

Artículo original

Pesquisa de *Clostridium difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada na região do Distrito Federal – Brasil

André Ricardo Lucas Martins^{a,*}, Margarete Medeiros^b, Virgílio Hipólito Lemos de Castro^b, Simone Percemanis^b, Dirce Yorika Kabuki^c, Ângela Patrícia Santana^b

^aLaboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasil. ^bFaculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), Brasil. ^cUniversidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Brasil.

Recibido 1 de abril de 2019; aceptado 25 de noviembre de 2019

Resumo: *Clostridium difficile* é uma bactéria gram-positiva anaeróbica formadora de esporos que causa doença em seres humanos e animais, principalmente aqueles submetidos à antibioticoterapia. Embora as pesquisas com o *C. difficile* sejam crescentes, as formas de transmissões ainda não são muito claras. No entanto, muitos autores associam essa bactéria como a principal causa de contaminação alimentar. Este trabalho teve como objetivo fazer o isolamento de culturas de *C. difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada na região do Distrito Federal, bem como a detecção dessa bactéria por meio da reação em cadeia de polimerase. Foram analisadas 82 amostras, não sendo feito o isolamento da cultura deste microrganismo em nenhuma delas. Entretanto, em 6 (7,3%) amostras a presença de *C. difficile* foi detectada por PCR. Embora não tenha sido possível o isolamento pelo cultivo do *C. difficile* nesta pesquisa, a técnica de PCR mostrou-se uma ferramenta eficaz quanto à detecção desse microrganismo. Por se tratar de um estudo pioneiro realizado no Distrito Federal e região, mais estudos devem ser realizados a fim de aprimorar técnicas de isolamento do *C. difficile* em alimentos, considerando a importância desse microrganismo para a saúde pública.

Palavras-Chave: *Clostridium difficile*; doenças transmitidas por alimentos; segurança alimentar.

Investigación de *Clostridium difficile* en carne bovina homogeneizada comercializada en la región del Distrito Federal – Brasil

Resumen: *C. difficile* es una bacteria grampositiva, anaerobia, formadora de esporas que causa enfermedades en seres humanos y animales, principalmente aquellos sometidos a antibioticoterapia. Si bien las investigaciones sobre *C. difficile* han aumentado, su forma de transmisión permanece incierta. Sin embargo, muchos autores la señalan como la principal causa de contaminación de los alimentos. El objetivo de este trabajo fue aislar *C. difficile* de carne bovina homogeneizada comercializada en la región del Distrito Federal y detectarla por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. En 82 muestras analizadas, no se obtuvo aislamiento microbiológico por cultivo. Sin embargo, en 6 muestras (7,3%) se detectó *C. difficile* por PCR. Aunque en esta investigación no se obtuvo el aislamiento en cultivo de *C. difficile*, la técnica de PCR demostró ser una herramienta eficaz para la detección de este microrganismo. Debido a que este es un estudio pionero en la región del Distrito Federal, es necesario realizar más investigaciones a fin de mejorar las técnicas de aislamiento de *C. difficile* en alimentos, debido a la importancia de este microrganismo para la salud pública.

Palabras clave: *Clostridium difficile*; enfermedades transmitidas por alimentos; inocuidad alimentaria.

Detection of *Clostridium difficile* in homogenized bovine meat marketed in the Federal District region of Brazil

Abstract: *C. difficile* is a grampositive, anaerobic, spore forming bacterium that causes disease in humans and animals, mainly those undergoing antibiotherapy. While research on *C. difficile* has increased, its form of transmission remains uncertain. However, many authors point out as the main cause food contamination. The objective of this work was to isolate *C. difficile* from homogenized beef meat commercialized in the Federal District region of Brazil by culture and by means of the polymerase chain reaction technique. In 82 samples analyzed, no isolates were obtained by culture. However, *C. difficile* was detected by PCR in 6 samples (7.3%). Although in this

investigation the isolation in culture of *C. difficile* was not attained, the PCR technique proved to be an effective tool for detection of this microorganism. Because this is a pioneer study in the Federal District region, more research is needed to improve the isolation techniques of *C. difficile* in food, due to the importance of this microorganism for public health.

Keywords: *Clostridium difficile*; foodborne disease; food safety.

* Correspondencia:

E-mail: andrerlm@gmail.com

Introdução

Clostridium difficile é uma bactéria anaeróbia formadora de esporos, Gram-positiva, que causa doença em seres humanos e animais. Os sintomas vão desde a colonização assintomática, diarreia e colite, podendo ser fatal [1]. A doença causada pelo microorganismo tem sido tradicionalmente considerada como uma infecção nosocomial em seres humanos, especialmente nos pacientes que receberam terapia antimicrobiana prolongada [2–4].

A incidência de doenças associadas à *C. difficile* tem aumentado ao longo da última década. Essa bactéria tem sido encontrada em produtos cárneos, intestinos de humanos e animais, podendo ser ainda transmitida pelo contato de indivíduos e animais infectados, ou pelo consumo de alimentos contaminados [5,6]. Adicionalmente, o Centro de Controle de Doenças (Center for Diseases Control, CDC) y la Administración de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA) listou *C. difficile* como uma das três ameaças urgentes em seu recente relatório sobre os agentes patogênicos emergentes com resistência aos antibióticos.

Atualmente o *C. difficile* é considerado um patógeno emergente e responsável pela maioria dos casos de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em seres humanos. Há fortes indícios de que esse microorganismo tem sido transmitido ao homem por meio de produtos de origem animal como: bovinos, suínos e aves. Apesar disso, são insatisfatórias as evidências as quais correlacionam a transmissão desse micro organismo ao homem por meio de alimentos contaminados.

Os alimentos de origem animal, especificamente a carne, pela sua composição rica em nutrientes e sua elevada atividade de água, são bastante susceptíveis à deterioração microbiana [7]. A carne é um excelente meio de cultura para desenvolvimento de microrganismos e frequentemente está envolvida na disseminação de agentes patogênicos causadores de enfermidades ao homem e a outros animais [7].

Segundo dados da associação brasileira das indústrias exportadoras de carnes, em 2015, o Brasil foi o maior produtor mundial de carne bovina com uma produção de 9,56 milhões de toneladas, de um total de 39,16 milhões de cabeças abatidas. O Brasil tem o segundo maior consumo de carne no mundo, atrás dos Estados Unidos, e terceiro colocado no ranking de consumo per capita (38,6 kg/hab/ano) ficando atrás da Austrália (88,3 kg/hab/ano) e Argentina (64,6 kg/hab/ano). A venda de carne no varejo do mercado brasileiro movimentou R\$176,36 bilhões, enquanto que as

exportações chegaram a R\$19,49 bilhões.

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

Materiais e métodos

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

Isolamento microbiológico nas amostras de carne bovina homogeneizada: A metodologia de isolamento microbiológico utilizada foi a descrita por Mooyottu *et al.* [8] em que 50 g de cada amostra de carne bovina homogeneizada foram pesadas individualmente em sacos plásticos estéreis e adicionado de 50 mL de caldo *Clostridium difficile* moxalactan-norfloxacin (CDMN), perfazendo a proporção 1:1. A composição do caldo CDMN foi: peptona 40 g/L, fosfato dissódico 5 g/L, fosfato de potássio 1 g/L, sulfato de magnésio 0,1 g/L, cloreto de sódio 2,0 g/L, frutose 6 g/L, cisteína 0,5 g/L, taurocolato de sódio 1 g/L, adicionados de moxalactam 16 mg/L e norfloxacin 6 mg/L, suplementado com taurocolato de sódio a 0,1% [9-11].

Em seguida, a mistura (carne homogeneizada e caldo CDMN) foi colocada por 1 min em homogeneizador de amostras digital tipo Stomacher - SL 299 - (Solab®). Finalizado o processo de homogeneização, uma alíquota (1,0 mL) deste caldo foi coletada e congelada à -85 °C

para futura extração de DNA. Outra alíquota (1,0 mL) da mesma mistura foi semeado em ágar CDMN e incubado, juntamente com o restante da mistura homogeneizada, a 37 °C durante 48 h em câmara de anaerobiose (Anaerobic Systems® da ThermoScientific®) com mistura especial de gases contendo 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂.

Após incubação da mistura do caldo CDMN com a carne homogeneizada, em câmara de anaerobiose à 37 °C por 48 h, foram coletadas duas alíquotas de um mililitro (1,0 mL) cada. Em seguida, uma das alíquotas foi congelada à -85 °C para posterior extração de DNA e a outra alíquota foi submetida a tratamento pela adição de 1,0 mL de etanol anidro 95% PA ACS® (Vetec) por uma hora, visando à eliminação das células vegetativas. Após esse tratamento, o produto foi submetido à centrifugação a 4000 ×g durante 10 min em microcentrífuga de bancada NT 800 (Novatecnica®), e o sobrenadante, gerado após o procedimento, foi descartado conforme protocolo descrito por Mooyottu *et al.* [8] e o sedimento foi ressuspenso em 500 µL de solução tampão fosfato (PBS) e semeadas em placas de Petri contendo ágar CDMN. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37 °C durante 48 h.

Colônias com suspeita de serem de *C. difficile*, as quais se apresentavam com coloração acinzentada ou branca, opacas, achatadas ou pouco convexas, rizoides ou circulares e de tamanho variando de 2-5 mm [12], foram semeadas em ágar base da marca Acumedia® contendo 7% de sangue de equino desfibrinado, e incubadas anaerobicamente a 37 °C durante 48 h. A identificação final do microrganismo foi feita baseando-se no crescimento em ágar CDMN, coloração de Gram e características da colônia [8].

Detecção de C. difficile pela PCR: A detecção do *C. difficile* por PCR foi realizada em cada etapa do cultivo microbiológico. O objetivo foi à detecção da presença do microrganismo nas amostras de carne homogeneizadas analisadas e, a possível detecção em cada etapa do isolamento microbiológico. O gene escolhido para a detecção da espécie por PCR foi o triose phosphate isomerase (*TPI*), um gene de manutenção específica da espécie, cujas sequências de *primers* são: *tpi-F (forward)* 5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3' e *tpi-R (reverse)* 5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3'. Os genes foram deduzidos a partir de alinhamentos de fragmentos internos do gene da *TPI* que gerou um de 230 pares de bases fragmento amplificado, específico de *C. difficile* [11].

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

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

proporções de 25:24:1, conforme protocolo descrito por outros autores [13]. Foram submetidos à PCR os caldos que foram submetidos à extração de DNA total, bem como as colônias que apresentaram características suspeitas de *C. difficile* (coloração acinzentada ou branca, opacas, chatas ou pouco convexas, rizoides ou circulares e de tamanho variando de 2-5 mm).

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µL, os quais eram compostos por: 1,25 mM MgCl₂, 2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse*, 1,0 U Taq DNA polymerase (Invitrogen®), 2,5 µL de tampão PCR 10X, e como template foram utilizados os produtos da PCR, com aproximadamente 10 ng/µL de concentração para as misturas antes e depois da incubação em anaerobiose, e PCR de colônias com características de *C. difficile*.

As reações de ampliação da PCR foram realizadas em termociclador (Mycycler Thermalcycler™, Bio Rad®) com um ciclo inicial de 95 °C por 2 min, seguida por 29 ciclos de: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, finalizando com 1 ciclo de 72 °C por 5 min. Ao término da amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, com brometo de etídio a 3 µg/mL, conforme protocolo descrito por Tschia [13]. As imagens foram capturadas através de equipamento sob luz ultravioleta (Major Scienc®). Conforme Lemee *et al.* [11], a expectativa era de ser encontrados produtos com 230 pares de bases. Cepas de *C. difficile* utilizadas como controle positivo neste estudo foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Dirce Yorika Kabuki do Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Resultados e discussão

Isolamento microbiológico de C. difficile em amostras de carne homogeneizada comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno: Não foram isoladas cepas de *C. difficile* em nenhuma das 82 amostras de carnes bovina homogeneizadas comercializadas no Distrito Federal e Entorno. Esse resultado se assemelha aos obtidos por Knight *et al.* [12], em que os autores não isolaram nenhuma cepa de *C. difficile* em 151 amostras de carcaças bovina analisadas, oriundas de abatedouros frigoríficos da Austrália.

De acordo com Tschia [13], foi realizada uma pesquisa de *C. difficile* em amostras de carnes resfriadas, sendo carne bovina moída, coxão mole (*Semimembranosus*), lombo suíno (*Longissimus dorsi*) e peito de frango, adquiridas de estabelecimentos comerciais do município de Campinas, em São Paulo. Os resultados globais obtidos pelos autores foram de 11,5% de presença de *C. difficile*, sendo desta forma diferente aos obtidos neste estudo. Uma das diferenças na metodologia descrita por Tschia [13] em relação a este trabalho, foi o tempo de incubação (carne homogeneizada e caldo CDMN 1:10) de 10 dias na primeira incubação, e posteriormente 48h no plaqueamento da amostra em ágar CDMN.

De acordo com Harvey *et al.* [14] analisaram 40 amostras de retalhos diversos de carnes de supermercados no Texas (Estados Unidos), em que foi detectado *C. difficile* em tres amostras (7,5%) as quais eram carne de porco e peru moída, e chouriço de porco. Esfardiari *et al.* e Weese *et al.* também isolaram *C. difficile* em 12% das amostras de carne bovinas homogeneizadas obtidas de mercados nas regiões de British Columbia, Saskatchewan, Ontário e Quebec, no Canadá [9,15].

O insucesso dos achados quanto ao isolamento microbiológico do *C. difficile* pode ter sido influenciado também por dois motivos: pela metodologia escolhida no emprego desse estudo e também pelo fato das amostras utilizadas advirem de estabelecimentos com selo de SIF, do DIPOVA ou pelo SIE de Goiás.

A metodologia utilizada para a execução dessa pesquisa foi baseada nos estudos de vários pesquisadores [8,11,15]. Entretanto, na metodologia empregada por Esfardiari *et al.* [9], no isolamento de *C. difficile* em carnes, observa-se que os autores utilizaram um período de incubação maior do que o utilizado neste trabalho que foi de 48h, sendo que na primeira incubação (após homogeneização da carne homogeneizada com o caldo CDMN) as amostras foram incubadas durante sete dias a 37 °C em anaerobiose. Da mesma forma, alguns autores realizaram a incubação num intervalo entre 10 e 15 dias sob condições de anaerobiose a 37 °C. Assim, pode ser que o tempo de 48h de incubação, utilizados neste estudo, tenha sido insuficiente para o desenvolvimento do microrganismo no meio de cultivo empregado [16].

Ainda em referência ao isolamento do cultivo microbiológico do *C. difficile*, admitido por Gould e Libago [1] eles defendem que as diferentes metodologias de cultivo podem contribuir para as variações das prevalências de *C. difficile* em diferentes estudos de carne de varejo. Atualmente não há trabalhos publicados que relatam a metodologia de eleição para detecção de *C. difficile* em alimentos [1]. Na inexistência de um método padrão para detecção e isolamento desse microrganismo em alimentos, cada pesquisador utiliza meios seletivos e enriquecimentos diferenciados, que por sua vez pode contribuir para a não padronização do método. Essa situação pode ser justificada pelas características anaeróbias do microrganismo e relativa complexidade da metodologia empregada em seu isolamento e detecção [13].

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

Pesquisa de C. difficile pela PCR: Das 82 amostras analisadas, 6 (7,3%) apresentaram a presença de *C. difficile*, sendo que estas seis amostras apresentaram reações da PCR positivas no caldo (mistura da carne com o meio CDMN na proporção 1:1) obtido após a homogeneização e antes da primeira incubação em câmara de anaerobiose a 37 °C por 48h, bem como neste mesmo caldo, após a incubação. Esta identificação detecta a presença do microrganismo nas

amostras de carne homogeneizada bovina, comercializadas no Distrito Federal e entorno.

Embora não tenha sido possível realizar o isolamento de culturas, a PCR permitiu detectar a presença do *C. difficile*, sendo este o primeiro trabalho de detecção do microrganismo na região. Considerando a eficiência da PCR quanto à detecção do *C. difficile*, Rodríguez *et al.* [17] detectaram essa bactéria, por esse método, em 2,3% de amostras de carne de hambúrguer e carne moída obtidas no comercio varejista da Bélgica.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados por Espardiari *et al.* [9], em pesquisa realizada no Iran em que utilizaram a PCR para fazer a detecção do *C. difficile* em carne bovina e de carneiro homogeneizadas, com detecção de 2,1% e 6,2%, respectivamente.

Da mesma forma Lemee *et al.* [11] utilizaram a PCR para análise de 622 amostras de fezes de animais (equino, bovino, cães e gatos) com sintomatologia de infecção intestinal por *C. difficile*, em que foi detectada a presença dessa bactéria em 8% das amostras avaliadas.

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

Conforme Tschia [13], em estudo para detecção do *C. difficile* realizado em amostras adquiridas de 24 estabelecimentos comerciais, do município de Campinas-SP, detectou a presença da bactéria em 21,8% em amostras de carne bovina homogeneizada, 18% em carne de frango, 3,3% em carne bovina em peça e 0,0% em carne suína, sendo todas confirmadas pelo uso da técnica da PCR.

De acordo com Silva *et al.* [18] também utilizou na PCR para detectar a presença de estirpes de *C. difficile* isoladas no Brasil de cães (oito amostras), leitões (6), potros (5), bezerras (5) e jaguatirica (1). A técnica mostrou se satisfatória quanto à identificação do *C. difficile*.

Conclusão

Foi constatada a presença de *C. difficile* em carne bovina homogeneizada comercializada no Distrito Federal e região do Entorno por meio da técnica de PCR, sendo a primeira descrição na região. Não foi possível realizar o isolamento por cultura do *C. difficile* utilizando a metodologia preconizada nesse estudo. Melhores ferramentas de diagnóstico são cruciais para a detecção precoce de muitos patógenos veterinários, incluindo *C. difficile*. Os resultados demonstram a necessidade de mais estudos no referido assunto a fim de verificar a extensão deste microrganismo em carne bovina comercializada no Distrito Federal e Entorno, considerando a relevância dessa bactéria para a saúde pública.

Referências

1. Gould LH, Libago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: A new foodborne pathogen. Clin Infec Dis. 2010; 51:577-82.
2. Bartlett JG. *Clostridium difficile* infection:

- pathophysiology and diagnosis. *Semin Gastrointest Dis.* 1997; 8:12–21.
3. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:409–15. doi: 10.3201/eid1203.051064.
 4. Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:1554-80. doi: 10.3748/wjg.15.1554
 5. Jobstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Köfer J, Wagner M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *J Food Microbiol.* 2010; 31:172–5.
 6. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:526–36. doi: 10.1038/nrmicro2164.
 7. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasil. Portaria n°368, de 04/09/1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos. Disponible em: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra150035.pdf>. Acceso junio de 2019.
 8. Mooyottu S, Flock G, Kollanoor-Johny A, Upadhyaya I, Jayarao B, Venkitanarayanan K. Characterization of a multidrug resistant *C. difficile* meat isolate. *Int J Food Microbiol.* 2015; 192:111-6.
 9. Esfandiari Z, Weese S, Ezzatpanah H, Jalali M, Chamani M. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. *BMC Microbiol.* 2014; 14:283. doi: 10.1186/s12866-014-0283-6.
 10. Chai C, Lee K-S, Lee D, Lee S, Oh SW. Non-selective and selective enrichment media for the recovery of *Clostridium difficile* from chopped beef. *J Microbiol Methods.* 2015; 109:20-4.
 11. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, Pons JL. Multiplex PCR targeting *tpi* (Triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5710-4.
 12. Knight DR, Thean S, Putsathit P, Fenwick S, Riley TV. Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79:2630-5.
 13. Tsuchiya AC. Avaliação de Métodos e ocorrência de *Clostridium difficile* em Carnes. Dissertação de Mestrado. Disponible em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255444>. Acceso junio de 2019.
 14. Harvey RB, Norman KN, Andrews K, Norby B, Hume ME, Scanlan CM, Hardin MD, Scott HM. *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23: 807-11. doi: 10.1177/1040638711407893.
 15. Weese JS, Reid Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett Appl Microbiol.* 2010; 50:362-5.
 16. Rahimi E, Jalali M, Weese JS. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health.* 2014; 14:119. doi: 10.1186/1471-2458-14-119.
 17. Rodríguez C, Taminiau B, Avesani V, Van Broeck J, Delmée M, Daube G. Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. *Food Microbiol.* 2014; 42:166-71.
 18. Silva ROL, Guedes RMC, Gabardo PM, Junior CAO, Salvarani FM, Pires PS, et al. Standardization of a model of *Clostridium difficile* infection in Syrian hamsters *Mesocricetus auratus*. *Ciência Rural.* 2014; 44:1415-21.