



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

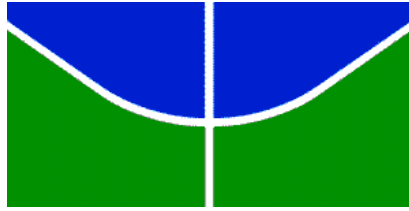
PESQUISA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CARNE BOVINA  
HOMOGENEIZADA COMERCIALIZADA NA REGIÃO DO DISTRITO  
FEDERAL

ANDRÉ RICARDO LUCAS MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA

Junho/2017



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PESQUISA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CARNE BOVINA  
HOMOGENEIZADA COMERCIALIZADA NA REGIÃO DO DISTRITO  
FEDERAL**

**ANDRÉ RICARDO LUCAS MARTINS**

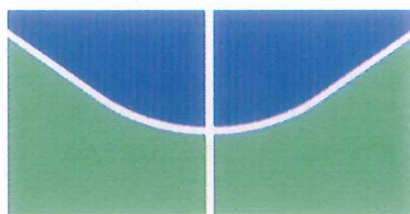
**ORIENTADOR(A): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 142/2017**

**BRASÍLIA / DF**

**JUNHO / 2017**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PESQUISA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CARNE BOVINA  
HOMOGENEIZADA COMERCIALIZADA NA REGIÃO DO DISTRITO  
FEDERAL

ANDRÉ RICARDO LUCAS MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,  
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE  
ANIMAL.

APROVADO POR:

Ângela Patrícia Santana

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF. DRA. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

(ORIENTADOR)

Simone Perelman

SIMONE PERECMANIS, PROF. DRA. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

(EXAMINADOR INTERNO)

Cristiano Sales Prado

CRISTIANO SALES PRADO, PROF. DR. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 30 DE JUNHO DE 2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

|    |  |
|----|--|
| Mp | Martins, André Ricardo Lucas<br>PESQUISA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM CARNE BOVINA<br>HOMOGENEIZADA COMERCIALIZADA NA REGIÃO DO DISTRITO<br>FEDERAL / André Ricardo Lucas Martins; orientador<br>ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA. -- Brasília, 2017.<br>23 p. |
|    | Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) -<br>Universidade de Brasília, 2017.   |
|    | 1. . I. SANTANA, ÂNGELA PATRÍCIA , orient. II.<br>Título.  |

## **AGRADECIMENTOS**

A minha querida esposa Clarissa, que o tempo todo esteve ao meu lado, me aturou nos instantes em que sacrifiquei o nosso convívio para execução deste objetivo. Sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. E dizendo sempre: “Está acabando?”

Ao amigos Leandro Feijó e Héber Brenner pelo estímulo e incentivo a este projeto.

A UNB e o laboratório de microbiologia de alimentos, pela oportunidade.

Aos amigos de laboratório Virgílio, Margareth, Ana Lourdes, Joana, Lailah, Emília, Milena e Viviane, pelos ensinamentos e paciência.

A minha orientadora Ângela Patrícia pela atenção, confiança e ensinamentos que levarei para a vida.

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram na concretização deste meu objetivo.

Por último, meu agradecimento especial aos meus estimados pais, por serem modelo de coragem, perseverança, apoio incondicional e incentivo imensurável. A eles dedico esse trabalho!

## RESUMO

*Clostridium difficile* é uma bactéria formadora de esporos anaeróbicos gram-positivos que causa doença em seres humanos e animais, principalmente aqueles submetidos à antibioticoterapia. Embora as pesquisas com o *C. difficile* sejam crescentes, as formas de transmissões ainda não são muito claras, entretanto, muitos autores associam os alimentos contaminados como principal forma de contaminação por essa bactéria. Este trabalho teve como objetivo fazer o isolamento microbiológico de *C. difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada na região do Distrito Federal, bem como a detecção dessa bactéria por meio da reação em cadeia de polimerase. Foram analisadas 82 amostras, não sendo feito o isolamento microbiológico do *C. difficile* em nenhuma delas. Entretanto, 06 (7,3%) amostras apresentaram a presença de *C. difficile* na PCR. Embora não tenha tido sucesso o isolamento microbiológico do *C. difficile* nesta pesquisa, a técnica de PCR mostrou-se uma ferramenta eficaz quanto à detecção desse microrganismo. Por se tratar de um estudo pioneiro realizado no Distrito Federal e região, mais estudos devem ser feitos a fim de aprimorar técnicas de isolamento do *C. difficile* em alimentos, considerando a importância desse microrganismo para a saúde pública.

Palavras-Chave: Doenças transmitidas por alimentos, segurança alimentar, toxinfecção alimentar.

## **Abstract**

*Clostridium difficile* is a gram-positive anaerobic spore-forming bacterium that causes disease in humans and animals, especially those undergoing antibiotic therapy. Although the studies with *C. difficile* are increasing, the forms of transmissions are still not very clear; however, many authors partner contaminated foods as the main form of contamination by this bacterium. The aim of this work were to isolate the *C. difficile* from homogenized beef commercialized at the Federal District area, as well as to detect this bacterium by the polymerase chain reaction. Eighty-two samples were analyzed, and no microbiological isolation of *C. difficile* was detected in any one of them. However, 06 (7.3%) samples showed the presence of *C. difficile* by PCR. Although the microbiological isolation of *C. difficile* was not successful in this study, the PCR technique proved to be an effective tool for the detection of this microorganism. Since this is a pioneering study carried out in the Federal District and region, but more studies should be done to improve techniques for isolating *C. difficile* in food, considering the importance of this microorganism to public health.

**Keywords:** Foodborne illness, food security, food poisoning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Resultado da PCR para detecção de *Clostridium difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada na região do Distrito Federal e Entorno. 1) Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®) 2) Controle positivo de *C. difficile*. 3 a 7) 230bp: reação positiva da PCR para *C. difficile* para 05 amostras de carnes bovina homogeneizadas. Visualização em transiluminador Imagequant (Gelifesciences) em gel de agarose a 1,5% com concentração de 5 µg/ ml de brometo de etídio.



## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| RESUMO .....   | VII  |
| ABSTRACT .....   | VIII |
| CAPÍTULO I .....   | 1    |
| <b>I    INTRODUÇÃO</b> .....   | 1    |
| <b>II    REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 3    |
| 1    HISTÓRICO .....   | 3    |
| 2    TAXONOMIA .....   | 4    |
| 3    MÉTODOS DE ISOLAMENTO DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE .....  | 4    |
| 4    EPIDEMIOLOGIA .....   | 5    |
| <b>III    OBJETIVOS</b> .....  | 7    |
| <b>IV    REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 8    |
| CAPÍTULO II .....  | 12   |
| <b>I    INTRODUÇÃO</b> .....   | 12   |
| <b>II    MATERIAL E MÉTODO</b> .....   | 13   |
| 1    ORIGEM DAS AMOSTRAS .....   | 13   |
| 2    ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO NAS AMOSTRAS DE CARNE BOVINA<br>HOMOGENEIZADA .....   | 13   |
| 3    DETECÇÃO DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE PELA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE .....   | 15   |
| 4    ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 16   |
| <b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 16   |
| 1    ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM AMOSTRAS DE<br>CARNE HOMOGENEIZADA COMERCIALIZADA NA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL ..... | 17   |
| 2    PESQUISA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE PELA REAÇÃO EM CADEIA DAPOLIMERASE ..   | 19   |
| <b>IV CONCLUSÃO</b> .....  | 21   |
| <b>V    REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 22   |

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1935, Hall e Toole, estudando a flora intestinal de recém-nascidos saudáveis, descreveram um microrganismo até então desconhecido, que recebeu inicialmente a denominação de *Bacillus difficilis*, e logo em seguida renomeado de *Clostridium difficile*, refletindo exatamente a dificuldade encontrada para isolar e manter esse microrganismo em cultura pura (LYERLY et al., 1988). Ainda segundo LYERLY et al., (1988), Hall e Toole demonstraram que o *C. difficile* era extremamente patogênico, quando administraram cultura líquida do microrganismo em animais experimentais, sendo que os mesmos apresentaram parada respiratória e morte.

*Clostridium difficile* é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio obrigatório e pode esporular em condições adversas (BERGEYS et al., 1986). É considerado um patógeno emergente e, atualmente, é responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos (SILVA et al., 2014).

Segundo HOOVER e RODRIGUEZ – PALACIOS (2013), estudos revelam a existência de fortes indícios de que o *C. difficile* tem sido transmitido ao homem por meio de produtos de origem animal oriundos de aves, suínos e bovinos. Esses mesmos autores relatam ainda que embora seja consolidada a presença de *C. difficile* em alimentos, são escassas as evidências comprobatórias da transmissão desse microrganismo ao homem por meio de alimentos contaminados.

Conforme GOULD et al., (2014) o *C. difficile* é tanto um organismo comensal como um agente patogênico em animais domésticos e dos produtos alimentares, mas nem todos os estudos compararam os isolados de animais com aqueles conhecidos por causar doenças humanas. Os autores ainda alegam que apesar de estudos iniciais não tenham encontrado relação entre isolados recuperados de gatos, cães e de seres humanos (KEEL et al., 2007), estudos recentes encontraram sobreposição considerável entre os isolados bovinos, equinos, suínos, cães e humanos. Em todos estes estudos, certas estirpes pareciam, ser em grande parte, espécie específicas, ao passo que outros foram encontrados através de múltiplas espécies, incluindo os humanos.

De particular interesse, em estudos de vários países certas cepas foram indistinguíveis entre humanos e outros mamíferos, o que sugere uma fonte comum, a transmissão animal/humano (GOORHUIS et al., 2008).

A transmissão de *C. difficile* por alimentos implica que os esporos sobrevivam a estresses ambientais comuns encontrados em alimentos industriais, como etapas de processamento e manipulação (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2010). Esses mesmos autores citam estudos que tem demonstrado a capacidade dos esporos de *C. difficile* em sobreviver às temperaturas de aquecimentos tipicamente utilizadas no processamento de carne. Os autores afirmam que os resultados demonstraram que os esporos são capazes de sobreviver por 2h a 71°C, e que um tratamento de 10 minutos a 85°C inativa somente cerca de 90% das cepas de esporos, sugerindo que as atuais práticas de processamentos térmicos comerciais podem ser insuficientes para reduzir os esporos deste microrganismo.

Segundo SILVA et al. (2014) a infecção por *C. difficile* em animais foi recentemente confirmada no Brasil em potros, cães e descrita em uma jaguatirica criada em cativeiro (SILVA et al., 2013a; SILVA et al., 2013b; SILVA et al., 2013c). Em suínos, estudos recentes sugerem uma grande disseminação da doença em granjas brasileiras em um elevado número de matrizes (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011), dado semelhante ao relatado nos últimos anos em países da Europa e nos Estados Unidos, onde a infecção por *C. difficile* é considerada a principal causa não controlada de diarreia em leitões (SONGER, 2010).

Considerando a importância do *C. difficile* na contaminação do homem por meio de alimentos provenientes de produtos de origem animal, o crescente aumento em todo o mundo de pesquisas com a finalidade de esclarecer a possível correlação de transmissão desta bactéria ao homem, as escassas pesquisas no Brasil, a ausência completa de dados sobre este microrganismo na região do Distrito Federal, aliado à complexidade da metodologia de isolamento e detecção, a proposta desse trabalho foi pesquisar o microrganismo *C. difficile* em carnes bovinas homogêneas comercializadas no Distrito Federal e região do Entorno, por meio do cultivo microbiológico e pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

### 1. HISTÓRICO

O *Clostridium difficile*, principal agente etiológico da colite pseudomembranosa, é um bacilo Gram positivo, anaeróbio e esporulado, descoberto em 1935 por Hall e O'Toole na flora intestinal de recém-nascidos saudáveis e que só na década de 70 foi identificado como responsável por esta patologia (ALMEIDA et al., 2006). Dos doentes infectados pelo *C. difficile*, de 1 a 5% desenvolvem colite pseudomembranosa e uma grande maioria permanece assintomática (REINK et al., 1994 e ALMEIDA et al., 2006).

Após sua descoberta, o *Clostridium difficile* passou por um período de relativo anonimato, haja vista que a colite pseudomembranosa foi uma condição rara na era pré-antibiótica (LYERLY et al., 1988). Contudo, em meados dos anos 1970 e início da década de 1980, essa enfermidade atingiu proporções epidêmicas, tornando-se uma complicação comum ao uso de antibióticos (Kelly et al., 1994; ROCHA et al., 1999).

Somente por volta de 1970, as bactérias anaeróbias começaram a ser implicadas como importantes agentes causadoras de doenças (ROCHA et al., 1999). Por conseguinte, surgiram vários estudos em busca de antimicrobianos ativos contra esses agentes infecciosos emergentes; tendo sido a lincomicina um dos primeiros sucessos (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 do cólon (KELLY, et al., 1994). Dessa forma, esse antibiótico mostrava-se eficaz não somente contra as bactérias anaeróbias, mas também como um fator desencadeante da colite pseudomembranosa, possivelmente favorecendo a ativação do *C. difficile* que se encontrava inócuo apenas como um microrganismo da microbiota intestinal (ROCHA et al., 1999).

Embora o *C. difficile* já tenha sido isolado de animais destinados à produção de alimentos como suínos, bovinos e aves (PIRS et al., 2008, ZIDARIC et al., 2008), as fontes de contaminação deste microrganismo não são muito claras, todavia há trabalhos que demonstram a presença de ribotipos

idênticos em isolados do microrganismo oriundos de animais e do homem, sugerindo uma possível transmissão de *C. difficile* de animais para os alimentos (ARROYO et al., 2005). Embora haja indícios da possível transmissão por alimentos, uma vez que animais são portadores deste microrganismo, pesquisas ainda são escassas em todo o mundo, e raros no Brasil, segundo TSUCHIYA (2012).

## 2. TAXONOMIA

*Clostridium difficile* é um bacilo anaeróbio de 0,5-1,9 x 3,3-16,9 µm, Gram positivo, formador de esporos oval, subterminal, geralmente móvel em caldo e a temperatura de crescimento varia de 25 a 45°C com ótima 30-37°C. A prolina, ácido aspártico, serina, leucina, alanina, treonina, valina, fenilalanina, metionina e isoleucina são utilizados pelo microrganismo durante seu crescimento e hidrolisa a esculina (BERGEYS, 1986; CATO et al., 1986).

De acordo com Lawson et al. (2016), a classificação do *Clostridium difficile* apresenta-se atualmente da seguinte forma:

|                |                       |
|----------------|-----------------------|
| <b>Reino</b>   | <i>Bacteria</i>       |
| <b>Filo</b>    | <i>Firmicutes</i>     |
| <b>Classe</b>  | <i>Clostridia</i>     |
| <b>Ordem</b>   | <i>Clostridiales</i>  |
| <b>Família</b> | <i>Clostridiaceae</i> |
| <b>Gênero</b>  | <i>Clostridium</i>    |
| <b>Espécie</b> | <i>C. difficile</i>   |

### **3. Métodos de Isolamento do *Clostridium difficile***

Atualmente há uma variedade de trabalhos que realizam experimentos comparativos para verificação de meios seletivos e enriquecimentos diferenciados com o objetivo de determinar os melhores protocolos para isolamento e cultivo do *C. difficile*.

No início das pesquisas com *C. difficile*, pesquisadores propuseram uma técnica de seleção de esporos e do uso de meios seletivos em placas, como o ágar sangue-álcool feniletílico, ágar frutose-gema de ovo-cicloserina-cefoxitina (CCFA) (KONEMAN et al., 2001). Estes autores descrevem que após 48 de incubação em anaerobiose, as colônias de *C. difficile* não são hemolíticas, medem cerca de 2 a 4 mm de diâmetro, são translúcidas, acinzentadas, elevadas ao microscópio, com aspecto iridescente.

Segundo TSUCHIYA (2012), outro meio também utilizado é o CDMN (ágar sangue - *Clostridium difficile* moxalactam norfloxacin) ágar sangue, onde as colônias apresentam-se com coloração acinzentada ou branca, opacas, chatas ou pouco convexas, rizóides ou circulares, de tamanho variando de 2-5 mm (GEORGE et al., 1979), e apresentam odor característico de fezes de cavalo (DELMÉE, 2001).

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).

### **4. Epidemiologia**

#### **Distribuição geográfica**

Segundo KONEMAN et al. (2001), o *C. difficile* encontra se amplamente distribuído na natureza, tendo sido isolado do solo, água,

conteúdo intestinal de diversos animais, vagina e uretra de seres humanos e fezes de muitos lactentes saudáveis. Entretanto, os autores defendem que o microrganismo é mais prevalente em fezes de adultos hospitalizados sem diarreia ou colite. Afirmam ainda que o *C. difficile* foi isolado a partir de fezes de aproximadamente 13 a 30% dos adultos hospitalizados os quais estavam colonizados, mas não apresentavam evidências de doenças causadas por *C. difficile* ou antecedentes de tratamento com antibióticos.

Vários estudos têm sido realizados por diversos pesquisadores em diferentes países, relatando a ocorrência de *C. difficile* em crianças (GARCIA et al., 1988).

Segundo HOOVER et al., (2013) desde 2005, cepas de *C. difficile* em condições de causar doenças no homem têm sido isoladas com frequência em diversos tipos de alimentos nas Américas e na Europa. Esses autores ainda afirmam que a ocorrência de *C. difficile* é extremamente variável, alternando de 0% e 42% em diversas categorias de carnes embaladas, levando em conta que a maioria dos estudos descreve uma prevalência inferior a 7%.

RODRIGUEZ-PALACIOS et al., (2009) e GOULD et al., (2014) em estudos realizados em duas províncias canadenses, encontraram a prevalência de *C. difficile* em produtos de carne bovina no varejo de 6,1% (6,7% em carne moída e 4,6% em costeletas de vitela). Esses mesmos autores também notaram uma variação sazonal da prevalência superior (11,5%) desse microrganismo nos meses de janeiro e fevereiro.

Segundo BOUTTIER et al. (2010) foi realizado uma pesquisa de produtos alimentícios obtidos em lojas de varejo de Paris, não sendo detectado *C. difficile* em salsichas de porco, porém sendo isolado esse microrganismo em 1,9% das amostras analisada a partir de carne bovina homogeneizada embalada a vácuo. Diante dos achados, os autores concluíram que a prevalência de *C. difficile* em carne moída na França é baixa em comparação com a prevalência de outros países.

Já Weese et al. (2009) isolaram *C. difficile* em 12% das amostras de carne bovina e suína homogeneizadas, coletadas entre agosto de 2008 e novembro de 2008, em quatro províncias canadenses (British Columbia, Saskatchewan, Ontário e Quebec).

No Brasil, TICHUYA (2012) realizou uma pesquisa de produtos cárneos obtidas de estabelecimentos comerciais do município de Campinas, em São Paulo e detectou a presença de *C. difficile* em 21,8 % de carne bovina homogeneizada, 3,3% em carne bovina peça, 18% em carne de frango e 0% em carne suína.

## **II. Objetivos**

### **Objetivo Principal**

Promover a pesquisa de *C. difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada na região do Distrito Federal e Entorno.

### **Objetivos Específicos**

- Isolamento microbiológico de *C. difficile* em carne bovina homogeneizada.
- Detecção de *C. difficile* por meio da reação em cadeia de polimerase, através de detecção de fragmento do gene triose *phosphate isomerase* (TPI).



### III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, N.[*et al*]. Colite pseudomembranosa – uma casuística de internamentos. *In Jornal Português de Gastreenterologia*. v. 13, p. 6-13, 2006.

ARROYO, L. G.[*et al*]. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *In Journal of Medical Microbiology*. v. 54, p. 163–166, 2005.

BALASSIANO, I.T. [*et al*]. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *In Antonie Van Leeuwenhoek*. v.99, n.2, p.249-255, 2011.

BOUQUIER, S.; BARC, M. C. *Clostridium difficile* in Ground Meat, France. *In Emerging Infectious Diseases*. v. 16, n. 4, p. 733–735, 2010.

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

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

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

GARCIA, L. B.; UZEDA, M. Ocorência de *Clostridium difficile* nas fezes de crianças do Rio de Janeiro. *In Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 30, n. 6, p. 419-423, 1988.

GEORGE, W. L.[*et al*]. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *In Journal of Clinical Microbiology*. v. 9, n. 2, p. 214-219, 1979.

GOORHUIS, A.; DEBAST, S. B.; VAN, L. L. A. Clostridium difficile PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs?. *In Journal Clinical Microbiology*. v. 46, n. 3, p. 1157, 2008.

GOULD, L.; LIMBAGO, B. Clostridium difficile in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen?. *In Clinical Infectious Diseases*. v. 51, n. 5, p. 577-582, 2010.

GOULD, L.; LIMBAGO, B. Clostridium difficile in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen?. *In Clinical Infectious Diseases*. v. 51, n. 5, p. 577-582, 2014.

HALL, I. C.; E. O'Toole. Intestinal flora in new-born infants. *In American Journal of Diseases of Children*. v. 49, p.390-402, 1935.

HOOVER, D.; RODRIGUEZ-PALACIOS, A. Transmission of *Clostridium difficile* in Foods. *In Infectious Disease Clinics of North America*. v. 27, n.3, p. 675-685, 2013.

KEEL, K.[*et al*]. Prevalence of PCR ribotypes among Clostridium difficile isolates from pigs, calves, and other species. *In Journal Clinical Microbiology*. v. 45, n. 6, p. 963-1964, 2007.

KELLY, C. P; POTHOUKAKIS, C; LAMONT, J; *Clostridium difficile* Colite. *In The new England Journal of Medicine*. v. 330, p. 257-262, 1994.

KONEMAN, E. W.[*et al*]. *In Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido*. Ed. Medsi. 5º edição, p. 781-783, 2001.

LAWSON, P. A.; CITRON, D. M.; TYRRELL, K. L.; FINEGOLD, S. M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Tool e 1935) Prévot 1938. *In Anaerobe*. v. 40, p. 95-99, 2016.

LIPPKE, R.T.[*et al*]. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *In Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.31, n.6, p.505-510, 2011.

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

REINKE, C. M.; MESSICK, C. R. Update on Clostridium difficile induced colitis. Part I. *In American Journal of Health-System Pharmacy*. v. 51, p.1771-1781, 1994.

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

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.[et al]. Possible seasonality of Clostridium difficile in retail meat, Canada. *In Emerging Infections Diseases*. v. 15, n. 5 p. 802-805, 2009.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.[et al]. Clostridium difficile survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe*. v. 16, n. 5, p. 540-542, out. 2010.

REINKE, C. M; MESSICK, C. R. Update on Clostridium difficile induced colitis. *In American Journal of Hospital Pharmacy*. v. 51, p. 1771-81, 1994.

SILVA, R. O. S.[et al]. Standardization of a model of Clostridium difficile infection in Syrian hamsters Mesocricetus auratus. *In Ciência Rural*. v. 44, n. 8, p. 1415-1421, 2014.

\_\_\_\_\_. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. *In Brazilian Journal of Microbiology*. v.44, n1, p.131-137, 2013a.

\_\_\_\_\_. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, v.20, p.82- 84, 2013b.

\_\_\_\_\_. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *In Equine Veterinary Journal*. v.45, p.671-675, 2013c.

\_\_\_\_\_. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *In Ciência Rural*. v.43, n.1, p.73-80, 2013d.

\_\_\_\_\_. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *In Ciência Rural*. v.41 n.8, p.1130-1135, 2011.

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

TSUCHIYA, A. C. **Avaliação de Métodos e ocorrência de *Clostridium difficile* em Carnes**. 83f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.

WEESE, J.S.[*et al*]. Detection and Enumeration of *Clostridium difficile* Spores in Retail Beef and Pork. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 15, p. 5009-5011, ago. 2009.

WEESE, J.S.[*et al*]. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *In Letters in Applied Microbiology*. v. 50, n. 4, p. 362-365, 2010.

## CAPÍTULO II

### I. INTRODUÇÃO

*Clostridium difficile* é uma bactéria anaeróbia formadora de esporos, Gram-positiva, que causa doença em seres humanos e animais. Os sintomas vão desde a colonização assintomática, diarreia e colite, podendo ser fatal (GOULD et al., 2010). A doença causada pelo microrganismo tem sido tradicionalmente considerada como uma infecção nosocomial em seres humanos, especialmente nos pacientes que receberam terapia antimicrobiana prolongada (BARTLETT, 1997; MCDONALD et al., 2006; HOOKMAN e BAKRI, 2009).

A incidência de doenças associadas à *C. difficile* tem aumentado ao longo da última década. Essa bactéria tem sido encontrada em produtos cárneos, intestinos de humanos e animais, podendo ser ainda transmitida pelo contato de indivíduos e animais infectados, ou pelo consumo de alimentos contaminados (JÖBSTL et al., 2010; RUPNIK et al., 2009). Adicionalmente, o CDC/FDA listou *C. difficile* como uma das três ameaças urgentes em seu recente relatório sobre os agentes patogênicos emergentes com resistência aos antibióticos.

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

Segundo dados da ABIEC, em 2015, o Brasil foi o maior produtor mundial de carne bovina com uma produção de 9,56 milhões de toneladas, de

um total de 39,16 milhões de cabeças abatidas. O Brasil tem o segundo maior consumo de carne no mundo, atrás dos Estados Unidos, e terceiro colocado no *ranking* de consumo per capita (38,6 kg/hab/ano) ficando atrás da Austrália (88,3 kg/hab/ano) e Argentina (64,6 kg/hab/ano). A venda de carne no varejo do mercado brasileiro movimentou R\$176,36 bilhões, enquanto que as exportações chegaram a R\$19,49 bilhões.

Considerando a relevância do *C. difficile* para a saúde pública, os poucos trabalhos realizados com o microrganismo em produtos cárneos no Brasil, este trabalho teve por objetivo pesquisar o microrganismo *C. difficile* em carnes bovinas homogeneizadas comercializadas no Distrito Federal e região do Entorno, por meio do cultivo microbiológico e pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

## **II.MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Origem das amostras**

Foram analisadas um total de 82 amostras de carne bovina homogeneizadas, adquiridas junto aos estabelecimentos comerciais (açougues, mercearias e supermercados) de Brasília e Entorno. As amostras foram obtidas em situação análoga a de um consumidor comum, não sendo declarada a finalidade da compra. Para cada amostra analisada, foi adquirida a quantidade compreendida entre 200 g e 1,0 kg. As mesmas foram obtidas no período de fevereiro de 2016 a março de 2017. As amostras foram armazenadas em suas embalagens originais, integras, com selo de Serviço de Inspeção Federal (SIF), do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Vegetal e Animal (DIPOVA) ou pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE) de Goiás, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório de microbiologia de alimentos (LAMAL), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, e processada em até 24 horas.

## 2. Isolamento microbiológico nas amostras de carne bovina homogeneizada

A metodologia de isolamento microbiológico utilizada foi a descrita por MOOYOTTU *et al.* (2015), em que 50 g de cada amostra de carne bovina homogeneizada foram pesadas individualmente em sacos plásticos estéreis e adicionado de 50 mL de caldo *Clostridium difficile* moxalactan-norfloxacina (CDMN), perfazendo a proporção 1:1. A composição do caldo CDMN foi: peptona 40g/L, fosfato dissódico 5g/L, fosfato de potássio 1g/L, sulfato de magnésio 0,1g/L, cloreto de sódio 2,0g/L, frutose 6g/L, cisteína [0,5 g/L, taurocolato de sódio 1g/L , adicionados de moxalactam 16 mg/L e norfloxacina 6 mg/L, suplementado com taurocolato de sódio a 0,1% (Manual E-Toku, <http://www.toku-e.com/Assets/ProductPDF/MS057.pdf>, ASPINALL *et al.*,1992; ZAHRA *et al.*, 2013; CHAI *et al.*, 2015).

Em seguida, a mistura (carne homogeneizada e caldo CDMN 1:1) foi homogeneizada por 1 minuto em homogeneizador de amostras digital tipo Stomacher - SL 299 – (Solab®). Finalizado o processo de homogeneização, uma alíquota (1,0 mL) deste caldo foi coletada e congelada à - 85°C para futura extração de DNA. Outra alíquota (1,0 mL) da mesma mistura foi semeado em ágar CDMN e incubado a 37°C durante 48h em câmara de anaerobiose (Anaerobic Systems® da ThermoScientific®) com mistura especial de gases contendo 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>.

Após incubação, em câmara de anaerobiose à 37°C por 48h, da mistura do caldo CDMN com a carne homogeneizada (1:1), uma alíquota de um mililitro (1,0 mL) foi coletada e congelada à - 85°C para posterior extração de DNA. Uma outra alíquota de um mililitro (1,0 mL) desta mesma mistura após o período de incubação foi submetida a tratamento pela adição de 1,0 mL de etanol anidro 95 % PA ACS® (Vetec) por uma hora, visando à eliminação das células vegetativas. Em seguida, esse produto foi submetido à centrifugação a 4000 xg durante 10 minutos em microcentrífuga de bancada NT 800 (Novatecnica®) e o sobrenadante foi descartado, conforme protocolo descrito por Mooyottu *et al.* (2015). Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 500 µl de solução tampão fosfato (PBS) e semeadas em placas de petri contendo

ágar CDMN. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37° C durante 48 h.

Colônias com suspeita de serem de *C. difficile*, as quais se apresentavam com coloração acinzentada ou branca, opacas, achatadas ou pouco convexas, rizoides ou circulares e de tamanho variando de 2-5 mm (GEORGE *et al.*, 1979), foram semeadas em ágar base da marca Acumedia® contendo 7% de sangue de equino desfibrinado, e incubadas anaerobicamente a 37°C durante 48 h. A identificação final do microrganismo foi feita baseando-se no crescimento em ágar CDMN, coloração de Gram e características da colônia (MOOYOTTU *et al.*, 2015).

### **3. Detecção de *Clostridium difficile* pela reação em cadeia de polimerase**

A detecção do *C. difficile* por PCR foi realizada em cada etapa do cultivo microbiológico. O objetivo foi a confirmação da presença ou não do microrganismo nas amostras de carne homogeneizadas analisadas e, a possível detecção em cada etapa do isolamento microbiológico. O gene escolhido para a detecção da espécie por PCR foi o triose *phosphate isomerase* (TPI), um gene de manutenção específica da espécie de *C. difficile*, cujas sequências de *primers* são *tpi-F (forward)* 5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3' e *tpi-R (reverse)* 5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3', conforme descrito por Leeme *et al.*, 2004 e Rodriguez *et al.*, 2014.

Foram realizadas reações da polimerase em cadeia na mistura do caldo CDMN com a carne homogeneizadas (1:1) e submetida à homogeneização no Stomacher - SL 299 – (Solab®), antes e após a incubação em câmara de anaerobiose à 37°C por 48h. Foram realizadas PCR de colônias nas placas em que houve crescimentos suspeitos de *C. difficile* em todas as etapas do isolamento microbiológico.

Para a extração de DNA total da mistura de caldo CDMN e das amostras de carne homogeneizada (1:1), antes e após a incubação em câmara de anaerobiose, foi utilizada o método do fenol, clorofórmio e álcool isoamílico



nas proporções de 25:24:1, conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2010). Foram submetidos à PCR os caldos que foram submetidos à extração de DNA total, bem como as colônias que apresentaram características suspeitas de *C. difficile* (coloração acinzentada ou branca, opacas, chatas ou pouco convexas, rizoides ou circulares e de tamanho variando de 2-5 mm).

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µl, os quais eram compostas por: 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTPs, 10pmol de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse*, 1,0 U Taq DNA polymerase (invitrogen®), 2,5µl de tampão PCR 10X, e como template foram utilizados os produtos da PCR, com aproximadamente 10ng/ µl de concentração para as misturas antes e depois da incubação em anaerobiose, e PCR de colônias com características de *C. difficile*.

As reações de ampliação da PCR foram realizadas em termociclador (Mycycler Thermalcycler™, Bio Rad®) com um ciclo inicial de 95° C por 2 minutos, seguida por 29 ciclos de: 94° por 1 minuto, 55° por 1 minuto e 72° C por 2 minutos, finalizando com 1 ciclo de 72° C por 5 minutos. Ao término da amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, com brometo de etídio a 3 µg/ml, conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2010). As imagens foram capturadas através de equipamento sob luz ultravioleta (Major Scienc®). Conforme Leeme *et al.* (2004), a expectativa era de ser encontrados produtos com 230 pares de bases. Cepas de *Clostridium difficile* utilizadas como controle positivo neste estudo foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Dirce Yorika Kabuki do Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

#### 4. **Análise estatística**

A análise estatística empregada foi a de estudo observacional, para a verificação da ocorrência de *C. difficile* em amostras de carnes bovina homogeneizadas, comercializadas no Distrito Federal e Entorno, conforme descrito por (Pereira *et al.*, 1995).

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. Isolamento microbiológico de *Clostridium difficile* em amostras de carne homogeneizada comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno

Não foram isoladas cepas de *C. difficile* em nenhuma das 82 amostras de carnes bovina homogeneizadas comercializadas no Distrito Federal e Entorno. Esse resultado se assemelha aos obtidos por KNIGHT *et al.* (2013), em que os autores não isolaram nenhuma cepa de *C. difficile* em 151 amostras de carcaças bovina analisadas, oriundas de abatedouros frigoríficos da Austrália.

TSUCHIYA (2012) realizou uma pesquisa de *C. difficile* em amostras de carnes resfriadas, sendo carne bovina moída, coxão mole (*Semimembranosus*), lombo suíno (*Longissimus dors*) e peito de frango, adquiridas de estabelecimentos comerciais do município de Campinas, em São Paulo. Os resultados globais obtidos pelos autores foram de 11,5% de presença de *C. difficile*, sendo desta forma diferentes aos obtidos neste estudo. Uma das diferenças na metodologia de TSUCHIYA (2012) em relação a este trabalho, foi o tempo de incubação (carne homogeneizada e caldo CDMN 1:10) de 10 dias na primeira incubação, e posteriormente 48h no plaqueamento da amostra em ágar CDMN.

HARVEY *et al.*, (2011) analisaram 40 amostras de retalhos diversos de carnes de supermercados no Texas (Estados Unidos), em que foi detectado *C. difficile* em 3 amostras (7,5%) as quais eram carne de porco e peru moída, e chouriço de porco. Weese *et al.* (2009) também isolaram *C. difficile* em 12% das amostras de carne bovinas homogeneizadas obtidas de mercados nas regiões de British Columbia, Saskatchewan, Ontário e Quebec, no Canadá.

A metodologia escolhida para ser empregada neste estudo é uma possível justificativa pelo insucesso dos achados quanto ao isolamento microbiológico do *C. difficile*. A metodologia utilizada para a execução dessa pesquisa foi baseada nos estudos de LEEME *et al.* (2004), WEESE *et al.* (2010) e MOOYOTTU *et al.* (2015). Entretanto, na metodologia empregada por

ZAHRA et al. (2013) no isolamento de *C. difficile* em carnes, observa-se que os autores utilizaram um período de incubação maior do que o utilizado neste trabalho que foi de 48h, sendo que na primeira incubação (após homogeneização da carne homogeneizada com o caldo CDMN) as amostras foram incubadas durante 7 dias a 37°C em anaerobiose. Da mesma forma, Harimi et al. (2014) realizaram a incubação num intervalo entre 10 e 15 dias sob condições de anaerobiose a 37°C. Assim, pode ser que o tempo de 48h de incubação, utilizados neste estudo, tenha sido curto para o desenvolvimento do microrganismo no meio de cultivo empregado.

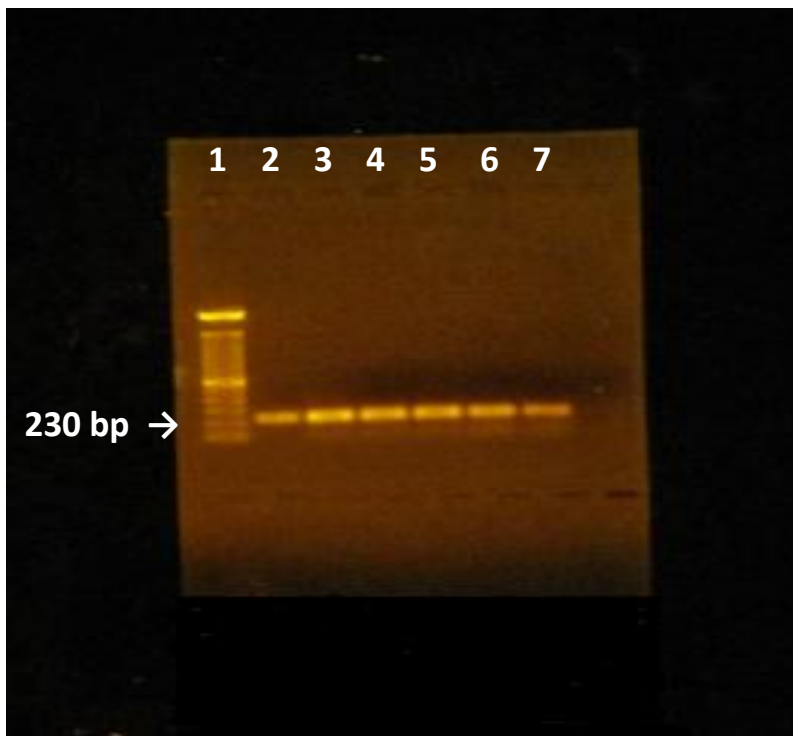
Ainda em referência ao isolamento do cultivo microbiológico do *C. difficile*, GOULD et al. (2010) defendem que as diferentes metodologias de cultivo podem contribuir para as variações das prevalências de *C. difficile* em diferentes estudos de carne de varejo. Atualmente não há trabalhos publicados que relatam a metodologia de eleição para detecção de *C. difficile* em alimentos (GOULD et al., 2010). Na inexistência de um método padrão para detecção e isolamento desse microrganismo em alimentos, cada pesquisador utiliza meios seletivos e enriquecimentos diferenciados (TSUCHIYA, 2012), que por sua vez pode contribuir para a não padronização do método. Essa situação pode ser justificada pelas características anaeróbias do microrganismo e relativa complexidade da metodologia empregada em seu isolamento e detecção (TSUCHIYA, 2012).

Mais pesquisas devem ser realizadas no sentido de se verificar a melhor forma de se cultivar este microrganismo na matriz carne bovina homogeneizada.

## **2. Pesquisa de *Clostridium difficile* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Das 82 amostras analisadas, 06 (7,3%) apresentaram a presença de *C. difficile* na PCR (Figura 1), sendo que estas seis amostras apresentaram reações da PCR positivas no caldo (mistura da carne com o meio CDMN na proporção 1:1) obtido após a homogeneização e antes da primeira incubação

em câmara de anaerobiose a 37°C por 48h, bem como neste mesmo caldo, após a incubação. Esta identificação confirma a presença do microrganismo nas amostras de carne homogeneizada bovina, comercializadas no Distrito Federal e Entorno.



**Figura 1** – Resultado da PCR para detecção de *Clostridium difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada na região do Distrito Federal e Entorno. 1) Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®) 2) Controle positivo de *C. difficile*. 3 a 7) 230bp: reação positiva da PCR para *C. difficile* para 05 amostras de carnes bovina homogeneizadas. Visualização em transiluminador Imagequant (Gelifesciences) em gel de agarose a 1,5% com concentração de 5 µg/ml de brometo de etídio.

Embora não tenha sido possível realizar o isolamento microbiológico, a PCR permitiu detectar a presença do *C. difficile*. Sendo este o primeiro trabalho de detecção do microrganismo na região. Considerando a eficiência da PCR quanto a detecção do *C. difficile*, RODRIGUEZ *et al.* (2014) detectaram essa bactéria, por esse método, em 2,3% de amostras de carne de hambúrguer e carne moída obtidas no comercio varejista da Bélgica.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados por ESFANDIARI *et al.* (2014), em pesquisa realizada no Iran em que

utilizaram a PCR para fazer a detecção do *C. difficile* em carne bovina e de carneiro homogeneizadas, com detecção de 2,1% e 6,2%, respectivamente.

Da mesma forma, LEEME et al. (2004) utilizaram a PCR para análise de 622 amostras de fezes de animais (equino, bovino, cães e gatos) com sintomatologia de infecção intestinal por *C. difficile*, em que foram confirmadas a presença dessa bactéria em 8% das amostras avaliadas.

Com isso, os autores citados acima consideraram a PCR como sendo um método de detecção confiável para *C. difficile*.

TSUCHIYA (2012) em estudo para detecção do *C. difficile* realizado em amostras adquiridas de 24 estabelecimentos comerciais, do município de Campinas-SP, detectou a presença da bactéria em 21,8% em amostras de carne bovina homogeneizada, 18% em carne de frango, 3,3% em carne bovina em peça e 0,0% em carne suína, sendo todas confirmadas pelo uso da técnica da PCR.

SILVA (2014) também utilizou da PCR para confirmar a presença de estirpes de *C. difficile* isoladas no Brasil de cães (8 amostras), leitões (6), potros (5), bezerros (5) e jaguatirica (1). A técnica mostrou-se satisfatória quanto a identificação do *C. difficile*.

#### **IV.CONCLUSÃO**

Foi constatada a presença de *C. difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada no Distrito Federal e região do Entorno por meio da técnica de detecção por PCR, sendo a primeira descrição na região. Não foi possível realizar o isolamento microbiológico do *C. difficile* utilizando a metodologia preconizada nesse estudo.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. **Perfil da Pecuária no Brasil Relatório Anual 2016** da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em <http://www.assessoriaagropecuaria.com.br/anexo/88>. Acesso em 22 de junho de 2017.

ASPINALL, S. T.; HUTCHINSON, D. N.; New Selective Medium for Isolating *Clostridium difficile* from faeces. *In Journal of Clinical Pathology*. v. 45, n. 9, p. 812-814, 1992.

BAKRI, M. M. [et al]. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. **Emerging Infections Diseases**. v. 15, p. 817-818, 2009.

BARTLTT, J.G. *Clostridium difficile* infection: pathophysiology and diagnosis. **Seminars in Gastrointestinal Disease**. v. 8, p. 12–21, 1997.

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

CHAI, C.[et al]. Non-selective and selective enrichment media for the recovery of *Clostridium difficile* from chopped beef. *In Journal of Microbiological Methods*. v. 109, p. 20-24, 2015.

DENG, K.[et al]. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *In Food Microbiology*. v. 46, p. 218-221, 2015.

ESFANDIARI, Z.[et al]. Prevalence and characterization of *Clostridium difficile* in beef and mutton meats of Isfahan Region, Iran. *In Jundishapur J. Microbiology*. v. 5, n. 8, p. 16771, 2014.

GEORGE, W. L.[et al]. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *In Journal of Clinical Microbiology*. v. 9, n. 2, p. 214-219, 1979.

GOULD, L. H.; LIBAGO, B.;. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: A new foodborne pathogen. *In Clinical Infectious Diseases*. v. 51, n. 5, p. 577-582, 2010.

HARVEY, R. B.[*et al*]. *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. In **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 23, n. 4, p. 807-811, 2011.

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

JOBSTL, M.; HEUBERGER, S.; INDRA, A. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. **Journal Food Microbiology**. v. 31, p.172–175, 2010.

KNIGHT, D. R.[*et al*]. Cross-Sectional Study Reveals High Prevalence of *Clostridium difficile* Non-PCR Ribotype 078 Strains in Australian Veal Calves at Slaughter. In **Appl Environ Microbiol**. v. 79, n. 8, p. 2630-2635, 2013.

LEMEE, L.[*et al*]. Multiplex PCR Targeting *tpi* (Triose Phosphate Isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of *Clostridium difficile*. In **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 5710-4, 2004.

McDonald, L.C.; Owings, M.; Jernigan, D.B. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. **Emerging Infectious Diseases**. v.12, p. 409–415, 2006.

MOOYOTTU, S.[*et al*]. Characterization of a multidrug resistant *C. difficile* meat isolate. In **International Journal of Food Microbiology**. v. 192, p. 111-116, 2015.

PEREIRA, M. G. Epidemiologia: teoria e prática. Editora: Guanabara-koogan. 583 p. 1995.

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

RAHIMI, E.; JALALI, M.; WEESE, J.S. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. In **BMC Public Health**. v. 5; N. 14, P. 119, 2014.

RODRIGUEZ, C.[*et al*]. Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. **Food Microbiology**. v. 42, p. 166-177, 2014.

Rupnik, M.; Wilcox, M.H.; Gerding, D.N. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. v. 7, p. 526–536, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. The Condensed Protocols. From Molecular Cloning: A Laboratory manual. By Cold Spring Harbor laboratory Press. p. 733, 2006.

SILVA, R. O. S.[*et al*]. Standardization of a model of Clostridium difficile infection in Syrian hamsters Mesocricetus auratus. *In* **Ciência Rural**. v. 44, n. 8, p. 1415-1421, 2014.

TOKU, E. Manual Application Data Sheet. E-Toku, <http://www.tokue.com/Assets/ProductPDF/MS057.pdf>. Acesso em 15 de junho de 2017.

TSUCHIYA, A. C. **Avaliação de Métodos e ocorrência de Clostridium difficile em Carnes**: em estudo de caso. 83f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.

WEESE, J.S.[*et al*]. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *In* **Letters in Applied Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 362-365, 2010.

ZIDARIC, V.[*et al*]. High diversity of Clostridium difficile genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *In* **Anaerobe**. v. 14, p.325–327, 2008.