UV 405 nm é eficiente para o controle da infecção por *C. difficile* em hospitais.

5.3.2.2 Influência do pH e da concentração na atividade esporicida de hipoclorito de sódio sobre *C. difficile*

Complementando o teste de eficiência de sanitizantes sobre esporos de *C. difficile*, realizou-se um teste para verificar a influência do pH e concentração do sanitizante a base de hipoclorito de sódio, na atividade esporicida.

Na **Figura 21** (A e B), estão expostos os gráficos representativos do efeito esporicida do sanitizante a base de hipoclorito de sódio e suas concentrações sobre esporos de *C. difficile* cepa VPI 10463 e LHCD 809.

Para a avaliação da eficiência do sanitizante a base de hipoclorito de sódio 100 e 200 mg/L a contagem da suspensão de esporos foi de 6,93 log esporos/mL para cepa VPI 10463 e 7,91 log esporos/mL para LHCD 809. Para a avaliação da eficiência do hipoclorito de sódio 10.000 mg/L a contagem da suspensão de esporos foi de 7,38 log esporos/mL para VPI 10463 e 6,73 log esporos/mL para LHCD 809.

A contagem da suspensão de esporos para a avaliação do teste esporicida para o sanitizante a base de hipoclorito de sódio 100 e 200 mg/L com alteração de pH para 7,5 foi de 6,64 log esporos/mL para cepa VPI 10463 e 8,56 log esporos/mL para LHCD 809.

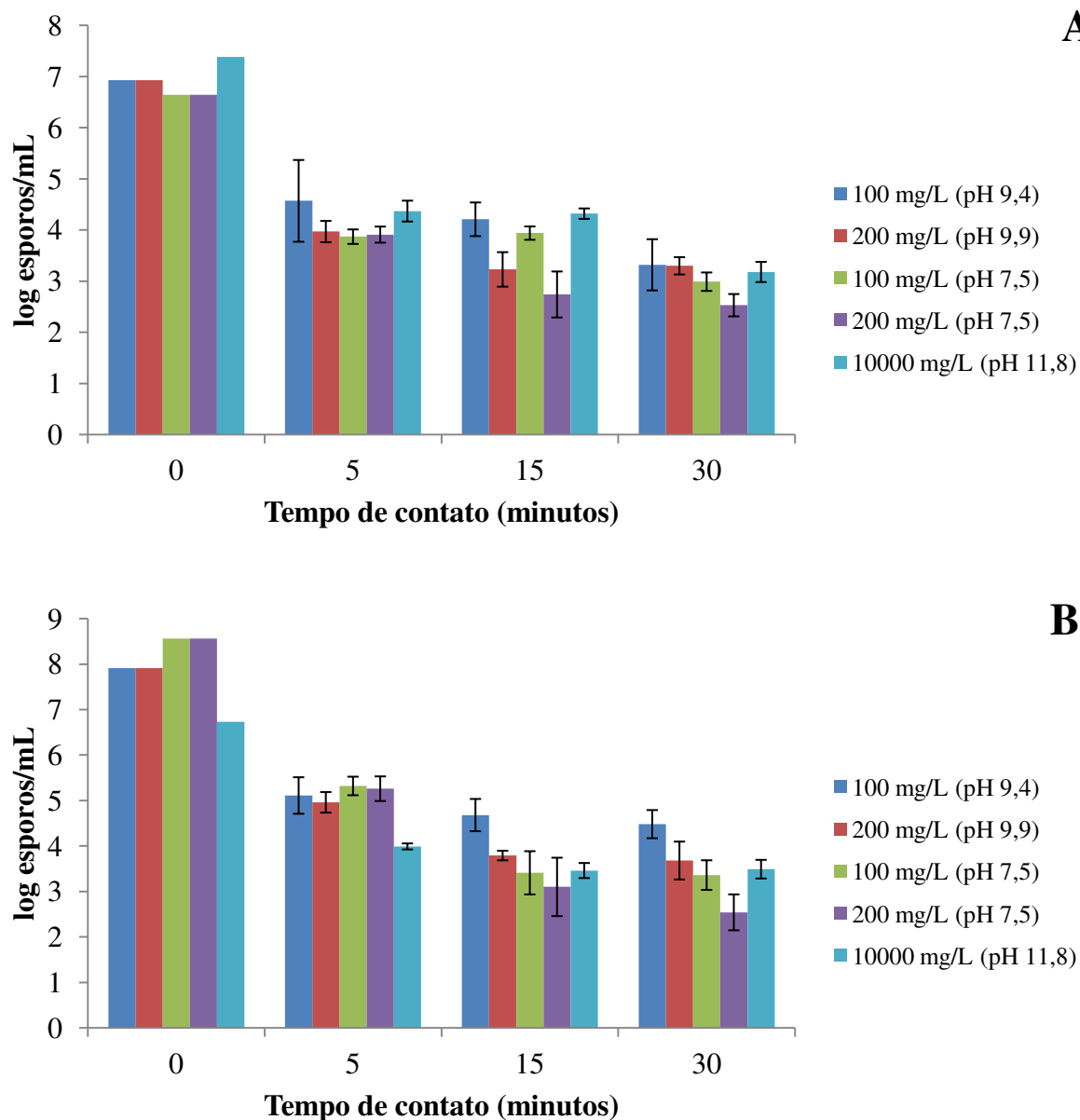


Figura 21. Efeito esporicida de sanitizantes a base de hipoclorito de sódio sobre esporos de *C. difficile* VPI 10463 (A) e LHCD 809 (B).

Na **Tabela 10** estão apresentadas as médias do fator de inativação (FI) de suspensões de esporos de *C. difficile* (VPI 10463 e LHCD 809) submetidos a diferentes concentrações pH de hipoclorito de sódio. Pelo teste da União Europeia prEN14347 o

sanitizante é considerado esporicida quando apresenta um fator de inativação de no mínimo 4,0 log esporos/mL.

Conforme os resultados apresentados na **Tabela 10**, todas as soluções sanitizantes testadas no tempo de contato de 5 min não apresentaram o efeito esporicida de referência. Além disso, os esporos da cepa de *C. difficile* VPI 10463 apresentaram uma maior resistência que a cepa LHCD 809 quando em contato com as soluções sanitizantes. A cepa VPI 10463 apresentou o fator de inibição superior a 4 ciclos log após 30 min de contato utilizando soluções a 200 mg/L (pH 7,5) e 10.000mg/L (pH > 11,8). O elevado fator de inativação (4,20 log esporos/mL) obtido para solução de NaOCl a 1 % e pH 11,8 pode ser atribuído principalmente a elevada atividade cáustica do meio - pela elevada quantidade de NaOH = 0,1 % (na diluição 1:10) do que pela presença de cloro na forma de íon hipoclorito (>95 % OCl⁻).

Andrade e Serrano (1993), utilizaram 105 mg/L de cloro residual, a partir do hipoclorito de sódio, em pH 8,0 a 30 °C e obtiveram 5 reduções logarítmicas na população dos esporos de *Bacillus subtilis* em 5 min de contato pelo método de suspensão.

Observando o efeito esporicida do hipoclorito de sódio 200 mg/L (pH 7,5) verificou-se o efeito esporicida a partir de 15 min com redução de $5,46 \pm 0,64$ log esporos/mL para cepa LHCD 809. E para a cepa VPI 10463 foi observado um efeito esporicida a partir de 30 min de contato, com redução de $4,11 \pm 0,22$ log esporos/mL.

Em relação a inativação dos esporos bacterianos, existe um consenso entre os pesquisadores de que a capa do esporo o protege da ação do cloro. A capa do esporo é a barreira a permeabilidade ao cloro, mas também é a camada onde se inicia a ação oxidante.

Dependendo da concentração e do pH, as soluções cloradas podem ser esporicidas, e para isso, o ácido hipocloroso (HClO) altera a permeabilidade da capa do esporo, que contém cerca de 15 % de cisteína em sua composição, aminoácido responsável pela resistência da capa ao cloro. No entanto, o esporo perde essa resistência a partir do momento em que o ácido hipocloroso consegue romper a capa, naturalmente em outros pontos dela, onde não está presente a cisteína. Há duas teorias que tentam explicar como o cloro inativa o esporo bacteriano. Em uma delas, afirma-se que, após o rompimento da capa, o esporo absorve água e nutrientes, germina, e o cloro elimina o esporo germinado, que já não apresenta resistência ao agente químico. Em outra, tem-se que, após a alteração da permeabilidade da capa, o cloro oxidaria as demais camadas constituintes do esporo até

atingir o protoplasma, onde se encontram DNA, RNA, ribossomos e enzimas essenciais à transformação do esporo em célula vegetativa (ANDRADE et al., 2008).

Vários fatores podem afetar a resistência dos esporos. Ela é variável com o gênero, espécie e estirpe do micro-organismo. Também, varia com as condições de esporulação (ANDRADE; SERRANO, 1993). Tais aspectos podem justificar as diferenças de resistência encontradas entre esporos de *C. difficile* utilizadas neste experimento.

Tabela 10. Fatores de inativação (log esporos/mL $\pm$ DP) de esporos de *C. difficile* VPI 10463 e LHCD 809 por ação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Isolados	Tempo de contato (min)	Soluções de hipoclorito de sódio (mg/L)				
		(% HOCl não dissociado)				
		100 mg/L pH 9,4 (<5%HOCl)*	200 mg/L pH 9,9 (<5%HOCl)*	100 mg/L pH 7,5 (50%HOCl)*	200 mg/L pH 7,5 (50%HOCl)*	10.000 mg/L pH 11,8 (<5%HOCl)*
VPI 10463	5	2,36 $\pm$ 0,80	2,96 $\pm$ 0,21	2,77 $\pm$ 0,14	2,73 $\pm$ 0,16	3,01 $\pm$ 0,20
	15	2,72 $\pm$ 0,33	3,70 $\pm$ 0,34	2,70 $\pm$ 0,13	3,90 $\pm$ 0,45	3,06 $\pm$ 0,10
	30	3,61 $\pm$ 0,50	3,63 $\pm$ 0,17	3,65 $\pm$ 0,18	4,11 $\pm$ 0,22	4,20 $\pm$ 0,20
LHCD 809	5	2,79 $\pm$ 0,40	2,95 $\pm$ 0,23	3,24 $\pm$ 0,20	3,30 $\pm$ 0,27	2,74 $\pm$ 0,07
	15	3,23 $\pm$ 0,35	4,12 $\pm$ 0,11	5,15 $\pm$ 0,48	5,46 $\pm$ 0,64	3,27 $\pm$ 0,17
	30	3,43 $\pm$ 0,31	4,23 $\pm$ 0,42	5,20 $\pm$ 0,33	6,02 $\pm$ 0,40	3,24 $\pm$ 0,21

* Teor de HOCl não dissociado a partir da curva de dissociação de ácido hipocloroso –

Fonte: AZEVEDO (1978); GRANUM; MAGNUSSEN (1987).

A eficiência dos sanitizantes a base de hipoclorito de sódio, segundo Kuaye (2017), é fortemente influenciada pela variação do pH do meio e presença de ácido hipocloroso na forma não dissociada - principal agente antimicrobiano. A partir da curva de dissolução do ácido hipocloroso observa-se que a pH 7,5 (=pKa) aproximadamente 50 % do cloro disponível livre se apresenta na forma de ácido hipocloroso e 50 % na forma de íon hipoclorito - composto pouco ativo como antimicrobiano. Em pH altamente alcalino (> 11) a

fração maior de cloro se apresenta como íon hipoclorito (OCl^-). A medida que se reduz o pH ($10 \rightarrow 4$), inversamente, aumenta o teor de ácido hipocloroso ($0 \rightarrow 100\%$) assim como o potencial de oxidação-redução da solução, o que caracteriza o maior efeito corrosivo de soluções cloradas ácidas às superfícies de aço inoxidável.

Dentre as cepas estudadas a LHCD de origem alimentar foi a que apresentou menor resistência às soluções de hipoclorito a 100 e 200 mg/L.

Em nossos ensaios, utilizando hipoclorito de sódio a uma concentração recomendada para aplicações em superfícies que contatam alimentos, sem a etapa de enxágue, de 200 mg/L de cloro residual total (CRT) e pH 7,5 observou-se a maior atividade esporicida, com fatores de inativação FI variando de 2,73 a 6,02 log esporos/mL. Neste valor de pH aproximadamente 50 % (100 mg/L) do cloro se apresentaria na forma de HOCl .

Portanto, é importante destacar os cuidados e atenções necessários ao se utilizar agentes à base de hipoclorito nos processos de sanitização, pois apenas a informação do teor de CRT de uma solução é insuficiente para prever a eficiência esporicida. A expressão cloro residual livre significa a soma das concentrações de ácido hipocloroso e do íon hipoclorito que estão em equilíbrio, em função do pH das soluções. Em nossos ensaios as soluções sanitizantes de hipoclorito apresentavam pH mais elevados (pH=9,4; 9,9 e 11,8) portanto com concentrações de ácido hipocloroso inferiores a 5 %.

A recomendação mais apropriada para o controle de esporos de *C. difficile* é o preparo e uso de soluções de hipoclorito com no mínimo 200 mg/L de CRT na faixa de pH entre 7-8 e 30 min de contato, desta forma obtém-se o efeito esporicida desejado, evitando-se o desperdício de utilizar concentrações muito elevadas de hipoclorito e perda de eficiência do processo.

5.3.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *C. difficile*

Os resultados da susceptibilidade aos oito antimicrobianos (ampicilina, clindamicina, ceftizoxime, moxifloxacina, metronidazol, tetraciclina, ceftriaxone e vancomicina) avaliados estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Susceptibilidade de 22 isolados de *C. difficile* de amostras de carnes (bovina e frango) a antimicrobianos.

Agente Antimicrobiano – MIC (µ/mL)	MIC (Concentração mínima inibitória - µ/mL)					
	Susceptível		Intermediário		Resistente	
	nº de isolados (%)	Variação do MIC	nº de isolados (%)	Variação do MIC	nº de isolados (%)	Variação do MIC
Ampicilina*	22 (100,0)	0,25 – 1,5	0		0	
Clindamicina*	3 (13,6)	0,064 – 1,5	0		19 (86,4)	12 - 256
Ceftizoxima*	8 (36,4)		0		14 (63,6)	128
Moxifloxacina*	19 (86,4)	0,094 - 2	3 (13,6)	3 - 6	0	
Metronidazol*	17 (77,3)	0,016 – 0,50	0		5 (22,7)	256
Tetraciclina*	11 (50,0)	0,023 - 3	2 (9,1)	6	9 (40,9)	24 - 64
Ceftriaxona*	16 (72,7)	0,023 - 16	4 (18,2)	24 - 32	2 (9,1)	64
Vancomicina**	19 (86,4)	0,19 - 2	-		3 (13,6)	3 – 24

*Os “breakpoints” foram de acordo com CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), 2007. **Ampicilina** (susceptível, ≤ 8 µg/mL; intermediário, 16 µg/mL; resistente, ≥ 32 µg/mL). **Clindamicina** (susceptível, ≤ 2 µg/mL; intermediário, 4 µg/mL; resistente, ≥ 8 µg/mL). **Ceftizoxima** (susceptível, ≤ 32 µg/mL; intermediário, 64 µg/mL; resistente, ≥ 128 µg/mL). **Moxifloxacina** (susceptível, ≤ 2 µg/mL; intermediário, 4 µg/mL; resistente, ≥ 8 µg/mL). **Metronidazol** (susceptível, ≤ 8 µg/mL; intermediário, 16 µg/mL; resistente, ≥ 32 µg/mL). **Tetraciclina** (susceptível, ≤ 4 µg/mL; intermediário, 8 µg/mL; resistente, ≥ 16 µg/mL). **Ceftriaxona** (susceptível, 16 µg/mL; intermediário, 32 µg/mL; resistente, ≥ 64 µg/mL).

Para **Vancomicina os “breakpoints” foram de acordo com “*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” (EUCAST). **Vancomicina** (susceptível, ≤ 2 µg/mL; resistente, > 2 µg/mL).

Utilizando os “breakpoints” de antimicrobianos sugeridos pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2007) para bactérias anaeróbias, pode-se observar que 77,3 % (17/22) e 86,4 % (19/22) dos isolados foram sensíveis ao metronidazole e vancomicina, respectivamente, antimicrobianos mais utilizados no tratamento de doenças associadas ao *C. difficile* (COCANOOUR, 2011). Em contrapartida, 22,7 % (5/22) e 13,6 % (3/22), respectivamente, foram altamente resistentes a estes agentes antimicrobianos.

Alta porcentagem de isolados de *C. difficile* de origem hospitalar resistentes à clindamicina, ceftriaxona, moxifloxacina e eritromicina e sensíveis aos dois agentes comumente utilizados no tratamento de CDAD, metronidazol e vancomicina foi evidenciado por Mutlu et al. (2007). A susceptibilidade ao metronidazol e vancomicina e resistência a clindamicina, gentamicina e colistina também foi observado por Cattoir et al. (2008).

Em pesquisa realizada por Liao et al. (2012), do total de 403 isolados testados, apenas duas cepas apresentaram resistência a vancomicina. Em doenças associadas ao *C. difficile*, o metronidazol é atualmente o agente de primeira escolha devido ao baixo custo e ao menor risco de seleção de enterococos resistentes à vancomicina (ASPEVALL et al., 2006; MC COLLUN; RODRIGUEZ, 2012).

Diversos autores têm relatado em suas pesquisas que *C. difficile* é sensível a metronidazole e a vancomicina, e que os laboratórios não costumam fazer o teste de sensibilidade/resistência para o *C. difficile*. Porém, tem sido constatado que o número de isolados resistentes a metronidazol e a vancomicina vem crescendo (BARBUT et al., 1999; BRAZIER et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2004; PELAEZ, et al., 2005, MOOYOTTU et al., 2015).

A resistência ao metronidazol e a vancomincina foi observada, repectivamente em 22,7 % (5/22) e 13,6 % (3/22) dos isolados de *C. difficile* (**Tabela 11**). Outros pesquisadores também relataram o aumento da taxa de resistência de metronidazol de 6,3 % a 12,0 % (PELAEZ et al., 2008; PELAEZ et al., 2002). Esta elevada resistência ao metronidazol em isolados de *C. difficile* pode ter como causa o uso indiscriminado de metronidazol no tratamento de infecção relacionada ao *C. difficile* (CDAD), alterações na capacidade metabólica do micro-organismo e habilidades das cepas em adquirir genes de resistência (GARDNER et al., 2011). Embora exista um aumento gradual da resistência de *C. difficile*, o metronidazol é um antimicrobiano eficaz para tratamentos de doenças relacionadas ao *C. difficile* (WULLT; ODENHOLT, 2004).

Isolados de carnes e produtos cárneos também apresentaram sensibilidade a metronidazole e vancomicina (VISSER et al., 2012; QUESADA-GOMÉZ et al., 2013; KOUASSI et al., 2014).

No Brasil, estudos realizados em isolados de *C. difficile* de fezes humanas foram sensíveis a metronidazol e vancomicina (ALCIDES et al., 2007; BALASSIANO et al., 2011).

Para clindamicina, os resultados foram de 13,6 % (3/22) e 86,4 % (19/22) susceptíveis e resistentes, respectivamente (**Tabela 11**). Em trabalho realizado por Aspevall et al. (2006), 84 % dos isolados clínicos eram resistentes a clindamicina. Em outro trabalho semelhante, Liao et al. (2012) obtiveram 13,6 % dos isolados susceptíveis a clindamicina. No trabalho de Alcides et al. (2007) os isolados de fezes de crianças foram altamente resistentes a clindamicina. Quesada-Goméz et al. (2013) detectaram *C. difficile* resistentes a clindamicina em amostras de carnes.

Alguns casos de CDAD têm sido associados ao uso de clindamicina (VOTH e BALLARD, 2005) e ceftriaxona (MARCON et al., 2006).

Para ceftizoxime 36,4 % (8/22) dos isolados foram sensíveis e 63,6 % (14/22) foram resistentes a este agente. Para ceftriaxone, 72,7 % (16/22) isolados foram susceptíveis, 18,2 % (4/22) obtiveram valores intermediários e 9,1 % (2/22) foram resistentes a este agente.

A clindamicina, ampicilina e as cefalosporinas de 3ª geração são os agentes indutores mais frequentes de CDAD (ASLAM; MUSHER, 2006), ou seja, *C. difficile* apresenta maior resistência a esses antimicrobianos. No entanto, todos os isolados estudados foram sensíveis a ampicilina (**Tabela 11**).

Pode-se observar que 50,0 % (11/22) dos isolados de *C. difficile* apresentaram sensibilidade, 9,1 % (2/22) apresentam resistência intermediária e 40,9 % (9/22) apresentaram resistência à tetraciclina (**Tabela 11**). Para moxifloxacina, do total de isolados analisados quanto à susceptibilidade, nenhum apresentou resistência a este antimicrobiano, 13,6 % (3/22) apresentaram sensibilidade intermediária e 86,4 % (19/22) dos isolados foram sensíveis a moxifloxacina. Em trabalho realizado por Liao et al. (2012), 17,9 % (72/403) dos isolados clínicos foram resistentes a este agente.

Nenhum isolado foi susceptível a todos os antimicrobianos. Um isolado foi resistente a apenas um agente antimicrobiano (ceftizoxima) e sensível aos demais antimicrobianos testados (ampicilina, clindamicina, moxifloxacina, metronidazol, tetraciclina, ceftriaxona e vancomicina).

A resistência a pelo menos três agentes antimicrobianos testados foi observada em 36,4 % (8/22) dos isolados (**Tabela 12**), demonstrando desta forma, multirresistência (GOUDARZI et al., 2013) entre os isolados avaliados.

Tabela 12. Discriminação dos isolados de *C. difficile* multirresistentes.

Isolados	Micro-organismo multirresistente	Agente Antimicrobiano
1	LHCD 436	vancomicina, tetraciclina, clindamicina e metronidazole
1	LHCD 809	vancomicina, clindamicina, ceftizoxime
1	LHCD 619	tetraciclina, clindamicina e ceftizoxime
1	LHCD 614	vancomicina, tetraciclina, clindamicina
1	LHCD 611	tetraciclina, clindamicina, metronidazole
1	LHCD 545	tetraciclina, clindamicina, metronidazole
1	LHCD 617	clindamicina, ceftizoxime e metronidazole
1	LHCD 970	clindamicina, ceftizoxime e metronidazole

Em particular 21 isolados de *C. difficile* (95,5 %) apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos. Apenas um isolado apresentou multirresistência a quatro antimicrobianos (vancomicina, tetraciclina, clindamicina e metronidazole). Em trabalho realizado por Goudarzi et al. (2013) 48,0 % (36/75) dos isolados apresentaram multirresistência.

Sendo assim carnes *in natura* e consequentemente produtos cárneos, representam um risco para saúde pública, agindo como possíveis veículos para transmissão de *C. difficile* resistentes aos antimicrobianos, portanto, estratégias adequadas para reduzir a contaminação de *C. difficile* em alimentos são fortemente recomendadas.

6. CONCLUSÃO

1. O desenvolvimento de *C. difficile* em carne bovina cozida embalada a vácuo é favorecido pela elevação da temperatura de 7 °C para 15 °C na estocagem.
2. Em condições favoráveis, como ambiente anaeróbio e rico em nutrientes, mesmo em temperatura de refrigeração, *C. difficile* mantém-se viável. As temperaturas de 4 °C e 7 °C normalmente utilizadas na estocagem de produtos alimentícios, incluindo as carnes, podem impedir o desenvolvimento de *C. difficile*, mas não asseguram a inocuidade pois o abuso de temperatura (15 °C) pode proporcionar sua multiplicação e consequente produção de toxinas, caso as condições sejam propícias.
3. Tanto a cepa de *C. difficile* padrão VPI 10463 quanto a cepa LHCD 809 isolada de carne de frango foram capazes de aderir e formar biofilmes em superfície de aço inoxidável. O biofilme caracteriza-se por apresentar uma estrutura multiforme com células vegetativas e esporuladas de *C. difficile*.
4. A cepa proveniente de alimentos (LHCD 809) apresentou menor grau de adesão e formação de biofilmes sobre o aço inoxidável quando comparada a cepa padrão VPI 10463. Esporos da cepa LHCD 809 apresentaram menos resistência que esporos da cepa padrão VPI 10463 quando em contato com hipoclorito de sódio (100-200 mg/L).
5. Um ambiente com baixo potencial redox (adição de cisteína) e o abuso de temperatura (25 °C) favorece a adesão e formação de biofilmes por *C. difficile*.
6. Nas concentrações de uso recomendadas pelos fabricantes, o hipoclorito de sódio foi o agente sanitizante que apresentou maior eficiência na redução de esporos de *C. difficile*, seguido do ácido peracético. A biguanida e o quaternário de amônio apresentaram baixa atividade sobre esporos de *C. difficile*.
7. A utilização de solução de hipoclorito de sódio como esporicida é fortemente influenciada pelo pH do meio, o qual deve ser obrigatoriamente ajustado na faixa de 7-8 para garantia de sua efetividade contra *C. difficile*. Além disso, o controle efetivo do teor de cloro disponível e do tempo de contato de 15-30 min deve ser observado.

8. Embora o hipoclorito de sódio tenha sido o mais eficiente sanitizante, a eliminação completa do biofilme de *C. difficile* formado em superfície de aço inoxidável não ocorreu, o que demonstra a dificuldade do processo de sanitização na remoção de biofilmes e a importância de se realizar o processo completo de higienização, ou seja, limpeza e sanitização.
9. Algumas cepas de *C. difficile* apresentaram resistência ao metronidazol e a vancomicina, medicamentos de primeira escolha para tratamentos de CDAD, demonstrando a importância e a necessidade do monitoramento periódico para avaliar o surgimento de cepas resistentes.
10. A presença de *C. difficile* multirresistentes em alimentos merece atenção dos setores de saúde pública, devido ao aumento de CDAD recorrentes, o que ressalta a importância de aplicação de medidas de prevenção contra a propagação de *C. difficile*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCIDES, A. P. P.; BRAZIER, J. S.; PINTO, L. J. F.; BALASSIANO, I. T.; BOENTE, R. F.; PAULA, G. R.; FERREIRA, E. O.; AVELAR, K. E. S.; MIRANDA, K. R.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.92, p.53-59, 2007.
- 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**, v.38, p.2706–2714, 2000.
- ALLISON, D. G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v.19, n.2, p.139-150, 2003.
- ALVARENGA, M. B.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P. Ação de formulados comerciais à base de cloro, iodo, ácido peracético ou peróxido de hidrogênio sobre esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 19659. In: **SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFV**, Viçosa, Imprensa Universitária. UFV, p.170-171, 1991.
- ANDRADE, N. J. Higiene na Indústria de Alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo (SP): **Varela**, p.410, 2008.
- ANDRADE, N. J.; BRIDEGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, p.833-838, 1998.
- ANDRADE, N. J.; SERRANO, A. M. Use of *Bacillus subtilis* spores to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite at different concentration and pH values. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.24, n.1, p.26-31, 1993.
- ANDRADE, N.J.; MACEDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo (SP): Varela, 182p. 1996.
- ANGLIM, A. M.; FARR, B. M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.7, p.602-608, 1994.

ASLAM, S.; MUSHER, D. M. An update on diagnosis, treatment, and prevention of *C. difficile*-associated disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.35, p.315-335, 2006.

ASPEVALL, O.; LUNDBERG, A.; BURMAN, L. G.; ÅKERLUND, T.; SVENUNGSSON, B. Antimicrobial susceptibility pattern of *Clostridium difficile* and its relation to pcr ribotypes in a Swedish university hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.5, p.1890–1892, 2006.

AUSIELLO, C. M. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. **Microbes and Infection**, v.8 (11), p.2640-2646, 2006.

AZEVEDO, J. M. N. Técnica de abastecimento e tratamento de água. 2 ed. São Paulo CETESB: 1978.

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

BALASSIANO, I. T.; SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J. M.; NOUÉR, S. A.; SOUZA, R. C.; BRAZIER, J. S.; FERREIRA, E. O.; DOMINGUES, R. M. C. P. Detection of crossinfection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.99, p.249-255, 2011.

BARBUT, F. D.; DECRE, B.; BURGHOFFER, D.; LESAGE, F.; DELISLE, V.; LALANDE, M.; DELMEE, V.; AVESANI, N.; SANO, C.; COUDERT; PETIT, J. C. Antimicrobial susceptibilities and serogroups of clinical strains of *Clostridium difficile* isolated in France in 1991 and 1997. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.2607–2611, 1999.

BARBUT, F.; DECRE, 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.

BARTLETT J. G.; CHANG T. W.; GURWITH, M.; GORBACH, S. L.; ONDERDONK, A. B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. **The New England Journal of Medicine**, v.298(10), p.531-534, 1978.

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

BARTLETT, J. G. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. **Annals of Internal Medicine**. v.145(10), p.758-764. 2006.

BAVERUD, V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. **Veterinary Quarterly**, v.24, p.203–219, 2002.

BECTON DICKINSON AND COMPANY. DIFCO manual - instruções de utilização. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar. Germany, 2013.

BLOCK, S.S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S.S. Desinfection, sterilization and preservation, **Philadelphia: Lea Febiger**, Chap.9, p.167-181, 1991.

BOER, E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, A.; HEUVELINK, A. E.; HARMANUS C.; KUIJPER, E. J. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**. v.144(3), p.561-564, 2011.

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

BORRIELLO, SP. *Clostridium difficile* and its toxin in the gastrointestinal tract in health and disease. **Research and clinical forums**, v.1, p.33–35, 1979.

BOWER, C. K. M.; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.152-157, 1996.

BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Ministério da Agricultura n.30.691, 29 de março de 1957. Alterado pelos decretos n.1.255 jun. 1962, n.1.236 set. 1994, n.1.812 fev. 1996, n.2.244 jun. 1997. Brasília: MA/DIPOA, 241p.1997.

- BRAZIER, J. S.; FAWLEY, W.; FREEMAN, J.; WILCOX, M. H. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.741–742, 2001.
- 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.
- CABEÇA, T. K.; PIZZOLITTO, A. C.; PIZZOLITTO, E. L. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. **Alimentos e Nutrição**, v.17(2), p.121-125, 2006.
- CALABI, E.; CALABI, F.; PHILLIPS, A. D.; FAIRWEATHER, N. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. **Infection Immunity**, v.70, n.10, p. 5770–5778, 2002.
- CARBO, H.M. **Aço inox – Especificações técnicas**. ACESITA S.A., 2001.
- 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.
- CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. Biofilms. **John Wiley**. New York, USA. p.2552–2555, 1990.
- CLAYTON, E. M.; REA, M. C.; SHANAHAN, F.; QUIGLE, E. M. M.; KIELY, B.; ROSS, R. P.; HILL, C. Carriage of *Clostridium difficile* in outpatients with irritable bowel syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, p.1290–1294, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Seventh Edition. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, CLSI document M11-A6; v.24, n.2, 2007.
- COCANOUR, C. S. Best strategies in recurrent or persistent *Clostridium difficile* infection. **Surgical Infection (Larchmt)**, v.12(3), p.235-239, 2011.

COHEN, S. H.; TANG, Y. J.; SILVA JR., J. S. Analysis of the Pathogenicity Locus in *Clostridium difficile* Strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.659–63, 2000.

COIGNARD, B.; BARBUT, F.; BLANCKAERT, K.; THIOLET, J. M.; POUJOL, I.; CARBONNE, A.; PETIT, J. C.; DESENCLOS, J. C. Emergence of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease, France. **Euro Surveill.** **11**:E060914.1, 2006.

COLLINS, M. A.; RODRIGUES, U. M.; DAINTY, R. H.; ROBERTS, T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. Nov. **FEMS Microbiology Letters**. v.96. p.235-240, 1992.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DeBEER, D.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v.176(8), p.2137-2142, 1994.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.67(3), p.429-453, 2003.

CROWTHER, G. S.; CHILTON, C. H.; TODHUNTER, S. L.; NICHOLSON, S.; FREEMAN, J.; BAINES, S. D.; WILCOX, M. H. Comparison of planktonic and biofilm-associated communities of *Clostridium difficile* and indigenous gut microbiota in a triple-stage chemostat gut model. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p.2137–2147, 2014.

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

DAVEY, M.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.847-867. 2000.

DAWSON, L. F.; VALIENTE, E.; FAULDS-PAIN, A.; DONAHUE, E. H.; WREN, B. W. Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. **PLoS ONE**, v.7, p.1-13, 2012.

DENG, K.; PLAZA-GARRIDO, A.; TORRES, J. A.; PAREDES-SABJA, D. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. **Food Microbiology**, v.46, p.218-221, 2015.

- DONG, D.; ZHANG, L.; CHEN, X.; JIANG, C.; YU, B.; WANG, X.; PENG, Y. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of clinical *Clostridium difficile* from a Chinese tertiary hospital. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.41, p.80-84, 2013.
- DÜRRE, P. Sporulation in clostridia (Genetics). In: *Handbook on Clostridia*, DÜRRE, P. Ed. **Taylor & Francis Group**, p.920, 2005.
- DÜRRE, P.; HOLLERGSCHANDNER, C. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v.10(2), p.69-74, 2004.
- ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. Study of the response of a biofilm bacterial community to uv radiation study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.5, 1999.
- ELHARIRY, H. M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. **Food Microbiology**, v.28, n.7, p.1266–1274, 2011.
- ESFANDIARI, Z.; WEESE, S.; EZZATPANAH, H.; JALALI, M.; CHAMANI, M. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. **BMC Microbiology**, v.14, p.283, 2014.
- EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. v.7.1, p.62, 2017.
- EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. *Chemical Disinfectants: Basic Sporicidal Activity—Test Method and Requirements (Phase 1). DRAFT prEN 14347*. Brussels: European Committee for Standardization, 2001.
- FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BÉNÉZECH, T. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, n.6, p.892–900, 2001.
- FAILLE, C.; LEQUETTE, Y.; RONSE, A.; SLOMIANNY, C.; GARÉNAUX, E.; GUERARDEL, Y. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores

surrounded or not with an exosporium. Consequences on their ability to adhere to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, n.3, p.125–135, 2010b.

FAILLE, C.; SYLLA, Y.; LE, G. C.; BÉNÉZECH, T.; SLOMIANNY, C.; LEQUETTE, Y. Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. **Food Microbiology**, v.27, n.6, p.769–776, 2010a.

FERNANDEZ, A.; ANAND, G.; FRIEDENBERG, F. Factors associated with failure of metronidazole in *Clostridium difficile*-associated disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.38, p.414–418, 2004.

FERREIRA, T. G.; BARBOSA, T. F.; TEIXEIRA, F. L.; FERREIRA, E. O.; DUARTE, R. S.; CAVALCANTI, R. M.; DOMINGUES, P.; PAULA, G. R. Effect of hospital disinfectants on spores of clinical Brazilian *Clostridium difficile* strains. **Anaerobe**, v.22, p.121-122, 2013.

FIGUEIREDO, H. M. Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite. Viçosa – MG, 85p. **Tese** (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, v.8, n.9, p.623-633, 2010.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança de Alimentos. (2nd ed.). Porto Alegre: Artemed, 2013.

FREEMAN, J.; WILCOX, M. H. Antibiotics and *Clostridium difficile*. **Microbes and Infection**. v.1, p.377–384, 1999.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-5, 2003.

GARDNER, E.; MEGHANI, N.; MANCUSO, P.; THOMSON, A. Recognizing metronidazole resistant *C. difficile*. **The Journal for Nurse Practitioners**, v.36(11), p.8-11, 2011.

GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; PETERSON, L. R.; MULLIGAN, M. E.; SILVA JR. J. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.16, p.459–477, 1995.

GERMANO, P. M.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole. p.32, 2008.

GIARDINO, L.; AMBU, E.; SAVOLDI, E.; RIMONDINI, R.; CASSANELLI, C.; DEBBIA, E. A. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Journal of Endodontics**, v.33(7), p.852-855, 2007.

GOUDARZI, M.; GOUDARZI, H.; ALEBOUYEH M.; RAD, M. A.; MEHR, F. S. S.; ZALI, M. R.; ASLANI, M. M. Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium difficile* Clinical Isolates in Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.15(8), p.704-11, 2013.

GRANUM, E.; MAGNUSSEN, J. The effect of pH on hypochlorite as disinfectant. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.183-186, 1987.

GROSCHELL, D. H. *Clostridium difficile* infection. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.33, p.203–245, 1996.

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

HENSGENS, M. P. M.; KEESEN, E. C.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V.; KOENE, M. G. J.; BOER, E.; LIPMAN, L. J. A.; KUIJPER, E. J. *Clostridium difficile* infection in the community: A zoonotic disease? **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.634–645, 2012.

HOLAH, J. T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A. Conductance-based surface disinfection test food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.255-259, 1990.

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

- HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v.6, n.1, p.9-18, 1995.
- HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. **World Journal Gastroenterology**, v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.
- 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**. v. 149, Issues 1-2, p.186-192, 2011.
- HUNTER, R. C.; BEVERIDGE, T. J. Application of a pH-Sensitive Fluoroprobe (CSNARF-4) for pH microenvironment analysis in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p.2501-2510, 2005.
- JANEZIC, S.; POTOČNIK, M.; ZIDARIC, V.; RUPNIK, M. Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. **PLoS ONE**, v.11(11), 2016.
- JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. **Anaerobe** v.37, p.13–24, 2016.
- JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6. Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 711p. 2005.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**. v.236, n.2, p.163-73. 2004.
- JOBSTL, M.; HEUBERGER, S.; INDRA, A. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. **Journal Food Microbiology**, v.138(1–2), p.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**, v.341, p.1645–1651, 1999.
- KAWAICHI, M. E. Efeito da inoculação de esporos de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo e capacidade de *Clostridium estertheticum* de formar biofilmes. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

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

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

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environmental International**, v.30, p.47-55, 2004.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSE, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated-EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.52, n.2, p.123-127, 2006.

KLAUSEN, M.; GJERMENSEN, M.; KREFT, J. U.; TOLKER-NIELSEN, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v.261, p.1-11, 2006.

KOUASSI, K. A.; DADIE, A. T.; N'GUESSAN, K. F.; DJE, K. M.; LOUKOU, Y. G. *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in cooked beef sold in Côte d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility. **Anaerobe**, v.28, p.90-94, 2014.

KRÓLASIK, J.; ZAKOWSKA, Z.; KREPSKA, M.; KLIMEK, L. Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. **Polish Journal of Microbiology**, v.59 (4), p.281-287, 2010.

KUAYE, A. Y. Limpeza e sanitização na indústria de alimentos. Editora Atheneu. Volume 4, 323 p. 2017.

LARSON, H. E.; PRICE, A.B.; HONOUR, P.; BORRIELO, S. P. *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. **The Lancet**, v.311(8073), p.1063-1066, 1978.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, v.24, p.281–287, 2007.

LIAO, C. H.; KO, W. C.; LU, J. J.; HSUEH, P. R. Characterizations of clinical isolates of *Clostridium difficile* by toxin genotypes and by susceptibility to 12 antimicrobial agents,

Including Fidaxomicin (OPT-80) and Rifaximin: A Multicenter Study in Taiwan. **American Society for Microbiology**, 2012.

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, v.38, p.1696–1697, 2000.

LOO, V. G.; POIRIER, L.; MILLER, M. A.; OUGHTON, M.; LIBMAN, M. D.; MICHAUD, S.; BOURGAULT, A. M.; NGUYEN, T.; FRENETTE, C.; KELLY, M.; VIBIEN, A.; BRASSARD, P.; FENN, S.; DEWAR, K.; HUDSON, T. J.; HORN, R.; RENE, P.; MONCZAK, Y.; DASCAL, A. A predominantly clonal multiinstitutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.2442–2449, 2005.

LUND, B.; PECK, W. Heat resistance and recovery of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with an extended shelf-life. **Journal Applied Bacteriology**. v.76, p.115-128, 1990.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1 p.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. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.39–45, 2003.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J. G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.538-543, 2007.

MARRIOT, N. G. Sanitizers. Cap.8. In: **Principles of food sanitation**. Kluwer Academic Publishers. 4 edição. p.139-157, 1999.

MARTINS, E. C.; KUAYE, A. Y. Emprego do ácido peracético e outros sanitizantes na indústria de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.10(43), p.5-8, 1996.

MC CLANE, B. A. *Clostridium perfringens*. In: Dolye, P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. **Food Microbiology Fundamental and Frontiers**, 2nd ed., cap.16, p.351-372. 2001.

McCOLLUM, D. L.; RODRIGUEZ, J. M. Detection, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infection. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v.10, p.581–592, 2012.

MERRIGAN, M.; VENUGOPAL, A.; MALLOZZI, M.; ROXAS, B.; VISWANATHAN, V. K.; JOHNSON, S.; GERDING, D. N.; VEDANTAM, G. Human Hypervirulent *Clostridium difficile* Strains Exhibit Increased Sporulation as Well as Robust Toxin Production, **Journal of Bacteriology** v.192, n.19, p.4904-4911, 2010.

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

METCALF, D.; AVERY, B. P.; JANECKO, N.; MATIC, N.; REID-SMITH, R.; WESSE, J. S. *Clostridium difficile* in seafood and fish. **Anaerobe**. v.17(2), p.85-86, 2011.

MEYER, S. T. O uso do cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.99-110, 1994.

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**, v.38, p.3072–3075, 2000.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v.17, n.2, p.73-87. 2009.

MOORHEAD, S.; MACLEAN, M.; COIA, J. E.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G. Synergistic efficacy of 405nm light and chlorinated disinfectants for the enhanced decontamination of *Clostridium difficile* spores. **Anaerobe**, v.37, p.72-77, 2016.

MOOYOTTU, S.; FLOCK, G.; KOLLANOOR-JOHN, A.; UPADHYAYA, I.; JAYARAO, B.; VENKITANARAYANAN, K. Characterization of a multidrug resistant *C. difficile* meat isolate. **International Journal Food Microbiology**, v.192, p.11–116, 2015.

MORAES, M. S. V.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; PASSOS, F. J. V.; GOMIDE, L. A. M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.17(3), p.1-12, 1997.

MORTON, L. G. H.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARD, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.41, n.3-4, p.247-259, 1998.

MUTLU, E.; WROE, A. J.; SANCHEZ-HURTADO, K.; BRAZIER, 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.

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, L. C. O.; VALLE, R. H. P.; VEIGA, S. M. O. M.; FIORINI, J. E. Uso de derivados clorados, ozônio e ultra-som na sanificação de água e alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, p.48-57, 2005.

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm – “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v.76, n.2, p.149-163, 2007.

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**; v.111, p.257–264, 1993.

ODLAUG, T. E.; PFLUG, I. J. Sporocidal properties of chlorine compounds: applicability to cooling water for canned foods. **Journal Milk Food Technology**, v.7, n.39, p.93-498, 1976.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, n.9, p.577-588, 2007.

PANTALÉON, V.; SOAVELOMANDROSO, A.P.; BOUTTIER, S.; BRIANDET, R.; ROXAS, B.; CHU, M., COLLIGNON, A., JANOIR, C., VEDANTAM, G., CANDELA, T.

The *Clostridium difficile* protease Cwp84 modulates both biofilm formation and cell-surface properties. **PLoS One**, v.1, 2015.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.77-83, 2004.

PELÁEZ, T.; ALCALÁ L.; ALONSO, R.; MARTIN-LOPEZ, A.; GARCIA-ARIAS, V.; MARÍN, M.; BOUZA, E. In vitro activity of ramoplanin against *Clostridium difficile*, including strains with reduced susceptibility to vancomycin or with resistance to metronidazole, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1157–1159, 2005.

PELÁEZ, T.; ALCALÁ, L.; ALONSO, R.; RODRIGUEZ-CREIXEMS, M.; GARCIA-LECHUZ, J. M.; BOUZA, E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46(6), p.1647-50, 2002.

PELÁEZ, T.; CERCENADO, E.; ALCALÁ, L.; MARÍN, M.; MARTIN-LOPEZ, A.; MARTINEZ-ALARCON, J. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46(9), p.3028-3032, 2008.

PELCZAR, M. et al. Microbiologia. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, Volume I, 1980.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.11-18, 2002.

PÉPIN, 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**. v.173(9), p.1037-1042, 2005.

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**; v.56. p.2299–2306, 1988.

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

PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A.; WEXLER, H. M. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. **Microbiology Ecology**, v.56, n.3, p.412-419, 2008.

PURCELL, E. B.; MCKEE, R. W.; MCBRIDE, S. M.; WATERS, C. M.; TAMAYO, R. Cyclic diguanylate inversely regulates motility and aggregation in *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**, v.194, p.3307–3316, 2012.

QUESADA-GOMEZ, C.; MULVEY, M. R.; VARGAS, P.; GAMBOA-CORONADO, M. M.; RODRIGUEZ, C.; RODRIGUEZ-CAVILLINI, E. Isolation of a txigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. **Journal of Food Protection**, v.76, n.2, p.348-351, 2013.

RAINEY, F. A.; HOLLEN, B. J.; SMALL, A. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23AL, In: Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.3, p.731-851, 2009.

RIBEIRO, J. M; CANUTO, K. M.; VESCHI, J. L. A. Compostos Clorados: Aspectos Gerais e sua Utilização como Agente Sanitizante na Agricultura, Micropropagação e Pecuária. **Embrapa**. Documentos 207, 2008.

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

RODRIGUEZ, C.; KORSACK, N.; TAMINIAU, B.; AVESANI, V.; VAN BROECK, J.; BRACH, P.; DELMÉE, M.; DAUBE, G. *Clostridium difficile* from food and surface samples in a Belgian nursing home: An unlikely source of contamination. **Anaerobe**, v.32, p.87–89, 2015.

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**, v.15(5), p.802-805, 2009.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; STAEMPFLI, H. R.; DUFFIELD, T. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v.13(3), p.485–7, 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**, v.12(11), p.1730-1736, 2006.

ROMÃO, C. M. C. A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Org). Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. **Rio de Janeiro: FIOCRUZ**, p.133-162, 1996.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

ROSADO, M.S. Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.81-85, 2000.

RUPNIK M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.13, p.457–9, 2007.

RUPNIK, M.; GRABNAR, M.; GERIC, B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. **Anaerobe**, v.9, p.289–294, 2003a.

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**, v.41, p.1118–1125, 2003.

- RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; DALE, N. G. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. v.7, p.526-536, 2009.
- RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, v.68, p.2614-2622, 2005.
- SAIKI, M. Y. Ocorrência de toxinas em carne bovina salgada e levemente dessecada, embalada a vácuo e inoculada com *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium botulinum*. **Dissertação** (mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de alimentos. Unicamp. 2002.
- SANTOS, P. D.; FERNANDES, P. H. S. Utilização de Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) na desinfecção de indústrias cervejeiras. **Revista TECCEN**, v.3(1), p.59-67, 2010.
- SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Revista Microbiologia in foco** – Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2007.
- SCHROEDER, M. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **American Family Physician**, v.71, n.5, p.921-928, 2005.
- SEALE, R. B.; MCQUILLAN, A. J.; BREMER, P. J. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.3, p.731–737, 2008.
- SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal Secretion. **Microbiological Reviews**, v.60, p.167-215, 1996.
- SIMANGO, C.; MWAKURUDZA, S. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. **International Journal of Food Microbiology**, v.124 p.268–270, 2008.
- SIMOES, M.; SIMOES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v.43, n.4, p.573-583, 2010.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals.

Animal health research reviews; v.5(2), p.321-326, 2004.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P.; BRAZIER, J.; BARBUT, F.;

DELME'E, M. Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe. **Journal of Medical Microbiology**. v.57, p.784-789, 2008.

SPRATT, D. A., PRATTEN, J., WILSON, M., GULABIVALA, K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **International**

Endodontic Journal, v.34(4), p.300-307, 2001.

STABLER, R. A.; GERDING, D. N.; SONGER, J. G.; DRUDY, D.; BRAZIER, J. S.;

TRINH, H. T.; WITNEY, A. A.; HINDS, J.; WREN, B. W. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains.

Journal of Bacteriology, v.188, p.7297-7305, 2006.

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

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v.56, p.187 – 209. 2002.

TARRANT, P. V. Animal behaviour and environment in the dark-cutting condition. In: Proceedings of an Australian Workshop. **Australian Meat and Live-stock Research and Development Corp**. Sydney South, p.8-18. 1989.

TASTEYRE, A.; BARC, M. C.; COLLIGNON, A.; BOUREAU, H.; KARJALAINEN, T.

Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization, **Infection and Immunity**, v.69, p.7937-7940, 2001.

TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of

Pseudomonas syringae pv. *theae*. **Journal of General Plant Pathology**, v.73, n.3, p.193-196, 2007.

TORRES, E. M. C.; WESSE, J. S.; STAEMPFLI, H. R. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. **Veterinary Microbiology**, v.152, n.1-2, p.212-215, 2011.

TOTÉ, K.; HOREMANS, T.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L.; COS, P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76 (10), p.3135-3142, 2010.

TROLLER, J. A. Sanitation in Food Processing. 2th Ed. **Academic Press**, 456p.1993.

TSUCHIYA, A. C. Avaliação de métodos e ocorrência de *Clostridium difficile* em carnes. **Dissertação** (mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

UEDA, S.; KUWABARA, Y. Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. **Biocontrol Science**, v.12(4), p.149-153, 2007.

VARGA, J. J.; THERIT, B.; MELVILLE, S. B. Type IV Pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v.76, n.11, p.4944- 4951. 2008.

VARGA, J. J.; THERIT, B.; MELVILLE, S.B. Type IV Pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v.76, n.11, p.4944- 4951. 2008.

VISSER, M.; SEPEHRI, S.; OLSON, N.; DU, T.; MULVEY, M. R.; ALFA, M. J. Detection of *Clostridium difficile* in retail ground meat products in Manitoba. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v.23, n.1, p.28-30. 2012.

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v.18(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**, v.50(4), p.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**, v.33, p.403–409, 2001.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products (17th ed.), **American Public Health Association**. 570 p. 2004.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory toxicology and Pharmacology**, v.67, p.456-467, 2013.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilmes after rising and cleaning procedures in food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, p.727- 733. 1996.

WULLT, M.; ODENHOLT, I. A double-blind randomized controlled trial of fusidic acid and metronidazole for treatment of an initial episode of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54(1), p.211-6. 2004.

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.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, 2002.

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

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v.46, p.39-56, 1943.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.125-148, 1994.