



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Clostridium difficile* EM CARNES

por

Patrícia Marta Marcelino Soares de Carvalho

Setembro 2014



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

DETECTION AND QUANTIFICATION OF *Clostridium difficile* IN MEAT

by

Patrícia Marta Marcelino Soares de Carvalho

September 2014



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Clostridium difficile* EM CARNES

DETECTION AND QUANTIFICATION OF *Clostridium difficile* IN MEAT

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica  
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Patrícia Marta Marcelino Soares de Carvalho

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Doutora Paula Teixeira  
Doutor Gonçalo Almeida

Setembro 2014



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

DETECTION AND QUANTIFICATION OF *Clostridium difficile* IN MEAT

DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Clostridium difficile* EM CARNES

Thesis presented to *Escola Superior de Biotecnologia* of the *Universidade Católica Portuguesa* to fulfill the requirements of Master of Science degree in Food Engineering

by

Patrícia Marta Marcelino Soares de Carvalho

Place: Escola Superior de Biotecnologia of the Universidade Católica Portuguesa

Supervision: Doutora Paula Teixeira  
Doutor Gonçalo Almeida

September 2014

## RESUMO

*Clostridium difficile* é um agente patogénico comensal do trato gastrointestinal, que coloniza o cólon quer de indivíduos saudáveis, quer de doentes hospitalizados. Este microrganismo tem recebido muita atenção nos últimos anos devido ao aumento da incidência e severidade de infeções causadas na comunidade, extravasando assim o ambiente hospitalar. *Clostridium difficile* é um patogénico emergente em animais e relatos recentes evidenciam uma relação clonal significativa entre isolados de bezerros e de seres humanos. Foi também encontrado em vários alimentos, nomeadamente carne, o que sugere que estes podem estar envolvidos na transmissão de *C. difficile* de animais aos humanos. Assim, este estudo teve como objetivo detetar e quantificar *C. difficile* em carnes comercializadas em estabelecimentos do comércio tradicional e em grandes superfícies, na zona do Grande Porto e Lisboa. Foi realizada uma avaliação microbiológica recorrendo a duas metodologias, uma baseada na contagem direta de *C. difficile* e outra baseada na deteção deste microrganismo recorrendo a um pré-enriquecimento das amostras e a um pré-tratamento com etanol a 96% antes da inoculação em meio selectivo. Fizeram parte deste estudo 145 produtos adquiridos entre janeiro de 2012 e janeiro de 2013: 60 amostras de carne de vaca (novilho, vitela e bovino), 20 amostras de carne picada de porco, 24 amostras de frango (coxas, asas, pescoço, sobrecoxa, moelas e hambúrgueres), 39 enchidos tradicionais (alheira, salsicha fresca, paio, morcela, presunto, fiambre, chouriço, linguiça e moura) e 2 amostras de moluscos bivalves. Verificou-se que todas as amostras foram negativas para a contagem e deteção de *C. difficile* pelos métodos utilizados. Dada a evidência crescente da presença deste agente em vários alimentos, estudos futuros deverão incluir um maior número de amostras e incluir alimentos de diversas origens. O desenvolvimento de métodos de deteção mais eficazes deverá ainda ser considerado. Este microrganismo poderá tornar-se num importante agente causador de doença, sendo por isso muito importante compreender qual o seu impacto na saúde pública, devendo ser estudadas formas de minimizar ou impedir a sua transmissão ao ser humano.

## ABSTRACT

*Clostridium difficile* is a pathogen frequently found in the gastrointestinal tract, which either colonize the colon of hospitalized patients but also healthy individuals. This microorganism has received much attention in recent years due the increased incidence and severity of infections caused in the community, thus venting the hospital. *Clostridium difficile* is an emerging pathogen in animals and recent reports show a significant clonal relation between isolates from calves and humans. It has also been found in various foods including meat, which suggests that they may be involved in the transmission of *C. difficile* from animals to humans. This study aimed to detect and quantify *C. difficile* in meat sold in traditional shops and supermarkets in Porto and Lisbon. Microbiological evaluation was performed using two methods, one based on direct counting of *C. difficile* and other based on the detection of this microorganism by using a pre-enrichment of the samples and pre-treatment with 96% ethanol prior to inoculation in the selective medium. This study included 145 products purchased between January 2012 and January 2013: 60 samples of beef (veal and beef), 20 samples of minced pork, 24 samples of chicken (thighs, wings, neck, overthighs, gizzards and burgers), 39 traditional sausages (“alheira”, fresh sausage, “paio”, blood sausage, smoked ham, ham, “chouriço”, “linguiça” and “moura”) and two samples of bivalve molluscs. It was found that all samples were negative for enumeration and detection of *C. difficile* by the methods used. The prevalence of *C. difficile* in retail meat may not be as high as some reports indicate, yet its potential presence should not be ignored. Given the growing evidence of the presence of this agent in various foods, future studies should include a larger number of samples and include foods from diverse origins. The development of more effective methods of detection should still be considered. This microorganism may become an important disease-causing agent, so it is very important to understand its impact on public health and ways to minimize or prevent its transmission to humans should be investigated.

## AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Engenharia Alimentar me ajudaram, directa ou indirectamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À *Coordenadora do Mestrado em Engenharia Alimentar, Professora Alcina Morais*, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Ao *Centro de Inovação e Apoio Tecnológico e Empresarial (CINATE)*, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a execução deste projecto num centro de tão elevada qualidade e exigência.

À *Doutora Paula Teixeira*, expresso o meu profundo agradecimento pela confiança, paciência, ensinamentos e excelente orientação, apesar da mudança de tema esteve sempre ao meu lado e confiou na minha capacidade.

Ao *Doutor Gonçalo Almeida*, o meu sincero agradecimento pela co-orientação neste Projecto.

Aos *Meus Amigos, Pedro, Rita, Susana Xis, Susana Teixeira, Ana*, um Muito Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Agradeço-vos a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos nas alturas de desânimo.

À *Rute*, por estar sempre presente em todos os momentos, por saber sempre quando preciso de um telefonema. Por me encorajar e apoiar, por me ouvir a rir ou a chorar, o meu Muito Obrigada.

Ao *Ricardo*, um agradecimento especial pelo incentivo, pela transmissão de confiança e de força.

À *Minha Família*, em especial aos *Meus Pais*, ao *Meus Irmãos* e aos *Meus Queridos Avós*, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço, por serem um enorme exemplo e por todos os ensinamentos de vida. A eles, dedico todo este trabalho.

E a todos que não citei o nome, mas que foram essenciais para realização de mais este sonho.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Caraterísticas de <i>Clostridium difficile</i></b>	<b>4</b>
<b>1.2. Fatores de Risco</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Patogénese</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Prevenção e Controlo</b>	<b>12</b>
<b>1.5. A Emergência de uma Nova Estirpe Hipervirulenta – NAP1/BI/027</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Métodos de Detecção e Contagem</b>	<b>14</b>
<b>1.6.1. Meio de Cultura</b>	<b>14</b>
<b>1.6.2. Detecção de toxinas</b>	<b>16</b>
<b>1.6.3. Tipificação: Métodos fenotípicos</b>	<b>19</b>
<b>1.6.4. Tipificação: Métodos Moleculares</b>	<b>20</b>
<b>1.7. <i>Clostridium difficile</i> em Animais</b>	<b>21</b>
<b>1.7.1. Cães e gatos</b>	<b>21</b>
<b>1.7.2. Suínos, Bovinos e Aves</b>	<b>22</b>
<b>1.8. <i>Clostridium difficile</i> em Alimentos</b>	<b>25</b>
<b>1.8.1. Ocorrência em Carnes e derivados e outros produtos</b>	<b>25</b>
1.8.1.1. <i>Clostridium difficile</i> em carnes, ovos e vegetais na Eslovénia, 2012	25
1.8.1.2. Prevalência de <i>Clostridium difficile</i> em carnes vendidas na Holanda, 2010	26
1.8.1.3. <i>Clostridium difficile</i> em carne picada, França, 2010	26



1.8.1.4. <i>Clostridium difficile</i> em produtos crus de origem animal, Áustria, 2010	27
1.8.1.5. Possível sazonalidade do <i>Clostridium difficile</i> em carnes de retalho, Canada, 2009	28
1.8.1.6. Detecção e quantificação de <i>Clostridium difficile</i> em carnes picadas de vaca e porco, Canada, 2009	29
1.8.1.7. <i>Clostridium difficile</i> em produtos de carnes picadas, USA, 2009	30
1.8.1.8. <i>Clostridium difficile</i> em carnes picadas, Canada, 2007	30
<b>1.8.2. Ocorrência em Aves, seus produtos e Frangos de Aviário</b>	<b>31</b>
1.8.2.1. Detecção e caracterização de <i>Clostridium difficile</i> em frango de aviário, Canada, 2010	31
<b>1.8.3. Ocorrência em Saladas Prontas a Comer e Vegetais</b>	<b>33</b>
1.8.3.1. Contaminação de saladas prontas a comer com <i>Clostridium difficile</i> , França, 2013	33
1.8.3.2. <i>Clostridium difficile</i> em vegetais, Canada, 2010	33
1.8.3.3. <i>Clostridium difficile</i> em saladas prontas a comer, Escócia, 2009	34
<b>1.8.4. Ocorrência em Moluscos Bivalves Comestíveis</b>	<b>36</b>
1.8.4.1. Ocorrência de <i>Clostridium difficile</i> em moluscos bivalves comestíveis, Itália, 2012	36
<b>1.9. <i>Clostridium difficile</i> no Meio Ambiente</b>	<b>37</b>
1.9.1. Isolamento ambiental de <i>Clostridium difficile</i> de um hospital de ensino veterinário, 2000	37
1.9.2. Distribuição de <i>Clostridium difficile</i> no ambiente de South Wales, 1996	38
<b>1.10. Objetivo Geral</b>	<b>39</b>

<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Amostragem</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Metodologia de análise</b>	<b>40</b>
<b>2.3. Controlo Positivo</b>	<b>44</b>
<b>2.3.1. Determinação da viabilidade de <i>Clostridium difficile</i></b>	<b>44</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>50</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Clostridium difficile* foi identificado em 1935, mas só a partir de 1978 foi associado a casos em humanos com diagnóstico de colite pseudomembranosa (Muto et al., 2005; Sunenshine et al., 2006; Freeman et al., 2010; Rodriguez-Pardo et al., 2013). *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos e toxigênico, comensal do trato gastrointestinal, que coloniza o cólon de cerca de 3% dos adultos saudáveis e de 10 a 30% dos doentes hospitalizados (Viana, 2013). Em condições normais, a microbiota intestinal inibe o crescimento de *C. difficile*. No entanto, quando o equilíbrio desta microbiota é alterado, por exemplo com a toma de antibióticos, os esporos de *C. difficile* encontram condições propícias à sua germinação, colonização e segregação de toxinas (Rupnik et al., 2009; Rodriguez-Pardo et al., 2013). A infecção por *C. difficile* é a principal causa de diarreias no mundo industrializado (Jones et al., 2012).

O conhecimento sobre a sua estrutura, toxinas e ribótipos está em expansão. Na última década várias estirpes hipervirulentas surgiram e foram associadas ao aumento da gravidade da doença, à sua alta recorrência e mortalidade. Embora anteriormente esta doença fosse classificada principalmente como uma infecção hospitalar, diretamente relacionada com os cuidados de saúde prestados, nas últimas décadas, as infecções causadas por *C. difficile* adquiridas na comunidade têm sido cada vez mais reportadas (Jones et al., 2012). Os fatores de risco incluem o internamento hospitalar, a idade avançada e o uso de antibióticos. A presença ubiquitária de *C. difficile* no ambiente e a colonização intestinal assintomática podem ser considerados importantes reservatórios para a infecção e para as alterações epidemiológicas da infecção por *C. difficile* (Jones et al., 2012).

Apesar de existir atualmente, por exigência da Comissão Europeia, uma vigilância na Europa para as infecções causadas por *C. difficile*, a sua comunicação não é feita de uma forma sistemática nem obrigatória (Jones et al., 2012).

Aproximadamente 25% dos doentes sujeitos a antibioterapia sofrem de diarreia, especialmente aqueles com idade avançada e com estado de saúde debilitado. Assim, o agente patogénico mais frequentemente detectado é *C. difficile*, responsável por cerca de 25% das diarreias associadas a antibioterapia, originando quase todas as suas manifestações graves (McFarland, 1998; Wistrom et al., 2001). A infecção por *C.*

*difficile* pode apresentar-se de várias formas: desde portador assintomático, passando por uma diarreia autolimitada, até formas mais graves como a colite pseudomembranosa (Hurley e Nguyen, 2002), colite severa, megacólon tóxico, perfuração intestinal com ou sem sépsis ou mesmo a morte. No estado de doença ativa, o epitélio do cólon é o maior alvo das toxinas de *C. difficile*, que causam a rutura da barreira celular abrindo as junções intercelulares. Este efeito aumenta a permeabilidade do cólon, levando a diarreia aquosa, a qual é um sintoma característico da diarreia associada a este microrganismo. Para além da diarreia, os principais sinais e sintomas são: febre (30 a 50% dos casos), leucocitose (50 a 60%) e dor abdominal (20 a 30%) (Silva et al., 2003). Surge, então, o termo Doença Associada a *C. difficile* (DACD) para descrever as suas manifestações sintomáticas (Martins, 2009).

Na última década foram observadas algumas alterações na epidemiologia de DACD, nomeadamente ao nível da incidência e da severidade, tendo sido relatados casos de DACD na comunidade e em indivíduos até agora considerados de baixo risco (Rodriguez-Palacios et al., 2006; McDonald et al., 2006; Rodriguez-Palacios et al., 2007).

Durante as décadas de 80 e 90, a incidência de DACD aumentou nos países desenvolvidos. Actualmente, tem-se verificado um aumento no número de casos e na gravidade das infeções em determinadas zonas geográficas, como na América do Norte e na Europa Ocidental, atribuível ao uso indiscriminado de antibióticos e à antibioterapia prolongada, assim como à emergência de uma estirpe hipervirulenta de *C. difficile* (ribótipo NAP1/BI/027) (Bartlett JG, 2005).

Relativamente à transmissão desta infeção, há que salientar que, a forma de contágio de excelência deste patogénico é a transmissão, em meio hospitalar, de um doente a outro por via fecal-oral. A colonização dos doentes relaciona-se com a duração do tempo de internamento, sendo que em 20% dos casos, esta ocorre na primeira semana de hospitalização, e que em 50% esta se dá depois da quarta semana (McFarland et al., 1998; Jones et al., 2012). Os portadores assintomáticos hospitalizados são potenciais reservatórios, podendo transmitir *C. difficile* a doentes suscetíveis (Schroeder, 2005).

Recentemente, têm-se estudado animais como fontes potenciais de transmissão da doença, identificando-se animais domésticos (cães e gatos) e outros com um contacto próximo com o Homem (cavalo, porcos e vacas) como reservatórios de *C. difficile*

(Hammit et al., 2007; Jhung et al., 2008; Gould e Limbago, 2010; Doyle, 2013; Sekulovis et al., 2014). Se os animais são uma potencial fonte de infecção de *C. difficile*, então os alimentos de origem animal também podem ser uma via de transmissão deste microrganismo. Alguns investigadores defendem que a presença do *C. difficile* em animais possa ter origem na deposição *ante-mortem* de esporos do microrganismo no músculo dos animais ou noutros tecidos, na contaminação da carcaça por via ambiental ou fecal, contaminação durante o processamento ou contaminação nos próprios supermercados (Moura, 2010).

### 1.1. CARACTERÍSTICAS DE *Clostridium difficile*

*C. difficile* é um bacilo Gram-positivo, móvel e formador de esporos ovais com localização subterminal quando em culturas jovens, e terminais quando presente em culturas envelhecidas. Não é hemolítico nem proteolítico, podendo ser gelatinase positiva. Fermenta vários açúcares, tais como a glucose, frutose, manitol e manose, sendo um dos poucos clostrídeos que fermenta o manitol e não a maltose. Da fermentação resulta um grande número de produtos, tais como, ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido butírico, ácido isocapróico, isobutanol e etanol.

A maioria das estirpes são toxigênicas, produzindo a toxina A e toxina B (ambas glucosiltransferases), sendo a toxina A uma enterotoxina e citotoxina e a toxina B uma citotoxina (Viana, 2013). As toxinas A e B caracterizam-se pela sua grande dimensão, posicionando-se entre as maiores toxinas bacterianas conhecidas (Voth e Ballard, 2005), e causam a morte celular pela desorganização da actina do citoesqueleto das células epiteliais cólicas (Rupnik et al., 2005).

Ambas as toxinas são normalmente necessárias para causar a colite pseudomembranosa. A toxina B tem pelo menos 100 vezes mais atividade enzimática que a toxina A o que sugere que este seja o fator determinante na diferença no potencial citotóxico (Silva et al., 2003).

Se a estirpe for toxigênica, as toxinas A e B são produzidas simultaneamente, mas a DACD pode ser provocada por estirpes que apenas produzam toxina B, no entanto, a lesão tecidual existente nos casos típicos resulta da ação conjunta das duas toxinas (Songer JG, 2004; Janvilisri et al., 2009).

Poucas moléculas de toxina são necessárias para produzir esta citólise. Ambas as toxinas induzem a libertação, pelos monócitos e macrófagos, de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) e interleucinas (IL), que contribuem para a resposta inflamatória associada à formação da pseudomembrana (Silva et al., 2003; Yaeger et al., 2007). A libertação de IL-8, IL-1 e FNT $\alpha$  pelos macrófagos e monócitos, provocam o extravasamento de neutrófilos e a inflamação tecidual através da geração de um gradiente quimiotático que induz a migração dos neutrófilos para o local de inflamação da mucosa intestinal (Silva et al., 2003).

A razão pela qual os pacientes apresentam diferentes evoluções sintomáticas da doença não está ainda clara, mas os efeitos clínicos dependem provavelmente de outros fatores de virulência ou de fatores intrínsecos do hospedeiro, nomeadamente a imunidade humoral (Silva et al., 2003; Sunenshine et al., 2006). É extremamente importante o nível de resposta imune em termos de circulação de anticorpos IgG (séricos) ou IgA (local) contra a toxina A. Pacientes com sintomas severos têm níveis significativamente mais baixos de anticorpos séricos do que pacientes que apresentam sintomas leves a moderados. Também foi demonstrado que após colonização de um paciente por *C. difficile*, existe uma associação entre uma resposta sistémica à toxina A (evidenciado pelo aumento dos níveis de IgA) e portadores assintomáticos de *C. difficile* (Silva et al., 2003).

Uma terceira toxina, menos conhecida, *C. difficile* toxina (CDT), é uma toxina binária denominada por toxina ADP-ribosiltransferase ou *C. difficile* transferase (Carman et al., 2011) é formada por 2 subunidades (cdtA e cdtB) e está associada a uma maior toxicidade da estirpe, porque aumenta a adesividade de *C. difficile* e atua ao nível do citoesqueleto das células, provocando uma maior perda de líquidos. Desta forma, as estirpes portadoras de toxina binária estão associadas a uma maior virulência (Viana, 2013).

O mecanismo pelo qual a flora indígena controla a colonização por *C. difficile* é conhecida por resistência à colonização. Presume-se que a flora intestinal anaeróbia seja crucial para a resistência à colonização, se bem que os componentes precisos, envolvidos neste processo, ainda não tenham sido claramente definidos. Esta resistência pode ser comprometida por doença, antibioterapia ou por outros procedimentos terapêuticos, promovendo o desenvolvimento de DACD (Blondeau JM, 2009).

O diagnóstico de *C. difficile* é feito através de vários métodos nomeadamente:

- deteção direta das toxinas em amostras de fezes, por vezes após a cultura das mesmas para aumentar a sensibilidade, e ensaio de neutralização de citotoxinas, métodos que demoram 3-4 dias até se obter o resultado;
- imunoensaio para a deteção do antigénio pelo teste da glutamato-desidrogenase (GDH), que tem alta sensibilidade mas não diferencia estirpes toxigénicas e não toxigénicas, e imunoensaio para toxina A e/ou B, que tem alta especificidade, métodos que permitem obter o resultado em minutos;

- ensaios moleculares para os genes codificadores de ambas as toxinas, os quais possuem alta sensibilidade e dão resultados ao fim de algumas horas;
- realização de colonoscopia para a detecção direta de pseudomembranas.

A combinação dos métodos anteriores permite o diagnóstico preciso da infecção (Norén, 2010; Hérnandez-Rocha et al., 2012; Rodriguez-Pardo et al., 2013, Viana, 2013).

A utilização de técnicas moleculares nos estudos epidemiológicos é muito útil na caracterização de *C. difficile*. Essas técnicas incluem restrição genômica, amplificação por PCR e sequenciação de determinados genes. O método de referência é a ribotipagem, que permite comparar tamanhos de fragmentos obtidos por este método, correspondentes a regiões de Ácido Ribonucleico ribossômico (ARN). O padrão de bandas obtido define um determinado ribótipo, que facilmente é comparado entre centros de estudo (Rupnik et al., 2009; Cohen et al., 2010; Kachrimanidou et al., 2011; Rodrigues-Pardo et al., 2013; Viana, 2013).

Atualmente são conhecidos mais de 150 ribótipos da bactéria, mas apenas alguns são enteropatogênicos humanos. A amplificação por PCR da região intergênica ARNr16S-23S e separação por electroforese em gel por capilaridade é o método mais utilizado a nível europeu na identificação dos vários ribótipos, permitindo a homologia da técnica de ribotipagem entre vários laboratórios (Indra et al., 2008; Cardoso et al., 2013).

Do ponto de vista epidemiológico, têm sido detetadas alterações importantes desde o final dos anos 90, tendo-se registado um aumento significativo de casos de DACD, nomeadamente nos Estados Unidos, Canadá e alguns países europeus. Essas alterações foram atribuídas ao aparecimento e disseminação da estirpe, referida já anteriormente, conhecida por BI/NAP1/027, a qual pertence ao ribótipo 027. Esta nova estirpe apresenta uma maior virulência associada à presença da toxina binária (CDT) (Viana, 2013). Porém, o aumento das infeções associadas a *C. difficile*, não pode ser só atribuído ao ribótipo 027, mas também a outros, tais como o ribótipo 001, 017, 053, 078 e 106, que possuem um mecanismo similar de hiperprodução de toxinas (Arvand et al., 2009; Rodrigues-Pardo et al., 2013; Viana, 2013). Na Europa o ribótipo 027 é o mais comum em casos graves de diarreia por *C. difficile*, entretanto, outros ribótipos como ribótipo 001 e 017 já foram identificados em casos que evoluíram para óbito (Clements et al., 2010).



Provavelmente a melhor defesa contra *C. difficile* é uma microbiota intestinal ativa, prevenindo a colonização desta bactéria. A motilidade intestinal normal e a barreira gástrica também são de extrema importância como fatores de proteção do hospedeiro (Silva et al., 2003).

## 1.2. FATORES DE RISCO

A taxa de portadores assintomáticos de *C. difficile* na população saudável é bastante variável. Entre os recém-nascidos varia entre 15 a 70 %, enquanto que na população adulta encontramos uma média de 3% na Europa e 15% no Japão. Essa taxa apresenta-se mais alta nos indivíduos hospitalizados variando entre 10 a 30% (Viscidi et al., 1981; McFarland et al., 1989; Brazier, 1998; Mulligan et al., 2008, Viana, 2013). Embora a maioria dos casos de infecção por *C. difficile* ocorra num contexto hospitalar, não é negligenciável que esta também possa ser adquirida na comunidade. Segundo um estudo de Riley e seus colaboradores (1995), baseado na análise de 580 isolados de fezes provenientes da população extra-hospitalar, detetou-se a presença de estirpes toxigênicas de *C. difficile* em 10,7% das amostras, fazendo deste agente o segundo patogénico entérico mais prevalente, depois de *Campylobacter* spp. Um relatório belga sustenta que 33% dos casos de DACD reportados não ocorreram em ambiente hospitalar (Lambert et al., 2009).

Para a aquisição de DACD destacam-se três fatores essenciais: perturbação da resistência à colonização do intestino, exposição a *C. difficile* e estado imunitário do hospedeiro debilitado (Martins, 2009).

- **Populações com risco aumentado:** doentes idosos e imunodeprimidos são os principais indivíduos de risco. No entanto, a referência a doentes jovens sem patologia prévia, que não foram expostos a antibióticos ou a um ambiente hospitalar, levou o Center for Disease Control and Prevention (CDC) a alertar que, actualmente existe um risco real de infecção por *C. difficile* em populações consideradas anteriormente de baixo risco. O único risco evidente nalguns casos pediátricos foi o contacto próximo com doentes com DACD, realçando assim, a importância da transmissão direta entre pessoas (CDC, 2005);
- **Idade:** estudos recentes demonstram que a DACD é mais grave e mortal em pessoas com mais de 65 anos (Pépin et al., 2004; McDonald et al., 2005; Rupnik, 2007 e Jones et al., 2012);
- **Exposição a antibióticos:** a antibioterapia é o principal fator de risco para a DACD, estando presente em 96% dos casos. Pode ter início aos 4-9 dias após a descontinuação da antibioterapia e surgir até às 8 semanas (Schroeder, 2005). Alguns antibióticos aparentam uma maior propensão para o aparecimento da

doença, especialmente aqueles de largo espectro de ação. Contudo as tendências têm variado ao longo do tempo (Monaghan et al., 2009). Os mais frequentemente implicados são as fluoroquinolonas, clindamicina, cefalosporinas e penicilinas. No entanto, praticamente todos os antibióticos podem predispor à DACD, incluindo o metronidazol e a vancomicina, os preconizados no tratamento da referida doença. De modo geral, os antibióticos que estão mais associados à DACD são os que têm menor absorção por via oral e maior excreção hepatobiliar (Cramer et al., 2008). O risco relativo de DACD após antibioterapia aumenta particularmente quando a estirpe é resistente ao antibiótico. Por exemplo, o uso da clindamicina foi considerado um fator de alto risco na sequência de um surto causado por uma estirpe resistente a este antibiótico em várias regiões dos Estados Unidos (Gerding, 2004);

- **Periparto:** estudos demonstram que a incidência de DACD está a aumentar em mulheres no periparto. Em 24 casos reportados, 91% das parturientes tinham realizado profilaxia com antibióticos durante o parto ou no tratamento de infeções bacterianas. Em dois casos identificou-se a estirpe 027, não havendo fatores de risco adicionais. Estes casos demonstram a necessidade de se considerar a presença de DACD em mulheres grávidas com diarreia, mesmo não apresentando os fatores de risco tradicionais (Rouphael et al., 2008);
- **Co-Morbilidades:** a Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) detetou que os doentes hospitalizados com DACD tinham em média mais de 10 diagnósticos comórbidos. De acordo com esta agência, quatro dos 20 principais diagnósticos observados nos doentes com DACD eram infeções onde o antibiótico é de difícil descontinuação (sépsis, pneumonia, infeção das vias urinárias e infeção da pele) (Martins LF, 2009);
- **Doentes Transplantados:** estudos de casos determinam que a DACD deve ser tida em conta como causa possível de diarreia em doentes que se submeteram a um transplante de órgão sólido, embora esta tenha constituído uma complicação raríssima no passado (Stelzmueller et al., 2007);
- **Pós-cirúrgico:** num estudo realizado em 997 hospitais, nos Estados Unidos, entre 2003 e 2005, verificou-se que a taxa de DACD foi de 14,9% em intervenções cirúrgicas, cujos doentes receberam profilaxia antimicrobiana pré-operatória, representando assim, um aumento significativo em relação aos 0,7%

no período entre 1999 e 2002 (Zerey et al., 2007). Em situações em que se pretenda prevenir infecções relativamente benignas ou infrequentes, e especialmente em doentes com idade avançada, o risco da profilaxia pré-operatória poderá, assim ser superior aos seus benefícios. Mesmo em doentes cirúrgicos sem medicação, verifica-se um aumento na incidência de DACD, particularmente em doentes submetidos a intervenções cirúrgicas de urgência ou nas resseções intestinais (Zerey et al., 2007);

- **Doença Inflamatória Intestinal:** indivíduos com doença inflamatória intestinal (DII) têm maior risco de desenvolver DACD. A associação entre DII e DACD pode ser atribuída a fatores como o uso de antibióticos para o tratamento de outros patogénicos gastrointestinais ou os frequentes internamentos inerentes à DII (Issa et al., 2007).

Muitos dos fatores de risco têm em comum o facto de interferirem com a barreira exercida pela microbiota intestinal normal no desenvolvimento de *C. difficile*, uma vez que esta microbiota compete com este microrganismo (Griffiths, 2005; Moura, 2010).

### 1.3. PATOGÉNESE

A infecção por *C. difficile* inicia-se com a ingestão do microrganismo na sua forma vegetativa ou dos seus esporos. Os esporos sobrevivem à acidez gástrica, germinam no cólon, onde as estirpes toxigénicas produzem toxinas. A sua secreção leva à produção do fator de necrose tumoral e de interleucinas pró-inflamatórias e ao aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo uma diarreia aquosa, colite e formação de pseudomembranas (Poutanen e Simor, 2004; Yam e Smith, 2005; Mcfarland, 2008). Os sintomas sistémicos são desencadeados pela indução de mediadores inflamatórios por parte das toxinas. Estima-se, no entanto, que 25% das estirpes de *C. difficile* não sejam patogénicas (Borriello, 1990).

A doença causada por *C. difficile* acarreta elevados custos para os sistemas de saúde. A incidência da doença em Portugal é de 2-16/100000 internamentos/ano, significativamente mais baixa que em países como o Canadá ou Estados Unidos (Anónimo, 2014). O desafio do seu diagnóstico é aumentado pelas suas crescentes incidência, severidade, mortalidade e morbidade.

*C. difficile* infeta tanto seres humanos como animais, e as diferenças e semelhanças destas infeções têm sido estudadas. Os ribótipos predominantes de *C. difficile* variam de acordo com as espécies de animais e localização geográfica, tendo sido já identificada uma sobreposição entre as linhagens de animais e de humanos. Alguns isolados de suínos e bezerros são indistinguíveis de uma importante estirpe patogénica humana, ribótipo 078. Cães e gatos com diarreia também podem ser portadores de *C. difficile* e a sua epidemiologia, tratamento e controle tem sido recentemente estudada. Verifica-se que, quer os animais de companhia, quer os animais para consumo humano podem ser portadores assintomáticos de *C. difficile* (Doyle, 2013).

#### 1.4. PREVENÇÃO E CONTROLO

O controlo e a prevenção são fundamentais, baseando-se em duas abordagens: o uso restritivo de antibióticos e a implementação atempada e sistemática de medidas de prevenção.

Um bom programa de controlo, consiste em prescrever antibióticos por um período de curta duração, evitar, sempre que possível, antibióticos de amplo espectro, restringir ao máximo antibióticos intravenosos e executar uma boa monitorização (Martins, 2009).

Segundo o esclarecimento da Direcção-Geral da Saúde, publicado em 2009, relativo às infeções por *C. difficile*, o cumprimento das recomendações preconizadas pelas comissões de controlo de infeção de cada unidade de saúde, relativamente à higiene das mãos (quer dos doentes, dos seus familiares e visitantes, quer dos profissionais de saúde ou cuidadores) e à higiene do ambiente seria suficiente para evitar a contaminação cruzada da infeção por esta bactéria. Na maioria dos casos, as infeções por esta bactéria podem ser evitadas ao assegurar-se uma boa prática de higiene no ambiente hospitalar (Divisão de Segurança do Doente, Direcção-Geral da Saúde, 2009).

O uso de luvas aquando do manuseamento dos doentes e a lavagem com água e sabão das mãos ajuda a eliminar esporos da bactéria sendo, no entanto, melhor o uso de toalhetes descartáveis (Anónimo, 2014).

Um estudo desenvolvido por Martins (2009) sugere como medida de prevenção e controlo da DACD a utilização de barreiras de precaução, onde os doentes infetados são colocados em quartos isolados ou, na impossibilidade de tal acontecer, coloca-los junto a outros doentes com DACD. O mesmo autor, propõem ainda que, dada a elevada contaminação ambiental provocada por *C. difficile*, o doente infetado deve ter acesso a casa de banho e louças privadas (Martins, 2009).

### 1.5. A EMERGÊNCIA DE UMA NOVA ESTIRPE HIPERVIRULENTA – NAP1/BI/027

A estirpe de *C. difficile*, designada por NAP1 ou ribótipo 027, caracteriza-se por uma produção de níveis mais elevados de toxinas A e B, e de uma toxina adicional conhecida como toxina binária (Cardoso et al., 2013). Para além destas características fundamentais, a resistência às fluoroquinolonas também distingue esta estirpe emergente das outras estirpes de *C. difficile* (Warny et al., 2005; Martins, 2009). As estirpes hipervirulentas possuem uma deleção de pares de bases do gene repressor *tcdC* o que leva a um aumento significativo 3-5 vezes nos níveis de produção de toxinas, durante a fase estacionária, fator este que contribui para a elevada virulência dessas estirpes (Dupuy et al., 2006; Hernández-Rocha et al., 2012). A estirpe 027 produz 16 vezes mais toxina A e 23 vezes mais toxina B *in vitro*, comparativamente às estirpes toxinotipo 0 (Warny et al., 2005). Verifica-se um elevado nível de resistência à gatifloxacina e à moxifloxacina nos isolados de *C. difficile* 027. Esta resistência fornece uma vantagem competitiva a esta estirpe, nomeadamente em ambiente hospitalar, onde as fluoroquinolonas são amplamente usadas (Pépin et al., 2005; Arvand et al., 2009; (Viana, 2013).

Existem autores, (por exemplo Morgan et al., 2008), que concluem não haver evidência que o ribótipo 027 seja mais virulento que outros ribótipos, havendo por isso necessidade de mais estudos neste campo.

Cardoso et al. (2013) concluíram num estudo realizado entre março de 2010 e agosto de 2011, onde incluíram 20 doentes com uma idade média de 73 anos, não haver nenhum ribótipo dominante e também não verificaram uma associação entre a gravidade da doença e os ribótipos isolados. O estudo realizado é inovador e, embora tenha um número reduzido de doentes incluídos, constitui um importante alerta para a caracterização dos diferentes ribótipos de *C. difficile* e das suas características patogénicas, como factor determinante na orientação clínica dos doentes com DACD (Viana, 2013). Este estudo permitiu ainda a descoberta de três novos ribótipos, sem homologia na base de dados europeia e que aguardam denominação, sendo este um grande contributo em termos científicos (Cardoso et al., 2013).

## 1.6. MÉTODOS DE DETECÇÃO E CONTAGEM

### 1.6.1. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura usado para o isolamento e contagem deste microrganismo é o *Clostridium difficile* agar base (George et al.,1979, Perry et al.,2010, Eckert et al., 2013). São adicionados ao meio base dois suplementos, o primeiro constituído por agentes seletivos D-cycloserina (500µg/ml) e cefoxitina (16µg/ml) (George et al.,1979, Perry et al.,2010, Eckert et al., 2013) que inibem o crescimento da grande maioria das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, bem como de *Streptococcus faecalis*, staphylococci, bacilos anaeróbios Gram-negativos e não esporulados e de algumas espécies de clostrídeos. O segundo suplemento é 7% (v/v) de Sangue de Cavalo liofilizado (George et al.,1979, Perry et al.,2010, Eckert et al., 2013) que permite não só uma melhor recuperação de algumas células de *C. difficile* danificadas, mas também propicia o crescimento de colónias maiores.

As amostras são inoculadas diretamente nas placas de Petri com o meio de cultura e incubadas a 35 °C ± 2 °C durante 18-24 horas, podendo ir até 48 horas, em condições anaeróbias. As colónias de *C. difficile* apresentam um diâmetro irregular de 4-6 mm, cor branco-acinzentado, fluorescência amarelo-esverdeada sob luz ultravioleta e um odor característico a “estrupe de cavalo” (George et al., 1979, Perry et al.,2010, Eckert et al., 2013).

Alguns autores sugerem um pré-tratamento das amostras com etanol (Alcohol Shock Treatment), para eliminar a flora competitiva. Nesta técnica, misturam-se partes iguais de etanol e amostra, homogeneiza-se a mistura em *vortex* e deixa-se a repousar, à temperatura ambiente, por uma hora. Terminado esse tempo inoculam-se as placas de Petri que incubam nas mesmas condições citadas anteriormente (Levett, 1985; George et al., 1979; Dzink e Bartlett, 1980).

Outros meios de cultura têm sido propostos para aumentar a eficácia na deteção deste microrganismo. O *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin (CDMN) é o meio de cultura proposto por Aspinall e Hutchinson (1992), constituído por 500 µg/ml de cloridrato de L(+)-cisteína monohidratado que aumenta significativamente o crescimento das células de *C. difficile* e por dois agentes seletivos, norfloxacin (12,0



µg/ml) e moxalactam (32,0 µg/ml) que reduzem a contaminação pela flora acompanhante em 30%, quando comparado com outros meios de cultura.

Vários investigadores (Arroyo et al., 2005; Jöbst et al., 2010; Boer et al., 2011 e Limbago et al., 2012) realizaram estudos para a deteção de *C. difficile* incluindo na sua execução uma fase de pré-enriquecimento em meio de cultura seletivo. Este pré-enriquecimento realiza-se, de uma maneira geral, a uma temperatura de 37 °C durante 7 dias em anaerobiose. Após esse período de incubação, sugere-se um pré-tratamento das amostras com etanol seguido de centrifugação, e só após esta etapa é que o sedimento recolhido é colocado em meio de cultura seletivo, incubando este a 37 °C por 72 horas em anaerobiose (Arroyo et al., 2005; Jöbst et al., 2010; Boer et al., 2011 e Limbago et al., 2012).

O método de cultura em meio é bastante sensível, mas não é muito específico devido à possibilidade do isolamento de estirpes não toxigénicas. As estirpes isoladas devem ser testadas quanto à sua capacidade de produção de toxinas. No entanto, a cultura é um ótimo meio para a obtenção de dados concretos em investigações epidemiológicas. As colónias de *C. difficile* são facilmente reconhecidas nos meios de cultura pelas suas características peculiares. A cromatografia gasosa é também uma opção na deteção deste microrganismo, é feita com pedaços de agar retirados da proximidade das colónias suspeitas e é o melhor método para a confirmação da sua identificação. *C. difficile* possui um perfil típico na cromatografia gasosa demonstrando a produção de grandes quantidades de ácidos butírico e iso-capróico (Silva et al., 2003).

### 1.6.2. DETEÇÃO DE TOXINAS

A detecção das toxinas produzidas por *C. difficile* pode ser realizada em culturas celulares ou através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). No primeiro caso, o método consiste na inoculação de uma amostra filtrada numa cultura de células onde, posteriormente é observado o efeito citopático como consequência da ruptura do citoesqueleto. Quase todas as linhagens celulares podem ser usadas (Vero, Hep2, fibroblastos, CHO ou HeLa) mas, para a maioria dos autores as células Vero são consideradas as mais sensíveis. A presença ou ausência do efeito citopático é observada em 24-48 horas (nos casos mais severos esse efeito pode surgir após 4-6 horas). A confirmação da especificidade é obtida pela repetição do teste com a adição de um anti-soro anti-*C. difficile* (Ryan et al., 2004). A ferramenta mais vulgarmente utilizada para a detecção de *C. difficile* consistia na determinação das toxinas por cultura celular e neutralização da toxina que exigia bom desempenho a nível de sensibilidade e especificidade. Contudo, a cultura celular ou os ensaios de citotoxicidade são morosos, requerem equipamento específico e o tempo até à obtenção de resultados pode estender-se às 72 horas. Consequentemente, muitos laboratórios utilizam estes ensaios para despiste de *C. difficile* em doentes hospitalizados. Ainda que mais convenientes, a maioria dos kits de ELISA, de detecção de toxinas apresenta uma sensibilidade limitada (NHS Evaluation report, 2009).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção de toxina A e/ou B revelam uma sensibilidade de 63-99% e uma especificidade de 93-100% (Deshpande et al., 2011) e permitem uma detecção qualitativa direta em amostras (normalmente aplicado a fezes humanas) em uma única etapa.

No método de ELISA são utilizados anticorpos monoclonais anti-Toxina A e anti-Toxina B revestidos numa microplaca e marcados com peroxidase de rábano no conjugado. As amostras são preparadas por centrifugação (fezes líquidas, semi-sólidas ou sólidas) em diluente apropriado. O sobrenadante é transferido para o poço da microplaca identificado revestido com anticorpos anti-*C.difficile* toxinas A e B. O conjugado e o sobrenadante da amostra são incubados a 37 °C durante 1 hora nos micro-poços bem como Calibrador e Diluente da Amostra puro, utilizados como controlo negativo. As toxinas presentes na amostra são capturadas e imobilizadas entre os dois anticorpos monoclonais especificamente concebidos. Após uma etapa de lavagem que

elimina o material não ligado, é adicionado um substrato cromogénico e incubado a 37 °C durante 30 minutos para demonstrar a presença de imuno-complexos. A reação é parada utilizando uma solução de ácido sulfúrico 1N. A leitura é realizada utilizando um espectrofotómetro definido para 450/620 nm. A presença de uma cor amarela indica a presença das toxinas de *C. difficile*.

A maior vantagem deste método é a possibilidade de ser realizado diretamente na amostra, sem necessidade de períodos de crescimento, sendo os resultados obtidos num curto espaço de tempo (aproximadamente 1,5 horas). Porém, este teste deve ser sempre realizado paralelamente em meio de cultura e quando o resultado for negativo e a cultura for positiva, o método deve ser repetido, utilizando as colónias isoladas no meio de cultura (Silva et al., 2003; Moura, 2010).

Alguns investigadores, como Cardoso et al. (2013), recorrem a outras metodologias para a determinação das diferentes estirpes de *C. difficile*, tal como o método de imunocromatografia, que apresenta uma sensibilidade de 87-92%. A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeiro criada para o estudo das proteínas séricas. A aplicação deste método revelou ser de grande valor em situações nas quais os profissionais de saúde necessitem de tomar decisões e assumir condutas imediatas. É um teste de triagem rápido e qualitativo, económico e de fácil interpretação, que apresenta sensibilidade e especificidade similares ao método de ELISA.

O ensaio é realizado numa matriz constituída por membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato transparente para facilitar a visualização do teste. O antígeno ou o anticorpo é fixado na membrana na forma de linhas ou pontos e o restante da membrana é bloqueado com proteína inerte como nos testes imunoenzimáticos (ELISA). Para deteção de antígenos podem ser utilizados anticorpos fixados na linha de captura e como conjugado um segundo anticorpo conjugado ao corante. Um dos métodos imunológicos desses testes emprega corante insolúvel, como ouro coloidal (róseo) ou prata coloidal (azul marinho) como revelador da interação antígeno-anticorpo. A amostra aplicada liga-se ao conjugado colorido e após a migração por cromatografia a formação do imunocomplexo é revelada pelo depósito do corante coloidal na linha de captura. Para assegurar a qualidade dos reagentes e a realização adequada do

procedimento, esses testes rápidos utilizam controlos internos, como nos testes imunoenzimáticos (Vaz et al., 2007).

### 1.6.3. TIPIFICAÇÃO: MÉTODOS FENOTÍPICOS

Os métodos utilizados inicialmente eram baseados nas propriedades fenotípicas do microrganismo. O primeiro a ser utilizado foi o antibiograma, no entanto, este método tem uma utilidade limitada uma vez que a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos antimicrobianos para as diferentes estirpes de *C. difficile* era semelhante. Assim, outros métodos são utilizados, tal como, a electroforese, baseados nos padrões das proteínas celulares e de superfície. Estes incluem a PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis), PAGE combinado com “radio-labelling” e PAGE combinado com “immunoblotting”. Um sistema de serotipagem por aglutinação foi usado com algum sucesso, tendo este método sido melhorado pela remoção dos antígenos flagelares que apresentavam reacção cruzada. Outro sistema baseado na susceptibilidade de *C. difficile* a bacteriocinas e a bacteriófagos, foi também desenvolvido mas verificou-se que 31% das estirpes não eram tipificáveis, tendo por isso caído em desuso (Gerding et al., 1995; Brazier, 1998). Muitos investigadores utilizaram uma combinação dos métodos referidos anteriormente mas rapidamente se verificou que embora estes métodos fossem adequados para o uso em estudos geograficamente limitados, era necessário outro método de tipificação para que os investigadores pudessem compreender a epidemiologia de *C. difficile* numa escala mais alargada (Brazier, 1998; Moura, 2010).

#### 1.6.4. TIPIFICAÇÃO: MÉTODOS MOLECULARES

Os métodos moleculares apresentam, geralmente, vantagens em relação aos métodos fenotípicos, relativamente à estabilidade de expressão e ao maior grau de diferenciação. A análise de ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico recorrendo a endonucleases de restrição foi de alguma utilidade mas não pode ser utilizada para tipificar organismos sem plasmídeos. A restrição do ADN genómico, usando a enzima de restrição *Hind III* provou ser um método com um elevado poder discriminatório e os resultados apresentam elevada reprodutibilidade. A grande desvantagem é que a comparação dos padrões de fragmentos de ADN requer a comparação entre isolados que foram testados no mesmo gel. Por esse motivo a comparação de isolados de diferentes laboratórios requer a manutenção de uma grande base de dados. Acresce, ainda o facto de poder ser necessária a restrição de ADN plasmídico para decifrar diferenças em bandas resultantes da restrição do ADN genómico. Para além destes aspetos, este método é tecnicamente exigente e bastante trabalhoso quando se utiliza um elevado número de isolados. Outra desvantagem associada a este método é o facto das enzimas utilizadas produzirem produtos de digestão complexos (superior a 50 bandas) cuja comparação a olho nu é extremamente difícil, criando assim a necessidade de utilização de equipamentos de análise de imagem. A combinação de endonucleases de restrição com sondas de ácidos nucleicos marcados, cujo objetivo é evidenciar a heterogeneidade dos locais específicos, simplifica os resultados facilitando a sua interpretação, porém esta técnica apresenta um poder discriminatório inferior à restrição convencional (Gerding et al., 1995; Brazier, 1998; Moura, 2010).

Uma outra modificação da análise por endonucleases de restrição é a utilização conjunta de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) e de enzimas de restrição. Esta técnica gera menos fragmentos de ADN e apresenta uma elevada sensibilidade. No entanto, cerca de 5% dos isolados não podem ser tipificados devido à degradação do ADN (Gerding et al., 1995; Moura, 2010). As metodologias baseadas em endonucleases de restrição foram, substituídas por métodos baseados em PCR (Polimerase Chain Reaction). A ribotipagem por PCR utiliza *primers* específicos, complementares a uma sequência de nucleótidos alvo.

### 1.7. *Clostridium difficile* EM ANIMAIS

Foram identificados animais de diversas espécies como portadores assintomáticos de *C. difficile* ou com DACD, nomeadamente cavalos, cães, gatos, suínos, bovinos, patos, avestruzes, galinhas e até hamsters (Rodriguez-Palacios et al., 2007; Indra et al., 2008; Pirs et al., 2008; Hansen et al., 2009).

#### 1.7.1. CÃES E GATOS

Vários estudos foram realizados em cães e gatos com o objetivo de determinar a presença de *C. difficile* e das suas toxinas nas fezes de animais com ou sem enterite (Tabela 1).

Tabela 1 - Registo de alguns estudos realizados em cães e gatos

Animal	Autores / Ano	Objetivo do estudo	Grupo (s) em estudo / Incidência	
Cães	Silva, 2011	Deteção das toxinas A e B e avaliação dos tipos toxigénicos de <i>C. difficile</i> a partir de fezes de cães	57 amostras de fezes de cães, sendo 35 de animais aparentemente saudáveis e 22 de animais diarreicos	Foram detetadas as toxinas A e B de <i>C. difficile</i> em 21 (36,8 %) das amostras de cães, sendo 16 (28,1 %) de animais diarreicos e cinco (8,8 %) de animais não-diarreicos
Cães	Struble et al., 2006	Determinar a presença de <i>C. difficile</i> nas fezes dos cães.	Grupo A: animais internados no Hospital veterinário da Universidade da Califórnia	18,4 % das amostras foram positivas para <i>C. difficile</i> (50 % toxigénicas). 27,6 % dos animais apresentavam diarreia, 16,7 % dos quais continham <i>C. difficile</i> sendo que 71,4 % destes eram toxigénicos.
			Grupo B: animais do canil local	0 % de amostras positivas
Cães e gatos	Erdemoglu et al., 2005	Determinar a presença deste <i>C. difficile</i> e das suas toxinas nas fezes dos animais em estudo	Grupo de animais com diagnóstico de enterite	<i>C. difficile</i> foi identificado em 41% dos cães (28% positivos para a Toxina A) e em 35% dos gatos (23% positivos para a Toxina A)
			Grupo de animais saudáveis	A prevalência foi de 29% tanto nos cães como nos gatos, sendo a Toxina A detetada em 20% dos cães e em 29% dos gatos.

O papel de diversos fatores que poderiam influenciar o risco de infecção como a idade do animal, internamento ou o uso de antibióticos ou agentes imunossupressores também foi avaliado. Verificou-se que *C. difficile* foi detectado com a mesma frequência nas fezes dos animais com e sem diarreia, tendo-se observado adicionalmente que a diarreia não estava relacionada com a capacidade de produção de toxinas das estirpes encontradas, concluindo-se que a presença do microrganismo não está relacionada com este sintoma. Observou-se ainda que a utilização de antibióticos, não foi relacionada de qualquer forma com a detecção de *C. difficile* nem com a capacidade de produção de toxinas das estirpes. A utilização de fármacos imunossupressores também não foi relacionada com a presença do microrganismo. Em relação à idade dos animais e a presença de *C. difficile*, os resultados obtidos indiciam um risco acrescido para a colonização do microrganismo nos animais com mais de dois anos (Struble et al., 2006; Songer et al., 2009).

### **1.7.2. SUÍNOS, BOVINOS E AVES**

As infecções por *C. difficile* em suínos foram confirmadas pela primeira vez na década de oitenta do século passado. A DACD nestes animais é caracterizada pela presença de um elevado número de células de *C. difficile* nas fezes, diarreia, colite pseudomembranosa, ascite, edema do mesocólon e hidrotórax. Esta doença é na sua maioria, diagnosticada em leitões com idade inferior a sete dias e caracteriza-se por não estar associada ao consumo de antibióticos (Songer, 2004; Yaeger et al., 2007). A estimativa precisa da incidência e prevalência de DACD em leitões não está disponível, mas a ocorrência generalizada desta patologia está implícita pelo seu diagnóstico laboratorial em diferentes zonas de produção suína, nomeadamente nos Estados Unidos da América (EUA). A diarreia neonatal em bezerros é uma doença usual que pode ser mortal quando em bezerros lactentes. Vários patogénicos entéricos foram já apontados como agentes etiológicos desta patologia, porém a maioria dos casos é considerada idiopática.

Relativamente às aves, alguns investigadores desenvolveram estudos onde se pretendia demonstrar que a presença de *C. difficile* em frangos de aviário vendidos em áreas urbanas, tais como mercados, é preocupante por estes locais se tratarem de focos de contaminação na população, já que são identificados como reservatórios do microrganismo. Os resultados obtidos sugerem que o consumo de carne de frango



contaminada com *C. difficile*, é um importante foco de exposição a este microrganismo, sendo considerado como uma via de transmissão da doença a humanos. Os esporos produzidos por este microrganismo são capazes de sobreviver por longos períodos no meio ambiente, tal como, fezes secas de frango e solos, onde o microrganismo pode facilmente contaminar outros alimentos existente no mercado (Simango e Mwakurudza, 2008). Vários estudos foram realizados nos últimos anos, com o objetivo de detetar a presença de *C. difficile* e suas toxinas (Tabela 2).

Tabela 2 - Registo de alguns estudos realizados em suínos, bovinos e aves.

Animal	Autores / Ano	Objetivo do estudo	Grupo (s) em estudo / Incidência / Observações		
Suínos	Yaeger et al., 2007	Estabelecer a relação entre a deteção de toxinas de <i>C. difficile</i> e um conjunto de parâmetros como a diarreia, edema do cólon, tiflíte e colite em leitões com idade inferior a sete dias.	100 Leitões com diarreia e 29 leitões aparentemente saudáveis, provenientes de explorações sem história clínica de enterite	<i>Clostridium difficile</i> foi isolado no cólon dos leitões em 51% (66/129) dos casos e no intestino delgado em 50% (65/129) dos casos. As toxinas A e B foram detetadas em 50% das análises do conteúdo do cólon mas apenas em 2% das análises ao conteúdo do intestino delgado.	A presença do microrganismo não foi indicativa da doença uma vez que o <i>C. difficile</i> foi isolado em 18% dos leitões cuja deteção de toxinas teve resultado negativo. A conclusão mais surpreendente deste estudo foi o número elevado de leitões (79%) saudáveis com resultado positivo para a pesquisa de toxinas.
Suínos	Songer JG, 2004	Detetar a presença das toxinas A e B em fezes de leitões com idade inferior a sete dias	600 leitões vivos submetidos ao diagnóstico de enterite	35% das fezes positivas para as toxinas A e B e em 55% dos casos detetada apenas uma das toxinas	
Suínos	Yaeger et al., 2002	Deteção da presença das toxinas A e B	100 leitões vivos com 1-7 dias de idade	Toxinas detetadas no conteúdo do cólon de 29% dos leitões. Todos os 29 leitões apresentavam edema do colon e foi observada colite em 21 de 29 animais.	
Bovinos	Rodriguez-Palacios et al., 2006	Deteção de <i>C. difficile</i> e suas toxinas, em bezerros com menos de um mês de idade, onde a idade média dos animais foi de 14,2 dias	Grupo A constituído por 144 animais com diarreia Grupo B constituído por 134 animais saudáveis designados por grupo controlo	7,6% amostras positivas para a presença de <i>C. difficile</i> e as toxinas A e B foram identificadas em 39,6% das fezes 7,6% das amostras positivas para a presença de <i>C. difficile</i> e as toxinas A e B foram identificadas em 20,9% das fezes	<i>Clostridium difficile</i> e as suas toxinas, A e B, foram identificadas concomitantemente em 4,2% do grupo A e em 5,2% do grupo B.
Aves	Simango e Mwakurudza, 2008	Deteção de <i>C. difficile</i> em frangos de aviário vendidos em mercados de áreas urbanas no Zimbabwe.	Amostras de seis mercados diferentes onde foram analisadas fezes das jaulas dos frangos e amostras de solo das áreas circundantes dos mercados.	<i>Clostridium difficile</i> foi isolado em 29,0% das 100 amostras de fezes e em 22,0% das amostras de solo. Algumas das estirpes de <i>C. difficile</i> isoladas das fezes dos frangos (89,7%) e solos (95,5%) foram consideradas toxigénicas.	

## **1.8. *Clostridium difficile* EM ALIMENTOS**

*Clostridium difficile* tem sido considerado um importante patogénico causador de diarreia em Humanos na comunidade, fora de ambientes hospitalares. A incidência e a severidade da doença causada parecem estar a aumentar (McDonald et al., 2006; Khanna S e Pardi DS, 2010; Khanna et al., 2011). Este microrganismo foi já identificado, em vários estudos, como o causador de doenças entéricas em outras espécies como porcos, bovinos, cães, gatos e cavalos. A presença de esporos de *C. difficile* nas fezes destes animais indicia a potencial contaminação das carnes dos mesmos, mas é importante ter em consideração que a contaminação não é sinónimo de transmissão por via alimentar (Rodriguez-Palacios et al., 2007).

Os alimentos de origem animal são uma importante fonte de microrganismos enteropatogénicos que podem incrementar o aparecimento de DACD na população, pelo seu generalizado consumo (Simango C e Mwakurudza S, 2008).

### **1.8.1. OCORRÊNCIA EM CARNES E DERIVADOS E OUTROS PRODUTOS**

#### **1.8.1.1. *Clostridium difficile* em carnes, ovos e vegetais na Eslovénia**

Zidaric e Rupnik (2012), avaliaram a presença de *C. difficile* em carnes, produtos de carne, legumes e ovos na Eslovénia. No total foram analisadas: 59 amostras de carne picada e de produtos de carne prontos a comer, oito amostras de saladas prontas a comer e legumes frescos e 49 ovos de galinha. A casca do ovo foi também analisada por zaragatoa. As amostras foram adquiridas em 2008, 2011 e 2012, em várias ocasiões e provenientes de 27 unidades de produção, 26 unidades (96,3%) localizadas na Eslovénia e uma na Áustria. Diferentes métodos de cultura foram usados para o isolamento de *C. difficile*. As colónias de *C. difficile* obtidas foram identificadas por morfologia, e confirmadas por deteção de marcador molecular *cd3* (Zidaric et al., 2008). Os isolados foram caracterizados por PCR, por ribotipagem e por capacidade de produção de toxinas.

*Clostridium difficile* não foi detectado em nenhuma das amostras de carne e de vegetais testados. Um único ovo de galinha em 49 (2,0%) foi positivo e quatro colónias foram obtidas.

Este foi o primeiro estudo que reportou a contaminação de ovos de galinha com *C. difficile* e, juntamente com relatórios sobre uma prevalência relativamente alta em aves de capoeira destacou a importância das aves como reservatório de *C. difficile* e acrescentou o seu potencial como fonte de infecção para os seres humanos.

#### **1.8.1.2. Prevalência de *Clostridium difficile* em carnes vendidas na Holanda**

Boer e seus colaboradores (2010), estudaram a prevalência de *C. difficile* em carnes picadas vendidas na Holanda. Quinhentas amostras de carne crua de porco, bezerro, cordeiro e frango foram recolhidas em talhos, de outubro de 2008 a março de 2009.

Das 500 amostras testadas, apenas oito (1,6%) foram positivas para a presença de *C. difficile*: uma de carne de cordeiro (6,3%) e sete de carne de frango (2,7%). As estirpes isoladas apresentam um ribótipo diferente dos isolados mais comumente recuperados de pacientes com DACD, excepto para o ribótipo 001 que foi isolado numa amostra de carne de frango.

Este estudo revela que outras matrizes para além de carnes podem ser fonte de transmissão de *C. difficile* a Humanos.

#### **1.8.1.3. *Clostridium difficile* em carne picada, França**

Bouttier e seus colaboradores (2010), realizaram um estudo para determinar a presença de *C. difficile* em carnes adquiridas em 20 lojas e supermercados, de zonas urbanas e suburbanas de Paris, entre setembro 2007 e julho de 2008. Foram analisadas 105 embalagens de carne picada (embaladas a vácuo ou não), 59 salsichas de porco, e 12 embalagens de carne crua destinadas à alimentação de gatos.

*Clostridium difficile* foi isolado em 1,9% (2/105) das amostras de carne picada, mas apenas nas amostras embaladas a vácuo. A atmosfera anaeróbia de embalagem a vácuo pode facilitar a sobrevivência de *C. difficile* e a germinação de esporos. *Clostridium*

*difficile* não foi detetado em nenhuma das 59 salsichas de porco nem nas 12 embalagens de comida para gato.

As duas estirpes isoladas pertencem ao ribótipo toxigénico 0 e ribótipo 012. O ribótipo toxigénico 0 foi já identificado, noutros estudos, em amostras de carne no Canadá. Em relação ao ribótipo 012, este pertence aos 10 ribótipos mais frequentemente isolados em humanos.

A prevalência de *C. difficile* em carne picada em França, é baixa em comparação com a relatada por outros países. No Canadá, Rodriguez-Palacios et al. (2007) estudaram 60 amostras de carne bovina e encontraram uma prevalência de 20% de *C. difficile*. Estes mesmos autores, utilizando um sistema de amostragem mais amplo (214 amostras de carne), obtiveram 6% de isolados de *C. difficile* nas 214 amostras em estudo (Rodriguez-Palacios et al., 2009). Também no Canadá, Weese et al. (2009) relataram que 12% das amostras de carne de bovino moída e carne de porco moída se encontravam contaminadas com este microrganismo. Nos Estados Unidos, *C. difficile* foi isolado de 42% das amostras de carne (bovina, suína e de peru produtos) (Songer et al., 2009).

#### **1.8.1.4. *Clostridium difficile* em produtos crus de origem animal, Áustria**

Jöbstl e seus colaboradores (2010), estudaram a presença de *C. difficile* em produtos crus. Para tal, analisaram 100 amostras de carne picada e 50 amostras de leite cru, adquiridas entre julho de 2007 e fevereiro de 2008, em supermercados e talhos localizados nos arredores de Graz, na Áustria.

Três das amostras de carne picada foram positivas enquanto que, nenhuma das 50 amostras de leite cru deu resultado positivo para a pesquisa de *C. difficile*. Foram identificados dois ribótipos distintos, sendo um deles toxinogénico. 66,7% (2/3) eram do ribótipo não toxinogénico A1-57 e 33,3% (1/3) foi identificado como sendo um ribótipo humano comum, normalmente isolado nas fezes de pacientes na Áustria.

Pelo facto de ter sido detetada na carne picada a presença de um ribótipo que normalmente é isolado em fezes de pacientes austríacos, fica a suspeita de se tratar de

um potencial agente zoonótico. Porém, existe uma forte possibilidade de a contaminação dos alimentos ocorrer durante o seu processamento, pelo manipulador.

Estes investigadores sugerem ainda um estudo mais aprofundado à cadeia de distribuição dos alimentos que consumimos, para melhor compreender a origem das infeções por *C. difficile* em humanos.

#### **1.8.1.5. Possível sazonalidade de *Clostridium difficile* em carnes de retalho, Canadá.**

Rodrigues-Palacios e seus colaboradores (2009) conduziram um estudo exaustivo para detetar a presença deste microrganismo em carnes vendidas no retalho no Canadá. Assim, realizaram uma amostragem mais ampla utilizando diferentes métodos de cultura. A prevalência do microrganismo foi determinada usando amostras provenientes de entidades governamentais, comparando três métodos de cultura, caracterizando os isolados e avaliando a variabilidade mensal na deteção de *C. difficile*. Foram analisadas 149 amostras de carne de vaca picada e 65 amostras de costeletas de vitela adquiridas em 210 retalhistas canadianos, entre janeiro e agosto de 2006. Estas amostras foram analisadas utilizando três métodos diferentes e num deles o estudo foi feito em duplicado, de forma a verificar a reprodutibilidade dos resultados. Assim, conseguiram realizar quatro análises por amostra.

Combinando-se os resultados das quatro análises, verificou-se que *C. difficile* foi identificado em 6,7% (10/149) das amostras de carne de vaca picada e em 4,6% (3/65) das amostras de costeletas de vitela. A prevalência combinada deste estudo foi de 6,1% (13/214). Um total de 28 isolados foram obtidos a partir das 13 amostras de carne (22 de carne de vaca picada e 6 das costeletas de vitela). Foram identificados por PCR, 8 ribótipos distintos, sete dos quais produtores de toxinas e presentes em 10 (77%) das amostras de carne.

A concordância dos resultados obtidos nos três métodos foi muito baixa. Apenas duas das amostras de carne de vaca picada foram positivas em mais do que um método, todas as outras amostras positivas foram confirmadas em apenas um dos três métodos utilizados. À semelhança de outros investigadores, tais como Songer e seus colaboradores (2009), os autores deste estudo explicam a presença de esporos nas

amostras através da contaminação cruzada no matadouro durante o processamento ou pela deposição *ante-mortem* dos esporos nos músculos dos animais.

#### **1.8.1.6. Detecção e quantificação de *Clostridium difficile* em carnes picadas de vaca e porco, Canadá**

Weese e seus colaboradores (2009), realizaram um estudo com o objetivo de determinar a prevalência de *C. difficile* em carnes picadas de vaca e de porco. No estudo realizado utilizaram métodos qualitativos e métodos quantitativos. Foram testadas um total de 230 amostras, divididas em dois grupos: grupo A constituído por 115 amostras de carne de vaca picada e o grupo B constituído por 115 amostras de carne de porco picada. As amostras foram adquiridas entre agosto de 2008 e agosto de 2009 em *outlets* retalhistas de quatro províncias canadianas.

*Clostridium difficile* foi isolado em 12% das amostras totais, sendo 12% do grupo A e 12% do grupo B. Tanto no grupo A como no B, 71% (10/14) dos isolados positivos foram observados utilizando o método qualitativo, 14% (2/14) foram observados simultaneamente nos métodos qualitativos e quantitativos e 14% (2/14) foram apenas observados no método quantitativo.

O facto de 14% das amostras positivas o serem apenas para o método quantitativo é contra intuitivo, uma vez que os métodos quantitativos são menos sensíveis do que os qualitativos. No entanto, estes resultados podem ser explicados pela distribuição heterogénea do microrganismo nas amostras, particularmente devido ao baixo nível de contaminação das mesmas. Todas as amostras em que tal aconteceu continham apenas 20 esporos/grama, o que teoricamente pode suportar mas não provar a hipótese apresentada. As amostras positivas identificadas segundo o método quantitativo, continham 20 a 240 esporos/grama. Este foi o primeiro estudo cujo objetivo era a quantificação da contaminação de carnes por *C. difficile*. O método qualitativo utilizado neste estudo tem um limite de deteção de aproximadamente 10 esporos/grama de amostra, enquanto que o método quantitativo apresentou um limiar de deteção de 20 esporos/grama.

Em relação à ribotipagem, o estudo revelou a presença de 5 ribótipos toxigénicos, sendo que o ribótipo 078/toxina tipo V foi o predominante, tendo sido identificado em 78%

(22/28) dos isolados. O ribótipo 027/toxina tipo III foi identificado em 7.1% (2/28) dos isolados, assim como o ribótipo C/toxina tipo IX. O ribótipo E/toxina tipo 0 e o ribótipo Y/toxina tipo III foram encontrados na mesma percentagem, 3.1% (1/28).

#### **1.8.1.7. *Clostridium difficile* em produtos de carnes picadas, USA**

Songer e seus colaboradores (2009), realizaram um estudo para determinar a presença de *C. difficile* em carnes embaladas vendidas no Tucson, EUA. Entre janeiro e abril de 2007, adquiriram 65 amostras de carne crua (carne de vaca picada, carne de porco picada, carne de peru picada, linguiça e chouriço) e 23 amostras de carne pronta para consumo (salsichas “braunschweiger” e “beef summer sausage”). As carnes foram adquiridas em três cadeias de supermercados, em três períodos distintos com mais de um mês de intervalo. Todos os produtos tinham diferentes prazos de validade o que indica diferentes datas de produção.

*Clostridium difficile* foi isolado em 42% (37/88) das amostras, em que 42% eram amostras de carne de vaca, 41,3% amostras de carne de porco e 44,4% amostras de carne de peru. Nos produtos prontos para consumo, *C. difficile* foi identificado em 47.8% (11/23) das amostras analisadas. A maior percentagem de isolados foi obtida nas salsichas “braunschweiger” (62,5%) e na carne de vaca picada (50%).

Estes investigadores defendem que a presença de *C. difficile* possa ter origem na deposição *ante-mortem* de esporos do microrganismo no músculo dos animais ou noutros tecidos, na contaminação da carcaça por via ambiental ou fecal, contaminação durante o processamento ou contaminação nos próprios supermercados.

#### **1.8.1.8. *Clostridium difficile* em carnes picadas, Canadá**

Rodriguez-Palacios e seus colaboradores (2007), pesquisaram esporos de *C. difficile* em carne picada vendida a retalho no Canadá. Para tal, foram estudadas 60 amostras de carne picada embalada, 53 de carne de vaca e 7 de carne de vitela, provenientes de cinco armazéns de retalhistas localizados no Ontário e de uma loja localizada no Quebec. As amostras foram adquiridas durante um período de dez meses em 2005.



*Clostridium difficile* foi isolado em 20% (12/60) do total das amostras, sendo 20,8% (11/53) isolados das amostras de carne de vaca picada e 14,3% (1/7) das amostras de carne de vitela picada. Dos 12 isolados recuperados, 11 eram produtores de toxinas.

Este foi o primeiro estudo realizado para a identificação de esporos de *C. difficile* em carne picada destinada ao consumo humano. Anteriormente tinham sido realizados outros estudos para a pesquisa de esporos deste microrganismo mas em alimentos à base de carne destinados ao consumo de animais de estimação, nomeadamente cães, onde esporadicamente foram encontrados isolados de *C. difficile* (Broda et al., 1996; Weese et al., 2005)

## 1.8.2. OCORRÊNCIA EM AVES, SEUS PRODUTOS E FRANGOS DE AVIÁRIO

### 1.8.2.1. Detecção e caracterização de *Clostridium difficile* em frango de aviário, Canadá

Weese e seus colaboradores (2010), avaliaram a presença de *C. difficile* em amostras de frango vendidas a retalho, no Ontário, Canada. Adquiriram entre novembro de 2008 e junho de 2009, 203 amostras de frango de onde distinguiram 3 grupos, dependendo da parte do corpo do frango de que se tratava. Pernas de galinha, coxas e asas foram analisadas utilizando métodos qualitativos e quantitativos.

*Clostridium difficile* foi isolado em 12,8% (26/203) das amostras de frango, 9,0% (10/111) em coxas, 18% (13/72) em asas e 15% (3/20) nas pernas. Todos os isolados foram identificados como ribótipo 078, uma estirpe que tem sido associada aos alimentos para animais, e classificado como potencial responsável pela doença em seres humanos. Todas as amostras classificadas como positivas, foram analisadas recorrendo a um protocolo com uma etapa de enriquecimento.

O presumivelmente baixo nível de contaminação demonstrado, com todas as amostras positivas somente em cultura de enriquecimento, também levanta questões. O protocolo de enriquecimento tem um limiar de deteção de 10 esporos/grama, com a metodologia quantitativa capaz de detectar de forma consistente a contaminação igual ou superior a 100 UFC/grama (Weese et al., 2009). Enquanto a dose infecciosa não for conhecida e como varia entre indivíduos, é razoável suspeitar que os níveis mais baixos de contaminação são uma preocupação menor do que os níveis mais elevados. No entanto, os níveis baixos não devem ser desprezados.

O papel da carne de frango ou de quaisquer produtos alimentícios em DACD não é claro, mas considerando a presença do patogénico em alimentos, a sua tolerância durante a cozedura e o aumento da incidência de DACD em pessoas, causadas por estirpes comumente encontrados em alimentos, indica a necessidade de uma investigação mais aprofundada sobre esta potencial via de infeção.

### 1.8.3. OCORRÊNCIA EM SALADAS PRONTAS A COMER E VEGETAIS

#### 1.8.3.1. Contaminação de saladas prontas a comer com *Clostridium difficile*, França

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de vegetais crus prontos a comer contaminados com *C. difficile* em França. Assim, Eckert e seus colaboradores (2013), investigaram 104 saladas e legumes prontos a comer. As amostras foram compradas em cinco mercados e supermercados, em Paris e arredores, entre setembro de 2010 e março de 2011. Especificamente, as amostras analisadas foram: 70 saladas prontas a comer e 44 vegetais crus prontos a comer (incluindo cenouras, cogumelos, rabanetes, brócolos, aipo, couve roxa, couve-flor, soja, ervilha, couve e beterraba). Os vegetais adquiridos eram provenientes de 19 fabricantes diferentes.

Foram isoladas estirpes toxigênicas de *C. difficile* em 3 amostras (2,9%): 2 saladas prontas a comer (um coração de alface e uma salada de alface de cordeiro) e uma amostra de rebentos de ervilha. As estirpes pertenciam a três ribótipos diferentes: ribótipo 001, 014/020/077 e 015.

*Clostridium difficile* é reconhecido como um agente patogénico humano, mas também é responsável pela infecção de animais e pode ser encontrado em vários produtos alimentares, incluindo vegetais crus. Esta presença pode reflectir uma contaminação do meio ambiente (solo) ou pode ser ocorrer durante o processamento. A contaminação de alimentos por *C. difficile* pode levantar preocupações para a saúde pública e mais estudos são necessários para avaliar o impacto da contaminação de alimentos.

#### 1.8.3.2. *Clostridium difficile* em vegetais, Canadá

Metcalf e seus colaboradores (2010), procuraram isolar *C. difficile* a partir de uma variedade de vegetais obtidos em mercearias locais e caracterizar esses isolados. Vários legumes foram comprados em 11 supermercados diferentes em Guelph, Ontário, Canadá, entre maio e agosto de 2009, com um total de 111 amostras. Foi utilizado o método de cultura com etapa de enriquecimento e os isolados foram caracterizados por ribotipagem, macrorestrição de ADN e eletroforese em campo pulsado (PFGE) e capacidade de produção de toxinas.

*Clostridium difficile* foi isolado em 4,5% (5/111) dos vegetais analisados. Foram identificados dois ribótipos e dois tipos de toxinas. Três isolados foram identificados como ribótipo 078/NAP 7/toxina V, possuindo todos os três genes que codificam a produção de toxinas. Os dois outros isolados partilham um ribótipo com uma estirpe toxigénica anteriormente encontrada em humanos com DACD nesta região.

A contaminação de vegetais foi detetada em níveis relativamente baixos, no entanto, todos os isolados foram toxigénicos e pertencentes a ribótipos previamente associados com a DACD. A contaminação de vegetais por *C. difficile* pode ocorrer embora as implicações para as práticas de segurança alimentar sejam ainda desconhecidas. A presença de isolados toxigénicos sugere que os legumes podem ser uma fonte de *C. difficile* para os seres humanos.

#### **1.8.3.3. *Clostridium difficile* em saladas prontas a comer, Escócia (2009)**

Bkari e seus colaboradores (2009) examinaram 40 embalagens de saladas prontas a comer, compradas entre maio e junho de 2008, em sete supermercados de Glasgow, Escócia. Foram utilizadas duas metodologias diferentes, uma com etapa de enriquecimento e outra de contagem directa.

Os esporos de *C. difficile* foram identificados em 7,5% (3/40) das amostras, mas apenas no método com enriquecimento, o que sugere um baixo nível de contaminação (< 3,0 UFC/grama). Os isolados identificados eram todos toxinogénicos, 66,7% (2/3) eram do ribótipo 001, um ribótipo comum em isolados clínicos na Escócia.

O isolamento destes ribótipos em saladas prontas a comer é preocupante e evidência o potencial risco associado com o consumo destas saladas, principalmente por se tratar de alimentos que não são cozinhados antes de serem consumidos. O consumo destes alimentos por indivíduos de risco, poderá levar à propagação de *C. difficile* e a um aumento da presença assintomática de *C. difficile* entre os seres humanos, aumentando assim o risco de contágio dentro de ambientes hospitalares. A presença de *C. difficile* em saladas prontas a comer pode resultar de contaminação do ambiente ou de transmissão por manipuladores de alimentos. Estes investigadores acreditam que é necessário desenvolver mais estudos para caracterizar os alimentos como fonte deste

patogénico e também para avaliar o papel do solo e dos animais como seus reservatórios.

#### 1.8.4. OCORRÊNCIA EM MOLUSCOS BIVALVES COMESTÍVEIS

##### 1.8.4.1. Ocorrência de *Clostridium difficile* em moluscos bivalves comestíveis, Itália

O objetivo do estudo, realizado por Pasquale e seus colaboradores (2012), foi avaliar a ocorrência de *C. difficile* em moluscos bivalves marinhos comestíveis, que, como filtro natural, são capazes de acumular partículas em suspensão na água, incluindo os microrganismos. Cinquenta e duas amostras (32 *Mytilus galloprovincialis*, 19 *Tapes philippinarum* e 1 *Venus verrucosa*) de origem diferente (22 recolhidas de peixarias, 21 de centros de depuração, seis de explorações de moluscos, e quatro adquiridas em feiras) foram compradas na província de Nápoles (sul da Itália), uma amostra adicional de *M. galloprovincialis* foi recolhida numa peixaria na cidade de Taranto (sul da Itália). As amostras foram adquiridas entre outubro de 2010 e janeiro de 2011.

*Clostridium difficile* foi encontrado em 49% das 53 amostras investigadas. Dezasseis isolados foram agrupados em 12 ribótipos conhecidos (001, 002, 003, 010, 012, 014/020, 018, 045, 070, 078, 106, e 126), enquanto que 10 amostras adicionais foram agrupadas em oito novos ribótipos. Dois tipos de toxinas (0 e V) foram encontrados. Cinquenta e oito por cento dos isolados eram toxigênicos.

Estes resultados indicam que as estirpes toxigênicas de *C. difficile* podem ser isoladas de moluscos bivalves. O estudo demonstrou que os moluscos bivalves marinhos podem ser contaminados pelos ribótipos toxigênicos mais frequentemente isolados nos pacientes sintomáticos em hospitais europeus. Os resultados estão de acordo com Iwamoto et al. (2010), que destacou a forma como os moluscos, que filtram a água como meio de alimentação, podem concentrar microrganismos patogênicos naturalmente presentes na água do mar ou vindo de reservatórios humanos, provenientes da poluição de esgotos. A ingestão de mariscos contaminados crus ou mal cozidos, e a elevada resistência dos esporos de *C. difficile* à temperatura pode representar uma importante fonte de exposição e um sério risco para a saúde pública. Mais estudos são necessários para elucidar a prevalência de estirpes toxigênicas de *C. difficile* em moluscos bivalves comestíveis e sua importância para a saúde pública.

## **1.9. *Clostridium difficile* NO MEIO AMBIENTE**

É possível encontrar *C. difficile* em todo o ambiente - em fezes de solo, ar, água, humanos e animais, e produtos alimentares. Porém, a infecção por *C. difficile* é mais comumente associado com os cuidados de saúde, que ocorrem em hospitais e outros serviços de saúde, onde existe uma percentagem muito maior de portadores assintomáticos.

### **1.9.1. Isolamento ambiental de *Clostridium difficile* de um hospital de ensino veterinário**

Foi realizado, por Weese e seus colaboradores (2000), um estudo ambiental num hospital de ensino veterinário para detetar a presença de *C. difficile*. A colheita foi realizada utilizando placas de contacto com cicloserina-cefoxitina-frutose e com 0,1% de agar de taurocolato de sódio.

*Clostridium difficile* foi isolado em 24 (6,3%) de 381 locais. O crescimento foi obtido em 4,5% (9/202) dos sítios analisados na Grande Clínica Animal, em 8,1% (13/160) de locais dentro da Clínica de Pequenos Animais, e em 20% (2/10) dos pontos de amostragem em outro lugar. Catorze das 21 estirpes testadas produziram toxinas *in vitro*.

Foi encontrada uma associação geográfica, dos isolados positivos, com áreas na grande clínica de animais onde anteriormente tinha sido diagnosticada diarreia nosocomial por *C. difficile* em cavalos. Vários outros locais com potencial para a transmissão nosocomial do microrganismo foram identificadas. Áreas em que *C. difficile* foi isolado tendem a ser áreas com alto tráfego de animal, com aumento da possibilidade de contaminação fecal, e difícil acesso para limpar as superfícies. Este estudo documenta a prevalência deste microrganismo no meio ambiente e o seu papel potencial na doença nosocomial.

### 1.9.2. Distribuição de *Clostridium difficile* no ambiente de South Wales

Al Saif e Brazier realizaram, em 1996, um estudo no País de Gales com o objetivo de determinar a prevalência de *C. difficile* no ambiente e demonstrar de que forma é que a população poderá estar exposta a este microrganismo. Sendo um microrganismo formador de esporos, *C. difficile* pode, teoricamente, sobreviver indefinidamente no meio ambiente e conseqüentemente ser ingerido pelo Homem de variadas formas. Para tal colheram amostras na água (rios, lagos, canais e mar), solo (parques, jardins e parques infantis), superfícies ambientais (hospitais, clínicas veterinárias, residências estudantis e moradias) e em vegetais crus vendidos nos mercados de Cardiff (tomate, batata, couve, alface, cebola, etc). Foi realizada a pesquisa do microrganismo e detecção da toxina A.

Os resultados demonstraram a presença de *C. difficile* em 36% (40/110) das amostras de água, 21,4% (22/104) no solo, 20% (76/380) em superfícies de hospitais, 16,7% (5/30) em superfícies de clínicas veterinárias e em 2,3% (7/300) de amostras de vegetais. A percentagem de isolados positivos para a toxina A foi de, respectivamente, 90% (36/40), 40,9% (9/22), 94,7% (72/76), 20% (1/5) e de 71,4% (5/7).

Os resultados obtidos indicam uma elevada prevalência em amostras de água de rios (81,2%) e de lagos (40%). Apenas foi encontrado *C. difficile* numa amostra de água da rede pública, o que demonstra o potencial de a rede de distribuição ser uma fonte de infecção, caso o tratamento da água não seja adequado.



### **1.10. OBJETIVO GERAL**

O estudo desenvolvido teve como objetivo detetar e quantificar *Clostridium difficile* em alimentos vendidos quer em estabelecimentos do comércio tradicional, quer em grandes superfícies, localizados na zona do Grande do Porto e Lisboa.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAGEM

No âmbito deste trabalho foi realizada uma avaliação microbiológica, Contagem e Detecção de *Clostridium difficile*, em 145 produtos adquiridos entre janeiro de 2012 e janeiro de 2013. Foram analisadas: 60 amostras de carne de vaca (novilho, vitela e bovino), 20 amostras de carne picada de porco, 24 amostras de frango (coxas, asas, pescoço, sobrecoxa, moelas e hambúrgueres), 39 enchidos tradicionais (alheira, salsicha fresca, paio, morcela, presunto, fiambre, chouriço, linguiça e moura) e duas amostras de moluscos bivalves. Os produtos foram comprados quer em estabelecimentos do comércio tradicional quer em grandes hipermercados.

A seleção das amostras, no momento de compra, foi o mais heterogênea possível, no comércio tradicional foi dada preferência às carnes já picadas e expostas para escolha do consumidor, enquanto que nas grandes superfícies a escolha variou entre carnes previamente picadas, marcas próprias embaladas e outras marcas embaladas a vácuo ou atmosfera modificada. No caso dos enchidos a compra foi efetuada seguindo o mesmo princípio de heterogeneidade, assim, foram analisados produtos adquiridos na charcutaria, produtos acondicionados em atmosfera modificada, em vácuo e produtos embalados apenas com ar. O transporte e acondicionamento das amostras foi realizado em sacos térmicos. As amostras foram conservadas em frigorífico, por um período máximo de 24 h, até ao momento de início de análise no laboratório.

### 2.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE

Foram testadas duas metodologias. Na metodologia A foi realizada contagem direta de *C. difficile* baseada em estudos realizados por vários autores (George et al., 1979, Perry et al., 2010, Eckert et al., 2013), utilizando como meio de cultura seletivo a Gelose *Clostridium difficile* (CLO; bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição da Gelose *Clostridium difficile* (CLO):

<b>Ingredientes</b>	
Peptona de caseína (bovino)	13 g
Peptona de carne (bovino ou porcino)	5 g
Peptona de coração (bovino ou porcino)	3 g
Amido de milho	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Agar	13,5 g
Sangue (carneiro)	50 ml
Cicloserina	0,100 g
Cefoxitina	0,008 g
Anfotericina B	0,002 g
Água	1000 ml
pH 7,3	

O meio é comprado pronto a usar, em embalagens de 20 placas.

A colheita das amostras foi realizada segundo a NP 1828:1982. A preparação das amostras e respectivas diluições foram realizadas segundo as técnicas descritas na ISO 6887-2:2003. Retiraram-se asséptica e aleatoriamente pequenas frações em diversos pontos da amostra para um saco de *Stomacher* esterilizado, perfazendo 10 g. De seguida, adicionou-se 90 ml de solução de Ringers (1/4 *strength*) e procedeu-se à homogeneização durante 2 minutos. Foram realizadas três diluições decimais em solução de Ringer. A contagem foi realizada em Gelose *Clostridium difficile* (CLO), por sementeira à superfície e incubação em condições de anaerobiose, utilizando jarras de anaerobiose e o kit gerador de anaerobiose Anaerocult A (Merck). As placas incubaram a 37 °C durante 72 h.

Após incubação, foram selecionadas as colónias características que apresentaram uma cor cinzenta e que por vezes se espalham ao longo das estrias de sementeira, que possuem um odor a estrume de cavalo e fluorescência amarelo-esverdeado sob luz UV (360 nm).

A identificação presuntiva foi confirmada por coloração de Gram e hemólise em gelose de sangue e pelas seguintes provas: presença de esporos, mobilidade em meio de Nitrato Mobilidade Agar, redução de nitratos, pesquisa da atividade das enzimas catalase, lecitinase, gelatinase e triptofanase.

A metodologia B foi uma adaptação das técnicas aplicadas por vários autores (Arroyo et al., 2005; Jöbst et al., 2010; Boer et al., 2011 e Limbago et al., 2012) usando o meio de cultura seletivo *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin (CDMN; Oxoid, Mediaproduits bv, Groningen, The Netherlands) (Tabela 5). A detecção de *C. difficile* foi realizada com um pré-enriquecimento em *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin broth (Tabela 4) e com pré-tratamento com Etanol antes da inoculação em placa.

Tabela 4 - Composição de *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin broth:

<b>Ingredientes</b>	
Protease peptona	40,0 g
Hidrogenofosfato dissódico	5,0 g
Dihidrogenofosfato de potássio	1,0 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Cloreto de sódio	2,0 g
Fructose	6,0 g
Água	1000 ml
pH 7,0 ± 0.2 a 25°C	

Após esterilização, é adicionado ao meio de cultura:

- 500,0 mg/l de cloridrato de L(+)-cisteína monohidratado;
- 12,0 mg/l de norfloxacin;
- 32,0 mg/l de moxalactam;
- 7% (v/v) de Sangue de cavalo.

Tabela 5 - Composição de *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin (CDMN):

Ingredientes	
Protease peptona	40,0 g
Hidrogenofosfato dissódico	5,0 g
Dihidrogenofosfato de potássio	1,0 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Cloreto de sódio	2,0 g
Fructose	6,0 g
Agar	15,0 g
Água	1000 ml
pH 7,0 ± 0.2 a 25 °C	

Após esterilização, é adicionado ao meio de cultura:

- 500,0 mg/l de cloridrato de L(+)-cisteína monohidratado;
- 12,0 mg/l de norfloxacin;
- 32,0 mg/l de moxalactam;
- 7% (v/v) de Sangue de cavalo;

Posteriormente o meio é distribuído em placas de Petri.

A colheita das amostras foi realizada segundo a NP 1828:1982. Porém, todas as amostras analisadas foram congeladas após se ter realizado a metodologia A. A descongelação das amostras foi realizada *overnight* em frigorífico. Seguidamente retirou-se asséptica e aleatoriamente pequenas frações em diversos pontos da amostra para um saco esterilizado de *Stomacher*, perfazendo 10 g e adicionou-se 20 ml de *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin broth. Procedeu-se à homogeneização em *Stomacher* durante 2 minutos e incubou-se os sacos de *Stomacher* a 37 °C durante 7 dias em condições anaeróbias, utilizando jarras de anaerobiose e o kit gerador de anaerobiose Anaerocult A (Merck). O Pré-tratamento

das amostras com etanol (Alcohol Shock Treatment) foi realizado da seguinte forma: misturou-se 2 ml de amostra com 2 ml de etanol 96%, homogeneizou-se em *Stomacher* durante 5 minutos, deixou-se repousar à temperatura ambiente por 1 hora e em seguida centrifugou-se as amostras a 3800 rpm durante 10 minutos. Retirou-se o sedimento obtido para *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin (CDMN) e incubou-se as placas a 37 °C em condições anaeróbias por 72 horas.

### **Leitura, interpretação e confirmação do *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin (CDMN)**

Após incubação observou-se a presença de colónias características que apresentam uma cor opaca branco-acinzentado, que possuem um odor a estrume de cavalo e fluorescência amarelo-esverdeado sob luz UV (360 nm). A identificação presuntiva foi confirmada de acordo com o descrito na metodologia A.

### **2.3. CONTROLO POSITIVO**

Foi utilizado como controlo positivo de *C. difficile*, um isolado clínico fornecido pelo Hospital de S. Marcos, Braga, com a referência **U 315639**. Foi preparada uma suspensão de 10 g de uma das amostras de carne picada nos respectivos diluentes (90 ml de solução de Ringers (1/4 *strength*) e em 20 ml de *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin broth), inoculadas com a cultura pura de *C. difficile* e executadas as metodologias A e B, tal como descrito anteriormente.

#### **2.3.1. Determinação de viabilidade de *Clostridium difficile***

Foi utilizado Brain Heart Infusion agar (BHI agar) como meio não seletivo nas contagens realizadas, para determinação de viabilidade de *C. difficile*. Foram realizadas diluições decimais em solução de Ringer 1/4 *strength* segundo as técnicas descritas na ISO 6887-2:2003. As contagens foram realizadas simultaneamente em BHI agar e nos meios de cultura seletivos (CLO e CDMN) usados nas duas metodologias testadas. As temperaturas e

condições de incubação foram exactamente iguais às descritas na metodologia A e B, bem como a leitura, interpretação e confirmação das colónias características.

As contagens foram realizadas em BHI agar, em CLO e em CDMN, com o controlo positivo inoculado em 10 g de carne, para perceber qual a sua taxa de recuperação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados um total de 145 produtos adquiridos na zona do Grande Porto e Lisboa, em estabelecimentos do comércio tradicional e grandes superfícies (supermercados e hipermercados), tal como registado nas Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13, em anexo. De acordo com as metodologias utilizadas, verificou-se que todas as 145 amostras foram negativas para a contagem e deteção de *C. difficile*.

Todas as amostras foram analisadas pelas duas metodologias descritas, sendo a primeira metodologia (A) baseada na contagem direta (George et al.,1979, Perry et al.,2010, Eckert et al., 2013). A Gelose *Clostridium difficile* (CLO) é um meio de isolamento seletivo destinado ao desenvolvimento de *C. difficile* a partir de fezes. A presença de sangue de carneiro facilita o crescimento da espécie a pesquisar. Os antibióticos e os antifúngicos presentes no meio inibem a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos (George et al.,1979; Al-Jumaili e Bint, 1981; Delmee e Wauters, 1981).

A segunda metodologia (B) baseia-se num pré-enriquecimento de sete dias de incubação, seguido de um pré-tratamento com etanol e isolamento em placas de meio seletivo para *C. difficile* (Arroyo et al., 2005; Jöbst et al., 2010; Boer et al., 2011 e Limbago et al., 2012). O meio *Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin (CDMN) resulta de uma fórmula proposta por Aspinall e Hutchinson (1992) e destina-se ao isolamento de *C. difficile* em fezes. Verificou-se que o CDMN é significativamente mais produtivo e que permite o isolamento de mais 20% de estirpes de *C. difficile*, quando comparado com meios de cultura suplementados apenas com D-cicloserina e Cefoxitina (Aspinall e Hutchinson,1992). Verificou-se que o pré-tratamento com etanol reduzia consideravelmente a flora contaminante e em alguns casos eliminava mesmo todos os outros microrganismos presentes nas amostras, principalmente nas amostras de carne picada, onde a contaminação por outros microrganismos é vasta e dificulta a seleção de colónias características de *C. difficile*.

A baixa prevalência de *C. difficile* em carnes e outros produtos alimentares, do estudo realizado, está de acordo com o descrito em outros estudos que referem baixo nível e baixa ocorrência de *C. difficile* em animais de abate destinados à alimentação (Bakri et al., 2009; Von Abercron et al., 2009; Gould e Limbago de 2010; Bouttier et al., 2010; Hoffer et al., 2010; Jöbstl et al., 2010; Boer et al., 2011). Porém, enquanto que alguns autores registaram apenas 1% de amostras positivas (Zidaric e Rupnik, 2012) outros conseguiram obter valores



de 51% (Simango e Mwakurudza, 2008) nas mesmas condições de análise (matriz e metodologias aplicadas), ver Tabela 6.

Tabela 6 – Compilação de estudos realizados por vários autores, entre 2012 e 2007

<b>País</b>	<b>Autores / Ano</b>	<b>Matriz</b>	<b>Número total de amostras</b>	<b>Número de amostras positivas (%)</b>
Eslovénia	Zidaric e Rupnik (2012)	59 carnes picadas e produtos prontos-a-comer; 8 saladas e legumes frescos; 49 ovos de galinha	116	1 (1)
Holanda	Boer et al. (2010)	Carnes cruas (porco, bezerro, cordeiro e frango)	500	8 (2)
França	Bouttier et al. (2010)	105 embalagens de carne picada ; 59 salsichas de porco; 12 embalagens de carne crua de comida para gato	176	2 (1)
Áustria	Jöbstl et al. (2010)	100 carnes picadas; 50 amostras de leite cru	150	3 (2)
Canadá	Weese et al. (2010)	Frango	203	26 (13)
Canadá	Rodrigues-Palacios et al. (2009)	149 carnes de vaca picada; 65 costeletas de vitela	214	13 (6)
Canadá	Weese et al. (2009)	115 carnes de vaca; 115 carnes de porco	230	28 (12)
USA	Songer et al. (2009)	65 carnes cruas (vaca, porco, peru, linguiça e chouriço); 23 carnes prontas para consumo (salsichas)	88	37 (42)
Zimbabwe	Simango e Mwakurudza (2008)	Frango de aviário (100 amostras de fezes e 100 de solo)	200	51 (26)
Canadá	Rodriguez-Palacios et al. (2007)	60 carnes picadas embaladas; 53 carnes de vaca; 7 carnes de vitela	120	44 (37)

Relativamente à taxa de recuperação, concluiu-se que, quando o nível de inóculo é superior a  $10^3$  não existe uma redução significativa do número de células. Nos casos em que a inoculação foi inferior a 300 ufc /g não se obtiveram contagens ( $< 10$  ufc/g), quando a enumeração foi feita em meio seletivo CLO, (Tabela 7). Melhores resultados foram obtidos com o meio CDMN no qual só não foi possível obter contagens quando o inóculo foi inferior a 30 ufc/ g (CDMN, Tabela 8) – 1 log de diferença entre métodos.

Estes resultados revelaram uma melhor sensibilidade do que a descrita para a pesquisa de *C. difficile* em fezes, 85,2% no caso do CLO (Eckert et al., 2013) e de 88,3% no caso do CDMN (Aspinall et al., 1992 e Bloedt et al., 2009).

Tabela 7 – Resultados obtidos na determinação da taxa de recuperação de *C. difficile*, para a metodologia A\*

<b>Amostra</b>	<b>Nível de inóculo (ufc / g)</b>	<b>Resultado em CLO (ufc / g de amostra)</b>
1	1,9E+04	1,6E+04
2	2,1E+03	1,0E+03
3	2,9E+02	$< 1,0E+01$
4	3,0E+01	$< 1,0E+01$

\*Método de contagem directa em CLO com 3 dias de incubação. Quatro amostras de carne picada, foram inoculadas com diferentes concentrações da cultura U 315639 e efetuadas contagens em BHI agar e CLO.

Tabela 8 - Resultados obtidos na determinação da taxa de recuperação de *C. difficile*, para a metodologia B\*

<b>Amostra</b>	<b>Nível de inóculo (ufc / g)</b>	<b>Resultado em CDMN (ufc / g de amostra)</b>
1	2,0E+04	1,1E+04
2	2,2E+03	1,7E+03
3	2,9E+02	2,0E+02
4	3,0E+01	< 1,0E+00

\*Método de detecção em meio seletivo, com pré-enriquecimento e pré-tratamento com etanol. Quatro amostras de carne picada, foram inoculadas com diferentes concentrações da cultura U 315639 e efectuadas contagens em BHI agar e CDMN.

Como todas as amostras se revelaram negativas para a presença de *C. difficile*, verificada quer no método quantitativo quer no qualitativo, pode assumir-se que o nível de contaminação típica nas carnes é muito baixo. Rodriguez-Palacios et al. (2009), defendem que a baixa sensibilidade dos métodos utilizados se deveria ao número reduzido de esporos presentes nas amostras analisadas, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, para as amostras contaminadas artificialmente com números baixos. Porém esta baixa contaminação não deve ser desprezada uma vez que se desconhece a relação entre a dose infectante e fatores de risco para as DACD.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

A infecção por *C. difficile* é um problema global com várias faces, colocando desafios cada vez mais exigentes, que impõem uma constante actualização e consciência, com o objetivo de reduzir o risco de doença e implementar corretas medidas no tratamento dos pacientes. Esta questão tem despertado, junto da comunidade científica bastante interesse, principalmente pelo facto de as Doenças Associadas a *C. difficile*, serem um achado cada vez mais frequente. Durante anos pensou-se que *C. difficile* fosse inócuo para o ser humano, apenas manifestando o seu carácter patogénico em pessoas que estivessem expostas aos fatores de risco, principalmente à terapia por antibióticos e ao internamento hospitalar. Esta realidade mudou e verifica-se o aumento da prevalência de algumas estirpes, usualmente isoladas em animais, nas DACD fora de ambientes hospitalares. Estas alterações supõem a possibilidade de *C. difficile* ser um agente zoonótico, transmitido aos humanos pelo contacto com os animais, ou mais grave ainda, pelos alimentos.

Os estudos sobre a prevalência de *C. difficile* realizados, em todo o mundo, em carnes e em outros produtos alimentares, tais como vegetais e moluscos bivalves, reforçam a ideia de se considerar *C. difficile* como um patogénico de origem alimentar. No entanto, não há nenhuma evidência epidemiológica atual (isto é, surtos alimentares associados à ingestão de alimentos contaminados por este microrganismo) para apoiar esta hipótese.

Não há atualmente uma explicação definitiva, que justifique os diferentes resultados obtidos por diferentes investigadores. Especula-se sobre a baixa contaminação típica deste tipo de matriz, sobre a dispersão pouco homogénea das células de *C. difficile* nas amostras e ainda sobre a presença sazonal deste microrganismo nos alimentos. A não utilização de métodos padronizados poderá ainda explicar algumas destas diferenças.

*Clostridium difficile* exemplifica a capacidade de patogénicos já conhecidos, emergirem com uma virulência aumentada, desafiando os cientistas a explicar o seu ressurgimento, os clínicos a repensar as suas práticas, e os peritos de saúde pública a encontrar novas medidas para limitar a sua disseminação (Bartlett JG, 2005). Serão necessários mais estudos que investiguem a transmissão de *C. difficile* do campo à nossa mesa, estudando este problema de uma forma global, onde veterinários, engenheiros alimentares, médicos e epidemiologistas se juntam para determinar se *C. difficile* é realmente um patogénico de origem alimentar.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Saif N, Brazier JS. 1996. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology*. 45:133-7.
- Al-Jumaili IJ, Bint J. 1981. Simple method of isolation and presumptive identification of *Clostridium difficile* - Zentralbl. Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. 250:142-146.
- Arroyo LG, Rousseau J, Willey BM, Low DE, Staempfli H, McGeer A, Weese JS. 2005. Use of selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(10):5341-5343.
- Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller G. 2009. *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Eurosurveillance*. 14:45.
- Aspinall ST, Hutchinson DN. 1992. New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*. 45:812-814.
- Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. 2009. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 15:817-818.
- Bartlett JG. 2005. The New *Clostridium difficile* – What does it mean?. *New England Journal of Medicine*. 353:2503-2505.
- Bloedt, K, Riecker M, Poppert S, and Wellinghausen N. 2009. Evaluation of new selective culture media and a rapid fluorescence in situ hybridization assay for identification of *Clostridium difficile* from stool samples. *Journal of Medical Microbiology*. 58:874-877.
- Blondeau JM. 2009. What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile* diarrhea?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63:238-242.
- Blossom DB, McDonald LC. 2007. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 45:222-227.
- Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. 2011. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *International*

Journal of Food Microbiology. 144:561-564.

- Borriello SP. 1990. The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonisation of the gut. *Annals of Medicine*. 22:61-67.
- Bouttier S, Barc M-C, Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. 2010 April. *Clostridium difficile* in Ground Meat, France. *Emerging Infectious Diseases journal* [serial on the Internet]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1604.091138>
- Brazier JS. 1998. The diagnosis of *Clostridium difficile* associated disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41Suppl:C29-40.
- Brazier JS. 1998. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41:47-57.
- Broda DM, DeLacy KM, Bell RG, Braggins TJ, Cook RL. 1996. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology*.29:335-352.
- Cardoso C, Freire R, Duarte J, Oleastro M, Santos A, Rodrigues JC, Cremers I, Oliveira AP. 2013. Determinação das diferentes estirpes de *Clostridium difficile* num grupo de doentes com infecção causada por esta bactéria. *GE Jornal Português de Gastrenterologia*. 20(6):250–254.
- Carman RJ, Stevens AL, Lyerly MW, Hiltonsmith MF, Stiles BG, Wilkins TD. 2011. *Clostridium difficile* binary toxin (CDT) and diarrhea. Elsevier Ltd. vol17, 4:161-165.
- Carrapa A, Zão A, Coelho J, Santos J, Pedrosa S. 2005. Técnicas de análise de ADN aplicadas a diagnóstico. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Departamento de Biologia Celular e Molecular. pag 1-3.
- Clements AC, Magalhães RJ, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV. 2010. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis*. 10(6):395-404.
- *Clostridium difficile*. Fev. 2014. Disponível: [http://ddcnovasperspectivas.blogspot.pt/2014\\_02\\_01\\_archive.html](http://ddcnovasperspectivas.blogspot.pt/2014_02_01_archive.html) [data da consulta: 22/03/2014]

- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control and Hospital Epidemiology*. 31:431-55.
- Cramer JP, Burchand GD, Lohse AW. 2008. Old dogmas and new perspectives in antibiotic – associated diarrhea. *Medizinische Klinik*. 103325-338;quiz 339-340.
- Delmee M, Wauters G. 1981. Rôle de *Clostridium difficile* dans les diarrhées survenants après antibiothérapie: étude de 87 cas. - *Acta Clinica Belgica*. 36:178-184.
- Deshpande, Abhishek; Pasupuleti, Vinay; Patel, Preethi; Ajani, Gati; Hall, Geraldine; Hu, Bo; Jain, Anil; Rolston, David D.K. 2011. Repeat stool testing to diagnose *Clostridium difficile* infection using enzyme immunoassay does not increase diagnostic yield. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 9 (8): 665–669.
- Doyle ME. 2013. *Clostridium difficile* as a Risk Associated with Animal Sources. Food Research Institute, University of Wisconsin–Madison, Madison WI 53706.
- Dupuy B, Matamouros S. 2006. Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of ARN polymerase sigma-factors. *Research in Microbiology*. 157:201-205.
- Dzik J e Bartlett JG. 1980. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 17:695-698.
- Eckert C, Burghoffer B, Barbut F. 2013. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile*, France. *Journal of Medical Microbiology*. 62(9):1435-1438.
- Eckert C, Burghoffer B, Lalande V, Barbuta F. Mar 2013. Evaluation of the Chromogenic Agar chromID *C. difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 5: 1002–1004.
- Erdemoglu A, Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T. 2005. Carriage of *Clostridium difficile* in dogs and cats. *Indian Veterinary Journal*. 82:929-32.
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et-al. 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology*

Reviews. 23:529-49.

- George WL, Kirby BD, Sutter VL, Finegold SM in Schlessinger D. 1979. Editor Microbiology. Washington D.C. American Society for Microbiology. 2670271.
- George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. Journal of Clinical Microbiology. 9:214-219.
- Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva Jr J. 1995. *Clostridium difficile* - Associated Diarrhea and Colitis. Infection Control and Hospital Epidemiology. 16:459-77.
- Gerding DN. 2004. Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones and *Clostridium difficile* associated – diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. Clinical Infectious Diseases. 38:646-648.
- Gould LH, Limbago B. 2010. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? Clinical Infectious Diseases. 51(5):577-582.
- Griffiths M. 2005. Quorum-sensing and virulence in foodborne pathogens. Understanding pathogen behavior-Woodhead Publishing Limited. Pag.582.
- Hammit MC, Bueschel DM, Keel MK, Hammit MC, Bueschel DM, Keel MK, Glock RD, Cuneo P, DeYoung DW, Reggiardo C, Trinh HT, Songer JG. 2007. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. Veterinary Microbiology. 127:342-52.
- Hansen F, Olsen KEP. 2009. *Clostridium difficile* – A Potentially Foodborne Zoonose? Significance in Humans, Animals and Food. NMKL Technical Report N°3. [www.nmkl.org](http://www.nmkl.org)
- Hernández-Rocha C, Naour S, Álvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D. 2012. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. Revista Chilena de Infectología. 29:434-445.
- Hoffer E, Haechler H, Frei R, Stephan R. 2010. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. Journal of Food Protection. 73:973-975(3).



- Hurley BW, Nguyen CC. 2002. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Archives of Internal Medicine*. 162:2177-2184.
- Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, et al. 2008. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoreses-based PCR ribotyping. *Journal of Medical Microbiology*. 57:685-689.
- Indra A, Schmid D, Hululescu S, Hell M, Gattringer R, Hasenberger P, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F. 2008. Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006-2007. *Journal of Medical Microbiology*. 57:702-708.
- ISO 6887-2:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
- Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Bealieu DB. 2007. Impact of *Clostridium difficile* on inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 5:345-351.
- Iwamoto M, Ayers T, Mahon BE, Swerddlow DL. 2010. Epidemiology of seafood associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:399-411.
- Janvilisri T, Scaria J, Thompson AD, Nicholson A, Limbago BM, Arroyo LG, Songer JG, Grohn YT, Chang Y-F. 2009. Microarray identification of *Clostridium difficile* core components and divergent regions associated with host origin. *Journal of Bacteriology*. 191:3881-3891.
- Jhung AM, Thompson DA, Killgore EG et al. 2008. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infections Diseases*. 14:1039-1045.
- Jöbstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Köfer J, Wagner M. 2010. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*. 138:172-175.
- Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH. 2012. *Clostridium difficile*: A European perspective. *The British Infection Association*. 66: 115-128.

- Kachrimanidou M, Malisiovas N. 2011. *Clostridium difficile* infection: A comprehensive review. *Critical Reviews in Microbiology*. 37:178-187.
- Khanna S and Pardi DS, 2010. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 4:409-416.
- Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, Sauver JL, Harmsen WS, 2012. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: A population-based study. *The American Journal of Gastroenterology*. 107(1):89-95.
- Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease Analysis, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PCR-Ribotyping, Multilocus Sequence Typing, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Surface Layer Protein A Gene Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:431-437.
- Lambert ML, Mertens K, Ramboer I, Delmée M, Suetens C. 2009. Nation-wide prospective surveillance of *Clostridium difficile* infections in hospital in Belgium, July 2007-2008 June. *Eurosurveillance*. 14:191-69.
- Levett. 1985. Effect of antibiotic concentration in a selective medium on the isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens. *Journal of Clinical Pathology*. 38(2):233-4.
- Limbago B, Thompson AD, Greene SA, MacCannell D, MacGowan CE, Jolbitado B, Hardin HD, Estes SR, Weese JS, Songer JG. 2012. Development of a consensus method for culture of *Clostridium difficile* from meat and its use in a survey of U.S. retail meats. *Food Microbiology*. 32:448-451.
- Martins LF. 2009. *Clostridium difficile* – Uma Ameaça Renovada. Artigo de Revisão Bibliográfica. Mestrado Integrado em Medicina, da Universidade do Porto.
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. 2005. An epidemic toxin gene variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*. 335:2433-2441.

- McDonald LC, Owings M, Jerning DB. 2006. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerging Infectious Diseases*. 12:409-15.
- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. 1989. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *The New England Journal of Medicine*. 320:204-10.
- McFarland LV. 1998. Epidemiology risk factors and treatments for antibiotic associated-diarrhea. *Digestive Diseases*. 16(5):292-307.
- Mcfarland LV. 2008. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile* - associated disease. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. 5:40-48.
- Metcalf DS, Costa MC, Dew WMV, Weese JS. 2010. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. *Letters in Applied Microbiology*. 51:600-602.
- Monaghan T, Boswell T, Mahida RY. 2009. Recent advances in *Clostridium difficile* – associated disease. *Postgraduate Medical Journal*. 85:152-162.
- Morgan OW, Rodrigues B, Elston T, Verlander NQ, Brown DFJ, Brazier J, et al. 2008. Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: A case study. *Plos one*. 3:e1812.
- Moura VM. 2010. *Clostridium difficile* - Uma Zoonose em ascensão. Pós-Graduação em segurança Alimentar. Escola Superior de Biotecnologia.
- Mulligan ME. 2008. *Clostridium difficile* – its role in intestinal disease. London. Academic Press. 229-256.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller EA, Tenover F, Tenover RH. 2003. *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Washington DC: ASM Press. ed. ISBN 1-55581-255-4.
- Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, et-al. 2005. A large outbreak of *Clostridium difficile* – associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 26:273-80.
- NHS Evaluation report: *Clostridium difficile* toxins assays, CEP08054 Feb 2009
- Norén T. 2010. *Clostridium difficile* and the disease it causes. *Methods in Molecular*

Biology. 646:9-35.

- NP – 1828: 1982 - Colheita e Envio de Amostras para Análise Microbiológica dos Géneros Alimentícios.
- Pasquale V, Romano V, Rupnik M, Capuano F, Bove D, Aliberti F, Krovacek K, Dumontet S. 2012. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. Food Microbiology. 31:309-312.
- Pépin J, Saheb N, Coulombe et al. 2005. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile* - associated diarrhea: a cohort study during na epidemic in Quebec. Clinical Infectious Diseases. 41:1254-1260.
- Pépin L, Valiquette L, Alary ME, et al. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. Canadian Medical Association Journal. 171:466-472.
- Perry JD, Asir K, Halimi D, Orenca S, Dale J, Payne M, Carlton R, Evans J, Gould FK. 2010. Evaluation of a chromogenic culture medium for isolation of *Clostridium difficile* within 24 hours. Journal of Clinical Microbiology. 48:3852–3858.
- Pirs T, Ocepek M, Rupnik M. 2008. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. Journal of Medical Microbiology. 57:790-792.
- Poutanen SM, Simor AE. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Canadian Medical Association Journal -Canadian Medical Association or its licensors. 171(1):51-8..
- Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, Martin H, Thompsom AD, McDonald LC, Limbago B, Weese JS. 2009. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. Emerging Infectious Diseases. 15:802-805.
- Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerging Infectious Diseases. 13:485-487.
- Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, Brazier JS, Weese JS. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Calves, Canada. Emerging Infectious Diseases. 12:1730-1736.

- Rodriguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. 2013. Infecciones producidas por *Clostridium difficile* In Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 31(4):254–263.
- Roupael NG, O'Donnell JA, Bhatnagar J, Lewis F, Polgreen PM, Beekmann S, Guarner J, Killgore GE, Coffman B, Campbell J, Zaki SR, McDonald LC. 2008. *Clostridium difficile* associated – diarrhea: an emerging threat to pregnant women. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 198:635.e1 – 635.e6.
- Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, et al. 2005. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. Journal of Medical Microbiology. 54:113-117.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 7:726-36.
- Rupnik M. 2007. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease?. Clinical Microbiology and Infection. 13:457-459.
- Ryan KJ, Ray CG. 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 322–324. ISBN 0-8385-8529-9.
- Schroeder MS. 2005. *Clostridium difficile* – associated diarrhea. American Family Physician. 71:921-928.
- Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, Wehland J, Aktories K. 2009. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathogens. e1000626.
- Sekulovic O, Garneau RJ, Néron A, Fortier LC. 2014. Characterization of temperate phages infecting *Clostridium difficile* isolates of human and animal origins. Applied and Environmental Microbiology. 80:2555-2563.
- Silva CM, Salvino CR. 2003. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções por *Clostridium difficile*. RBAC. 35:65-71.
- Silva R. 2011. Detecção das toxinas A/B e avaliação dos tipos toxigênicos de *Clostridium difficile* a partir de fezes de leitões e cães. Tese de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

- Simango C, Mwakurudza S. 2008, *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. International Journal of Food Microbiology. 124:268-270.
- Songer JG, 2004. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. Animals Health Research Reviews. 5:321-326.
- Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. 2009. *Clostridium difficile* in Retail Meat Products, USA, 2007. Emerging Infectious Diseases. 15:819-821.
- Stabler RA, Dawson LF, Phua LT, Wren BW. 2008. Comparative analysis of BI/NAP1/027 hypervirulent strains reveals novel toxin B - encoding gene (tcdB) sequences. Journal of Medical Microbiology. 57:771-775.
- Stelzmueller I, Goegele H, Biebl M, Wiesmayr, Berger N, Tabarelli W, Ruttman E, Albright J, Margreiter R, Fille M, Bonatti H. 2007. *Clostridium difficile* in solid organ transplantation - a single center experience. Digestive Diseases and Sciences. 52(11):3231-3236.
- Struble AL, Tang YJ, Kass PH, Gumerlock PH, Madewell BR, Silva Jr J. 2006. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 6:342-347.
- Sunenshine RH, McDonald LC. 2006. *Clostridium difficile*-associated disease: New challenges from an established pathogen. Cleveland Clinic Journal of Medicine. 73:187-197.
- Vaz AJ, Takei K. 2007. Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações. Guanabara Koogan, 1 ed., <http://www.biomedicinapadrao.com/2012/06/imunocromatografia.html>
- Viana HL. 2013. *Clostridium difficile*: infecção e ribotipos. GE Jornal Português de Gastreenterologia. 20:240-242.
- Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. 1981. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. Gastroenterology. 81:5-9.
- Von Abercron SM, Karlsson F, Wigh GT, Wierup M, Krovacek K. 2009. Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. Journal of Food

Protection. 72(8):1732-1734.

- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366(9491):1079-1084.
- Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ. 2009. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* in retail beef and pork. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:5009-5011.
- Weese JS, Henri R, Staempfli, John F, Prescott. 2000. Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12:449–452.
- Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. 2010. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. 50:362-365.
- Weese JS, Rousseau J, Arroyo L. 2005. Bacteriological evaluation of comercial canine and feline raw diets. *Canadian Veterinary Journal*. 46:513-516.
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18: 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB et al. 2001. Frequency of antibiotics-associated diarrhea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47:43-50.
- Yaeger M, N Funk, L Hoffman. 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 14:281-287.

- Yaeger ML, Kinyon JM, Songer JG. 2007. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19:52-59.
- Yam FK, Smith KM. 2005. “Collateral damage”: antibiotics and the risk of *Clostridium difficile* infection. *Orthopedics*. 28:275-279.
- Zerey M, Paton BL, Lincourt AE, Gersin KS, Kercher KW, Heniford BT. 2007. The burden of *Clostridium difficile* in surgical patients in the United States. *Surgical Infections (Larchmt)*. 8(6):557-566.
- Zidaric V, Rupnik M. 2012. *Clostridium difficile* in meat products, eggs and vegetables in Slovenia. Institute for Public Health Maribor, Slovenia.
- Zidaric V, Zemljic M, Janezic S, Kocuvan A, Rupnik M. 2008. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe*. 14:325-327.



## ANEXO

Tabela 9 – Sessenta amostras de carne de vaca, novilho, vitela e bovino foram analisadas. Foram adquiridas 16 amostras em grandes superfícies (hipermercados e supermercados), 13 amostras no Porto e 3 em Lisboa. No comércio tradicional foram adquiridas 44 amostras, 25 no Porto e 19 em Lisboa.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Carne de vaca picada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Carne de vaca picada	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Carne de vaca picada	JUMBO - Arrábida	Vila Nova de Gaia	HIPER/SUP
Carne de vaca picada	Pingo Doce	Gondomar	HIPER/SUP
Carne de vaca picada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Carne de vaca picada	Supermercado Biguana	Mindelo - Vila do Conde	SUPERMERCADO
Carne de vaca picada	Pingo Doce	Amial - Porto	HIPER/SUP
Preparado de carne picada bovino	Continente (marca: Continente)	Vila do Conde	HIPER/SUP
Carne de Vitela	Pingo Doce	Porto	HIPER/SUP
Carne picada de Novilho	JUMBO	Vila Nova de Gaia	HIPER/SUP
Carne picada de novilho	Supermercado Froiz	Porto	SUPERMERCADO
Carne picada de novilho	Froiz	Porto	SUPER/HIPER
Carne de novilho picada	Froiz	Porto	SUPER/HIPER
Carne picada de novilho	INTERMARCHÉ	Porto Salvo	SUPER/HIPER
Carne picada Novilho	JUMBO	Alfragide	SUPER/HIPER
Carne picada Vitela	PINGO DOCE Venda Nova	Amadora	SUPER/HIPER
Carne de vaca picada	Super Talho da Praia	Mindelo	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho Pereira	Mindelo	Tradicional

Tabela 9 (continuação)

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Carne de vaca picada	Talho Central Miradouro	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho da Giesta	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho Alegria	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho do Monte	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho Vieira	Boavista - Porto	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho "O Barroso"	Amial - Porto	Tradicional
Carne de vaca picada	Carnes Meireles	Gondomar	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho Central	Gondomar	Tradicional
Carne de vaca picada	Carnes Rendeira	Maia	Tradicional
Carne de vaca picada	Talho da Estação	Rio Tinto - Gondomar	Tradicional
Carne picada de novilho	Talhos Carlos Pinto	Porto	Tradicional
Carne de novilho picada	Talhos Boavista	Porto	Tradicional
Carne picada de novilho	INTERMARCHÉ	Vila Nova de Gaia	Tradicional
Carne picada de novilho	Talhos Regal	Vila Nova de Gaia	Tradicional
Carne picada de novilho	Talhos Carnes Sá da Bandeira	Vila Nova de Gaia	Tradicional
carne picada do dia Novilho	Talhos Pessegueiro	Porto	Tradicional
Carne de novilho de 2ª categoria	Talhos Beira Alta	Matosinhos	Tradicional
Bife da perna	Talhos da Boavista	Porto	Tradicional
Carne picada	Talhos Carnes Casal	Vila Nova de Gaia	Tradicional
Carne picada	Talhos Carnes Meireles	Maia	Tradicional
Carne picada	Talhos Multicarnes de Gueifães	Maia	Tradicional
Carne picada	Talho Novo do Forno	Rio Tinto - Gondomar	Tradicional
Carne picada	Talho da Quinta	Rio Tinto - Gondomar	Tradicional

Tabela 9 (continuação)

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Carne de vaca picada	Talho Luso Francês	Lisboa	Tradicional
Carne de vaca picada	Talhos Lino & Vicente	Lisboa	Tradicional
Carne picada de bovino	Talhos do Júlio	Lisboa	Tradicional
Carne picada de novilho nacional	Talhos MAXISANTOS	Lisboa	Tradicional
Carne picada de novilho	Vitor & Vitor	Lisboa	Tradicional
Carne picada de vaca	Espaço da Carne	Almada	Tradicional
Carne picada de novilho	Talho Terminus da Carne	Algés	Tradicional
Carne picada	Talho Truques Especiais nas Carnes, Lda	Queluz	Tradicional
Carne picada de novilho	Talho Majestade da Amadora	Amadora	Tradicional
Carne picada de novilho	Talho Monumental	Amadora	Tradicional
Carne picada de novilho	Talho do Túnel	Cacém	Tradicional
Carne picada de novilho	Talhos Extracarnes	Cacém	Tradicional
Carne picada de novilho	Mercado da Carne	Loures	Tradicional
Carne picada de novilho	Boutique da Carne Gourmet da Flamenga	Flamenga	Tradicional
Carne picada de novilho	Talho Central	P. Stº Adrião	Tradicional
Carne picada de novilho	Talhos MAXISANTOS	Odivelas	Tradicional
Bife da Pá Dianteiro de novilho	Mercado da Carne	Loures	Tradicional
Carne de novilho Dianteiro comprido	Boutique da Carne Gourmet da Flamenga	Flamenga	Tradicional
Carne picada de novilho	Talho Carlos	Lisboa	Tradicional

Tabela 10 – Foram analisadas 20 amostras de carne de porco adquiridas no Porto. Oito foram adquiridas em grandes superfícies (hipermercados e supermercados) e 12 no comércio tradicional.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Carne de porco picada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Carne de porco picada	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Carne de porco picada	JUMBO - Arrábida	Vila Nova de Gaia	HIPER/SUP
Carne de porco picada	Pingo Doce	Gondomar	HIPER/SUP
Carne de porco picada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Carne de porco picada	Supermercado Biguana	Mindelo	SUPERMERCADO
Carne de porco picada	Pingo Doce	Amial - Porto	HIPER/SUP
Preparado de carne picada porco	Continente (marca: Continente)	Vila do Conde	HIPER/SUP
Carne de porco picada	Super Talho da Praia	Mindelo	Tradicional
Carne de porco picada	Talho Pereira	Mindelo	Tradicional
Carne de porco picada	Talho Central Miradouro	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de porco picada	Talho da Giesta	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de porco picada	Talho Alegre	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de porco picada	Talho do Monte	Valbom - Gondomar	Tradicional
Carne de porco picada	Talho Vieira	Boavista - Porto	Tradicional
Carne de porco picada	Talho "O Barroso"	Amial - Porto	Tradicional
Carne de porco picada	Carnes Meireles	Gondomar	Tradicional
Carne de porco picada	Talho Central	Gondomar	Tradicional
Carne de porco picada	Carnes Rendeira	Maia	Tradicional
Carne de porco picada	Talho da Estação	Rio Tinto - Gondomar	Tradicional

Tabela 11 – Foram analisadas 24 amostras de carne de frango, provenientes de várias partes do frango. Todas foram adquiridas na zona do grande Porto, 7 foram adquiridas em grandes superfícies (hipermercados e supermercados) e 17 no comércio tradicional.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Moelas frango embaladas	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Aparas de frango	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Aparas de frango	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Aparas de frango	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Fricasse de frango (cloaca)	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Fricasse de frango (coxa)	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Fricasse de frango (sobrecoxa)	Continente	Valbom - Gondomar	HIPER/SUP
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Hamburger de frango	Continente	Porto	Tradicional
Hamburger de frango	Continente	Porto	Tradicional
Hamburger de frango	Continente	Porto	Tradicional
Hamburger de frango	Continente	Porto	Tradicional
Hamburger de frango	Continente	Porto	Tradicional
Aparas de frango (pescoço)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (asas)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional
Aparas de frango (cloaca)	Cantina escolar	Porto	Tradicional

Tabela 12 – Vários tipos de enchidos tradicionais foram analisados, num total de 39 amostras. Foram adquiridos em supermercados na zona do grande Porto: 12 alheiras, 6 salsichas frescas, 3 chouriços tradicionais, 3 paios, 3 morcelas, 3 presuntos, 1 pá fumada, 1 fiambre fatiado, 5 enchidos crioulos, 1 linguiça e 1 moura.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Alheira	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Salsicha fresca embalada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Salsicha fresca embalada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Salsicha fresca embalada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Salsicha fresca embalada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Salsicha fresca embalada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Salsicha fresca embalada	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Chouriço de carne tradicional	Continente	Vila do Conde	SUPERMERCADO
Chouriço de carne tradicional	Continente	Vila do Conde	SUPERMERCADO
Chouriço Moura	Continente	Vila do Conde	SUPERMERCADO
Paio	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Paio	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Paio	Continente	Porto	SUPERMERCADO

Tabela 12 (continuação)

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Morceia	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Morceia de arroz	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Morceia de arroz	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Presunto	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Presunto	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Presunto	Supermercado Froiz	Porto - Campus de S. João	SUPERMERCADO
Pá fumada	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Fiambre fatiado	Continente	Vila do Conde	SUPERMERCADO
Enchido crioulo	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Enchido crioulo	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Enchido crioulo	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Enchido crioulo	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Enchido crioulo	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Enchido crioulo	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Linguiça do Alvão	Continente	Porto	SUPERMERCADO
Moura do Alvão	Continente	Porto	SUPERMERCADO

Tabela 13 – Duas amostras de moluscos bivalves foram analisadas, adquiridas na zona do Porto, uma com 2 dias de depuração e outra sem depuração.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Local de compra</b>	<b>Cidade</b>	<b>Tipo de estabelecimento</b>
Molusco (berbigão com 2 dias de depuração)	Depuradora	Vila do Conde	Tradicional
Molusco (berbigão não depurado)	Depuradora	Vila do Conde	Tradicional