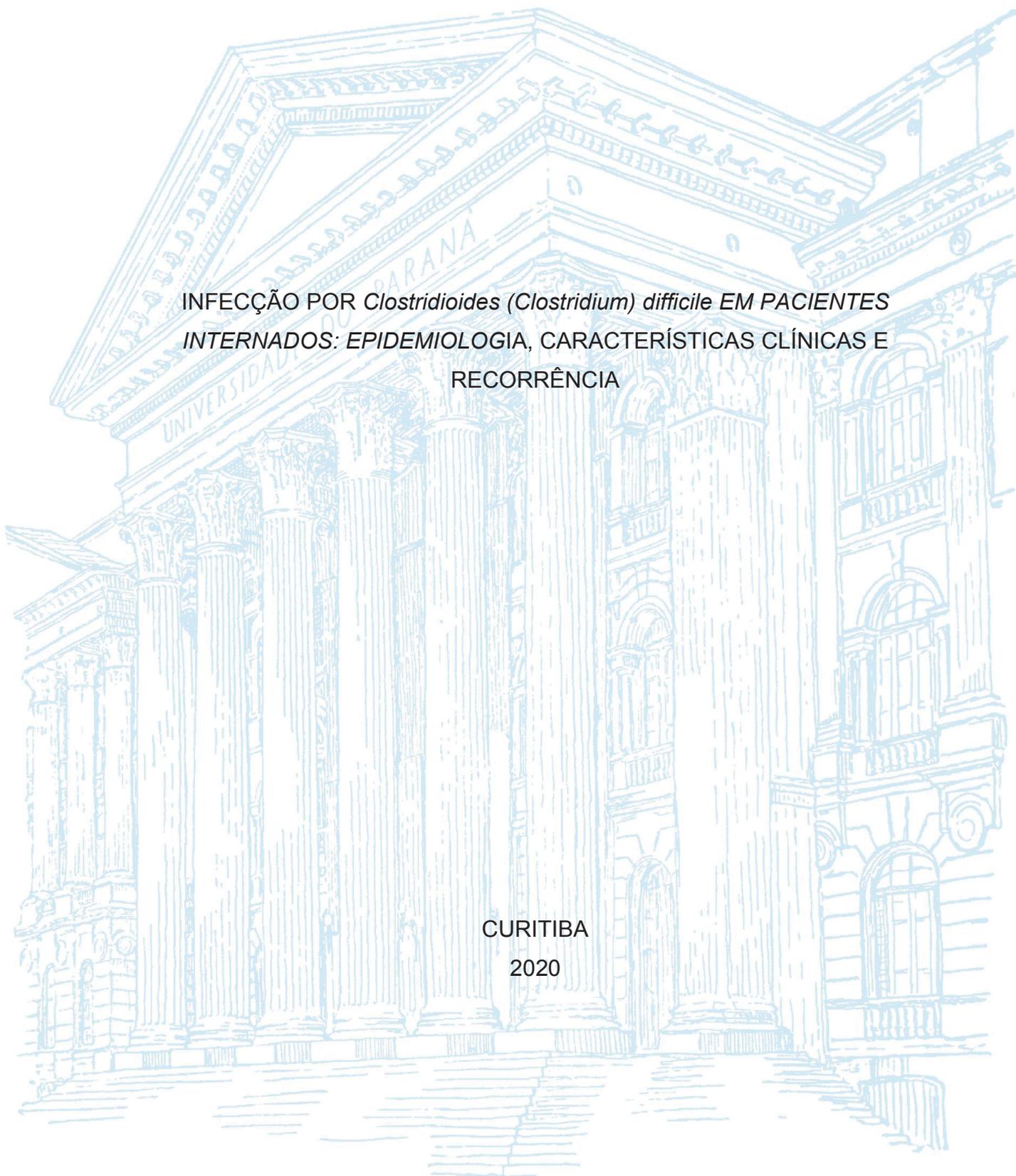


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANE CESCHIN MAESTRI

INFECÇÃO POR *Clostridioides (Clostridium) difficile* EM PACIENTES  
INTERNADOS: EPIDEMIOLOGIA, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E  
RECORRÊNCIA

CURITIBA  
2020



ADRIANE CESCHIN MAESTRI

INFECÇÃO POR *Clostridioides (Clostridium) difficile* EM PACIENTES  
INTERNADOS: EPIDEMIOLOGIA, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E  
RECORRÊNCIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Mara Raboni

Coorientadora: Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira

CURITIBA

2020

M186 Maestri, Adriane Ceschin  
Infecção por *Clostridioides (Clostridium) difficile* em pacientes internados: epidemiologia, características clínicas e recorrência [recurso eletrônico] / Adriane Ceschin Maestri. – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Mara Raboni

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keite da Silva Nogueira

1. Infecções por clostridium. 2. Epidemiologia.  
3. Recidiva. I. Raboni, Sonia Mara. II. Nogueira, Keite da Silva.  
III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLM: WC368



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ADRIANE CESCHIN MAESTRI** intitulada: **INFECÇÃO POR CLOSTRIDIÓIDES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE EM PACIENTES INTERNADOS: EPIDEMIOLOGIA, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RECORRÊNCIA**, sob orientação da Profa. Dra. SONIA MARA RABONI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

09/11/2020 13:44:04.0

SONIA MARA RABONI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

06/11/2020 23:04:59.0

ALESSANDRO CONRADO DE OLIVEIRA SILVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica

09/11/2020 12:44:35.0

ODERY RAMOS JUNIOR

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico aos meus pais Myrian e Ivan (in memoriam) que nunca mediram esforços em me proporcionar um ensino de qualidade.

Dedico ao meu esposo Carlos Afonso e aos meus filhos Vinícius, Thiago e Isabela.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, nenhuma força é maior do que aquela que vem Dele.

Aos pacientes, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao meu esposo Carlos Afonso obrigado pela paciência, por meu ouvir e pelo seu amor.

A minha orientadora Dra. Sonia Mara Raboni, agradeço a compreensão, pelos ensinamentos e por toda atenção e sugestões.

À minha coorientadora e companheira de bancada Dra. Keite da Silva Nogueira, pelos seus ensinamentos, que faz com maestria. Agradeço principalmente pela sua dedicação, e por tornar esse árduo caminho mais divertido.

Agradeço imensamente à Universidade Federal do Paraná por propiciar minha formação profissional.

Agradeço imensamente aos meus colegas do Setor de Bacteriologia da Unidade de Análises Clínicas do Complexo Hospital de Clínicas por toda ajuda e palavras de incentivo.

Agradeço à Dra. Laura Lúcia Cogo pela amizade, colaboração e sugestões.

Agradeço à Dilair Camargo de Souza e Ana Paula Tomaz pelas palavras de incentivo e pela troca de conhecimentos e amizade.

Agradeço à Marisa Viante Rossi, à Ester Ninomiya e à Adriana Pagnussat por toda ajuda e amizade.

Agradeço à Central de Preparação de Meios e Reagentes da ULAC por toda colaboração.

Agradeço à Gerente da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas, Dra. Marisol Dominguez Muro pela oportunidade e incentivo.

Agradeço à Alessandra Daur pelos fornecimentos de insumos e por sempre transmitir alegria.

Agradeço à amiga para toda vida Daniela Bertoncello de Oliveira pela torcida e palavras de incentivo que mesmo de longe estava tão presente.

Agradeço os infectologistas, enfermeiros e farmacêuticos da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) das instituições participantes que se empenharam neste projeto.

Agradeço imensamente à Fundação Araucária, Biometrix, Abbott Alere, Laborclin, Setor de Ciências Biológicas UFPR por todo apoio e confiança.

Agradeço o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pequeno Príncipe, especialmente Dra. Líbera Maria Dalla Costa, Érica Medeiros e Letícia Kraft pela atenção e parceria nas identificações bacterianas.

Ao Regimento da Polícia Montada “Coronel Dulcídeo” o meu muito obrigado por nos abrir as portas, especialmente ao Dr. Enio Granatto (médico veterinário), sempre tão solícito e gentil no auxílio das coletas de sangue.

Agradeço à Coordenação do Mestrado e todos os professores que ao longo desses dois anos de mestrado nos passaram seus conhecimentos e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da UFPR pela incansável ajuda e paciência.

Agradeço aos acadêmicos de Medicina da UFPR Leonardo Filippetto Ferrari e Gustavo Sarot pela ajuda e dedicação.

Aos funcionários do arquivo do Complexo do Hospital de Clínicas da UFPR o meu muito obrigada por todo o empenho e ajuda.

Por fim agradeço todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.

**Louis Pasteur**

## RESUMO

A infecção por *C. difficile* (ICD) representa a principal causa de diarreia associada a antibióticos (DAA) em adultos, e está intimamente relacionada ao aumento da mortalidade, hospitalização prolongada e aumento dos custos em saúde. O objetivo desse estudo foi avaliar a prevalência, características clínicas associadas e desfechos da ICD em hospitais de Curitiba. Foi instituído junto à comissão de controle de infecção e laboratório de microbiologia das 8 instituições participantes um protocolo de coleta de fezes e dados clínicos de pacientes internados apresentando diarreia após uso de antimicrobianos. As amostras foram avaliadas por testes imunoenzimáticos (EIE) e amplificação de ácidos nucleicos por PCR de acordo com algoritmos recomendado por diretrizes internacionais. Os dados clínicos foram coletados em ficha específica, compreendendo fatores de risco locais associados a infecção, tratamento e evolução da diarreia. Foram incluídos no estudo 351 pacientes adultos ( $\geq 18$  anos), dos quais 85 (24,2%) apresentaram teste GDH positivo. Entre essas amostras, 62 amostras foram positivas para toxinas (26 foram positivas por EIE e PCR e 36 amostras foram positivas apenas na PCR) assim sendo 289 amostras (82,3%) negativas para ICD. A prevalência de ICD nesta coorte de pacientes internados com DAA foi de 17,7% (62/351). Foram fatores de risco independentes para ICD a colonização por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenêmicos, uso de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos. Diarreia grave foi apresentada por 64,5% dos pacientes com ICD, 8% evoluindo para colite com necessidade de terapia intensiva. Obteve-se a cura primária em 83,8% (52/62) e dos pacientes que foram acompanhados 20,8% (10/48) apresentaram recorrência da infecção. Não houve associação entre o tratamento usado para ICD e a recorrência ou mortalidade. A mortalidade avaliada em 30 dias correspondeu em 24% (15/62) dos casos positivos, sendo 4,8% (3/62) relacionadas diretamente a ICD. Os dados relatados neste estudo demonstram uma alta frequência de ICD em pacientes hospitalizados de alto risco, com impacto na mortalidade destes indivíduos. Ampla investigação desta infecção deve ser realizada buscando a implantação de medidas de controle e intervenção precoce neste grave evento.

Palavras-chave: *Clostridioides difficile*, colite pseudomembranosa, infecção por *Clostridioides difficile* (ICD), infecção recorrente por *Clostridioides difficile* (rICD).

## ABSTRACT

*C. difficile* infection (CDI) is the leading cause of antibiotic-associated diarrhea (AAD) in adults, and is closely related to increased mortality, prolonged hospitalization, and high health care costs. The objectives of this study were to evaluate the prevalence, associated clinical characteristics, and outcomes of CDI in hospitals in Curitiba. A protocol of stool collection and clinical data of inpatients with diarrhea after the use of antimicrobials was instituted with the infection control commission and microbiology laboratory of the 8 participating institutions. The samples were evaluated by immunoenzymatic tests (IEE) and nucleic acid amplification by PCR according to algorithms recommended by international guidelines. Clinical data were collected in a specific file, comprising local risk factors associated with infection, treatment, and outcome. The study included 351 adult patients ( $\geq 18$  years), of which 85 (24.2%) were GDH positive. Among these samples, 62 samples were positive for toxins (26 by EIA and PCR and 36 samples were positive by PCR only), thus 289 samples (82.3%) were negative for CDI. The prevalence of CDI in this cohort of AAD patients was 17.7% (62/351). Independent risk factors for DCI were colonization by Gram-negative carbapenem-resistant bacilli, the use of broad-spectrum cephalosporins, and carbapenems. Severe diarrhea was presented by 64.5% of patients with CDI, 8% evolving to colitis requiring intensive care. The primary cure was obtained in 83.8% (52/62) and among patients who were followed up, 20.8% (10/48) presented recurrence of infection. There was no association between recurrence and mortality rate in 60 days, independent of the treatment. The 30-day mortality corresponded to 24% (15/62) of the positive cases, being 4.8% (3/62) related to CDI. The study reports a great frequency of CDI in high-risk hospitalized patients, with an impact on the mortality rate. A broad investigation of this infection should be carried out seeking the implementation of control measures and early intervention in this severe event.

Keywords: *Clostridioides difficile*, pseudomembranous colitis, *Clostridioides difficile* infection (CDI), recurrent *Clostridioides difficile* infection (rCDI).

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISPOSIÇÃO DOS GENES DO LOCUS DE PATOGENICIDADE DE <i>C. difficile</i> E AS ESTRUTURAS DE DOMÍNIO DE PROTEÍNAS DE TcdA e TcdB .....	22
FIGURA 2 – MECANISMOS DE AÇÃO TOXINAS A E B NAS CÉLULAS EPITELIAIS COLÔNICAS .....	25
FIGURA 3 – MECANISMO DE AÇÃO TOXINA BINÁRIA DE <i>C. difficile</i> NAS CELULAS EPITELIAIS COLÔNICAS.....	26
FIGURA 4 – PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> .....	28
FIGURA 5 – FISIOPATOGENIA DA ICD .....	29
FIGURA 6 – O EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL E O RISCO DE INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> (ICD).....	32
FIGURA 7 – PREVALÊNCIA DA ICD NO BRASIL.....	40
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DOS RIBOTIPOS (RT) E TIPOS DE SEQUÊNCIA (ST) DE <i>C. difficile</i> EM HUMANOS RELATADOS NOS ESTADOS BRASILEIROS .....	42
FIGURA 9 – ALGORITMOS PARA O DIAGNÓSTICO DE ICD .....	52
FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS HOSPITAIS PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	54
FIGURA 11 – TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE GDH E TOXINAS .....	57
FIGURA 12 – SISTEMA GENEXPERT PARA A DETECÇÃO DE TOXINAS <i>C. difficile</i> .....	58
FIGURA 13 – RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS .....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DAS INSTITUIÇÕES, PACIENTES INCLUÍDOS E TAXAS DA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> .....	60
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO DE ACORDO COM A INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> .....	62
TABELA 3 – ANÁLISE MULTIVARIADA DOS FATORES ASSOCIADOS A ICD .....	64
TABELA 4 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS NO DIA DA COLETA DA AMOSTRA .....	65
TABELA 5 – RESULTADO DO TRATAMENTO PARA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i> .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AGC	Colégio Americano de Gastroenterologia
ATCC	American Type Culture Collection
BAK	Ágar brucela suplementado com vitamina K 5% de sangue de cavalo
CCEY	Ágar cicloserina cefoxitina gema de ovo
CCFA	Ágar cicloserina cefoxitina frutose
CCNA	Ensaio de neutralização de toxicidade
CD	<i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CDT	<i>C. difficile</i> transferase ou toxina binária
<i>cdt A</i>	Gene da toxina binária sub unidade A
Cdt A	Subunidade A da toxina binária
<i>cdt B</i>	Gene da toxina binária sub unidade B
Cdt B	Subunidade B da toxina binária
Cdt locus	Local onde se encontra os genes que codificam a toxina binária
CPM	Colite pseudomembranosa
CROP	Domínio oligopeptídico de repetição combinada das toxinas A e B
CT	Cultura toxigênica
DAA	Diarreia associada ao uso de antimicrobiano
DACD	Diarreia associada ao <i>C. difficile</i>
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
EIE	Ensaio imunoenzimático
ESCMID	Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas
FDA	Food and Drug Administration
GDH	Glutamato desidrogenase
GI	Trato gastrointestinal
IBP	Inibidor de bomba de prótons
ICD	Infecção por <i>C. difficile</i>
IDSA	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
LRS	Receptor de lipoproteínas estimulado por lipólise
MALDI-TOF	Espectrometria de massa de tempo de voo por dessorção/ionização à laser assistido por matriz
MLST	Multilocus sequencing typing

NAAT	Teste de amplificação de ácidos nucleicos
NTCD	<i>C. difficile</i> não toxigênico
PALOC	Locus de patogenicidade do <i>C. difficile</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVRL3	Receptor tipo poliovírus 3
qPCR	PCR em tempo real
Rho GTP	Proteínas envolvidas na formação actínica do citoesqueleto das células
rICD	Recorrência da infecção por <i>C. difficile</i>
RPM	Rotações por minutos
RT	Ribotipo
SHEA	Sociedade Americana de Epidemiologia em Saúde
ST	Tipo de sequência
<i>tcd A</i>	Gene da toxina A
Tcd A	Toxina A
<i>tcdB</i>	Gene da toxina B
Tcd B	Toxina B
<i>tcdC</i>	Gene regulador negativo da expressão de toxina
<i>tcdD</i>	Gene regulador positivo da expressão de toxina
<i>tcdE</i>	Gene que codifica uma proteína importante no processo de entrada das toxinas nas células do epitélio colônico
TMF	Transplante de Microbiota Fecal

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

™ - Marca comercial

µg - Microgramas

µl - Microlitros

U/µl- Unidades por microlitros

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
1.1	JUSTIFICATIVA	19
1.2	OBJETIVOS	20
1.2.1	Objetivo geral	20
1.2.2	Objetivos específicos	20
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
2.1	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	21
2.2	TOXINAS	22
2.3	PATOGÊNESE	26
2.4	FATORES DE RISCO	30
2.5	TRANSMISSÃO E PREVENÇÃO	33
2.5.1	TRANSMISSÃO	33
2.5.2	PREVENÇÃO	34
2.6	EPIDEMIOLOGIA	36
2.7	TRATAMENTO	43
2.7.1	Tratamento com Antibióticos	43
2.7.2	Tratamento Cirúrgico	44
2.7.3	Novas Terapias para ICD	45
2.7.3.1	Imunológicos	45
2.7.3.2	Neutralização dos antibióticos no trato gastrointestinal	45
2.7.3.3	Terapias baseadas em recuperação da microbiota intestinal	46
2.7.3.4	Bioterapia	47
2.8	DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i>	48
2.8.1	CCNA (Ensaio Neutralização de Citotoxicidade) e CT (Cultura Toxigênica)	48
2.8.2	GDH (glutamato desidrogenase)	50
2.8.3	Pesquisa de toxinas	51
2.8.3.1	EIE (ensaios imunoenzimáticos)	51
2.8.3.2	NAAT (testes de amplificação de ácidos nucleicos)	51
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	53
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	53
3.2	PERÍODO DO ESTUDO	53

3.3	LOCAL DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	53
3.4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	54
3.5	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E CONFIGURAÇÃO DE DADOS .....	55
3.6	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO .....	55
3.7	DEFINIÇÕES .....	56
3.8	COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	56
3.9	PESQUISA DE ENZIMA GDH E DE TOXINAS A E B DE <i>C. difficile</i> NAS FEZES POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO .....	57
3.10	DETECÇÃO DOS GENES DAS TOXINAS DE <i>C. difficile</i> NAS FEZES POR PCR .....	57
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>
	<b>APÊNDICE 1 – ARTIGO PUBLICADO</b> .....	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE 3 – FICHA PARA INCLUSÃO NO ESTUDO</b> .....	<b>89</b>
	<b>APÊNDICE 4 – DADOS CLÍNICOS</b> .....	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE 5 – ORIENTAÇÕES SOBRE O ESTUDO</b> .....	<b>94</b>
	<b>ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>95</b>
	<b>ANEXO 2 – PROJETO FINANCIADO PELA FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA</b> ..	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de antibióticos nas últimas décadas fez com que o *Clostridioides (Clostridium) difficile* surgisse como a principal causa de diarreia associada a antimicrobianos e uma das infecções mais frequentes nos serviços de saúde (MAGILL et al., 2014). Em 1978, quando descrito como agente etiológico da colite pseudomembranosa, a sua patogenicidade foi reconhecida (BARTLET et al, 1978). Desde então, houve um aumento na prevalência e morbidade destas infecções gerando diversos estudos sobre epidemiologia e patogênese da infecção por *C. difficile* (ICD).

O principal fator de virulência do micro-organismo é a produção de toxinas por estirpes que abrigam um *locus* de patogenicidade (PaLoc), onde estão os genes das toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB* - toxina *C. difficile* A e B), a regulação destas toxinas está diretamente relacionada à gravidade das infecções, variando de diarreia leve até enterocolite fulminante com megacólon tóxico e perfuração do cólon (MARTIN-VERSTRAETE; PELTIER; DUPUY, 2016). Além do uso de antibióticos, a contaminação ambiental são fatores de risco para a ICD, enquanto a idade avançada está diretamente relacionada ao risco e gravidade da infecção (BURNHAM; CARROLL, 2013). No início dos anos 2000, houve importante mudança na ICD, principalmente na América do Norte, Europa, Austrália e muitos países asiáticos, devido a emergência de uma cepa hipervirulenta e epidêmica de rápida disseminação mundial, que está associada a altas taxas de transmissão, aumentando significativamente a incidência e a gravidade dessa infecção, principalmente nos idosos (McDONALD et al., 2005; CLEMENTS et al., 2010).

Atualmente estudos mostram alta mortalidade relacionada à infecção, incidência de casos complicados e frequência de ICD recorrente (20 a 30% dos pacientes), sendo que alguns pacientes fazem várias recorrências, tornam-se dependentes do uso de antibióticos com impacto na qualidade de vida (CHILTON; PICKERING; FREEMAN, et al. 2018).

Estudos estimam que *C. difficile* infecta milhões de pacientes americanos e europeus a cada ano. Nestes países existem protocolos de prevenção e controle da ICD sendo obrigatório a notificação dos casos detectados (ECDC 2013; LESSA et al, 2015). Nos países em desenvolvimento, os estudos epidemiológicos são limitados e estima-se que 15% dos casos de diarreia são atribuíveis a ICD (CURCIO et al.,

2019). No Brasil, poucos dados estão disponíveis sobre a epidemiologia, frequência e recorrência de ICD em pacientes hospitalizados (TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019). Este é o primeiro estudo envolvendo várias instituições do sul do Brasil, onde foram avaliados pacientes com diarreia associada a antimicrobianos e correlacionou-se a presença de ICD com os achados clínicos, cura sustentada e recorrência em uma coorte de pacientes hospitalizados. Além disso, os dados relatados devem estimular os hospitais brasileiros a reconhecer a necessidade da implantação de práticas apropriadas de controle desta infecção.

### 1.1 JUSTIFICATIVA

A ICD é uma doença com ampla disseminação mundial, sendo relatada por muitos autores como a mais frequente infecção nosocomial em suas instituições. Outro problema relevante é o diagnóstico, o qual nem sempre é disponível nas instituições, pois o diagnóstico adequado e precoce é essencial para correta terapia, redução da mortalidade, do tempo de internação, dos custos do tratamento e da disseminação desse micro-organismo no ambiente hospitalar.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção por *Clostridioides difficile* em pacientes internados com diarreia associada a antimicrobianos em um grupo de instituições da cidade de Curitiba, sul do Brasil.

### 1.2.2 Objetivos específicos

a. Determinar a frequência de infecção por *C. difficile* em diarreias hospitalares em pacientes atendidos no Complexo do Hospital de Clínicas da UFPR e nas instituições coparticipantes.

b. Reconhecer os fatores de risco associados a infecção por esse micro-organismo na população estudada.

c. Avaliar a evolução, recorrência e desfecho das infecções por *C. difficile*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

*C. difficile* é um bacilo Gram positivo, anaeróbio esporulado, que pode produzir toxinas. Foi isolado pela primeira vez em 1935 por Hall e O'Tolle, quando estes analisavam a alteração da microbiota de recém-nascidos lactentes, e que devido à dificuldade no seu isolamento, foi denominado de *Bacillus difficilis* (HALL; O'TOOLE, 1935). Em 1938, Prévot reclassificou *B. difficilis* dentro do gênero *Clostridium* e, recentemente, sua nomenclatura foi modificada para um novo gênero baseado na análise de seu genoma, passando então a ser nominado como *Clostridioides difficile* (CD) (LAWSON et al., 2016).

A princípio pensava-se que o *C. difficile* não fosse patogênico aos seres humanos, e que não estava relacionado à diarreia devido ao uso de antibióticos (DAA). Porém na década de 70, a clindamicina passou a ser extensivamente usada para o tratamento de infecções anaeróbias e, concomitantemente apareceram os primeiros indícios de que seu uso estava associado à colite pseudomembranosa (CPM) (TEDESCO; BARTON; ALPERS, 1974). Estudos posteriores mostraram que determinados antibióticos estavam relacionados a uma maior susceptibilidade à infecção, pela alteração na microbiota bacteriana intestinal e o *C. difficile* foi descrito como agente etiológico da colite pseudomembranosa (GEORGE et al., 1978; LARSON et al., 1978; BARTLETT et al., 1978).

CD pode ser encontrado na forma vegetativa, que é sensível ao oxigênio e na forma de esporos, que são resistentes ao calor, acidez gástrica, antibióticos e a muitos antissépticos utilizados em hospitais, fazendo com que esse micro-organismo consiga sobreviver em condições adversas por longos períodos de tempo, facilitando a sua disseminação no meio ambiente, permitindo tanto a transmissão hospitalar como a comunitária. Eles são transmitidos através da rota fecal-oral, podendo colonizar o trato intestinal de animais e seres humanos, sendo também encontrados no solo (LEFFLER; LAMONT, 2015).

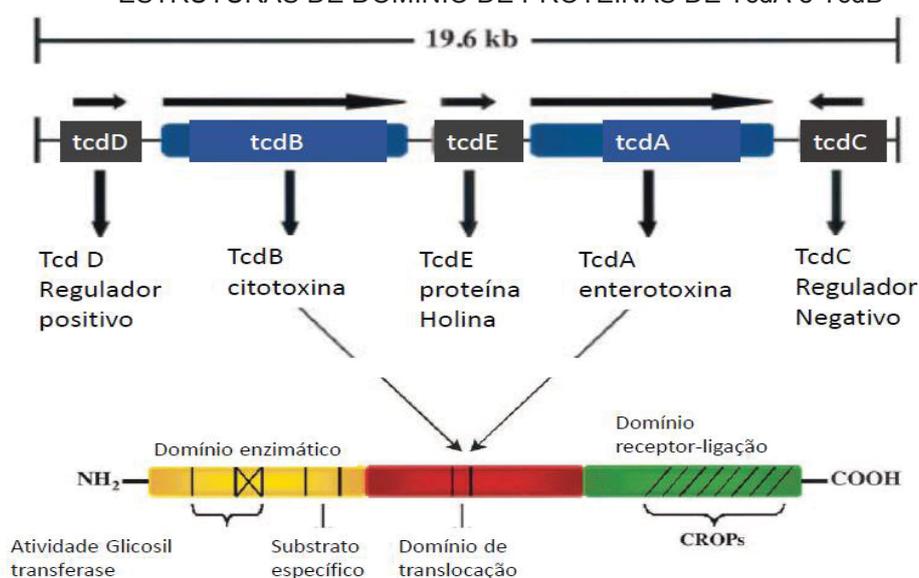
As taxas de colonização por *C. difficile* são elevadas (25% - 30%) em bebês e crianças saudáveis até 1 ano de idade, enquanto em adultos saudáveis fica em torno de 2% a 4% (NAGY, 2018). A colonização pode ser impedida pelas propriedades da microbiota fecal que funciona como uma barreira (BURKE;

LAMONT 2014; ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016). Em adultos, taxas mais elevadas, entre 20 a 30%, são vistas em populações de alto risco, como os pacientes hospitalizados (GATEAU et al, 2018), nos quais o uso prévio de antimicrobianos e infecção anterior (ICD) são preditores de colonização nessas populações (LEFFLER; LAMONT, 2015; KHANAFER et al., 2017).

## 2.2 TOXINAS

Estirpes patogênicas de *C. difficile* abrigam um *locus* de patogenicidade (PaLoc), onde estão os genes das toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB* - toxina de *C. difficile* A e B) e três genes adicionais (*tcdC*, *tcdD*, *tcdE*). O gene *tcdE* fica entre os genes *tcdA* e *tcdB* e codifica uma proteína importante no processo de entrada das toxinas A e B na célula (VOTH; BALLARD, 2005). A montante do gene *tcdB* encontra-se o gene *tcdD* que é um regulador positivo da expressão de *tcdA* e *tcdB*. A jusante de *tcdA* está o gene *tcdC* um regulador negativo da expressão de toxina durante a fase de crescimento (FIGURA 1). Nas cepas não toxigênicas o PaLoc é substituído por 115 pb (pares de base) altamente conservados (VOTH; BALLARD, 2005).

FIGURA 1– DISPOSIÇÃO DOS GENES DO LOCUS DE PATOGENICIDADE DE *C. difficile* E AS ESTRUTURAS DE DOMÍNIO DE PROTEÍNAS DE TcdA e TcdB



FONTE: Adaptado de VOTH; BALLARD (2005).

A maioria das cepas produzem as duas toxinas (A e B), a toxina A (enterotoxina) que danifica o epitélio intestinal resultando em intensa inflamação, enquanto a toxina B é descrita como uma citotoxina (BURNHAM; CARROLL, 2013). Apesar de apresentarem grande tamanho, atuam no citoplasma da célula hospedeira após se ligarem a receptores específicos fazendo com que sejam endocitadas (VOTH; BALLARD, 2005). O domínio oligopeptídico de repetição combinada (CROP) da toxina A (TcdA) se liga a um carboidrato na superfície apical das células epiteliais, enquanto o da toxina B (TcdB) se liga a um receptor tipo poliovírus 3 (PVRL3) expresso em cada célula do epitélio colônico. Depois da translocação das toxinas para o citoplasma ocorre a acidificação do endossoma, permitindo desta maneira que o domínio CROP seja incorporado na membrana endossômica, se tornando uma potente glicosiltransferase (ABT; McKENNEY; PAMER, 2016), que irá promover a glicosilação de resíduo de treonina das proteínas da família de GTPases (Rho, Rac e Cdc42) levando a apoptose celular (BURKE; LAMONT, 2014).

Estas GTPases estão envolvidas na regulação e formação da actina citoesquelética das células do epitélio intestinal. Com a glicosilação ocorre a despolimerização da actina, desorganizando e abrindo as junções responsáveis pela integridade celular, levando a célula à morte. Todo este cenário faz com que a cascata inflamatória do hospedeiro seja estimulada, exarcebando o dano no tecido epitelial, causando a diarreia e a colite pseudomembranosa FIGURA 2 (BURNHAM; CARROLL, 2013; BURKE; LAMONT, 2014; ABT; McKENNEY; PAMER, 2016).

Além das toxinas A e B, existe uma terceira toxina, chamada *C. difficile* transferase (CDT) ou toxina binária, que é considerada uma adjuvante na virulência de algumas cepas de *C. difficile*. O gene que codifica essa toxina não está no PaLoc, mas em outra região conhecida como Cdt locus (CdtLoc). A toxina binária é composta por duas subunidades, Cdt A e Cdt B, que se ligam ao receptor de lipoproteína estimulada por lipólise (LSR) e desta maneira são internalizados. A subunidade B (Cdt B) cria poros no endossomo acidificado, permitindo a liberação da subunidade CdtA no citosol, que se transforma em uma potente citotoxina, a ADP-ribosil-transferase (responsável por uma maior virulência). Esta enzima interfere na polimerização da rede de actina subjacente à membrana celular, através da ribosilação irreversível, promovendo o alongamento dos microtúbulos de fibronectina e se projetando através das microvilosidades. Essas alterações

aumentam a aderência do *C. difficile* ao epitélio gerando a alteração da forma, perda de fluidos e morte celular FIGURA 3 (ABT; McKENNEY; PAMER, 2016). A contribuição precisa dessa toxina na ICD ainda não está bem elucidada embora já tenha sido associada a um aumento da mortalidade (ABT; McKENNEY; PAMER, 2016; NAGY, 2018).

Alguns isolados clínicos de *C. difficile* que não expressam a toxina A tem sido raramente obtido, a partir de pacientes sintomáticos, enquanto as estirpes que não expressam a toxina B não têm sido relatadas. Ambos mutantes deficientes em toxinas A e B permanecem capazes de causar doença em hamsters, embora em ambos a doença se apresente atenuada em comparação com apresentada com o tipo selvagem (RODRIGUEZ. et al, 2016). Há relatos de desenvolvimento grave de ICD causado por TcdA - TcdB – CDT + (ANDROGA et al., 2015), apesar do papel da toxina CDT na ICD ainda ser controverso.

Na fase de crescimento estacionário, a transcrição de *tcdA* e *tcdB* é conduzida por *tcdD*, enquanto durante o crescimento exponencial, o *C. difficile* expressa níveis mais altos de *tcdC*, cuja função hipotética é atuar como um fator antissigma e, assim, suprimir a transcrição de *tcdA* e *tcdB* (ABT; McKENNEY; PAMER, 2016).

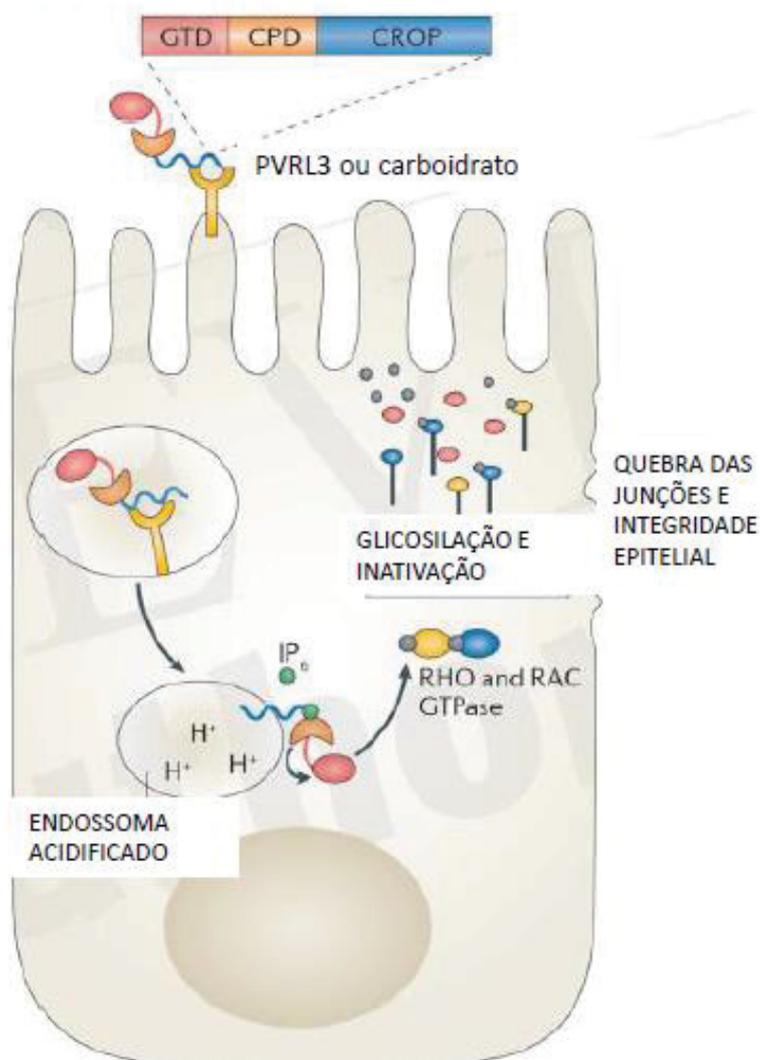
A hipervirulência tem sido associada a deleções na sequência do *tcdC*, o que apoia o papel potencial do *tcdC* na limitação da expressão de toxinas pelo *C. difficile* (MARTIN-VERSTRAETE; PELTIER.; DUPUY, 2016). Além das toxinas, outros importantes fatores de virulência contribuem para patogênese, incluindo fimbrias, adesinas, flagelo e cápsula. A formação de esporos permite a persistência do organismo em ambiente hospitalar e a resistência aos processos de descontaminação (BURNHAM; CARROLL, 2013).

Estudos que usam a tipagem por *multilocus sequencing typing* (MLST) e sequenciamento de genoma completo revelam que *C. difficile* pode ser dividido em cinco grupos genéticos (designados 1 a 5), com várias cepas em cada grupo. As cepas associadas a doenças mais graves e aumento da mortalidade têm sido chamadas de hipervirulentas. Exemplos destas cepas incluem o ribotipo 027 (toxotipo III, ST-1, BI / NAP1) e ribotipo 078 (ST-11) (BURNHAM; CARROLL, 2013). Cepas hipervirulentas estão envolvidas em surtos desde o início do século, o que pode variar com a localização geográfica. A hipervirulência é caracterizada pela alta resistência à fluoroquinolonas; esporulação eficiente (aumentada); altos níveis de

produção de toxinas (em torno de 20 vezes mais) relacionadas com as mutações no gene *tcdC* e a produção de toxina binária (BURNHAM; CARROLL, 2013); LEFFLER; LAMONT, 2015).

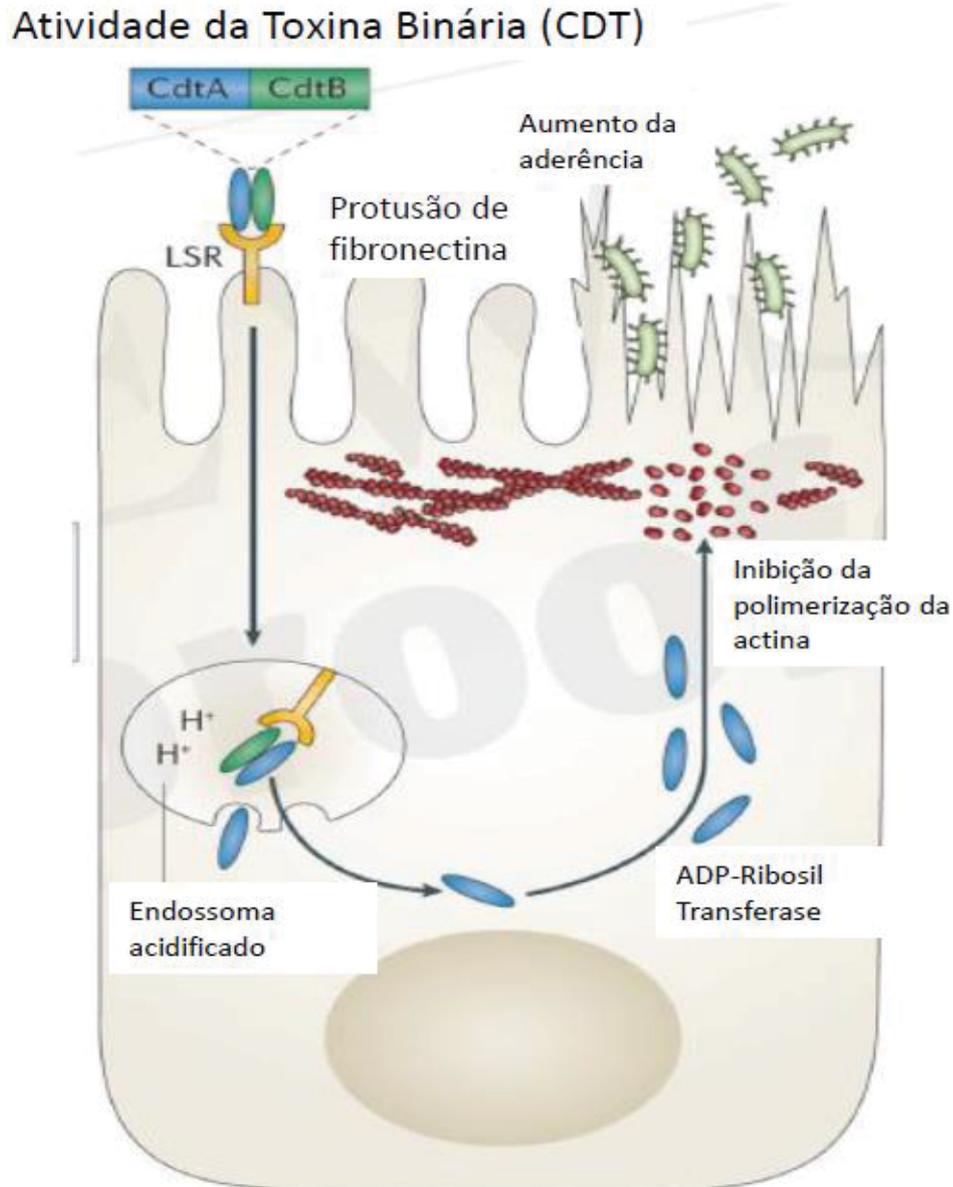
FIGURA 2– MECANISMO DE AÇÃO TOXINAS A E B NAS CÉLULAS EPITELIAIS COLÔNICAS

Atividade TcdA e TcdB



FONTE: Adaptado de ABT; MCKENNEY; PAMER (2016).

FIGURA 3 – MECANISMO DE AÇÃO TOXINA BINÁRIA DE *C. difficile* NAS CÉLULAS EPITELIAIS COLÔNICAS



FONTE: Adaptado de ABT; McKENNEY; PAMER (2016).

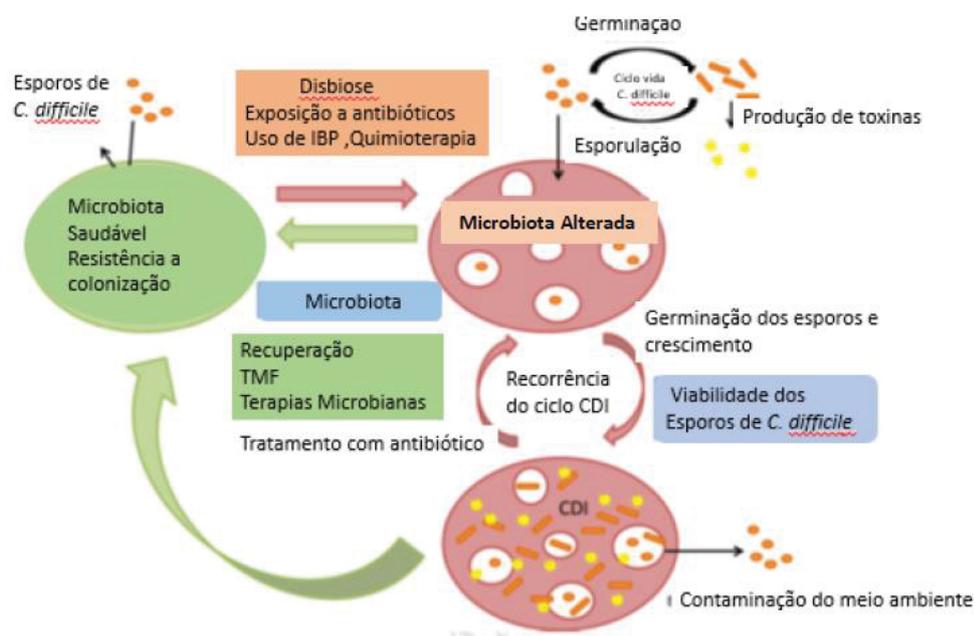
### 2.3 PATOGÊNESE

A regulação da síntese de toxinas é um dos fatores determinantes na patogênese, e autores mostram que o espectro da severidade da doença está correlacionado aos níveis de toxinas produzidas durante a infecção do hospedeiro (MARTIN-VERSTRAETE.; PELTIER.; DUPUY, 2016).

A infecção por *C. difficile* ocorre em estágios; inicialmente há a disbiose

(microbiota normal do cólon é modificada) e os esporos de origem exógena (da eventual transmissão fecal-oral) passam pelo estômago (McCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012). Estes, por serem resistentes ao pH estomacal, conseguem chegar no intestino, onde são expostos aos sais biliares primários (promotores da germinação destes esporos) sendo então convertidos à forma vegetativa (POUTANEN; SIMOR, 2004; ABT; McKENNEY; PAMER 2016). Em um segundo estágio, as células vegetativas se aderem na parede do cólon intestinal, se multiplicam colonizando-o, e, se estas forem toxigênicas, começam a secretar toxinas, causando as manifestações clínicas (POUTANEN; SIMOR, 2004; McCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012). Posteriormente, o *C. difficile* pode esporular no intestino, propiciando a disseminação dos esporos através das fezes diarreicas (CHILTON; PICKERING; FREEMAN, 2018), conforme apresentada na FIGURA 4.

Alguns quadros de diarreia podem evoluir para um quadro grave de enterocolite pseudomembranosa (BURKE; LAMONT, 2014). Nesses casos, a resposta imune do hospedeiro é ativada pelo dano que as toxinas causam no epitélio colônico, desencadeando a produção de fator de necrose tumoral alfa e interleucinas pró-inflamatórias. Com isso, os neutrófilos e monócitos são recrutados para o local, as toxinas interferem nos filamentos de actina, resultando na abertura entre as junções das células epitélio colônico e evoluindo para a apoptose celular (ABT; McKENNEY; PAMER 2016; RODRIGUEZ et al, 2016), como já comentado anteriormente. A perda dos filamentos de actina induz ao aparecimento de úlceras na superfície da mucosa colônica, sendo então rapidamente recobertas com muco, proteínas séricas e células inflamatórias. No local também ocorre a produção de enzimas hidrolíticas que atuarão na degradação do tecido conjuntivo, levando à colite, criando uma típica formação de pseudomembrana e diarreia aquosa, como mostrado na FIGURA 5 (POUTANEN; SIMOR, 2004).

FIGURA 4 – PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR *C. difficile*

FONTE: Adaptado de CHILTON; PICKERING; FREEMAN (2018).

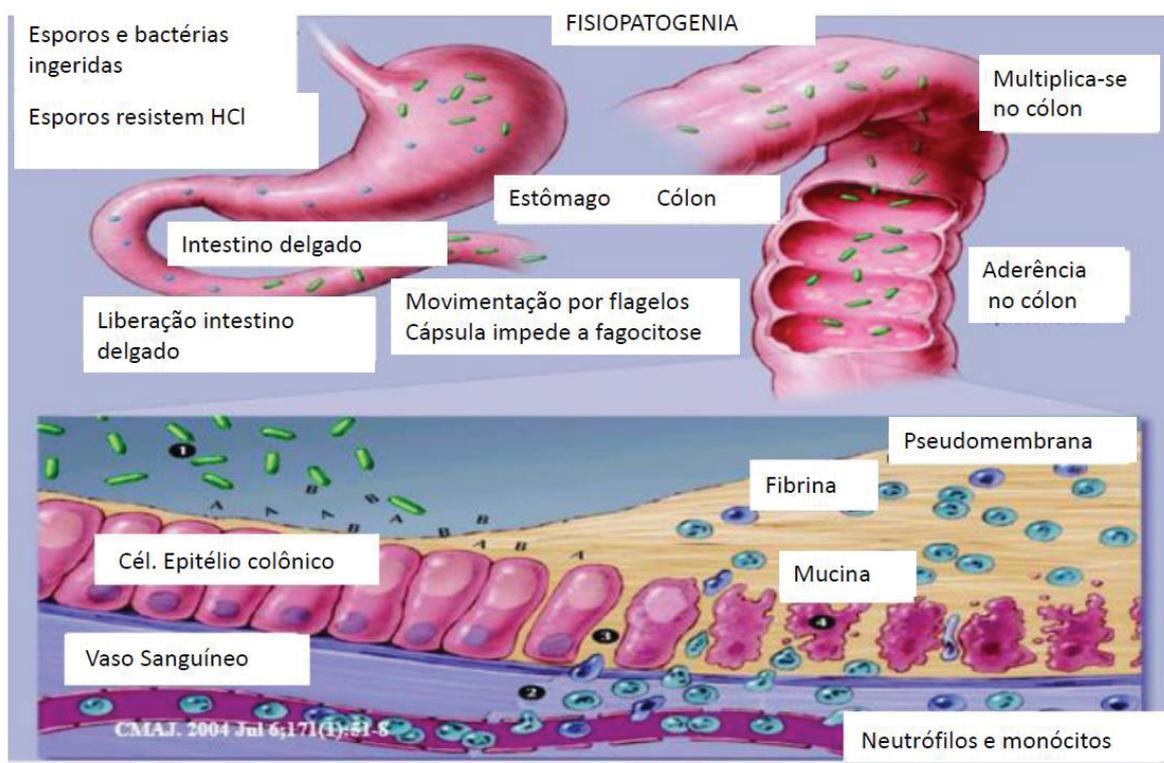
A apresentação clínica da ICD, pode variar dentro de um amplo espectro, que vai desde o estado de portador assintomático, diarreia leve, até diarreia severa, e complicações como enterocolite fulminante com megacólon tóxico e perfuração do cólon (OOIJEVAAR et al., 2018). Esta estratificação dos sintomas clínicos é importante porque vão refletir na escolha do tratamento. Certos fatores relacionados ao hospedeiro como a densidade de receptores nos colonócitos, níveis de anticorpos contra as toxinas e alteração da microbiota intestinal (BURNHAM; CARROLL, 2013), além da regulação da síntese de toxinas produzidas por *C. difficile* irão influenciar na intensidade da infecção e nos casos de recorrências (MARTIN-VERSTRAETE; PELTIER; DUPUY, 2016).

Diretrizes internacionais citam alguns achados clínicos em adultos que podemos utilizar como indicadores para a severidade da infecção, considerando-se uma doença grave quando a contagem de células brancas for  $> 15.000$  células/ml, temperatura ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ), aumento da creatinina (1,5 vezes o basal do paciente), níveis aumentado de proteína C-reativa, albumina sérica  $< 3$  g/dl, lactato sérico  $> 2.2$  mmol/l (SURAWICZ et al., 2013; McDONALD et al., 2018).

Em um grau leve podem ocorrer diarreia sem febre ou cólicas (sinais de colite), já na doença moderada, a diarreia ocorre com cólicas abdominais e febre, com a presença de leucocitose igual ou menor de 15.000 células/ml e creatinina sérica menor 1,5 mg/dl (McCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012; SURAWICZ et al., 2013; McDONALD et al., 2018).

Uma pequena porcentagem dos pacientes com ICD podem apresentar a forma fulminante, caracterizada por hipotensão, dor abdominal intensa e a diarreia abundante pode estar presente. Essa forma mais grave da doença pode evoluir rapidamente para íleo, megacólon tóxico, e até perfuração do cólon, que impedem o trânsito do conteúdo intestinal, explicando assim a falta de diarreia em alguns casos (SURAWICZ et al., 2013; McDONALD et al., 2018). Quando a enterocolite pseudomembranosa se faz presente além dos parâmetros acima citados, verifica-se também a presença de muco nas fezes (RODRIGUEZ. et al, 2016).

FIGURA 5 – FISIOPATOGENIA DA ICD



FONTE: Adaptado de POUTANEN; SIMOR (2004).

Os esporos são eliminados pelas fezes, sendo que alguns podem permanecer aderidos ao epitélio colônico, conseguindo escapar da resposta imune inata ou ainda

dos antibióticos específicos usados para tratamento da ICD, quando os antibióticos são suspensos e a microbiota intestinal ainda não se recuperou, os esporos que ficaram aderidos podem germinar fazendo a recorrência da infecção (rICD) (HERNÁNDEZ-ROCHA et al., 2012; CHILTON; PICKERING; FREEMAN, et al. 2018).

A recorrência da infecção primária (rICD), após a resolução inicial dos sintomas, pode variar de 20% a 30% nos adultos. Este percentual no risco vai aumentando para cada recorrência sucessiva e alguns pacientes podem apresentar múltiplas recorrências (CHILTON; PICKERING; FREEMAN, 2018; KHANNA; GERDING, 2019), impondo grande ônus econômico ao serviço de saúde, além de afetar a qualidade de vida, deixando os pacientes em um ciclo vicioso de rCDI e dependentes de antibioticoterapia (DESHPANDE et al., 2015; CHILTON; PICKERING; FREEMAN, et al. 2018). A recorrência clínica pode se dar com a mesma cepa, ou com uma nova cepa, neste caso sendo considerada uma reinfecção, o que pode ser difícil distinguir (BRADLEY et al, 2018).

Determinados ribotipos de CD estão associados com a recorrência e/ ou doença grave (FALCONE et al., 2018), no entanto, estudos apontam que principalmente aqueles pacientes mais suscetíveis à recorrência podem ter uma colonização mista de *C. difficile* (PETRELLA et al., 2012; SEEKATZ et al., 2018).

## 2.4 FATORES DE RISCO

A microbiota fornece uma barreira protetora ao intestino, um amplo grupo de antibióticos usados têm sido associados com ICD, porém alguns possuem um poder de risco maior na indução desta infecção, como as cefalosporinas, penicilinas, clindamicinas e fluoroquinolonas (LEFFLER; LAMONT, 2015). Os antibióticos fazem um enfraquecimento desta barreira, facilitando que o *C. difficile*, quando presente, supere as bactérias normais intestinais, prolifere e invada o epitélio colônico, o que constitui o principal fator de risco para a doença (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009) FIGURA 6.

O risco maior de desenvolvimento de ICD é durante a vigência da antibioticoterapia, contudo apesar de menor, pode ocorrer até 3 meses após o uso (SMITS et al., 2016; CZEPIEL et al., 2019).

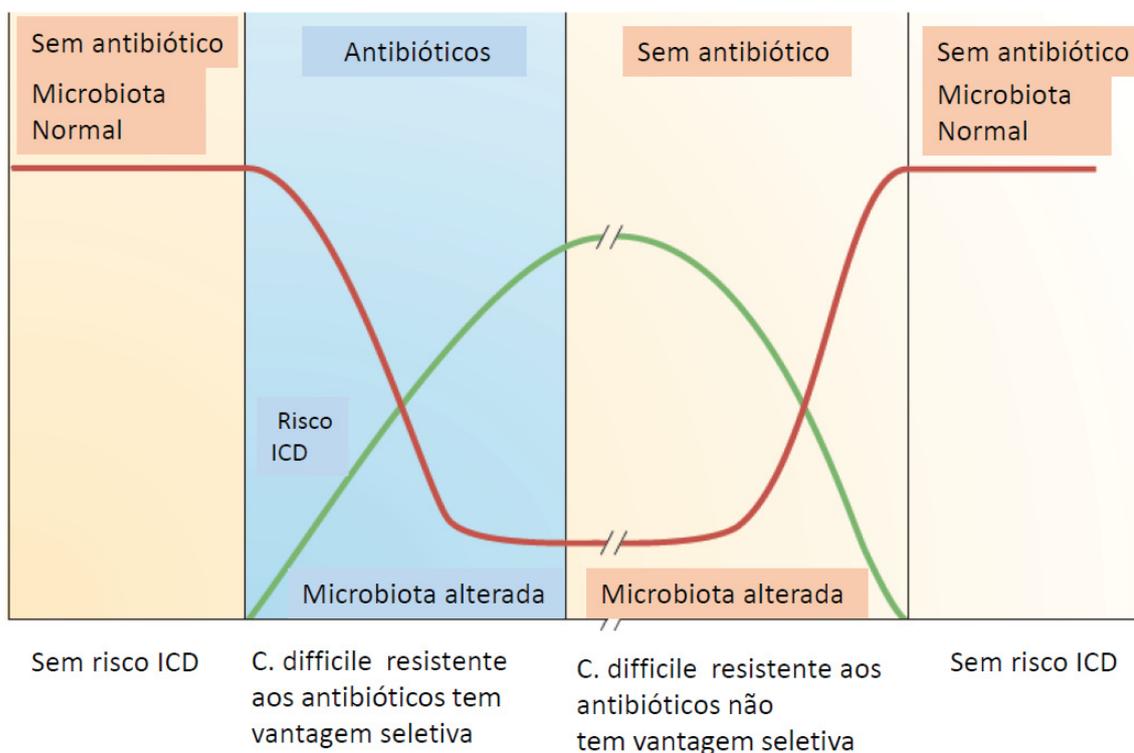
A população adulta está mais exposta ao *C. difficile* e apresenta mais comorbidades, o que torna as chances de infecção maiores apesar de compartilhar os mesmos riscos com a população infantil (McFARLAND et al., 2016).

A idade avançada, superior a 65 anos, além do uso antimicrobianos constituem um importante fator de risco (LEFFLER; LAMONT, 2015). Outros fatores são documentados como exposição a esporos de *C. difficile* de qualquer fonte, incluindo ambiente hospitalar, permanência em instituições de saúde, comorbidades, história prévia de ICD (KHANAFER, 2017; NAGY, 2018), cirurgia gastrointestinal, sondas de alimentação, imunodeficiência, quimioterapia, doença renal crônica e doença inflamatória intestinal (CZEPIEL et al., 2019), porém a ausência de fatores de risco não exclui a presença de infecção por *C. difficile*, visto que mudanças estão ocorrendo na população afetada, constata-se uma tendência no aumento na incidência da infecção em pacientes jovens, da comunidade e sem exposição prévia a antibióticos (BURNHAM; CARROLL, 2013). Autores especulam o fato de que alguns medicamentos usados habitualmente, possam estar contribuindo para a diminuição da diversidade do microbioma intestinal, justificando o fato da ICD estar crescendo nestas populações (MAIER et al., 2018).

Recentemente cirurgias abdominais e amputações dos membros inferiores foram relacionadas a um aumento no risco de ICD em comparação às demais cirurgias (DE ROO; REGENBOGEN, 2020).

O uso de inibidores da bomba de prótons (IBP) e risco de desenvolvimento de ICD é controverso. Vários estudos e metanálises encontraram uma associação significativa entre estes medicamentos e outros não confirmaram tais achados, pois quando estas análises foram ajustadas para outras comorbidades, o risco aumentado não foi verificado (CZEPIEL et al., 2019; DE ROO; REGENBOGEN, 2020).

FIGURA 6 – O EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL E O RISCO DE INFECÇÃO POR *C. difficile* (ICD)



FONTE: Adaptado de RUPNIK; WILCOX; GERDING (2009).

Estudo recente com o intuito de avaliar fatores de risco associado a ICD adquirida na comunidade, demonstrou que a associação se fez presente com o uso de amoxicilina/clavulanato, cefalosporina e clindamicina nas 12 semanas anteriores; com infecção prévia por *C. difficile* e com o aumento da frequência das consultas ambulatoriais (MIRANDA-KATZ et al., 2020).

Tromboembolismo venoso foi considerado como fator de risco para a recorrências de ICD em adultos (DE ROO; REGENBOGEN, 2020), os demais fatores anteriormente mencionados são mantidos para os casos de recorrências (LEFFLER; LAMONT, 2015; DESHPANDE et al. 2015; CZEPIEL et al., 2019).

## 2.5 TRANSMISSÃO E PREVENÇÃO

### 2.5.1 TRANSMISSÃO

A forma resistente de *C. difficile*, os esporos, estão altamente ligados a surtos, representando o principal veículo da infecção, pela persistência e transmissão da ICD. Eles são resistentes ao álcool e a vários desinfetantes rotineiros, permanecendo no ambiente por meses até anos, razão que leva a acreditar que no ambiente hospitalar são disseminados de paciente para paciente através de mãos contaminadas dos profissionais de saúde, equipamentos compartilhados e superfícies ambientais. Transmissão de portadores assintomáticos para sintomáticos também é evidenciada (CHITNIS et al, 2013; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; TURNER; ANDERSON, 2020). Artigos publicados entre os anos de 2007 a 2017 investigando possíveis vias de transmissão hospitalar ou fontes de aquisição de CD, concluiu que 53,3% foi devido a portadores sintomáticos, 40,0% do ambiente hospitalar e 20,0% de portadores assintomáticos (DUROVIC; WIDMER; TSCHUDIN-SUTTER, 2018).

É vasta a diversidade das cepas de CD que circulam em nosso meio, o desenvolvimento de métodos epidemiológicos moleculares (sequenciamento do genoma completo) nos permitiu reconhecer fontes potenciais de transmissão e além de mostrar a existência de um inter-relacionamento genético entre muitas destas cepas de *C. difficile* isoladas de humanos, animais, alimentos e meio ambiente contaminados. (LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; TURNER; SMITH; LEWIS, 2019).

Pacientes diagnosticados com ICD devem ser colocados em precauções de contato pela alta carga de esporos nas fezes que podem contaminar o ambiente. Esporos de CD também podem ser encontrado nas fezes de portadores colonizados assintomáticos, alguns estudos sugerem que estes pacientes devam ser colocados em precaução de contato para a redução da taxa de transmissão, porém outros estudos epidemiológicos moleculares revelam que a transmissão por estes portadores é muito pequena (TURNER; ANDERSON, 2020). Fora do ambiente hospitalar, na comunidade, a disseminação ocorre nas instalações de cuidados de saúde a longo prazo, como residência de idosos (MCDONALD et al., 2018; TURNER; SMITH; LEWIS, 2019). A transmissão doméstica pode acontecer com apenas um membro da família apresentando ICD recentemente. Os bebês também são vistos como potenciais reservatórios para os familiares, pois são altamente colonizados (TURNER; SMITH; LEWIS, 2019). Análises microbiológicas mostraram

que os esporos podem permanecer nas fezes até 6 por semanas após a cura (GATEAU et al, 2018).

Os reservatórios ambientais são contestáveis de fonte transmissão, apesar que já se tenha isolados CD de vários locais como águas (de rios, piscinas, residuais) parques, praias, solo, frutos do mar (salmão, camarão e mexilhões), legumes (alface, broto de ervilha, gengibre, cenoura, batatas e saladas). Alguns autores sugerem que a presença nestes nichos pode representar uma consequência da disseminação pelos portadores ou infectados (LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; TURNER; SMITH; LEWIS, 2019).

Descrições cada vez maiores de ocorrências de CD em animais de estimação, suínos, colonização em bovinos, alimentos e o ambiente contaminados geraram análises para caracterizar o potencial zoonótico como fonte de transmissão comunitária, observando uma correlação genética entre estes isolados e de humanos, que por algumas vezes se apresentam indistinguíveis. Podemos constatar que o ribotipo 078 que originalmente colonizava o gado agora tem sido associado a ICD adquirida na comunidade por humanos, estudo demonstra a mesma identidade de cepas de *C. difficile* 078 recuperados de suínos e seus criadores (KNETSCH et al., 2014; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019). Outra hipótese é que o uso indevido de certos antibióticos e outros suplementos alimentares (trealose) com a intenção de promover o crescimento animal parecem alavancar o aparecimento de certas características até então não presentes em determinadas linhagens. No ribotipo 078 (devido à inserção de genes) aprimorou metabolização da trealose o que facilitou o aparecimento em humanos, como também visto com a resistência a tetraciclina (por pressão seletiva) pelo seu uso na agricultura. Ribotipos de PCR 014/020 que são bem comuns em humanos foram encontrados associados a animais (DUROVIC; WIDMER; TSCHUDIN-SUTTER, 2018; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; TURNER; SMITH; LEWIS, 2019).

### 2.5.2 PREVENÇÃO

A chance de contrair ICD durante uma internação hospitalar é diretamente proporcional ao tempo de permanência, sendo assim os hospitais devem implantar um programa de vigilância para prevenir a infecção nosocomial. A prevenção é

multifatorial, algumas intervenções consideradas como pilares se fazem eficientes na redução da transmissão da ICD, entre estas estão a higiene rigorosa das mãos e a precaução de contato. Outras de considerável importância também têm sido citadas, como a limpeza eficaz do ambiente e administração adequada de antibióticos. A busca de portadores assintomáticos é desencorajada, porém quando este é reconhecido, medidas de controle da infecção devem ser tomadas (TAMMA; SANDORA 2012).

✓ Higiene das mãos

Fundamental para reduzir a transmissibilidade, uma vez que os esporos são altamente resistentes a desinfetantes e permanecem nas superfícies. Além disso podem estar presentes nas mãos dos profissionais que cuidam de pacientes com ICD. Desinfetantes a base de álcool também são ineficazes, mas a lavagem com água e sabão por 15 a 30 segundos faz a remoção física dos esporos (TAMMA; SANDORA, 2012; TURNER; ANDERSON, 2020).

Produtos para a higienização das mãos à base de álcool, são normalmente encontrado nos hospitais, e são eficientes na redução de bactérias resistentes. Este tipo de produto pode ser até aceitável para a higiene das mãos, além do uso de luvas, após cuidar de um paciente com CD, desde que não esteja ocorrendo um surto (DUBBERKE, 2012).

✓ Precauções de contato

Aliados à lavagem de mãos, o uso adequado de luvas e aventais no contato com pacientes suspeitos ou confirmados de ICD ajudam a diminuir a carga de esporos veiculados pelos profissionais de saúde (TAMMA; SANDORA 2012). Se possível os pacientes devem ser colocados em quartos individuais, se não, para diminuir a infecção nosocomial a opção de coorte por características de ICD é bem recebida. O período de duração da precaução de contato vai depender da incidência local da infecção, de acordo como o recomendado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) deve ser ao menos 48 horas após a resolução da diarreia, contudo nos locais de alta incidência o isolamento deve ser feito até a alta (TURNER; ANDERSON, 2020), visto que *C difficile* pode ser propagado por até 6 semanas após o tratamento (GATEAU et al., 2018).

✓ Desinfecção ambiental

Os esporos podem sobreviver nas superfícies por meses até anos, análises microbiológicas confirmam a presença do CD em superfícies altamente tocadas

como banheiros, pias e quartos de pacientes com infecção. A desinfecção deve ser feita com desinfetantes a base de cloro (hipoclorito de sódio) que é eficaz na morte dos esporos (DUBBERKE, 2012; TURNER; ANDERSON, 2020).

✓ Uso racional de antimicrobianos

Os programas para serem eficientes devem otimizar a escolha, o tempo e a duração da administração antimicrobiana, favorecendo o efeito pretendido com o mínimo de efeitos indesejáveis (risco para ICD e seleção de patógenos multirresistentes). A restrição de antibióticos reduz o risco de infecção, podendo reduzir as taxas de ICD em até 60%, como visto com a disseminação da cepa NAP1, quando se restringiu o uso de fluoroquinolona (DUBBERKE, 2012; TURNER; ANDERSON, 2020).

## 2.6 EPIDEMIOLOGIA

Um estudo realizado em 2011, nos EUA com pacientes internados descreveu *C. difficile* como o patógeno mais comum em infecções associadas à assistência à saúde, causando 12,1% destas infecções (MAGILL et al., 2014) e em recente revisão sistemática, *C. difficile* foi apontado como o principal agente infeccioso em diarreia associada à antibióticos (DAA) no mundo, representando 20% de todos os casos de DAA entre pacientes hospitalizados (NASIRI et al., 2018).

A incidência de ICD pode variar entre os pacientes internados, dependendo do ano e a localização geográfica analisada. Nos Estados Unidos, ICD é atualmente a infecção nosocomial mais frequente, tendo a taxa aumentada em torno de 4 vezes entre os anos de 1993 e 2009, estabilizando em 110 por 100.000 internações em 2009, podendo chegar a 1.000 casos por 100.000 internações entre os pacientes com 65 anos ou mais (BURKE; LAMONT, 2014).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estima que cerca de 1 em cada 5 pacientes apresentará recorrência da infecção, e que dentro de um mês após o diagnóstico, 1 em cada 11 pessoas com mais de 65 anos morrerá de uma infecção por *C. difficile* associados aos cuidados de saúde, fato que impõe grande ônus econômico, impactando diretamente nos custos aos sistemas de saúde, como relatado pelo CDC em 2008 que os custos diretos de tratamento intensivo da ICD nos EUA foram estimados em US\$ 4,8 bilhões. Com a implementação de programas de prevenção e vigilância, em 2017, o custo estimado

caiu para US\$ 1 bilhão, causando 223.900 casos de infecção em pacientes hospitalizados e, pelo menos, 12.800 pessoas foram a óbito por infecções diretamente relacionadas a *C. difficile* ([https://www.cdc.gov/hai/organisms/cdiff/cdiff\\_infect.html](https://www.cdc.gov/hai/organisms/cdiff/cdiff_infect.html)).

Uma metanálise que avaliou taxas de incidência de ICD em relatórios de vigilância entre 2005 a 2015, envolvendo 41 países, sendo a maioria da Europa e América do Norte, demonstraram que as taxas ICD associadas a unidades de saúde foram 2,24/1000 admissões/ano, para os internamentos em UTI e em clínica médica 11,08 e 10,8/1000 admissões/ano respectivamente e 0,55/1000 admissões/ano associada à comunidade (BALSELLS et al., 2019).

A incidência da ICD na Europa, foi demonstrada em estudo realizado com 97 instituições, que revelou uma vasta disparidade, a média ponderada na incidência foi de 4,1 por 10.000 pacientes/ dia, e quando se analisou individualmente cada país, as taxas variaram de 0 a 36,3 (BAUER et al., 2011). Em 2007, foram implementados programas de medidas de prevenção e vigilância, momento em que a incidência de infecção por *C. difficile* começou a atingir um platô (JONES; KUIJPER; WILCOX, 2013).

O Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) em 2016 apresentou o Relatório Epidemiológico Anual de Infecções relacionadas aos cuidados de saúde por *C. difficile*. Vinte países da EU (União Europeia) reportaram 7.711 casos de ICD, dos quais 74,6% eram ICD associados a cuidados de saúde, destes 16,7% dos casos tiveram um curso complicado de infecção, 3,9% foram casos fatais atribuídas diretamente à ICD e com 7,9% apresentaram recorrência (ECDC, 2018).

Nos últimos 20 anos um fator epidemiológico ocasionou uma considerável mudança na ICD, decorrente do aparecimento de uma nova cepa com maior virulência e de rápida disseminação global, responsável por surtos de ICD, principalmente nos EUA durante os anos de 2000 a 2003, sendo então identificada pela primeira vez em 2005 por McDonald e colaboradores, denominada como BI/NAP1/027 pelo padrão apresentado nos métodos usados para sua caracterização: reação em cadeia da polimerase (PCR) ribotipo 027, eletroforese de gel em campo pulsado tipo 1 Norte Americano (NAP1) e análise da endonuclease de restrição (REA) tipo BI. As características de patogenicidade são devidas, à produção de uma toxina adicional chamada de toxina binária ou CDT (embora seu papel na gravidade

da infecção ainda não estar claro), a uma deleção em *tcdC* que leva a uma alta produção de toxinas, esporulação aumentada e ainda, resistência às fluoroquinolonas (BURNHAM; CARROLL, 2013), particularidades que levaram a um aumento na incidência e gravidade da infecção, acometendo em maior frequência pacientes idosos, principalmente na América do Norte e Europa (McDONALD et al., 2005; KUIJPER; COIGNARD; TÜLL, 2006; CLEMENTS et al., 2010). Tal fato fez com que a diarreia associada ao *C. difficile* (DACD) fosse reconhecida como uma infecção hospitalar importante, criando ameaças emergentes à saúde humana e à comunidade (KUIJPER; COIGNARD; TÜLL, 2006).

Além do aumento progressivo da ICD estar associado a BI/NAP1/027, estudos mostraram que outros ribotipos podem estar associados a surtos e casos graves, esta distribuição varia de acordo com a época e país, e dentro deste, por regiões ou, até mesmo, entre instituições (DE ROO; REGENBOGEN, 2020). Alguns ribotipos toxigênicos permaneceram entre os prevalentes por décadas, são como o 014, 020, 002, 027 e, dentro dos não toxigênicos, o ribotipo 010 (NAGY, 2018). Outros ribotipos são especificamente regionais, como o ribotipo 356 que é encontrado na Itália, ou predominantes em mais de um local como 018 na Itália, Japão e Coreia, ou o 176 na República Tcheca e Alemanha (DE ROO; REGENBOGEN, 2020). Nos EUA a proporção de ribotipo 027 nos isolados tem diminuído significativamente com o passar do tempo, de 31% em 2011 e 2012, para 22% em 2013 e 2014 e para 14% em 2015 e 2017 (TICKLER et al., 2019), como mostra estudo. Reduções importantes no uso de fluoroquinolonas é o provável fator modificador na diminuição na prevalência, apesar do melhoramento do controle de infecção (TICKLER et al., 2019). Em contra partida, entre 2005 e 2008, a gravidade da infecção do ribotipo 078 foi semelhante ao ribotipo 027, porém o ribotipo 078 foi mais frequente na população mais jovem e em infecções adquiridas na comunidade (McDONALD et al., 2018; TICKLER et al., 2019; DE ROO; REGENBOGEN, 2020).

Nos países da União Europeia estudos demonstram identificação de 65 ribotipos diferentes; entre eles o 056 e 018 foram significativamente relacionados a casos complicados da doença, afetando mais idosos, apresentando produção de níveis aumentado de toxinas e níveis séricos mais altos de proteína C-reativa. Os ribotipos de PCR 027 e 176 predominaram em contextos epidêmicos, enquanto os ribotipos de PCR 001/072 e 014/020 em não epidêmicos. A manutenção desta diversidade é vista como um fator positivo por estar inversamente relacionada à

resistência a antibióticos. Também verificou-se um aumento em torno de 10% na prevalência do ribotipo 078 em pacientes mais jovens da comunidade (RUPNIK,;WILCOX; GERDING, 2009; BAUER et al., 2011; BARBUT; RUPNIK, 2012; RUPNIK et al, 2016). Assim, a ICD que por muito tempo foi considerada uma infecção nosocomial ligada ao uso de antimicrobianos, nestes últimos anos, apresentou uma mudança da população afetada, com relatos de aumento na incidência entre os jovens, na comunidade e sem exposição prévia a antibióticos (CHITNIS et al.,2013; DEPESTEL; ARONOFF, 2013; GERDING; LESSA, 2015; ABRAHAMIAN et al., 2017; DE ROO; REGENBOGEN, 2020).

Nos hospitais do Japão e Coréia do Sul o ribotipo 018 também predomina seguido do 017. Em estudos coreanos o ribotipo 018 ocorreu mais em mulheres, apesar de causar ICD mais grave do que o 017, não apresentou aumento na recorrência nem tão pouco na mortalidade (DE ROO; REGENBOGEN, 2020).

Muitos estudos foram gerados a partir da propagação de cepas epidêmicas, podendo ser encontradas em diversos hospitais pelo mundo, porém na América Latina poucos estudos foram realizados para avaliar a frequência de ICD e conhecimento dos perfis toxigênicos, dessa forma, considera-se uma infecção negligenciada (PIRES et al.,2014; MUÑOZ et al., 2018).

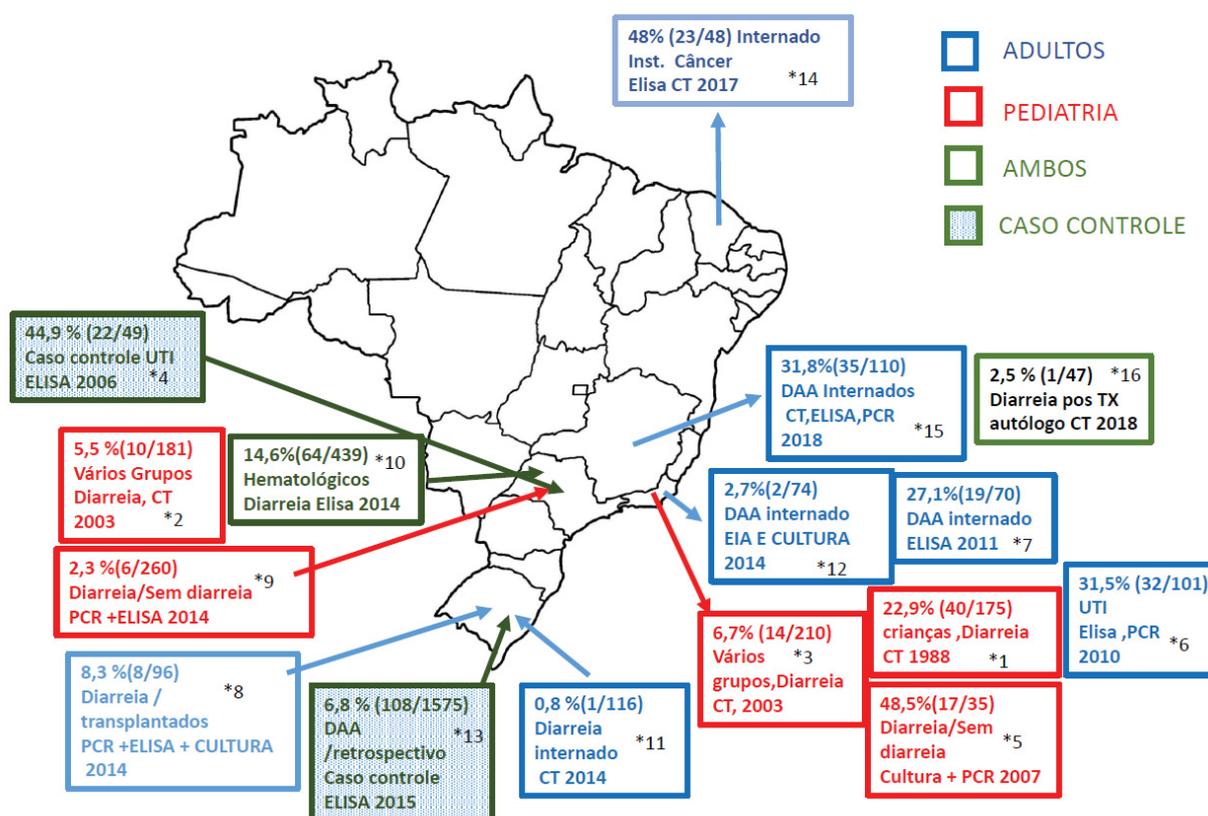
Na América Latina, o primeiro relato de surgimento de *C. difficile* NAP1 foi em 2010 na Costa Rica, durante um surto que acometeu 20 pacientes hospitalizados (QUESADA-GÓMEZ et al., 2010). No ano seguinte, dois casos de ICD associada ao ribotipo 027 foi apontado no Chile, posteriormente, um estudo maior envolvendo 45 hospitais em todo o país entre os anos de 2012 e 2013, mostrou a disseminação da estirpe hipervirulenta (NAP1) em 79% das 719 amostras isoladas (HERNÁNDEZ-ROCHA et al., 2012; AGUAYO et al., 2015). No Panamá, em 2012, NAP1/027 acometeu seis pacientes hospitalizados (LOPEZ-URENA et al., 2014) e em 2015 foi isolado pela primeira vez no México (CAMACHO-ORTIZ et al. 2015).

Recentemente, Curcio e colaboradores (2019) realizaram metanálise avaliando diarreia associada a *C. difficile* (DACD) nos países em desenvolvimento, revelaram que 15% dos casos de diarreia são atribuíveis à infecção por *C. difficile* (incluindo pacientes da comunidade e hospitalizados), porém ocorrendo diferenças nas taxas, sendo mais altas na América Latina e na China.

No Brasil os estudos são pontuais e ainda escassos, e apenas alguns estados reportam taxas da prevalência da ICD, como mostrado em recente revisão feita por

Trindade; Domingues; Ferreira, (2019). Nos últimos anos, verificou-se uma grande variação na prevalência dessa infecção. Na FIGURA 7, pode-se observar dados de prevalência obtidos a partir de estudos brasileiros sobre ICD realizados nos últimos 30 anos. Junto com os dados de prevalência, encontram-se indicado o estado em que o estudo foi realizado, a população estudada, o método laboratorial utilizado e ano em que o estudo foi publicado.

FIGURA 7 – PREVALÊNCIA DA ICD NO BRASIL



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Tx = transplante; UTI = Unidade de Terapia Intensiva; EIA = Ensaio imunoenzimático; CT = Cultura Toxigênica; DAA = Diarreia associada a antimicrobianos; PCR = reação em cadeia da polimerase; \*1 GARCIA; DE UZEDA, 1988; \*2 FERREIRA et al., 2003; \*3 PINTO et al., 2003; \*4 MARCON et al., 2006; \*5 ALCIDES et al., 2007; \*6 BALASSIANO et al., 2010; \*7 BALASSIANO et al., 2011; \*8 PIRES et al., 2014; \*9 MERINO et al., 2014; \*10 SPADÃO et al., 2014; \*11 MONTEIRO et al., 2014; \*12 SECCO et al. 2014, \*13 LARENTIS et al., 2015; \*14 COSTA et al., 2017; \*15 CANÇADO et al., 2018; \*16 CASTRO et al., 2018.

Na busca de minimizar a disseminação de cepas epidêmicas emergentes (que podem causar surtos), estudos que realizam tipagem molecular são necessários para a detecção de cepas com novos fatores de virulência. No entanto, no Brasil não são amplamente utilizados pelos hospitais, nota-se que pouquíssimos estados fazem esse tipo de identificação. Como mostrado na FIGURA 8. Entre eles se destacam:

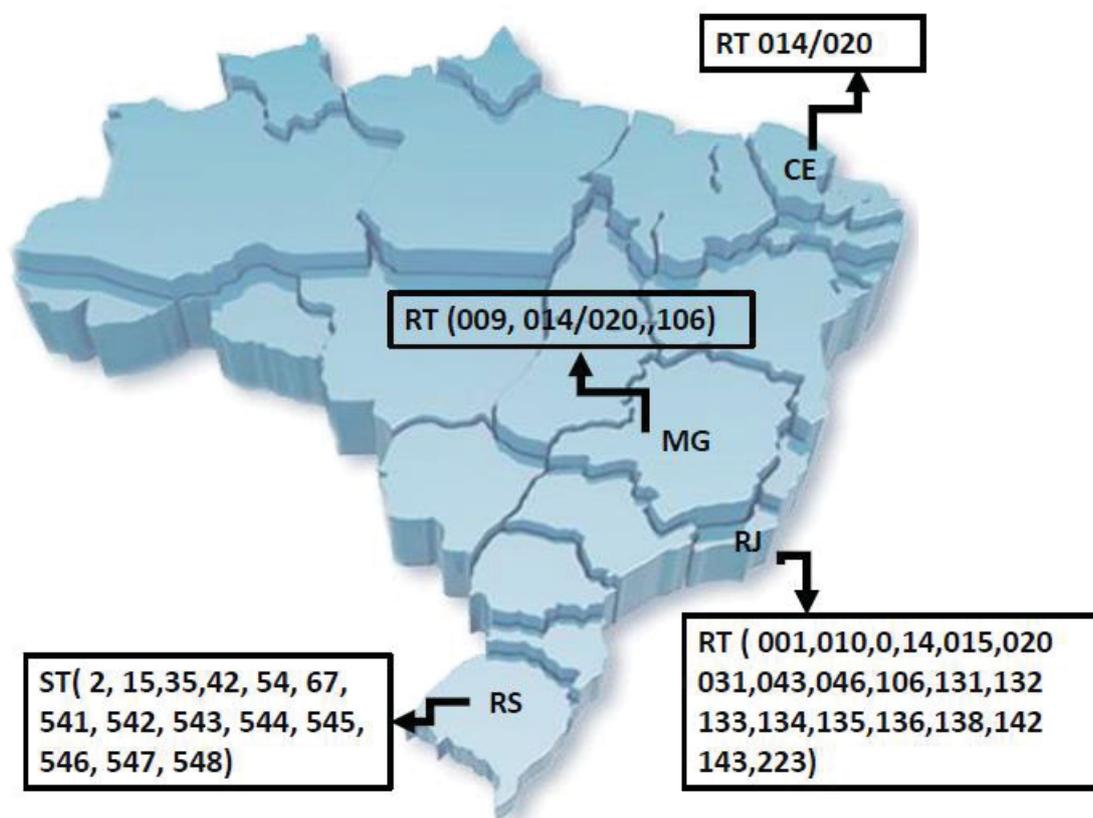
- Rio de Janeiro (2009) o ribotipo 106 é notificado pela primeira vez no Brasil, comumente encontrado no Reino Unido, revelando assim o poder de disseminação deste micro-organismo (BALASSIANO et al., 2009). Além do Reino Unido, este foi recentemente associado a surtos na Irlanda e Espanha, com alta prevalência no Canadá, o ribotipo é resistente a pelo menos três antibióticos e apresenta taxa de esporulação aumentada (DE ROO; REGENBOGEN, 2020).

- Minas Gerais (2015) estudo relacionando a semelhança entre ribotipos isolados de *C. difficile* de humanos e animais (possível via de transmissão zoonótica). A ribotipagem de PCR identificou 014/020, 009 e 106, foram isolados de humanos e animais, sugerindo o potencial zoonótico (SILVA, et al., 2015).

- Ceará (2017) estudo com pacientes internados, em hospital especializado em câncer em uma amostra foi considerado um novo pulsotipo e não era tipável por ribotipos de PCR, foi caracterizado como toxinotipagem do tipo IXb, que pela análise filogenética, é relacionada ao NAP1/027/ST01 e a outros pertencentes ao clado 2, embora não mostre características do clone epidêmico (COSTA et al., 2017).

- Rio Grande do Sul (2018) - relata o primeiro caso de *C. difficile* hipervirulento no Brasil com base no MLST, o ST (tipo de sequência), a cepa foi classificada como ST67, pertencente ao clado 2, que possui uma alta diversidade de tipos de sequência, incluindo ST1(NAP/027) (PIRES et al., 2018). Em 2020 estudo que caracterizou os tipos de sequência (ST) de 16 isolados de *C. difficile*, identificou quatorze STs diferentes (SALDANHA et al., 2020).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DOS RIBOTIPOS (RT) E TIPOS DE SEQUÊNCIA (ST) DE *Clostridiodes difficile* EM HUMANOS RELATADOS NOS ESTADOS BRASILEIROS



FONTE: Adaptado de TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA (2019).

Legenda: RT = ribotipos de PCR; ST = Tipos de sequência MLST; CE = Ceará; MG = Minas Gerais; RJ = Rio de Janeiro; RS = Rio Grande do Sul.

## 2.7 TRATAMENTO

O tratamento empírico deve ser iniciado mediante uma forte suspeita clínica enquanto o diagnóstico laboratorial estiver em andamento. Com esta atitude previne-se o agravamento dos casos e a disseminação do CD no ambiente hospitalar. O tratamento para ICD deve ser iniciado somente em pacientes sintomáticos, e a primeira medida a ser tomada assim que possível é a retirada do antibiótico incitador (SURAWICZ et al., 2013).

Atualmente a escolha do tratamento da ICD está centralizado em estratégias para prevenir ICD recorrente (rICD) (KHANNA; GERDING, 2019), pois esta é encontrada em 20 a 30% dos pacientes adultos e em 20% em pacientes pediátricos, além de apresentar alta mortalidade (McFARLAND et al, 2016).

### 2.7.1 Tratamento com Antibióticos

Desde a década de 1970, metronidazol e vancomicina oral foram os pilares do tratamento da infecção por *C. difficile* em crianças e adultos. A escolha da antibioticoterapia deve ser selecionada de acordo com a gravidade que a doença se apresenta. Várias diretrizes mencionam para tratamento de adultos e crianças o metronidazol como medicamento de primeira linha em ICD não grave, enquanto a vancomicina oral foi a droga de escolha para ICD grave. Além disso, estudos revelam que a vancomicina foi superior ao metronidazol na cura primária da ICD em adultos (ZAR et al, 2007; VARDAKAS et al., 2012; NELSON; SUDA; EVANS, 2017).

Vancomicina e metronidazol apresentaram taxas equivalentes na recorrência da infecção, porém a administração vancomicina apresentou melhor desempenho para o risco de mortalidade avaliado em 30 dias, podendo justificar o uso de vancomicina em infecções graves (STEVENS, et al., 2017).

A fidaxomicina, antibiótico bactericida com mínima absorção sistêmica e com altas concentrações no lúmen gastrointestinal, apresenta alta eficácia contra *C. difficile*, se tornou disponível para o tratamento em adultos. Apresentando como característica, não influenciar significativamente na flora fisiológica do cólon, o que faz que seu uso esteja relacionado com uma menor recorrência da infecção (OOIJEVAAR et al., 2018). Porém alguns autores não verificaram o mesmo

(diminuição da recorrência) quando se trata de cepas altamente virulentas (SCHÄFFLER; BREITRÜCK, 2018; MENDO-LOPEZ et al., 2019).

Estudo realizado por Guery et. al (2018) em adultos, demonstraram que quando a fidaxomicina foi administrada na forma de pulsos, se apresentou superior na cura sustentada e com menor recorrência da infecção em comparação com a dose padrão de vancomicina.

Em 2018, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) e Sociedade Americana de Epidemiologia em Saúde (SHEA) atualizaram suas diretrizes, apontando que a vancomicina oral e fidaxomicina representam a base para o tratamento ICD em adultos e também, sugerem que o metronidazol não deva ser usado em um episódio de infecção não grave, a não ser que o acesso à vancomicina e a fidaxomicina não esteja disponível ou estas estejam contraindicadas (como no caso de alergias) (GUPTA; CIFU; KHANNA, 2018; KOUHSARI et al., 2018; McDONALD et al., 2018).

A tigeciclina exerce atividade bacteriostática contra *C. difficile*, existem poucos trabalhos que avaliam o seu uso e sugerem benefícios como estratégia para ICD grave sem resposta à terapia padrão. Até este momento, o seu uso está aprovado para tratamento de infecções complicadas de pele, tecidos moles e infecções intra-abdominais complicadas (McDONALD et al., 2018; OOIJEVAAR et al., 2018).

Novos antibióticos como Surotomina, Ridinilazole, Cadazolid estão em fases de ensaios clínicos II e III para o tratamento de ICD (MENDO-LOPEZ et al., 2019).

### 2.7.2 Tratamento Cirúrgico

É o tratamento de escolha para pacientes graves com megacólon, perfuração ou a forma fulminante, estes devem passar por uma colectomia de emergência com o intuito de sobrevivência (BAUER.; KUIJPER; VAN DISSEL, 2009; ONG et al., 2017; KOUHSARI et al., 2018).

## 2.7.3 Novas Terapias para ICD

### 2.7.3.1 Imunológicos

#### A. Anticorpos monoclonais

Bezlotoxumabe e actoxumabe foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2016 para uso como tratamento adjuvante em pacientes com risco de rICD. O bezlotoxumabe (anticorpo monoclonal humano contra TcdB) impede a toxina B de se ligar às células hospedeiras (OOIJEVAAR et al., 2018) e foi associado a uma menor taxa de recorrência da infecção em comparação com o grupo placebo, enquanto o actoxumabe (anticorpo contra TcdA) não apresentou efeito na recorrência da doença isoladamente ou em combinação com bezlotoxumabe (MENDO-LOPEZ et al., 2019). Mais estudos serão necessários para definir o algoritmo de tratamento do ICD com bezlotoxumabe (SCHÄFFLER; BREITRÜCK, 2018).

#### B. Vacinas

São direcionadas à prevenção da ICD primário pela imunidade ativa as toxinas de *C. difficile*. Algumas vacinas para ICD estão atualmente em testes clínicos e os dados de eficácia ainda não estão disponíveis (RILEY; LYRAS; DOUCE, 2019).

### 2.7.3.2 Neutralização de Antibióticos no trato gastrointestinal

Recente opção na prevenção do ICD primário é promover a resistência à colonização por *C. difficile*, anulando os efeitos dos antibióticos no trato gastrointestinal (GI), conservando a microbiota do cólon. Para esta estratégia ser eficaz, não pode prejudicar a absorção dos antibióticos no trato gastrointestinal superior, devendo a neutralização ocorrer no cólon. No momento duas opções estão sendo avaliadas em ensaios clínicos.

- SYN-004 ou ribaxamase: é uma beta-lactamase oral para inativar antibióticos beta-lactâmicos ((penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos) no trato GI inferior (KHANNA; GERDING, 2019).

- DAV132: corresponde a uma cápsula oral formulada com carvão ativado, direcionada para a liberação no íleo distal, com a função de adsorver os antibióticos, reprimindo a ruptura do microbioma. Está sendo desenvolvido na Europa e EUA (KHANNA; GERDING, 2019).

### 2.7.3.3 Terapias baseadas na reposição da microbiota intestinal

#### A) Transplante de Microbiota Fecal (TMF)

O primeiro relato sobre transplante fecal em paciente com infecção por *C. difficile* foi publicada em 1983 (SCHWAN et al., 1983). Entre as opções terapêuticas é o que se apresenta mais promissor e emergente na prevenção de ICD recorrente, sendo recomendado para aqueles pacientes com falha nos tratamentos antibióticos administrados e que apresentaram múltiplas recorrências.

Através deste procedimento, a microbiota intestinal saudável (doador) tende a restaurar sua composição e função no microbioma rompido (receptor) evitando o uso de mais antibióticos (o que faz diminuir o potencial de colonização por bactérias resistentes) e a recuperação do equilíbrio da microbiota intestinal, tornando-a resistente à colonização. Estudos relatam altas taxas de cura (SURAWICZ et al., 2013; QURAIISHI et al., 2017).

Em 2015, foi o primeiro relato de transplante fecal por enteroscopia no Brasil (GANC et al., 2015) e em 2017 foi criado pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, o primeiro banco de fezes para o transplante de microbiota fecal no país.

Apesar de seu benefício para as infecções recorrentes, pouco se sabe sobre os efeitos adversos a longo prazo, incluindo doenças malignas, doenças autoimunes, além de outros fatores pelos quais alguns autores desencorajam tal procedimento (XU et al., 2015; SONG; KIM, 2019; TAN; JOHNSON, 2019).

B) Baseada em enema: RBX2660 é uma suspensão padronizada e estabilizada à base de microbiota derivada de fezes de doadores humanos saudáveis que está sendo avaliada em ensaios clínicos (KHANNA; GERDING, 2019, MENDO-LOPEZ et al., 2019).

C) Baseada em cápsulas: Esta metodologia é vantajosa em relação à instilação endoscópica por apresentar menor custo processual, praticidade na via de administração e, eventualmente, menos eventos adversos. SER-109 é uma cápsula

oral que contêm esporos bacterianos enriquecidos e purificados de amostras de fezes de doadores saudáveis. Após a triagem padronizada dos doadores, faz-se uma preparação destas fezes que conterá espécies de esporos de *Firmicutes*, o papel do SER-109 na gestão do ICD ainda está sob investigação (KHANNA; GERDING, 2019; MENDO-LOPEZ et al., 2019).

#### 2.7.3.4 Bioterapia

A) *C. difficile* não toxigênico: Esporos bacterianos de estirpes que não possuem genes para toxinas de *C. difficile* (NTCD). Supõe-se que o NTCD concorra pelo mesmo nicho metabólico ou na aderência no trato gastrointestinal com *C. difficile* toxigênico, o que ainda não está totalmente elucidado. Estudos em hamsters e em humanos sugerem que estas cepas de NTCD são capazes de colonizar pacientes e prevenir a infecção por uma cepa toxigênica de *C. difficile* (KHANNA; GERDING, 2019). Contudo em 2013, foi observado em um estudo que cepas não-toxigênicas podem ter a capacidade de alterar seu fenótipo para cepas de *C. difficile* toxigênicas, tornando-se assim uma predisposição para o desenvolvimento de ICD (BROUWER et al., 2013).

B) Probióticos: O uso de probióticos na prevenção e tratamento da ICD em adultos ainda é discutível e controverso. Em revisões prévias não foram encontradas evidências suficientes para indicar o uso de probióticos como auxiliar à antibioticoterapia, nem tão pouco haver indícios do seu uso isoladamente no tratamento, sugerindo a necessidade de estudos mais robustos (PILLAI; NELSON, 2008; SONG; KIM, 2019). Como também várias diretrizes (IDSA/SHEA, ESCMID, ACG e da Australásia) relatam não haver evidências suficientes para recomendar os probióticos como agente na prevenção da ICD, porém alguns estudos estão ocorrendo para avaliar nos casos de rICD (MENDO-LOPEZ et al., 2019).

## 2.8 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *C. difficile*

O diagnóstico da ICD é considerado desafiador, por apresentar grande influência no tratamento dos pacientes com a doença e pelo fato que nenhum dos testes disponíveis combinarem alta sensibilidade e especificidade, fazendo com que várias diretrizes recomendem um algoritmo de 2 ou 3 etapas para otimizar o diagnóstico (CROBACH et al., 2016; NAGY, 2018; GATEAU et al., 2018).

Baseia-se em achados clínicos e laboratoriais que confirmam presença de cepas toxigênicas ou toxinas em fezes, a rapidez na detecção da infecção afeta positivamente a atenção ao paciente. Quando se tem a ICD confirmada, acelera o isolamento e tratamento destes pacientes, enquanto se tem um resultado negativo permitirá o bloqueio imediato da terapia empírica e do seu isolamento (GATEAU et al., 2018). Somente amostras diarreicas (fezes não formadas) devem ser testadas para ICD, exceto no caso de íleo paralítico (CROBACH et al., 2016). Os testes devem ser realizados apenas em pacientes sintomáticos devido às altas taxas de colonização assintomática entre algumas populações, como visto nas crianças com idade inferior a 12 meses. Repetir o teste de amostras negativas dentro do mesmo episódio diarreico também deve ser desencorajado ou totalmente proibido, pois vários estudos têm demonstrado a falta de valor diagnóstico para a repetição do teste, independentemente do método. Isto também se aplica para as amostras positivas dentro de um intervalo de tempo, pois muitos pacientes permanecerão colonizados por *C. difficile* por até 6 semanas (GATEAU et al., 2018), após tratamento com êxito. Finalmente, o teste para *C. difficile* não deve ser realizado em lactentes (isto é, pacientes com idade inferior a 1 ano de idade), devido à sua alta taxa de colonização (GILLIGAN, 2015; GATEAU et al., 2018; McDONALD et al., 2018).

### 2.8.1 CCNA (Ensaio de Neutralização de Citotoxicidade) e CT (Cultura Toxigênica)

Durante muitos anos, o teste de neutralização da citotoxicidade celular (CCNA) foi considerado o padrão ouro para diagnóstico de ICD, porque era um teste direto para indicação da presença de uma toxina (por exemplo, toxina B) em uma amostra. O teste era recomendado porque alguns dos isolados de *C. difficile* não produzem toxinas sendo considerados não patogênicos. Este ensaio consiste em inocular um filtrado de fezes em uma cultura de células e observar o efeito citopático

ou seja, o arredondamento celular, após 1 ou 2 dias de incubação. A especificidade do método é avaliada pela neutralização deste efeito citopático com anti-soros direcionados contra a toxina do *C. difficile* (BURNHAM; CARROLL, 2013). Atualmente, muitos especialistas consideram a sensibilidade baixa para ser considerado como padrão-ouro, parcialmente pela degradação que as toxinas sofrem ao decorrer do tempo. Quando se compara com a cultura toxigênica (CT), que seria o isolamento do micro-organismo em cultura seguido da detecção da produção da toxina pelos isolados, a sensibilidade do CCNA é de apenas 66,7% (TENOVER et al., 2011). Além disso, o CCNA é mais demorado e mais caro pela a necessidade de manutenção das linhagens celulares (BURNHAM; CARROLL, 2013).

A cultura toxigênica tem sido considerada como o método de referência sempre que se deseja validar um método de diagnóstico de ICD. Além de ser um método de excelência para comparação de metodologias, é também útil para estudos epidemiológicos, porém, exige especialização do laboratório, dos profissionais responsáveis e um longo tempo para o resultado, sendo estes os motivos para não ser indicado no diagnóstico de rotina da doença (BURNHAM; CARROLL, 2013). Além disso, alguns autores argumentam que o método, apesar de produzir maior número de amostras positivas, não é superior na detecção de ICD, pois o isolamento da bactéria e a detecção do gene para produção de toxina seriam menos relacionados à clínica do que a detecção da toxina já formada na amostra, como ocorre no CCNA (BURNHAM; CARROLL, 2013; GILLIGAN, 2015; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017).

A cultura pode ser realizada em meios seletivos, sendo o mais usado o ágar pré-reduzido cicloserina cefoxitina frutose (CCFA). Entre os outros meios disponíveis estão o ágar cicloserina cefoxitina gema de ovo (CCEY) ou Meio Brazier's. A seleção do *C. difficile* também pode ser realizado pelo tratamento da amostra com etanol ou alta temperatura antes da semeadura. Substâncias como taurocolato ou lizozima podem ser adicionadas ao meio para melhorar a germinação dos esporos. (BURNHAM; CARROLL, 2013). Após semeadura, a cultura deve ser incubada em anaerobiose por 48h antes da primeira leitura e por 7 dias antes de liberar como negativa. A cultura realizada exclusivamente em meios seletivos é de 18% a 20% menos sensível quando comparada à cultura utilizando caldo enriquecido. No entanto, o enriquecimento em caldo acrescenta pelo menos 24 horas ao tempo de

execução do teste, que já apresenta um tempo prolongado. Após incubação, as colônias de *C. difficile* apresentam uma aparência de vidro esmerilhado e cheiro de para-cresol (semelhante a um celeiro de cavalo) (BURNHAM; CARROLL, 2013). Colônias com essa característica, em que são visualizados bacilos Gram-positivos, anaeróbios esporulados, são presuntivamente identificadas como *C. difficile*. A identificação definitiva pode ser feita por kits comerciais (RapidANA, Remel, Lenexa, KS ou ANC card Vitek®, BioMerieux) ou por MALDI-TOF (BURNHAM; CARROLL, 2013). Para completar a cultura toxigênica, após a identificação do *C. difficile*, é necessário comprovar a toxigenicidade do isolado, usando um método molecular para pesquisa dos genes das toxinas nas cepas ou ainda, um teste para pesquisa da toxina no sobrenadante do meio, como ensaios imunoenzimáticos (EIE) ou teste de citotoxicidade celular (BURNHAM; CARROLL, 2013; GILLIGAN, 2015; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017).

Devido à complexidade, custo e tempo de resultado, a cultura não tem sido usada rotineiramente no diagnóstico de ICD. Três métodos de ensaio são atualmente utilizados para compor as etapas para detectar a presença de *C. difficile* toxigênico nas fezes. Estes métodos são EIE (ensaios imunoenzimáticos) para glutamato desidrogenase (GDH) e para toxinas A e B, além de técnicas de amplificação de ácido nucleico (NAAT) para o gene de toxina A e/ou B. Os testes que utilizam ensaios imunoenzimáticos são amplamente adotados pelos laboratórios devido ao seu baixo custo e facilidade de uso (CROBACH et al., 2009; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2017).

### 2.8.2 GDH (glutamato desidrogenase)

O GDH é uma enzima metabólica (altamente conservada) secretada, por *C. difficile*, o que a torna uma ferramenta para o diagnóstico (GATEAU et al., 2018). O EIE para este antígeno além de barato e rápido, representa um método sensível para detectar a presença de *C. difficile*, devido seu alto valor preditivo negativo, sendo muito útil como teste rápido de triagem, porém este método possui baixa especificidade, uma vez que não faz a distinção entre cepas toxigênicas e não toxigênicas. A presença de toxina deve ser confirmada em todas as amostras GDH positivas antes de um resultado positivo para ICD (BURNHAM; CARROLL, 2013; VAUSTAT, 2017).

### 2.8.3 Pesquisa de toxinas

A pesquisa de toxinas pode ser realizada de diversas maneiras, incluindo cultura de células como o ensaio de neutralização de citotoxicidade (CCNA) já mencionado acima ou, como na maioria dos laboratórios, por ensaios imunoenzimáticos (EIE) ou Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAT) (CROBACH et al., 2009; SHARP et al., 2010).

#### 2.8.3.1 EIE (Ensaio Imunoenzimático)

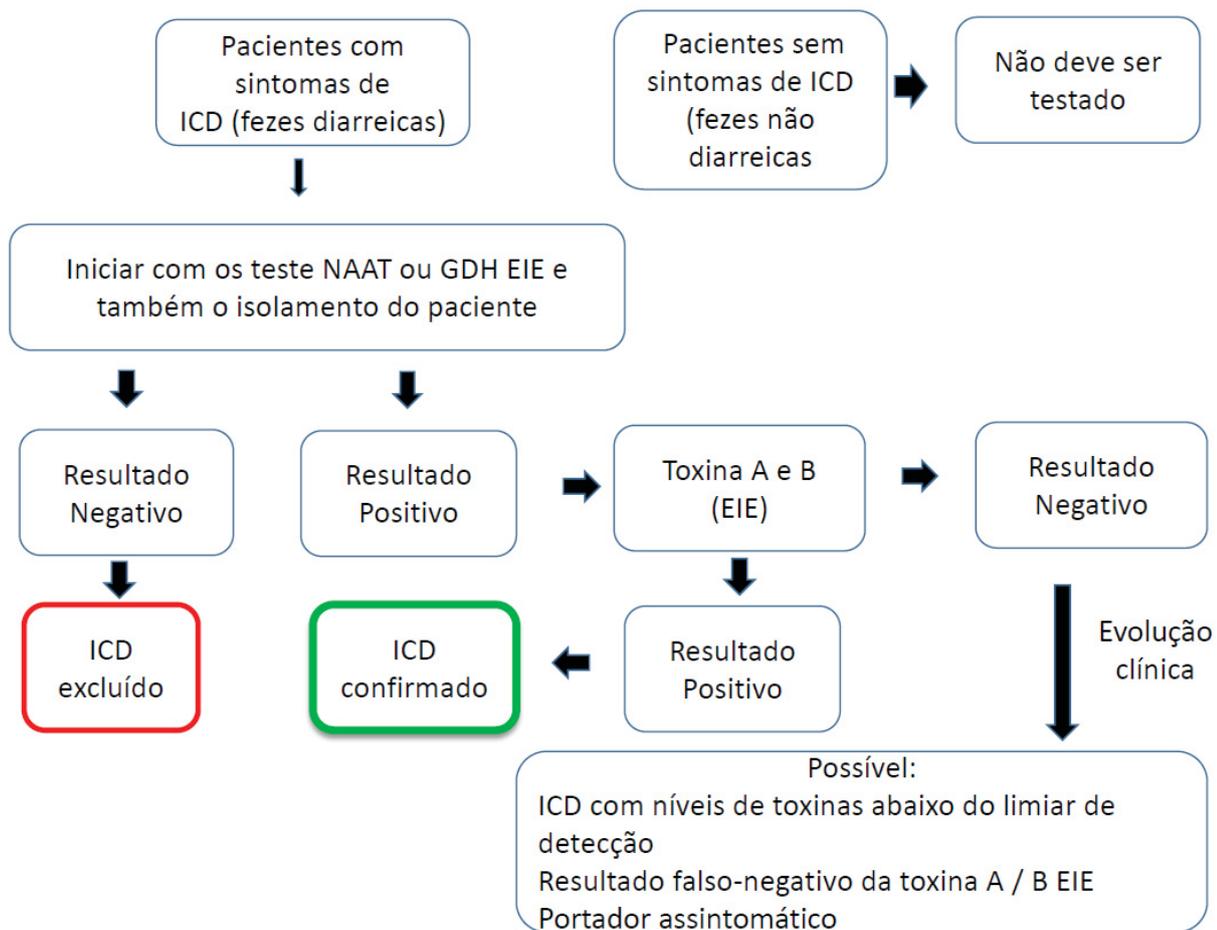
Testes comerciais de EIE para toxinas A/B tem baixa sensibilidade em comparação com a cultura e NAAT. A sensibilidade de acordo com a marca utilizada, pode variar entre 28% a 77% em comparação com os ensaios de citotoxicidade celular (CROBACH et al., 2009), este fato se deve à degradação da toxina a temperatura ambiente, desta forma várias diretrizes alertam para os riscos de realizar a detecção das toxinas A/B por EIE como um teste autônomo, pois o mesmo pode gerar resultados falso-negativos, com isto os NAATs representam o melhor método para detectar as cepas toxigênicas (BURNHAM; CARROLL, 2013; GATEAU et al., 2018).

#### 2.8.3.2 NAAT (Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos)

As realizações de NAAT para os genes das toxinas oferecem maior sensibilidade e especificidade do que os métodos baseados em EIE, porém são mais caros. Deve-se atentar para o fato de o teste detectar os genes da toxina e não a toxina livre nas fezes, podendo assim se tratar de um portador assintomático, reforçando a ideia de que o teste deve ser realizado em pacientes sintomáticos (CROBACH et al., 2009; GATEAU et al., 2018).

Como um único teste não abrange alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de ICD, muitos estudos propõem algoritmos de ensaios, utilizando dois ou mais dos três métodos de ensaio, a fim de aperfeiçoar o diagnóstico de infecção por *C. difficile* com minimização de custos (NAGY, 2018; GATEAU et al., 2018; CZEPIEL et al., 2019). Entre as combinações propostas de testes estão mostradas na FIGURA 9.

FIGURA 9– ALGORITMOS PARA O DIAGNÓSTICO DE ICD



FONTE: : Adaptado de CZEPIEL et al. (2019).

Legenda: ICD = Infecção por *C. difficile*; EIE = Ensaio imunoenzimático.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo de coorte prospectivo e multicêntrico para a presença de infecção por *Clostridioides difficile*, avaliando a epidemiologia, tratamento e recorrência.

Participaram do estudo pacientes adultos internados em oito instituições de Curitiba (Complexo Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital do Idoso Zilda Arns, Hospital Ônix, Hospital das Nações, Hospital São Vicente, Hospital Santa Casa de Curitiba, Hospital Erasto Gaertner, Hospital Universitário Cajuru) como pode ser visualizado na FIGURA 10. Dentre estes, quatro hospitais são considerados de grande porte, variando de 168 a 500 leitos. Um deles é o maior do estado e referência em muitas especialidades como transplante de medula óssea e tratamento de doenças hematológicas. Um é exclusivamente para tratamento do câncer, um especializado em trauma e transplante de rim, e o último possui muitas especialidades, incluindo atendimento de emergência psiquiátrica. Os outros quatro hospitais são de médio porte, com 84 a 131 leitos. Um deles é exclusivo para tratamento de idosos. Todas estas instituições têm serviços altamente complexos e 10 a 45 leitos em unidades de terapia intensiva.

#### 3.2 PERÍODO DO ESTUDO

O presente estudo ocorreu de junho 2017 a junho 2019.

#### 3.3 LOCAL DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Após a coleta do material clínico nas instituições já relatadas, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia e Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas - Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – CHC/UFPR. Curitiba, Paraná, Brasil.

Nestes laboratórios foram realizadas toda a parte experimental que compreendeu o processamento das amostras: realização do teste rápido, PCR, armazenamento a - 80°C, bem como a tabulação e análise de dados.

FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS HOSPITAIS PARTICIPANTES DO ESTUDO



FONTE: o autor (2019).

### 3.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP) do HC-UFPR sob o registro nº CAAE 59027716.5.1001.0096, seguindo as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Para os demais coparticipantes, também se obteve a aprovação do estudo pelo seus Comitês de Ética e Pesquisa Institucional, e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 2).

A identidade dos participantes foi preservada através do sigilo profissional e de métodos de identificação numérica (todas as amostras foram identificadas por números e não pelo nome do paciente).

### 3.5 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E CONFIGURAÇÃO DE DADOS

Os critérios de inclusão foram pacientes hospitalizados com mais de 48 horas de internação, apresentando diarreia (três ou mais episódios de diarreia com fezes líquidas ou pastosas em 24 horas), de ambos os sexos com 18 anos ou mais, que usaram antimicrobianos nos últimos 90 dias ou uso de imunossupressores, quimioterapia ou radioterapia nos últimos 30 dias antes do início do quadro diarreico, e/ou internamento por mais de 48 horas e pacientes no mesmo quarto ou espaço físico com outro paciente portador de diarreia por *C. difficile* (paciente contactante de caso confirmado de ICD).

As amostras foram triadas por médicos infectologista de cada unidade participante e estas vieram acompanhada de uma ficha preenchida que continham os dados necessários para a inclusão no estudo (APÊNDICE 3); os dados clínicos foram coletados utilizando um questionário padronizado (APÊNDICE 4). As informações coletadas incluíam dados demográficos, comorbidades segundo escore de Charlson (CHARLSON et al., 1987), presença de fatores de risco predisponentes nos 3 meses anteriores ao início da diarreia (tratamento antimicrobiano, quimioterapia, sonda nasogástrica, cirurgia, colonização por bacilos Gram-negativos multidroga resistente (*Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao carbapenens); parâmetros laboratoriais no dia da coleta da amostra de fezes (contagem de leucócitos, creatinina sérica, albumina sérica, lactato, proteína-C reativa), para pacientes na UTI foi coletado o escore de Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (SOFA) (VICENT et al., 1996), curso clínico, tratamento recebido e desfecho.

### 3.6 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Foram excluídos indivíduos que apresentavam um o mais dos seguintes critérios:

- Não concordaram e/ou não assinaram o TCLE
- Amostras não diarreicas
- Amostras repetidas dentro do mesmo episódio diarreico
- Presença de ileostomia, colostomia ou ressecção colônica maior que hemicolectomia

- Obstrução /Suboclusão intestinal
- Sangramento ou hemorragia intestinal grave
- Diarreia crônica
- Uso de laxantes/enema nas últimas 48 horas

### 3.7 DEFINIÇÕES

Foram consideradas das diretrizes internacionais que utilizam alguns critérios para classificar as infecções como também os quadros clínicos e evolução do tratamento da ICD, conforme abaixo descritas:

- ICD é definida pela presença de sintomas (geralmente diarreia) e por um teste de fezes positivo para toxinas de *C. difficile* ou pela detecção de *C. difficile* toxigênico (COHEN et al., 2010).
- ICD recorrente (rICD) é definido como uma recorrência dos sintomas da ICD dentro de 8 semanas após o início de um episódio anterior, desde que os sintomas do episódio anterior tenham sido resolvidos após a conclusão do tratamento inicial (OOIJEVAAR et al., 2018).
- A cura inicial é definida como: ausência de diarreia por dois dias consecutivos após a conclusão da antibioticoterapia padrão (OOIJEVAAR et al., 2018).
- A cura sustentada (ou geral) é definida como cura clínica do episódio inicial de ICD e nenhuma infecção recorrente (OOIJEVAAR et al., 2018).
- ICD grave em adultos foi definida como diarreia com sangue e/ou diarreia com aumento do nível de creatinina sérica (1,5 vezes o basal do paciente), hipoalbuminemia (albumina sérica <3 g/dL), febre (temperatura >38°C) e leucocitose (contagem de glóbulos brancos > 15.000 células/mm<sup>3</sup>) e ou colite pseudomembranosa (MCDONALD et al., 2018; OOIJEVAAR et al., 2018).

### 3.8 COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram analisadas amostras de fezes diarreicas coletadas a partir da evacuação espontânea de qualquer horário do dia, em frasco de coleta estéril com boca larga e tampa bem ajustada, de acordo com o protocolo estabelecido na Instituição. A amostra foi transportada em um recipiente com gelo. O tempo decorrido entre a coleta e a semeadura não passou de vinte e quatro horas. No

momento da coleta o paciente ou responsável assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 3.9 PESQUISA DE ENZIMA GDH E DE TOXINAS A E B DE *C. difficile* NAS FEZES POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Assim que a amostra foi recebida um teste rápido (FIGURA 11) de enzima imunoensaio (EIE) foi realizado, este detecta especificamente a glutamato desidrogenase e toxinas A e B de *C. difficile* (*C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®, Alere Inc., Waltham, MA, USA), foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

FIGURA 11 – TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE GDH E TOXINAS

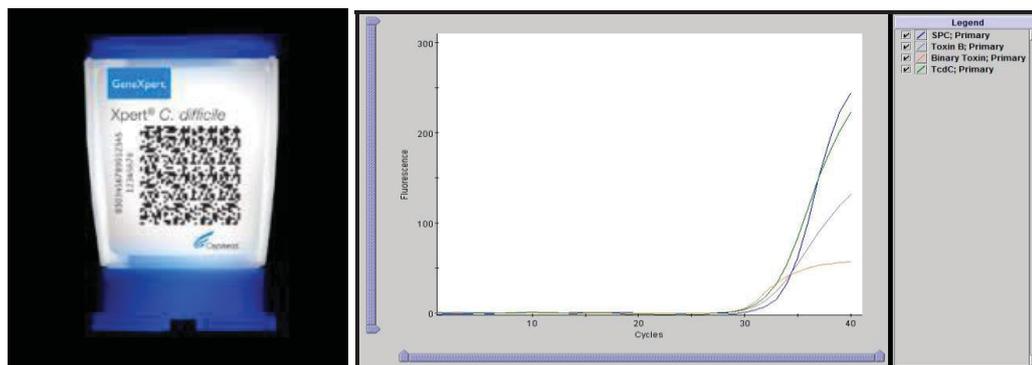


FONTE: O autor (2017)

Legenda: Ag=GDH (Glutamato desidrogenase); Tox = toxina A e B.

### 3.10 DETECÇÃO DOS GENES DAS TOXINAS DE *C. difficile* NAS FEZES POR PCR

A metodologia empregada foi o sistema GeneXpert® CEPHEID (Xpert *C. difficile* Test, Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA), o qual apresenta sensibilidade e especificidade variando de 90% a 100% e 92,9% a 98,6% respectivamente (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ; et al. 2017), realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Trata-se de um sistema totalmente automatizado, que integra a extração, amplificação e detecção dos genes que codificam a toxina B (*tcdB*), toxina binária (*cdt*) e possível deleção *tdcC* (FIGURA 12).

FIGURA 12 – SISTEMA GENEXPERT PARA A DETECÇÃO DE TOXINAS *C. difficile*

FONTE: O autor (2017).

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva utilizando o software Stata, versão 13 (StataCorp LP, College Station, TX, EUA). Os dados foram apresentados como frequências e porcentagens, medianas e valores mínimos / máximos, ou médias e faixas, conforme apropriado. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da amostra. O teste do qui-quadrado ou teste de Fisher foi utilizado para variáveis categóricas e o teste de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas, conforme apropriado. As variáveis foram identificadas como estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

Regressão logística foi realizada para análise multivariada. Os endpoints definidos foram ICD e variáveis com  $p \leq 0,100$ , ou variáveis relacionadas com ICD em outros estudos. Odds ratio e intervalos de confiança de 95% foram usados para quantificar a força dessas associações.

## 4 RESULTADOS

Durante o período de junho de 2017 a junho de 2019 um total de 392 amostras foram encaminhadas, destas 41 foram excluídas por serem amostras repetidas ou fezes bem formadas.

O estudo incluiu 351 amostras, das quais 62 (17,7%) foram definidas como caso infecção por *C. difficile* (ICD) pelos critérios previamente estabelecidos. As taxas de prevalência da ICD entre as instituições variaram de 8,3% a 41,7%, com a maioria das taxas individuais de cada instituição próxima a média geral (Tabela 1). A exceção foi o Hospital 7, que apresentou prevalência menor que esta média, porém deve ser observada o baixo número de amostras recebidas, e o Hospital 2 que apresentou um surto de ICD durante o período do estudo. As diferenças entre os hospitais não puderam ser comparadas devido à grande variação entre os números de amostras incluídas de cada hospital.

O teste de enzima imunoensaio (EIE) para GDH e toxinas, foram negativos em 266 pacientes e positivos em 26 pacientes. Os testes foram discordantes, ou seja, GDH positivo e toxinas negativas em 59 pacientes. Todas as amostras com GDH positivo foram submetidos a detecção de toxinas pelo GeneXpert (PCR).

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS INSTITUIÇÕES, PACIENTES INCLUÍDOS E TAXAS DE INFECÇÃO POR *C. difficile*

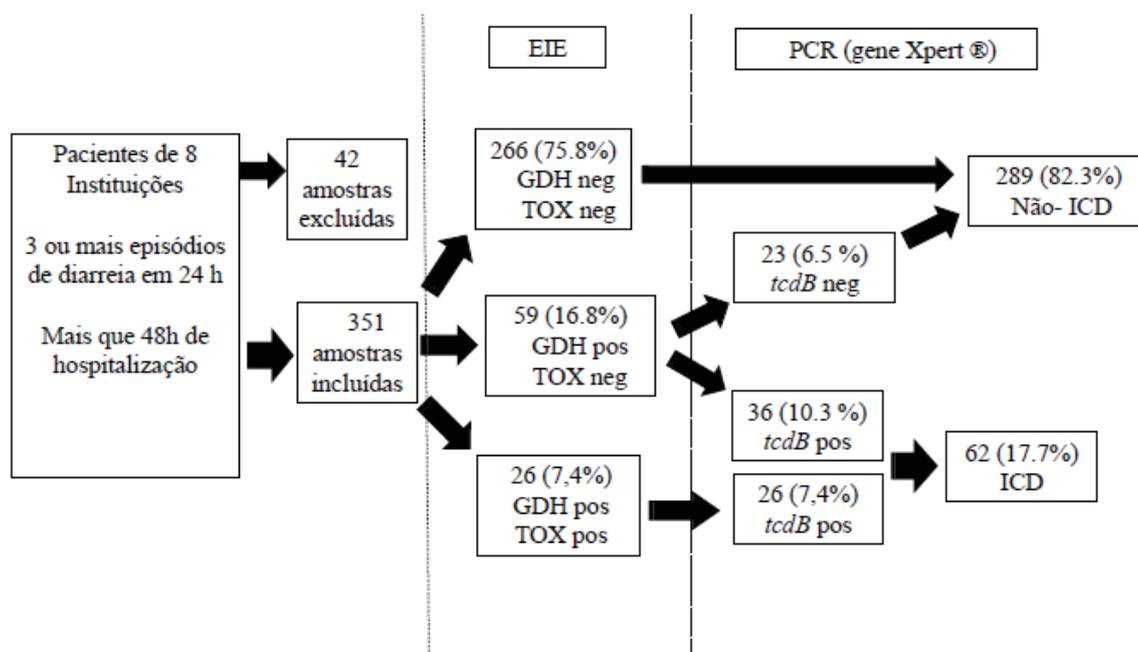
Instituições	Hosp.1*	Hosp.2*	Hosp. 3*	Hosp. 4*	Hosp.5*	Hosp. 6*	Hosp.7*	Hosp.8*
Público ou privado	Publico	Publico	Privado	Privado	Privado	Privado	Privado	Privado
Principais Especialidades	Transplante de medula óssea e doenças hematológicas	Tratamento de idosos	Oncologia e transplante de medula óssea	Hospital Geral	Trauma, cirurgia ortopédica, transplante renal	Neurologia doenças cardíacas e cirurgia ortopédica	Doenças cardíacas e cérebro vasculares	Doenças cardíacas e cérebro vasculares
Atividades de ensino e pesquisa	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
Leitos	501	121	168	90	167	84	116	186
Leitos de UTI	83	20	24	10	29	10	24	38
Unidade cirúrgica	Grande porte	Grande porte	Médio porte	Médio porte	Grande porte	Grande porte	Grande porte	Grande porte
Serviço de Emergência	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Unidade de Transplante	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
Número de pacientes incluídos neste estudo	179	24	59	24	22	20	12	11
Número casos de ICD	30	10	10	3	3	3	1	2
Prevalência de ICD entre pacientes com DAA (%)	16.76	41.67	16.95	12.50	13.64	15.00	8.33	18.18

FONTE: o autor (2020).

\* Legenda: Hosp 1: Complexo Hospital de Clínicas; Hosp 2: Hospital Zilda Arns; Hosp 3: Hospital Erasto Gaertner; Hosp 4: Hospital Ônix; Hosp 5: Hospital Universitário Cajuru; Hosp 6: Hospital das Nações. Hosp 7: Hosp São Vicente; Hosp 8: Hospital Santa Casa.

Entre as 59 amostras que foram toxinas negativas pelo EIE, 36 (10,3%) foram positivas no teste da PCR para *C. difficile* (*tcdB* detectado), e das 26 (7,4%) amostras anteriormente toxinas positivas no EIE, todas foram confirmadas por PCR (*tcdB* detectado) Figura 13. O gene da toxina binária (*cdt* detectado) foi observado em 10 amostras e o presuntivo 027 (deleção *tcdC*) em duas amostras.

FIGURA 13 - RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS



FONTE: o autor (2020).

Legenda: ICD: infecção por *C. difficile*; EIE: Ensaio imunoenzimático; GDH: Glutamato Desidrogenase; TOX: Toxina; PCR: reação em cadeia da polimerase; Pos: Positivo; Neg: negativo; *tcdB*: gene da toxina B.

Os dados demográficos e as principais características clínicas dos pacientes incluídos no estudo são apresentados na Tabela 2. Estes dados foram colhidos até 90 dias antes do dia da coleta de amostra de fezes.

Na análise univariada, idade acima de 65 anos, hospitalização prévia, ICD anterior, outras infecções prévias, pacientes colonizados por bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenens (BGN-CR) e o uso de cefalosporinas foram relacionados a um maior risco de ICD. O escore de Charlson apresentou um valor médio de 3,4 (variação de 0 a 14) e não diferiu entre os grupos ICD e não ICD (Tabela 2). Na análise multivariada, colonizados por BGN-CR (odds ratio [OR] = 5,3,  $p < 0,001$ ), hospitalização anterior (OR = 2,8,  $p = 0,010$ ) e uso de cefalosporina de amplo espectro (OR = 2,5,  $p = 0,015$ ) ou carbapenens (OR = 2,4,  $p = 0,019$ ) se apresentaram como fatores de risco independentes para ICD (Tabela 3).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO DE ACORDO COM A INFECÇÃO POR *C. difficile*

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>Total n=351 (%)</b>	<b>ICD n=62 (%)</b>	<b>Não ICD n=289 (%)</b>	<b>P valor*</b>
<b>DADOS DEMOGRÁFICOS</b>				
Idade (> 65 anos)	126 (35.9)	30 (48.4)	96 (33.2)	0.020
Sexo, masculino	201 (57.3)	33 (53.2)	168 (58.13)	0.740
Hospital Público	203 (57.8)	40 (64.5)	163 (56.4)	0.240
UTI	110 (31.3)	13 (21.0)	97 (33.6)	0.050
Enfermaria Oncologia	129 (36.7)	23 (37.0)	96 (33.2)	0.328
Idade, média (min-max)	59 (18-93)	63 (22-92)	58 (18-93)	0.022
<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</b>				
Escore Charlson >2	171 (48.7)	28 (45.2)	143 (49.5)	0.317
Hospitalização prévia	210 (59.8)	48 (77.4)	162 (56.1)	0.002
Infecção prévia <i>C. difficile</i>	7 (2.0)	4 (6.4)	3 (1.0)	0.006
Outras infecções	231 (65.8)	48 (77.4)	183 (63.3)	0.030
Uso de IBP	264 (75.2)	43 (69.4)	221 (76.5)	0.240
Sonda enteral	139 (39.6)	17 (27.4)	122 (42.2)	0.020
Cirurgia abdominal prévia	46 (13.1)	6 (9.7)	40 (13.8)	0.260
Colonizado por VRE	30 (8.6)	7 (11.3)	23 (8.0)	0.390
Colonizado por BGN-CR	43 (12.3)	15 (24.2)	28 (9.7)	0.002
Uso de drogas imunossupressoras	164 (46.7)	20 (32.3)	144 (49.8)	0.010
<b>COMORBIDADES</b>				
Diabetes mellitus	69 (19.7)	13 (21.0)	56 (19.4)	0.770
Infarto agudo do miocárdio prévio	16 (4.6)	1 (1.6)	15 (5.2)	0.220
Insuficiência cardíaca	39 (11.1)	11 (17.7)	28 (9.7)	0.070
Doença vascular arterial periférica	27 (7.7)	8 (12.9)	19 (6.6)	0.100
Acidente vascular cerebral anterior	39 (11.1)	10 (16.1)	29 (10.0)	0.170
Demência	30 (8.5)	10 (16.1)	20 (6.9)	0.020
Doença pulmonar	44 (12.5)	6 (9.7)	38 (13.1)	0.450
Doença do tecido conjuntivo	7 (2.0)	0 (0.0)	7 (2.4)	0.220
Úlcera gastroduodenal prévia	15 (4.3)	3 (4.8)	12 (4.2)	0.810
Doença hepática	7 (2.0)	1 (1.6)	6 (2.1)	0.810
AVC anterior com hemiplegia	16 (4.6)	4 (6.5)	12 (4.1)	0.430
Doença Renal	61 (17.4)	6 (9.7)	55 (19.0)	0.080
Tumor sólido	44 (12.5)	3 (4.8)	41 (14.2)	0.040
Leucemia	68 (19.4)	11 (17.7)	57 (19.7)	0.720
Linfoma	25 (7.1)	5 (8.1)	20 (6.9)	0.750
Tumor metastático	26 (7.4)	7 (11.3)	19 (6.6)	0.200

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO DE ACORDO COM A INFECÇÃO POR *C. difficile*

COMORBIDADES	(conclusão)			
	Total n=351 (%)	ICD n=62 (%)	Não ICD n=289 (%)	P valor*
Infecção pelo HIV	35 (10.0)	2 (3.2)	33 (11.4)	0.050
Outras comorbidades	118 (33.6)	24 (38.7)	94 (32.5)	0.350
Dias hospitalização-mediana (min-max)	13 (2-222)	12 (2-200)	13 (2-222)	0.406
<b>ANTIBIÓTICOS PRÉVIOS</b>				
Cephalosporinas de amplo espectro	210 (59.8)	44 (71.0)	166 (57.4)	0.032
Cefazolina	27 (7.7)	9 (14.5)	18 (6.2)	0.031
Carbapenens	134 (38.2)	29 (46.8)	105 (36.3)	0.120
Penicilina	124 (35.3)	19 (30.6)	105 (36.3)	0.240
Fluoroquinolonas	109 (31.0)	21 (33.9)	88 (30.4)	0.600
Sulfametoxazol	102 (29.1)	14 (22.6)	88 (30.4)	0.220
Vancomicina	96 (27.4)	17 (27.4)	79 (27.3)	0.990
Metronidazol	49 (14.0)	11 (17.7)	38 (13.1)	0.340
Macrolídeos	43 (12.2)	8 (12.9)	35 (12.1)	0.860
Clindamicina	36 (10.2)	6 (9.7)	30 (10.4)	0.540
Aminoglicosídeos	23 (6.55)	6 (9.7)	17 (5.9)	0.270
Outros	62 (17.7)	8 (12.9)	54 (18.7)	0.180
Sulfametoxazol + outro	100 (28.5)	14 (22.6)	86 (29.7)	0.163
Carbapenens + vancomicina	65 (18.5)	10 (16.1)	55 (19.0)	0.370
Cefalosporinas + aminoglicosídeos	16 (4.5)	2 (3.2)	14 (4.8)	0.440
Polimixina + carbapenens	15 (4.3)	3 (4.8)	12 (4.1)	0.512
Antimicrobianos usados, mediana (intervalo)	3 (1-9)	3 (1-6)	3 (1-9)	0.458

FONTE: o autor (2020).

Legenda: \* Qui-quadrado ou teste de Fisher para variáveis categóricas; Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os dados clínicos e antimicrobianos referem-se a 90 dias antes do dia da coleta da amostra de fezes. Abreviaturas: ICD: infecção por *C. difficile*; UTI: unidade de terapia intensiva; VRE enterococos resistentes à vancomicina; BGN-CR: bacilos gram-negativos resistentes a carbapenens; HIV: vírus da imunodeficiência humana; AVC: acidente vascular cerebral, IBP: Inibidor de bomba de prótons.

Os pacientes apresentaram em média cinco episódios de diarreia por dia por um período médio de 11 dias; essas taxas não diferiram entre os grupos ICD e não ICD. A Tabela 4 mostra as manifestações clínicas e laboratoriais no dia da coleta da amostra e seus desfechos, os quais comparam o ICD com outras causas de diarreia. A presença de muco ou sangue nas amostras de fezes foi relacionada ao

diagnóstico de ICD. Um número maior de pacientes com ICD tiveram diarreia grave e episódios recorrentes em comparação aos pacientes sem ICD.

TABELA 3 – ANÁLISE MULTIVARIADA DOS FATORES ASSOCIADOS A ICD

FATORES	OR	IC (95%)	p
Colonizado por BGN-CR	5.3	2.2 - 13.7	< 0.001
Hospitalização Prévia	2.8	1.4 - 6.2	0.010
Uso de Cefalosporinas amplo espectro	2.5	1.2 - 5,2	0.015
Uso de Carbapenens	2.4	1.2 - 5.3	0.019

FONTE: o autor (2020).

Legenda: As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Stata, versão 13 (StataCorp LP, College Station, TX, EUA. OR: Odds Ratio; ICD: infecção por *C. difficile*; IC: intervalo de confiança; BGN-CR: bacilos gram-negativos resistentes a carbapenens.

A terapia empírica para ICD, após a coleta da amostra, foi iniciada em 46,4% (163 de 351) dos pacientes até o resultado dos exames. Entre esses pacientes, 21,5% (35 de 163) foram confirmados com ICD e o tratamento antimicrobiano continuou. Em relação aos pacientes com resultados negativos, 37,4% (61 de 163) interromperam o tratamento antimicrobiano empírico para ICD após o resultado negativo para ICD.

Todos os pacientes com ICD receberam terapia antimicrobiana (Tabela 5) e 38 (61,3%) deles interromperam o antimicrobiano causador como parte do tratamento como sugerido pelas diretrizes internacionais. As terapias primárias escolhidas foram metronidazol oral (n = 42, 66,1%), vancomicina oral (n = 16, 25,8%) ou vancomicina oral combinada com metronidazol intravenoso (n = 5, 8,1%). A cura primária foi alcançada em 52 (83,9%) pacientes, enquanto 10 (16,1%) morreram com sintomas de diarreia. Onze (17,7%) pacientes necessitaram de mudança na terapia para obtenção da cura primária. O resultado de 60 dias não foi avaliado em quatro pacientes (6,5%) por não estarem disponível clinicamente. Entre os 48 pacientes com desfecho de 60 dias disponível, 38 (79,2%) apresentaram cura geral e 10 (20,8%) rICD.

TABELA 4 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS NO DIA DA COLETA DA AMOSTRA

VARIÁVEIS	TOTAL (N=351)	ICD (N=62)	NÃO-ICD (N=289)	P VALOR*
Temperatura > 37°C	124 (35.3)	21 (33.9)	103 (35.6)	0.427
Fezes com muco/sangue	57 (16.2)	18 (29.0)	39 (13.5)	0.003
Vômito	58 (16.5)	10 (16.1)	48 (16.6)	0.930
Dor abdominal	98 (27.9)	20 (32.3)	78 (27.0)	0.400
Escore SOFA > 2	168 (47.9)	23 (37.1)	145 (50.2)	0.041
Leucocitose (>15.000 /mm <sup>3</sup> )	68 (19.4)	17 (27.4)	51 (17.6)	0.059
Creatinina > 1.5 baseline	34 (9.7)	4 (6.4)	30 (10.4)	0.340
Hipoalbuminemia (< 3 g/dL)	44 (12.5)	7 (11.3)	37 (12.8)	0.468
PCR > 10 (mg/L)	140 (39.9)	33 (53.2)	107 (37.0)	0.058
Lactato > 18 (mg/dL)	13 (3.7)	2 (3.2)	11 (3.8)	0.823
Diarreia severa	166 (47.3)	40 (64.5)	126 (43.6)	0.002
Duração da diarreia (> 30 dias)	81 (23.4)	11 (19.0)	70 (24.3)	0.243
Diarreia recorrente	25 (7.1)	10 (16.1)	15 (5.2)	0.005
Taxa de Mortalidade, 30 dias	88 (25.0)	15 (24.2)	73 (25.2)	0.501

FONTE: o autor (2020)

Legenda: \* Teste qui-quadrado ou teste de Fisher para variáveis categóricas. Abreviaturas: PCR: proteína C reativa; ICD: infecção por *C. difficile*; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment. Os dados relativos aos sintomas e resultados laboratoriais foram obtidos no dia da coleta das fezes. Os dados relacionados ao desfecho foram obtidos 60 dias após a coleta da amostra.

Cinco pacientes com ICD (8%) apresentaram colite grave e necessitaram de cuidados intensivos. Quatro pacientes (6,4%) morreram devido à sepse abdominal, incluindo três casos (4,8%) em que a morte foi provavelmente relacionada à colite. Um paciente apresentou megacólon, enquanto nenhum dos pacientes necessitou de cirurgia ou hemodiálise devido ao ICD. O desfecho dos pacientes tratados com metronidazol não foi estatisticamente diferente dos tratados com vancomicina. O uso de vancomicina oral como terapia primária ou secundária também não teve relação com o desfecho ( $p > 0,05$ ).

Nenhuma das condições clínicas avaliadas no presente estudo esteve associada a risco de mortalidade ou recorrência ( $p > 0,05$ ) em 30 dias. Além disso, a presença de toxina binária ou deleção de *tcdC* não foi associada a um resultado

desfavorável ou recorrência ( $p > 0,05$ ). Nenhuma diferença nos sintomas ou desfechos foi observada em pacientes com ICD para toxinas detectadas por PCR e EIE em comparação com aqueles só com PCR positivo e toxina EIE negativa, enquanto quando as toxinas foram detectadas por EIE, observou-se maior probabilidade de recorrência de ICD ( $p = 0,010$ ).

TABELA 5- RESULTADO DO TRATAMENTO PARA INFECÇÃO POR *C. difficile*

Terapia Primária	Tratamento Antimicrobiano		Resultado do tratamento % (n/TP)		Resultado de 60 dias % (n/TP)		
	% (n/ICD)	Terapia Secundária	% (n/TP)	Cura Inicial	Cura Geral	Recorrência	Morte
Metronidazol Oral	67.7 (42/62)	Nenhum	76.2 (32/42)	90.5 (38/42)	76,5 (26/34)	14.7 (5/34)	19.0 (4/38)
		Vancomicina Oral	21.4 (9/42)				
		Vancomicina Retal	2.4 (1/42)				
Vancomicina Oral	32.3 (20/62)	Nenhum	95.2 (19/20)	70.0 (14/20)	57.1 (8/14)	35.7 (5/14)	30.0 (6/20)
		Vancomicina Retal e Tigeciclina	4.8 (1/20)				
Valor p	-	-	0.33	0.05	0.17	0.10	0.26

FONTE: o autor (2020).

Legenda: n: número de pacientes; CDI: infecção por *C. difficile*; TP: terapia primária; Terapia secundária - quando a terapia primária precisar ser alterada para alcançar a cura inicial.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo epidemiológico multicêntrico, observou-se uma prevalência de ICD de 17,7% em pacientes com diarreia associada a antimicrobianos. Entre os pacientes com ICD, houve uma taxa de recorrência de 20,8%, mortalidade geral em 30 dias de 24,3% e mortalidade relacionada de 4,8%. Pacientes colonizados por BGN-CR, hospitalização prévia e uso de cefalosporina ou carbapenens foram associados a um maior risco de ICD.

Vários estudos avaliaram a prevalência, os fatores de risco e os resultados da ICD, os quais apresentam frequências variáveis entre distintas regiões e instituições (CHAKRA et al., 2014). No entanto, os dados epidemiológicos sobre ICD em países em desenvolvimento ainda são limitados. Uma metanálise recente mostrou que 15% de todos os casos de diarreia associada a antimicrobianos na África, Ásia e América Latina são devidos a ICD. Dados que incluem pacientes hospitalizados e comunitários relatam taxas mais altas na América Latina e na China (CURCIO et al., 2019).

No Brasil, os dados sobre o ICD são limitados a alguns estudos envolvendo um número pequeno de amostras e de instituições participantes. Estudo recente, com coleta de amostras durante 4 anos em um hospital universitário, encontrou 31,8% (35/110) de prevalência de ICD em pacientes adultos com diarreia associada a antimicrobianos (CANÇADO et al., 2018), enquanto nenhum estudo até o momento analisou o resultado geral ou a frequência de rCDI.

O presente estudo está alinhado com outros realizados no Brasil e na América Latina em termos de prevalência de ICD. Porém, obteve-se um número pequeno de amostras testadas e casos de ICD em relação à duração do estudo, apesar do número de instituições envolvidas. Os critérios de inclusão que restringiram o estudo a ICD hospitalar (diarreia após 48 horas de internação) podem ter contribuído para o pequeno número de casos encontrados.

A hospitalização prévia, colonização por BGN-CR e o uso de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos foram relacionados a um risco maior de ICD. Todos esses fatores são conhecidos por estarem relacionados à disbiose intestinal, que é um requisito para a multiplicação do *C. difficile* e produção de toxinas (CHAKRA et al., 2014; LEFFLER; LAMONT, 2015; LEWIS; PAMER, 2017;

WATSON et al., 2018; CZEPIEL et al., 2019; TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019).

O uso dos grupos de antibióticos mais associados ao ICD (clindamicina e fluoroquinolonas) não foram encontrados como fator de risco associada a infecção neste estudo. O pequeno número de pacientes que fizeram uso de clindamicina pode ser contribuído a esse achado, outros estudos brasileiros também não encontraram associação entre fluoroquinolonas e ICD (TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019). São necessários estudos com maior inclusão de pacientes para confirmar o achado da relação da colonização por bacilos Gram-negativos multirresistentes com um risco aumentado para ICD.

Da mesma forma, o uso de inibidores da bomba de prótons (IBP) não foi fator de risco para ICD. O papel potencial dos IBP como fatores de risco ainda é controverso; alguns autores consideram esses agentes associados a um risco aumentado de ICD, especialmente na comunidade, outros consideram essa associação inexistente devido à falta de padronização quanto a exposição aos IBP relacionando a fatores do paciente, e que quando estas foram ajustadas para presença de comorbidades não se apresentaram como risco (CZEPIEL et al., 2019; DE ROO; REGENBOGEN, 2020). Outros aspectos demográficos e fatores de risco presumidos, como tempo de internação, uso de imunossupressores, cirurgia abdominal e alimentação enteral, não foram significativamente diferentes entre os pacientes com ICD e aqueles com diarreia não associada a ICD.

Na análise univariada, a idade e a demência foram associadas a um maior risco de ICD, mas não surgiram como fatores independentes na análise multivariada. A associação da idade dos pacientes >65 anos e ICD foi demonstrada anteriormente (LEFFLER; LAMONT, 2015; CHAKRA et al., 2014; CZEPIEL et al., 2019) e está relacionada à disbiose da microbiota intestinal. Alguns estudos têm mostrado que a hospitalização reduz ainda mais a diversidade de espécies do microbioma intestinal (LESSA et al., 2015). Alterações semelhantes no microbioma foram mostradas em pacientes com demência (ARAOS et al., 2018). Outros fatores que foram estatisticamente significativos na análise univariada, mas não na análise multivariada, foram a ocorrência prévia de ICD e infecções. Esses fatores provavelmente contribuíram para a colonização e disbiose por *C. difficile*, mas não foram fatores independentes para ICD.

Curiosamente, encontramos a menor taxa de ICD em pacientes em unidades de terapia intensiva e oncologia, que apresentam maior risco de adquirir essa infecção (CZEPIEL et al., 2019). Apesar do risco aumentado de ICD nesses pacientes, eles também apresentam muitas outras causas não infecciosas de diarreia (ANDREYEV et al., 2014; TIRLAPUR et al., 2016).

O gene *cdt*, que codifica a toxina binária, foi detectado em 16,1% (10/62) das amostras positivas e a deleção *tcdC* que é um marcador de cepa hipervirulenta em 3,2% delas (2/62). Apenas alguns estudos latino-americanos avaliaram a presença de cepas hipervirulentas de *C. difficile* (LÓPEZ-UREÑA et al. 2014; AGUAYO et al., 2015; CAMACHO-ORTIZ et al., 2015; GUALTERO et al., 2017). No Brasil, três estudos relataram cepas produtoras de toxina binária (SILVA et al., 2014; COSTA et al., 2017; SALDANHA et al., 2020) e apenas um detectou o marcador da cepa hipervirulenta (PIRES et al., 2018). Ao contrário de relatórios globais anteriores, não se encontrou associação entre a presença de toxina binária ou deleção de *tcdC* com desfecho grave ou rCDI (RAO; HIGGINS; YOUNGA, et al., 2018). Isso pode ser devido ao pequeno número de casos de ICD avaliados; um número maior de estudos multicêntricos é necessário para suprir essa lacuna. A detecção de toxinas por EIE foi previamente associada a resultados desfavoráveis (ORIGÜEN et al., 2018). No entanto, a toxina detectada por EIE no presente estudo foi associada apenas à recorrência da infecção.

Na coorte do presente estudo, 83,8% (52/62) dos pacientes obtiveram cura primária, enquanto a escolha do tratamento administrado para ICD não teve associação significativa com o desfecho de 60 dias, porém houve uma tendência do uso de metronidazol ( $p=0,05$ ) ser melhor ao uso de vancomicina, o que deve ser confirmado com um número maior de pacientes, uma vez que em 2018 a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) e Sociedade Americana de Epidemiologia em Saúde (SHEA) (McDONALD et al., 2018) atualizaram seus protocolos de tratamento sugerindo o uso de vancomicina ou fidaxomicina para os casos de ICD, deixando o uso de metronidazol para infecções não graves apenas quando a vancomicina não estiver disponível ou em pacientes alérgicos. Metronidazol foi a terapia primária mais comum. Entre os pacientes tratados com metronidazol como terapia primária, 23,8% não apresentaram melhora dos sintomas, e o alcance da cura primária exigiu uma mudança na terapia para vancomicina oral isolada ou combinada com metronidazol intravenoso. Apesar disso,

a terapia inicial com metronidazol oral apresentou maior taxa de melhora dos sintomas do que a vancomicina oral.

Alguns estudos relataram um menor risco de morte com a terapia com vancomicina em comparação com o metronidazol, sugerindo que a vancomicina deve ser a primeira escolha de tratamento em ICD (OOIJEVAAR et al., 2018; WANG et al., 2019). Ainda assim, os dados não mostraram nenhuma diferença na eficácia entre a vancomicina oral e o metronidazol oral em infecções não graves (IGARASHI et al., 2018). Neste estudo, alguns pacientes com ICD complicado foram incluídos, e metronidazol oral foi a terapia de escolha na maioria desses casos.

Este estudo apresentou algumas limitações, incluindo o pequeno número de pacientes e, conseqüentemente, os poucos casos de ICD, o que limitou algumas análises estatísticas. Atribuímos o pequeno número de amostras aos nossos rígidos critérios de inclusão e dependência das equipes de atendimento para solicitação de exames laboratoriais para inclusão de pacientes. Além disso, o acompanhamento em diferentes hospitais limitou o acesso a algumas informações, que foram revisadas retrospectivamente a partir de prontuários médicos. No entanto, estes dados demonstram alta frequência de ICD em pacientes hospitalizados de alto risco, com impacto na mortalidade destes indivíduos, uma ampla investigação desta infecção deve ser realizada buscando a implantação de medidas de controle e intervenção precoce neste grave evento.

A compreensão adequada da epidemiologia da ICD em países em desenvolvimento requer estudos futuros, incluindo um número maior de casos de ICD e avaliação de características como patogênese, recorrência da infecção, virulência, resposta ao tratamento e análise do microbioma.

## 6 CONCLUSÃO

- A prevalência da infecção por *C. difficile* em diarreias hospitalares associadas ao uso de antimicrobianos foi de 17,7 % em oito instituições de Curitiba.
- Fatores que foram associados a um maior risco de ICD foram pacientes colonizados por BGN-CR, hospitalização prévia e uso de cefalosporinas ou carbapenems.
- Entre os pacientes com ICD observou-se uma taxa de recorrência de 20,8%, mortalidade geral em 30 dias de 24,3% e mortalidade relacionada de 4,8%. Diarreia severa foi apresentada por 64,5% dos pacientes, 8% dos pacientes apresentaram colite grave sendo necessário transferência para Unidade de Terapia Intensiva. A cura primária foi obtida em 83,8% dos pacientes. Não houve diferença significativa avaliando o resultado em 60 dias na terapia com metronidazol oral ou vancomicina oral para o tratamento da ICD. Toxina B foi detectada em todos os pacientes com ICD (62), sendo que 10 casos foram positivos para toxina binária e destes 2 com provável deleção no regulador negativo da toxina (*tdcC*). Detecção da toxina pelo teste de enzima imunoensaio (EIE) foi associada a recorrência da infecção.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora alguns estudos em países em desenvolvimento tenham relatado a carga de ICD em pacientes hospitalizados, este é o primeiro estudo envolvendo vários hospitais multiespecialidades no Brasil, avaliando pacientes sintomáticos e correlacionando os achados com cura sustentada (geral) e recorrência de infecção. Destaca-se que tais investigações devem ser ampliadas buscando aumentar o conhecimento sobre o impacto desta infecção nos pacientes hospitalizados, entre estes são sugeridos analisar a epidemiologia na população infantil da infecção por *Clostridioides difficile* em pacientes internados com diarreia associada a antimicrobianos, avaliar os algoritmos de diagnóstico usando métodos enzimáticos para detecção de GDH, toxina A e B, cultura e métodos de biologia molecular quanto à acurácia e relação custo-benefício para implantação no Complexo do Hospital de Clínicas-CHC e caracterizar as cepas de *C. difficile* isoladas em cultura quanto à sensibilidade a antimicrobianos, produção de toxinas, presença de fatores de virulência e genes de resistência a antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMIAN, F. M.; et al. Clostridium difficile Infection Among US Emergency Department Patients With Diarrhea and No Vomiting. **Annals of Emergency Medicine**, v. 70, n. 1, p. 19- 27.e4, 2017. doi: 10.1016/j.annemergmed.2016.12.013,
- ABT, M. C.; MCKENNEY, P. T.; PAMER, E. G. Clostridium difficile colitis: Pathogenesis and host defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 609–620, 2016. doi:10.1038/nrmicro.2016.108
- AGUAYO, C.; et al. Rapid spread of Clostridium difficile NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. **Epidemiology and Infection**, p. 1–5, 2015. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0950268815000023](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268815000023)>. .
- ALCIDES, A. P. P.; et al. New PCR ribotypes of Clostridium difficile detected in children in Brazil Prevalent types of Clostridium difficile in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 53–59, 2007. doi: 10.1007 / s10482-006-9134-2
- ANDROGA, G. O.; et al. Positive Clostridium difficile in a young patient with ulcerative colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3702–3704, 2015. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609731/pdf/zjm3702.pdf>>. .
- ANDREYEV, J.; et al. Guidance on the management of diarrhoea during cancer chemotherapy. **Lancet Oncol**, v.15, p: e447–60, 2014. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70006-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70006-3).
- ARAOS, R.; et al. Fecal Microbiome Among Nursing Home Residents with Advanced Dementia and *Clostridium difficile*. **Dig Dis Sci**, v. 63, p: 1525–1531, 2018. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1112>.
- BALASSIANO, I. T.; et al. Characterization of Clostridium difficile strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, v. 15, n. 3, p. 61–64, 2009. doi: 10.1016 / j.anaerobe.2008.12.007
- BALASSIANO, I. T.; et al. An outbreak case of Clostridium difficile-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 4, p. 449–455, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017>>. .
- BALASSIANO, I. T.; et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of Clostridium difficile in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, , n. 99, p. 249–255, 2011. doi: 10.1007/s10482-010-9483-8
- BALSELLS, E.; et al. Global burden of Clostridium difficile infections: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Health**, v. 9, n. 1, 2019. doi: 10.7189 / jogh.09.010407

BARBUT, F.; RUPNIK, M. Editorial commentary: 027, 078, and others: Going beyond the numbers (and away from the hypervirulence). **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 12, p. 1669–1672, 2012. doi: 10.1093/cid/cis790

BARTLETT J. G.; et al. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis **Gastroenterology**, 75 (5): 778-82, Nov, 1978 Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1403772>

BAUER, M. P.; KUIJPER, E. J.; VAN DISSEL, J. T. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). **Clinical Microbiol Infect**, v. 15, n. 12, p. 1067–1079, 2009. doi: 10.1111 / j.1469-0691.2009.03099.x

BAUER, M. P.; et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 63–73, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61266-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61266-4)>. Acesso em: 15/9/2019.

BRADLEY, C.; et al. How do we define recurrence in *Clostridium difficile* infection? **Journal of Hospital Infection**, 2018. The Healthcare Infection Society. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.07.026>>. .

BROUWER, M.; et al. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. **Nat Commun**, v.4, n. 2601, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3601>

BURKE, K. E.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection: A worldwide disease. **Gut and Liver**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2014. doi: 10.5009 / gnl.2014.8.1.1

BURNHAM, C. A. D.; CARROLL, K. C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: An ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 604–630, 2013. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-13>

CAMACHO-ORTIZ, A.; et al. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. **PLoS One**, v.10: e0122627, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122627>

CANÇADO, G. G.; et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, v. 54, p. 65–71, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.08.005>

CASTRO, M. D.; et al. Infectious diarrhea in autologous stem cell transplantation: high prevalence of coccidia in a South American center. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 2, p. 132–135, 2018.. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.htct.2017.10.002>>. .

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, November 2019. Disponível em [https://www.cdc.gov/hai/organisms/cdiff/cdiff\\_infect.html](https://www.cdc.gov/hai/organisms/cdiff/cdiff_infect.html) Acesso em 26 junho 2020.

CHAKRA, C. N. A.; et al. Risk Factors for Recurrence, Complications and Mortality in *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. **PLoS One**, v. 9,6 e98400, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098400>.

CHARLSON, M. E. et al. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. **J Chron Dis**, 40 (1987):373-383. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8).

CHILTON, C. H.; PICKERING, D. S.; FREEMAN, J. Microbiologic factors affecting *Clostridium difficile* recurrence. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.017>>. .

CHITNIS, A. S.; et al. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. **JAMA Internal Medicine**, v. 173, n. 14, p. 1359–1367, 2013. doi:10.1001/jamainternmed.2013.7056

CLEMENTS, A. C.; et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 395–404, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70080-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70080-3)>. .

COHEN, S. H.; et al. 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 ). **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31, p. 431–455, 2010. doi:10.1086/651706

COSTA, C. L.; et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, v. 48, p. 232–236, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.001>>. .

CROBACH, M. J.; et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 12, p. 1053–1066, 2009. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03098.x

CROBACH, M. J.; et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clin Microbiol Infect**. v. 22, p: s63-81, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010>

CURCIO, D.; et al. *Clostridium difficile*-associated Diarrhea in Developing Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 87–103, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40121-019-0231-8>.

CZEPIEL, J.; et al. *Clostridium difficile* infection : review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** v. 38, p: 1211-1221, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6> .

DEPESTEL, D. D.; ARONOFF, D. M. Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 26, n. 5, p. 464–475, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0897190013499521>>. .

DE ROO, A.C.; REGENBOGEN, S. E. *Clostridium difficile* Infection: An Epidemiology Update. **Clin Colon Rectal Surg**. v. 33 n. 2 p. 49-57 2020. doi:10.1055/s-0040-1701229

DESHPANDE, A; et al. Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v.36, n.4, p: 452-460, 2015. doi:10.1017/ice.2014.88

DUBBERKE E, Strategies for Prevention of CDI. **J. Hosp. Med** v.7, n 3, p: S14-S17, 2012. doi: 10.1002 / jhm.1908

DUROVIC A.; WIDMER, A. F.; TSCHUDIN-SUTTER, S. New insights into transmission of *Clostridium difficile* infection-narrative review. **Clin Microbiol Infect**. v. 24, n. 5 p: 483-492, 2018. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.027

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Point prevalence survey of health care associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: **ECDC** 2013. <https://doi.org/10.2900/86011>

**ECDC**. European Centre for Disease Prevention and Control. Introduction to the Annual epidemiological report for 2016. 2018. Disponível em <https://www.ecdc.europa.eu/en/annual-epidemiological-reports> Acesso em 07 março 2020.

FALCONE, M.; et al. Risk factors for recurrence in patients with *Clostridium difficile* infection due to 027 and non-027 ribotypes. **Clinical Microbiology and Infection**, 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.020>

FERREIRA, C. E. A.; et al Prevalence of *Clostridium* spp . and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City , Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. June, p. 451–454, 2003. Fundação Oswaldo Cruz. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000400003>

GANC, A. J.; et al. Fecal microbiota transplant by push enteroscopy to treat diarrhea caused by *Clostridium difficile*. **Einstein (Sao Paulo)**, v.13, n.2, p.338-339, 2015. doi:10.1590/S1679-45082015MD3106

GARCIA, L.B.; DE UZEDA, M. Occurrence of *Clostridium difficile* in the feces of children. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**. Sao Paulo, 1988 v.30, p.419-423, doi:10.1590/S0036- 702 46651988000600006

GATEAU, C.; et al. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005>>. .

GEORGE, R. H.; et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. **British medical journal**, v. 1, n. 6114, p. 695, 1978. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6114.695>

GERDING, D. N.; LESSA, F.C. The epidemiology of *Clostridium difficile* infection inside and outside health care institutions. **Infect Dis Clin North Am.**n.29, v.1, p :37-50, 2015. doi: 10.1016/j.idc.2014.11.004

GILLIGAN, P. H. Optimizing the Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. **Clinics in Laboratory Medicine**, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.003>>. .

GUALTERO, S. M.; et al. Characteristics of *Clostridium difficile* infection in a high complexity hospital and report of the circulation of the NAP1/027 hypervirulent strain in Colombia. **Biomedica**, v. 37, p: 466-472, 2017. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3244>

GUERY, B.; et al. Extended-pulsed fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection in patients 60 years and older (EXTEND): a randomised, controlled, open-label, phase 3b/4 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 296–307, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30751-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30751-X)>. .

GUPTA, A.; CIFU, A. S.; KHANNA, S. Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* Infection. **JAMA Clinical Guidelines Synopsis**, v.302, n. 10 p. 1031–1032, 2018. doi:10.1001/jama.2018.12194

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. **Am J Dis Child**. v.49, n.2, p:390–402, 1935. doi:10.1001/archpedi.1935.0197002010501

HERNÁNDEZ-ROCHA, C., et al. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 4, p. 434–445, 2012. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000400011>

IGARASHI, Y.; et al. Oral vancomycin versus metronidazole for the treatment of *Clostridioides difficile* infection: Meta-analysis of randomized controlled trials. **J Infect Chemother**, v. 24 p: 907-914, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.08.003>

JONES, A. M.; KUIJPER, E. J.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile*: A European perspective. **Journal of Infection**, v. 66, n. 2, p. 115-128, 2013. doi: 10.1016/j.jinf.2012.10.019

KHANAFER, N.; et al. Factors associated with *Clostridium difficile* infection: A nested case-control study in a three-year prospective cohort. **Anaerobe**, n.44 p. 117-123, 2017. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.03.003

KHANNA, S.; GERDING, D. N. Anaerobe Current and future trends in *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* infection management. **Anaerobe**, v. 58, p. 95–102, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.04.010>>. .

KNETSCH, C. W.; et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. **Euro Surveil.** v. 19 n. 45 :20954, 2014. Published 2014 Nov 13. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.45.20954

KOUHSARI, E.; et al. *Clostridium difficile* infection: A review. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 103–109, 2018. <https://doi.org/10.1097 / MRM.000000000000135>

KUIJPER, E. J.; COIGNARD, B.; TÜLL, P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 2–18, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15300124>>. .

LARENTIS, D. Z.; et al. Outcomes and Risk Factors Associated with *Clostridium difficile* Diarrhea in Hospitalized Adult Patients. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, 2015. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/346341>.

LARSON, H. E.; et al. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. **Lancet**, v.1, n. 8073, p:1063-1066, 1978. doi:10.1016/s0140-6736(78)90912-1

LAWSON, P. A.; et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95–97, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>>. .

LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* Infection. **N Engl J Med**, n. 372 p:1539-1548, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772> .

LESSA, F. C.; et al. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 9, p. 825–834, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408913>.

LEWIS, B. B., PAMER, E. G. Microbiota-Based Therapies for *Clostridium difficile* and Antibiotic-Resistant Enteric Infections. **Annu Rev Microbiol.**, v. 71, p:157–178, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093549>.

LIM, S.C.; KNIGHT, D.R.; RILEY, T.V. *Clostridium difficile* and One Health. **Clin Microbiol Infect.** v.26 n.7, p: 857-863, 2020. doi: 10.1016/j.cmi.2019.10.023

LÓPEZ-UREÑA, D.; et al. Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: Case reports in Panama. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. PART 2, 2014. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.066399-0>

MAGILL, S. S.; et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014. doi: 10.1056 / NEJMoa1306801

MAIER, L.; et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. **Nature**, v. 555, n. 7698, p. 623–628, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature25979>>. .

MARCON, A. P.; et al. Nosocomial Diarrhea in the Intensive Care Unit. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 384–389, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702006000600005>

MARTIN-VERSTRAETE, I.; PELTIER, J.; DUPUY, B. The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 1–24, 2016. doi:10.3390/toxins8050153.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A.; et al. Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 9, p. 1552, 2017. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-327/full/v23/i9/1552.htm>>.

McCOLLUM, D. L.; RODRIGUEZ, J. M. Detection, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology** v. 10, n.6, p: 581-592, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.03.008>

McDONALD, L. C.; et al. An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 23, p. 2433–2441, 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051590>>. .

McDONALD, L. C.; et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clin Infect Dis**, v. 66, p: e1-e48, 2018. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>

McFARLAND, L.V.; et al. Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. **World J Gastroenterol.**, v. 22. n.11 p. 3078-3104, 2016. doi:10.3748/wjg.v22.i11.3078

MENDO-LOPEZ, R.; et al. Recent developments in the management of recurrent *Clostridioides difficile* infection. **Anaerobe**, p. 102108, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102108>>. .

MERINO, V. R. C.; et al. Genes Encoding Toxin of *Clostridium difficile* in Children with and without Diarrhea. **Scientifica (Cairo)**, v. 2014, n. 743, p. 594014, 2014. doi:10.1155/2014/594014

MIRANDA-KATZ, M.; et al. Epidemiology and Risk Factors for Community Associated *Clostridioides difficile* in Children. **The Journal of Pediatrics**, v. 221, p 99-106, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.peds.2020.02.005>

MONTEIRO, A. DE A.; et al. A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 672–674, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.004>.

MUÑOZ, M.; et al. New insights into *Clostridium difficile* (CD) infection in Latin America: Novel description of toxigenic profiles of diarrhea-associated to CD in Bogotá, Colombia. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00074>

NAGY, E. What do we know about the diagnostics , treatment and epidemiology of Clostridioides ( *Clostridium* ) *difficile* infection in Europe? **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 3, p. 164–170, 2018. Elsevier Taiwan LLC. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.12.003>>. .

NASIRI, M. J.; et al. *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. **Anaerobe**, v. 50, p. 32–37, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.011>>. .

NELSON, R. L.; SUDA, K. J.; EVANS, C. T. Antibiotic therapy to *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in adults. **Cochrane Database Syst Rev** v. 3 CD004610, 2017. doi: 10.1002 / 14651858.CD004610.pub5

ONG, G. K. B.; et al. *Clostridium difficile* colitis: A clinical review. **The American Journal of Surgery**, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961017300053>>. .

OOIJEVAAR, R. E.; et al. Update of treatment algorithms for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 5, p. 452–462, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.022>>. .

ORIGÜEN, J.; et al. Comparison of the clinical course of *Clostridium difficile* infection in glutamate dehydrogenase-positive toxin-negative patients diagnosed by PCR to use with a positive toxin test. **Clin Microbiol Infect**, v. 24, p. 414-421, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.033>.

PETRELLA, L. A.; et al. Decreased cure and increased recurrence rates for *clostridium difficile* infection caused by the Epidemic C. *difficile* BI strain. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 3, p. 351–357, 2012. doi: 10.1093 / cid / cis430

PILLAI, A.; NELSON, R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.1 CD004611, 2008. doi: 10.1002/14651858.CD004611.pub2

PINTO, L. J. F.; et al. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 1095–1099, 2003. doi:10.1099/jmm.0.05308-0

PIRES, R. N.; et al. *Clostridium difficile* infection in Brazil: A neglected problem? **American Journal of Infection Control**, v. 42, n. 4, p. 459–460, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2013.10.012>>. .

PIRES, R. N.; et al. Hypervirulent clostridium difficile strain has arrived in Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 3, p. 371–373, 2018  
doi:10.1017/ice.2017.280

PIRES, R.N.; et al. High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.40 p:484-485, 2019. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.27>.

POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal**, v. 171, n. 1, p. 51–58, 2004. Disponível em: <<http://www.cmaj.ca/cgi/doi/10.1503/cmaj.1031189>>. .

PRÉVOT A. Etudes de systematic bacterienne. **Ann Inst Pasteur**, n.61 p: 72–91. 758, 1938.

QUESADA-GÓMEZ, C.; et al. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 669–670, 2010.  
doi : 10.1128 / JCM.02196-09

QURASHI, M. N.; et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of fecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 6 n. 5, p. 479-493, 2017.  
doi:10.1111/apt.14201

RAO, K.; HIGGINS, P. D. R.; YOUNGA, V. B. An Observational Cohort Study of *Clostridium difficile* Ribotype 027 and Recurrent Infection. **mSphere**, v.3e00033-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00033-18>.

RILEY, T. V; LYRAS D.; DOUCE, G. R. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. **Vaccine**, v. 37, n. 50, p :7300-7306, 2019.  
doi:10.1016/j.vaccine.2019.02.052

RODRIGUEZ, C., et al. *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. **Microb Pathog**. v.97, p :59-78, 2016.  
doi:10.1016/j.micpath.2016.05.018

RUPNIK, M.; et al. Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes and high proportion of 027 and 176 in some hospitals in four South Eastern European countries. **Anaerobe**, v. 42, p. 142–144, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.005>>. .

RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 526–536, 2009. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2164>>. .

SALDANHA G. Z., et al. Genetic relatedness, Virulence factors and Antimicrobial Resistance of *C. difficile* strains from hospitalized patients in a multicentric study in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**. v.22, p :117-121,2020.  
doi:10.1016/j.jgar.2020.01.007

SCHÄFFLER, H.; BREITRÜCK, A. *Clostridium difficile* - From colonization to infection. **Frontiers in Microbiology**, n.9, p,646, 2018.  
doi:10.3389/fmicb.2018.00646

SCHWAN, A.; et al. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of homologous faeces. **The Lancet**, v. 2 (8354), p. 845, 1983.  
doi: 10.1016 / s0140-6736 (83) 90753-5

SECCO, D. A.; et al. *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. **Anaerobe**, v. 28, p. 85–89, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.013>

SEEKATZ, A. M.; et al. Presence of multiple *Clostridium difficile* strains at primary infection is associated with development of recurrent disease. **Anaerobe**, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.017>>. .

SHARP et al. Evaluation of the C.diff Quick Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. **J Clin Microbiol**. v.48, n.6, p:2082-2086, 2010. doi:10.1128/JCM.00129-10

SILVA, R. O. S.; et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 4, p. 447–450, 2014. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0100-2014>

SILVA, R. O. S.; et al. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1062–1065, 2015.  
doi:10.1590/0074-02760150294

SMITS W, K.; et al. *Clostridium difficile* infection. **Nat Rev Dis Primers**. v. 2:16020, 2016. doi:10.1038/nrdp.2016.20

SONG, J. H.; KIM, Y. S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: Risk factors, treatment, and prevention. **Gut and Liver**, v. 13, n. 1, p. 16–24, 2019.  
doi:10.5009/gnl18071

SPADÃO, F.; et al. Incidence of diarrhea by *Clostridium difficile* in hematologic patients and hematopoietic stem cell transplantation patients : risk factors for. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 325–331, 2014. .  
<http://doi.org/10.1590/S0036-46652014000400010>

STATA CORP. Stata Statistical Software: Release 13. College Station, TX: StataCorp LP, 2013.

STEVENS, V.; et al. Comparative Effectiveness of Vancomycin and Metronidazole for the Prevention of Recurrence and Death in Patients with *Clostridium difficile* Infection. **JAMA Intern Med.** v.177, n. 4, p.546-553, 2017. doi:10.1001/jamainternmed.2016.9045

SURAWICZ, C.M.; et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. **Am J Gastroenterol**, v.108, n.4, p.478-499, 2013. doi:10.1038/ajg.2013.4

TAMMA, P. D., SANDORA, T. J. *Clostridium difficile* Infection in Children: Current State and Unanswered Questions. **J Pediatric Infect Dis Soc.**v.1, n. 3, p:230-243, 2012. doi:10.1093/jpids/pis071

TAN, X.; JOHNSON, S. Fecal microbiota transplantation (FMT) for *C. difficile* infection, just say 'No'. **Anaerobe**, v. 60 (102092), 2019. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.102092

TEDESCO, F. J.; BARTON, R. W.; ALPERS, D. H. Clindamycin-Associated Colitis. A prospective study. **Ann Intern Med**, v. 81, n. 4, p. 429-433, 1974. doi:10.7326/0003-4819-81-4-429

TENOVER, F. C.; et al. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection: Can molecular amplification methods move us out of uncertainty? **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 6, p. 573–582, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.06.001

TICKLER, I. A.; et al. Changes in molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in the United States between 2011 and 2017. **Anaerobe**, v. 60, p. 102050, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.003>. .

TIRLAPUR, N.; et al. Diarrhoea in the critically ill is common, associated with poor outcome, and rarely due to *Clostridium difficile*. **Sci Rep**, v. 6:24691, 2016. https://doi.org/10.1038/srep24691.

TRINDADE, C. N. R.; DOMINGUES, R. M. C. P. ; FERREIRA, E. O. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. **Anaerobe**, v. 58, p. 13–21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.002>.

TURNER, N. A.; ANDERSON, D.J. Hospital Infection Control: *Clostridioides difficile*. **Clin Colon Rectal Surg.** v.33, n.2 p: 98-108, 2020. doi:10.1055/s-0040-1701234

TURNER, N. A.; SMITH, B.A.; LEWIS, S. S. Novel and emerging sources of *Clostridioides difficile* infection. **PLoS Pathog.** 15 (12): e1008125, 2019, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008125

VARDAKAS, K.Z.; et al. Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. **Int J Antimicrob Agents**. v.40. n. 1, p. 1-8, 2012. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.004

VAUSTAT, D. Glutamato deshidrogenasa . Su valor diagnóstico en la. **Revista Argentina de Microbiología**, , n. xx, p. 8–12, 2017. Elsevier España, S.L.U. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.006>>. .

VICENT, J. L.; et al. The SOFA (sepsis related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. **Intensive Care Med**; 22 (1996):707-710. <https://doi.org/10.1007/bf01709751>

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* Toxins : Mechanism of Action and Role in Disease *Clostridium difficile* Toxins : Mechanism of Action and Role in Disease. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 18, n. 2, 2005. doi:10.1128/CMR.18.2.247-263.2005

WANG, Y.; et al. Dose addition of intravenous metronidazole to oral vancomycin improve outcomes in *Clostridioides difficile* infection? **Clin Infect Dis**, ciz1115. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1115>

WATSON, T.; et al. Evaluating the risk factors for hospital-onset *Clostridium difficile* infections in a large healthcare system. **Clin Infect Dis**, v. 66, p: 1957-1959, 2018. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1112>

XU, M.; et al. Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 102–111, 2015. doi: 10.3748 / wjg. v21.i1.102

ZAR, F. A.; et al. A Comparison of Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea, Stratified by Disease Severity. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, n. 3, p. 302–307, 2007. <https://doi.org/10.1086/519265>

## APÊNDICE 1 – ARTIGO PUBLICADO

Anaerobe 64 (2020) 102238



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anaerobe](http://www.elsevier.com/locate/anaerobe)

Clostridioides difficile (including epidemiology)

Multicenter study of the epidemiology of *Clostridioides difficile* infection and recurrence in southern Brazil

Adriane Ceschin Maestri <sup>a</sup>, Sonia Mara Raboni <sup>b</sup>, Hugo Manuel Paz Morales <sup>b, c</sup>,  
Leonardo Filippetto Ferrari <sup>d</sup>, Felipe Francisco Bondan Tuon <sup>b, e</sup>, Alexandre Losso <sup>d</sup>,  
Camila Marconi <sup>f</sup>, Keite da Silva Nogueira <sup>a, f, \*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Bacteriology, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Rua Padre Camargo, 280 - Alto da Glória, CEP: 80.062-240, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Infectious Diseases Unit, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Rua General Carneiro, 181 - Alto da Glória, CEP: 80.060-900, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital Erasto Gaertner, Rua Dr. Ovande do Amaral, 201 - Jardim das Américas, CEP: 81520-060, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Medical School, Universidade Federal do Paraná, Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, CEP: 80.062-240, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Emerging Infectious Diseases (LEID), Pontifícia Universidade do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, CEP: 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>f</sup> Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Avenida Coronel Francisco H. dos Santos, 100 - Jardim das Américas, CEP: 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 March 2020

Received in revised form

17 June 2020

Accepted 29 June 2020

Available online 24 July 2020

Handling Editor: Paola Mastrantonio

## Keywords:

*Clostridioides difficile*

Antibiotic-associated diarrhea

Pseudomembranous colitis

## ABSTRACT

*Clostridioides (Clostridium) difficile* is the main etiology underlying antibiotic-associated diarrhea (AAD). Still, few Brazilian data are available on this infection. The aims of this multicenter study were to identify the prevalence, clinical characteristics, and outcomes of *C. difficile* infection (CDI) in patients with antibiotic associated diarrhea at eight hospitals in Curitiba, southern Brazil, during the years 2017–2019. Stool samples were tested using enzyme immunoassay for glutamate dehydrogenase antigen (GDH) and A/B toxins. Positive GDH samples were further evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR) for the presence of genes encoding toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdt*), and marker of hypervirulent *C. difficile* strain (*tcdC* deletion). The prevalence of CDI in 351 patients with AAD included in the study was 17.7% (n = 62). Among the CDI cases, *tcdB* was positive in all 62 stool samples, while *cdt* was positive in 10 samples, and *tcdC* deletion was positive in only two. Carriage of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli, previous hospitalization, and use of broad-spectrum cephalosporin and carbapenem were associated with CDI. Among patients with CDI, 64.5% presented with severe diarrhea, and 8% (5/62) progressed with colitis and required intensive care. The 30-day mortality was 24% (15/62), and the CDI-associated mortality was 4.8% (3/62). Overall, 83.8% (52/62) of the patients achieved primary cure, and 20.8% of the evaluated patients (10/48) presented CDI recurrence. The treatment administered was not significantly associated with the 60-day recurrence or mortality. In conclusion, we reported in this study data of prevalence and recurrence rates of CDI in patients with AAD and evaluated the number of severe cases and infection-related mortality, which were up to now unknown in Southern Brazilian hospitals.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Estudo da prevalência e de estratégias de diagnósticos da infecção por *Clostridioides difficile*

Nome da Pesquisadora Principal ou Orientadora: Keite da Silva Nogueira

Nome dos Pesquisadores assistentes: Adriane Ceschin Maestri, Hugo Manuel Paz Morales, Alexandre Westephal Losso, Leonardo Filipetto Ferrari.

- **Natureza da pesquisa:** o (a) Sr.(a) \_\_\_\_\_ que está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade avaliar dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de diarreia infecciosa em crianças atendidas em hospitais de Curitiba.
- **Participantes da pesquisa:** Os pacientes atendidos nos hospitais de Curitiba participantes da pesquisa com diarreia (3 ou mais evacuações não formadas) e que tenham usado antibiótico há menos que 90 dias ou terem feito quimioterapia há menos que 30 dias.
- **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo o Sr (a) permitirá que o (a) pesquisador (a) colete duas amostras de fezes e utilize os dados do internamento do menor contidos no prontuário (registro médico) e dados referentes aos exames realizados no laboratório de microbiologia. O (a) Sr (a) tem liberdade de se recusar a autorizar a participação do menor e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o (a) Sr (a). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa. O menor não será identificado nominalmente, e em nenhum momento da pesquisa ou da divulgação dos dados da pesquisa esse sigilo será quebrado, não colocando em risco sua identidade.

- **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa poderá trazer desconforto no momento da coleta das fezes. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Para minimizar um possível desconforto no momento da coleta da amostra, será fornecido utensílio próprio (comadre) onde tornará a coleta da amostra mais confortável e esta será feita pela pessoa responsável pelo menor ou pela equipe da enfermagem não causando assim nenhum constrangimento.
- **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e o (a) orientador (a) terão conhecimento dos dados.
- **Benefícios:** ao participar desta pesquisa o (a) Sr (a) terá à disposição exames que poderão ajudar o médico assistente a identificar a causa da diarreia.
- **Ressarcimento e Indenização:** Caso ocorra qualquer despesa decorrente a participação na pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, bem como a meu acompanhante (se for o caso), haverá ressarcimento dos valores gastos em dinheiro. De igual maneira caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei. O participante da pesquisa receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo patrocinador), pelo tempo que for necessário em caso de danos comprovadamente decorrentes da pesquisa

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

Obs.: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa. Declaro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do Responsável Legal do Participante da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável Legal do Participante da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Orientador

Pesquisador principal: KEITE DA SILVA NOGUEIRA (41) 999003513. Demais pesquisadores: ADRIANE CESCHIN MAESTRI (41) 99187-2220, HUGO MANUEL PAZ MORALES (41) 998367100, LEONARDO FILIPETTO FERRARI (41)999349566, ALEXANDRE WESTEPHAL LOSSO (41) 999190941.

### APÊNDICE 3 – FICHA PARA INCLUSÃO NO ESTUDO



Projeto “ Estudo da prevalência e de estratégias de diagnósticos da infecção por *Clostridium difficile*”

Instituição:			
Paciente:			
ID Paciente		Unidade	
Idade		Sexo	
Data internamento		Data e hora da coleta	

Dados Clínicos (critérios de inclusão/exclusão):

1. Paciente apresentou diarreia (mais de 3 episódios em 24h)  Sim  Não
2. Paciente internado a 48h ou mais  Sim  Não
3. Paciente apresenta diarreia crônica  Sim  Não
4. Uso de antibióticos nos últimos 90 dias  Sim  Não
5. Uso de imunossupressores, quimioterapia ou radioterapia nos últimos 30 dias  Sim  Não
6. Internamento com outro paciente portador de diarreia por *Clostridium difficile*  Sim  Não
7. Presença de ileostomia, colostomia ou ressecção colônica maior do que a hemicolectomia;  Sim  Não
8. Obstrução/ suboclusão intestinal;  Sim  Não
9. Sangramento ou hemorragia intestinal grave;  Sim  Não
10. Paciente em uso de laxante  Sim  Não

Responsável:

Email ou telefone para envio do Laudo:

Enviar para:

Keite Nogueira ou Adriane Ceschin

Laboratório de Bacteriologia – ULAC-CHC-UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba -PR.



Importante: Coletar em frasco estéril sem meio de transporte e manter em geladeira até envio ao laboratório.

Enviar a amostra em caixa com gelo ao laboratório de Bacteriologia do CHC-UFPR em no máximo 24 horas.

## APÊNDICE 4 – DADOS CLÍNICOS



Projeto “ Estudo da prevalência e de estratégias de diagnósticos da infecção por *Clostridium difficile*”

No. Ficha \_\_\_\_\_

### AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA

Data da avaliação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hospital: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Registro do paciente: \_\_\_\_\_ Data Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F Telefone / Celular: \_\_\_\_\_

Data da internação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data da alta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Unidade de internação: ( ) enfermaria ( ) UTI Se UTI, APACHE II de admissão: \_\_\_\_\_

Unidade de Internação do dia do Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Nº do quarto/enfermaria: \_\_\_\_\_

### FATORES DE RISCO

#### Fator de risco até o momento do diagnóstico

Internação nos últimos 90 dias ( ) sim ( ) não

Instituição de longa permanência ( ) sim ( ) não

Outras infecções nos últimos 90 dias ( ) sim ( ) não Sítios? \_\_\_\_\_

Ranitidina / omeprazol nos últimos 7 dias? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

AINE ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Dieta via sonda enteral? ( ) sim ( ) não

Cirurgia abdominal nos últimos 90 dias ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

História prévia de *C. difficile*? ( ) sim ( ) não Quando? \_\_\_\_\_

Colonizado por bactéria MR ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Creatinina da internação: \_\_\_\_\_ Hemodiálise ( ) sim ( ) não

Imunossupressor ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Todos os dados deverão ser do dia do início da diarreia

Data de início da diarreia \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data de término da diarreia \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nº episódios por dia : \_\_\_\_ Presença de muco ou sangue ( ) sim ( ) não

Vômitos ( ) sim ( ) não Dor abdominal ( ) sim ( ) não

Temperatura max: \_\_\_\_\_ Leucócitos: \_\_\_\_\_ Neutrófilos (%): \_\_\_\_\_

Bastões (%): \_\_\_\_\_ Plaquetas: \_\_\_\_\_ Creatinina: \_\_\_\_\_

Albumina: \_\_\_\_\_ PCR: \_\_\_\_\_ Lactato: \_\_\_\_\_

**ANTIBIÓTICOS**

Antibióticos prévios nos últimos 90 dias (nome, posologia, dias de tratamento):

---



---



---



---

Tratamento:

( ) Metronidazol VO Dose: \_\_\_\_\_ Data de início \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data de término \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Metronidazol EV Dose: \_\_\_\_\_ Data de início \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data de término \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Vancomicina VO Dose: \_\_\_\_\_ Data de início \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data de término \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Vancomicina retal Dose: \_\_\_\_\_ Data de início \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data de término \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) outros: \_\_\_\_\_

( ) Sem tratamento para *C.difficile*

Continuou com ATB prévio (qual? até qual data?) \_\_\_\_\_

---

**EVOLUÇÃO**

Necessidade de cirurgia pela colite ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Admissão em UTI ( ) sim ( ) não Se sim, APACHE: \_\_\_\_\_

Necessidade de IOT ( ) sim ( ) não Choque (droga vasoativa) ( ) sim ( ) não

Necessidade de hemodiálise ( ) sim ( ) não Íleo paralítico ( ) sim ( ) não

Megacólon tóxico ( ) sim ( ) não Cm de dilatação: \_\_\_\_\_

Colonoscopia: ( ) sim ( ) não Laudo: \_\_\_\_\_

Tomografia de abdome: ( ) sim ( ) não Laudo: \_\_\_\_\_

**DESFECHO**

Resposta ao final do tratamento Data ao final do tratamento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Resolução sintomas ( ) reposta parcial ( ) sem resposta ( ) piora

Recidiva? ( ) sim ( ) não Quantos dias após tratamento? \_\_\_\_\_

Óbito em 30 dias? ( ) sim ( ) não Motivo do óbito? \_\_\_\_\_

Data óbito: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Outras observações

---



---



---



---



---



---



---



---

Responsável pelo preenchimento: \_\_\_\_\_

**ESCORE DE CHARLSON DO DIA DA INTERNAÇÃO**

Comorbidade	S/N	Escore
DM (1)		
Infarto do miocárdio (1)		
Insuficiência Cardíaca Congestiva (1)		
Doença Vascular Periférica (1)		
Doença Cerebrovascular (1)		
Demência (1)		
Doença Pulmonar Crônica (1)		
Doença do Tecido Conjuntivo (1)		
Úlcera (1)		
Doença Hepática leve (1)		
Hemiplegia (2)		
Doença Renal moderada ou grave (2)		
DM com lesão de órgão (2)		
Tumor sólido sem metástase (2)		
Leucemia (2)		
Linfoma (2)		
Doença Hepática moderada ou severa (3)		
Tumor sólido metastático/ Neoplasia (6)		
HIV/AIDS (6)		
Outros ( )*		
TOTAL	----	

\*Quais: \_\_\_\_\_

**SOFA SCORE DO DIA DO INÍCIO DA DIARREIA**

O pior na data de início da diarreia	
FiO <sub>2</sub> (%)	
PaO <sub>2</sub>	
Ventilação mecânica (s/n)	
Bilirrubina (mg/dL)	
Glasgow	
Pressão Arterial Média (mmHg)	
Droga vasoativa (dopamina e/ou noradrenalina?; Quanto?)	
Creatinina (mg/dL)	
Diurese (mL/dia)	
TOTAL	

## APÊNDICE 5 – ORIENTAÇÕES SOBRE O ESTUDO

HOSPITAL DE CLÍNICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LABORATÓRIO DE  
ANÁLISES CLÍNICAS

LABORATÓRIO DE  
DIAGNÓSTICO  
POR IMAGEM

EBSERH  
EMPRESA DE SERVIÇOS DE SAÚDE

SECRETARIA DE  
EDUCAÇÃO

BRASIL

# INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA DE DIARREIA AGUDA RELACIONADA A ASSISTÊNCIA A SAÚDE

### Critérios de inclusão (preencher os 3):

- 1)  $\geq 18$  anos.
- 2)  $\geq 3$  evacuações de fezes não formadas em 24 horas,
- 3) Estar internado na Instituição Participante

### E presença de pelo menos um dos seguintes critérios abaixo:

- Uso de antibióticos nos últimos 90 dias
- Uso de imunossupressores, quimioterapia ou radioterapia nos últimos 30 dias
- Internamento por mais de 48 horas no mesmo quarto ou espaço físico junto com outro paciente portador de diarreia por *Clostridium difficile*
- 48 horas de internamento

### Critérios de exclusão:

Presença de ileostomia, colostomia ou ressecção colônia maior do que a hemicolectomia

Obstrução / suboclusão intestinal

Sangramento ou hemorragia intestinal grave

Diarreia crônica

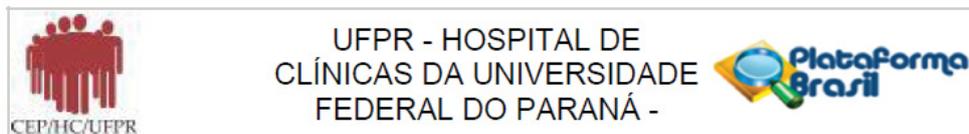
Uso de laxantes/enema nas últimas 48 hrs

Orientar coleta do material em um pote estéril sem meio de transporte.



Armazenar em geladeira e enviar com gelo em até 24 horas ao Laboratório do Hospital de Clínicas - Rua Padre Camargo, 280, Setor de Bacteriologia - fone: 3360-7975.

## ANEXO 1- TERMO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo da prevalência e de estratégias de diagnósticos da infecção por Clostridium difficile

**Pesquisador:** Adriane Ceschin Maestri

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 59027716.5.1001.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.919.837

#### Apresentação do Projeto:

O estudo proposto é um estudo clínico laboratorial, com finalidade de obter dados epidemiológicos e também uma melhoria no diagnóstico da infecção por C. difficile

#### Objetivo da Pesquisa:

Determinação da incidência da Infecção por C. difficile no hospital e melhora no diagnóstico dessa infecção, estabelecendo um método com bom custo-benefício visando otimizar o tratamento e reduzir a disseminação.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Devidamente apresentados

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pendências atendidas pelo pesquisador conforme solicitado por este CEP.

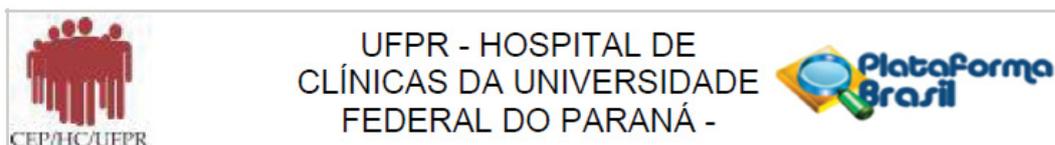
#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Devidamente apresentados

#### Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181  
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900  
 UF: PR Município: CURITIBA  
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.919.837

pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências devidamente atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_723527.pdf	19/10/2016 20:51:03		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	parecer.pdf	19/10/2016 20:49:29	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso.pdf	26/06/2016 18:58:55	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	resultado_publico.pdf	26/06/2016 18:56:14	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	uso_especifico.pdf	26/06/2016 18:55:50	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	confidencialidade.pdf	26/06/2016 18:55:18	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculum_lattes.pdf	26/06/2016 18:50:33	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_responsabilidade_pesquisadores.pdf	26/06/2016 18:49:00	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Brochura Pesquisa	pesquisa.docx	04/06/2016 17:48:57	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração do	patrocinador.pdf	04/06/2016	Adriane Ceschin	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181  
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900  
 UF: PR Município: CURITIBA  
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.919.837

Patrocinador	patrocinador.pdf	17:36:54	Maestri	Aceito
Orçamento	or.pdf	04/06/2016 17:18:13	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	04/06/2016 17:00:42	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/06/2016 09:39:36	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	orientador.pdf	04/06/2016 09:10:08	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	guarda.pdf	04/06/2016 09:07:53	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP.doc	04/06/2016 09:07:31	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	comp_pesquisadores.pdf	04/06/2016 08:56:51	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ULAC.pdf	04/06/2016 08:53:14	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	04/06/2016 08:49:54	Adriane Ceschin Maestri	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 14 de Fevereiro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Renato Tambara Filho**  
**(Coordenador)**

**ANEXO 2- PROJETO FINANCIADO PELA FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA****Projeto PPSUS - EFP\_00012729****Dados do Edital****Tipo do fomento**

Fomento PPSUS

**Sigla do Edital**

EFD\_00000115

**Nome do Edital**

Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS Edição 2015 Fundação Araucária-PR / SESA-PR / MS-Dect/ CNPq

**Dados do Projeto****Sigla do Projeto**

EFP\_00012729

**Título**

Estudo da prevalência e de estratégias de diagnósticos da infecção por Clostridium difficile

**Modalidade de Gestão**

Estudo Multicêntrico

**Setor de aplicação da Pesquisa**

Desenvolvimento conceitual ou metodológico