

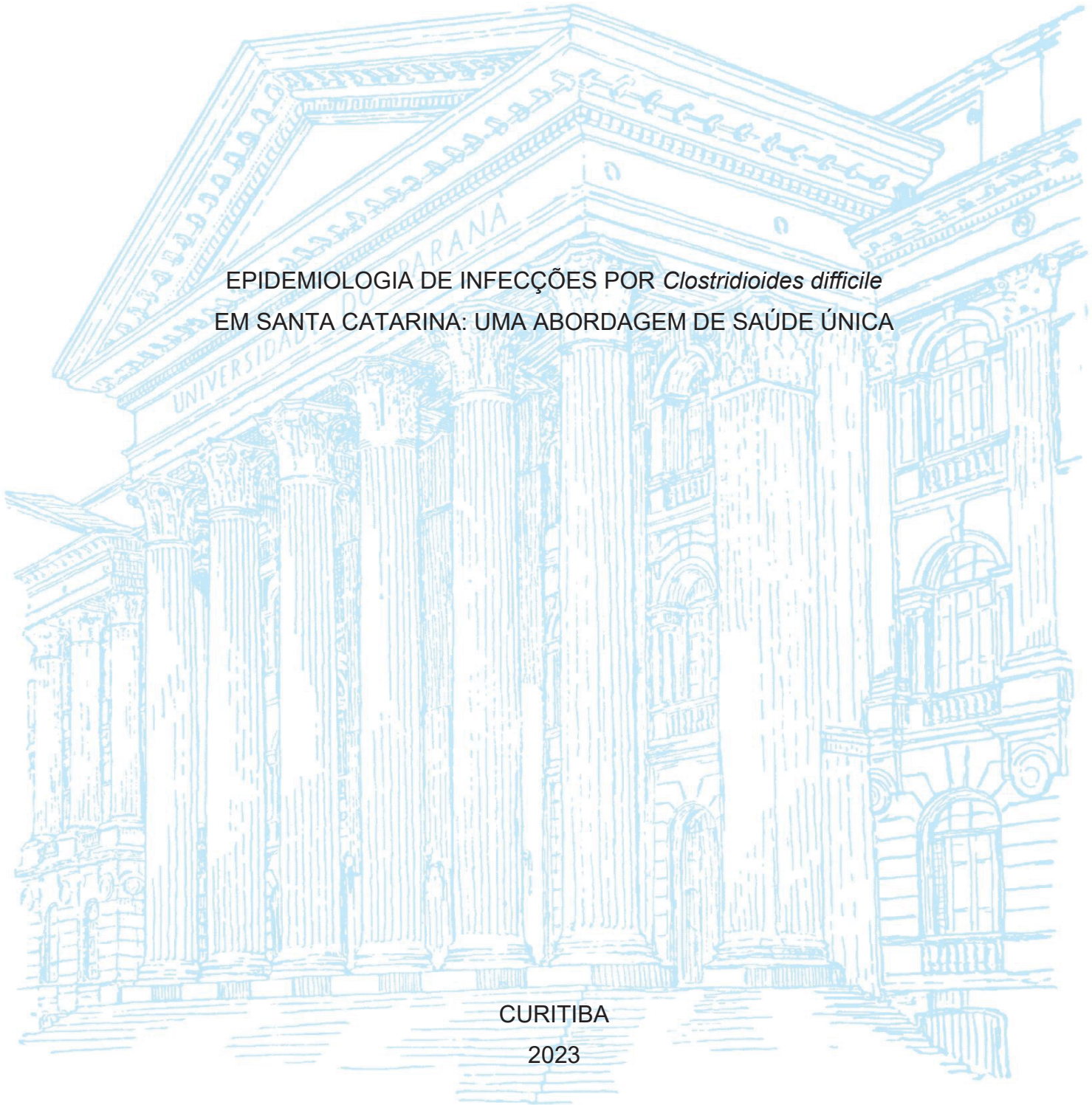
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA DE CASTILHO

EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES POR *Clostridioides difficile*
EM SANTA CATARINA: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA

CURITIBA

2023



FERNANDA DE CASTILHO

EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES POR *Clostridioides difficile* EM SANTA
CATARINA: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Castilho, Fernanda de

Epidemiologia de infecções por *Clostridioides difficile* em Santa Catarina : uma abordagem de saúde única / Fernanda de Castilho.
– Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira.

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Conrado de Oliveira Silveira.

1. Diarréia. 2. Anti-infecciosos. 3. Enteropatias parasitárias. I.
Nogueira, Keite da Silva, 1980-. II. Silveira, Alessandro Conrado de
Oliveira. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA DE CASTILHO** intitulada: **Epidemiologia de infecção por *Clostridioides difficile* em Santa Catarina: uma abordagem de Saúde Única**, sob orientação da Profa. Ma. KEITE DA SILVA NOGUEIRA, 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 mestra 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, 28 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica
02/05/2023 12:49:32.0
KEITE DA SILVA NOGUEIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/05/2023 11:02:15.0
CAMILA MARCON
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
05/05/2023 12:30:27.0
ELEINE KUROKI ANZAI
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DE
BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica
05/05/2023 14:11:48.0
ALESSANDRO CONRADO DE OLIVEIRA SILVEIRA
Coorientador(a) (55002068)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho e me guiar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Luciane e Gildomar, que nunca mediram esforços para incentivar meu estudo, e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida. Sem vocês, eu não chegaria até aqui. Também à minha família, que sempre acreditou no meu sonho e me motiva a seguir em frente. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

À minha orientadora, Professora Keite Nogueira, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança, pela orientação exemplar e empenho em enriquecer este trabalho com uma visão crítica e de elevado rigor científico. Sobretudo, agradeço pela amizade, apoio e compreensão desde que nos conhecemos no Programa de Pós-Graduação em Bacteriologia Clínica da FURB, no qual iniciamos nossa caminhada juntas e projetamos planos para este trabalho. Obrigada também à Alice e à Marly, por me acolherem inúmeras vezes e me apoiarem com carinho nesta jornada.

Ao meu coorientador, Professor Alessandro Silveira, pelos ensinamentos que transcendem os limites da Universidade. Agradeço por me acompanhar e me aconselhar desde meus primeiros passos na graduação até hoje; que nossa amizade e parceria permaneçam e ainda rendam muitos frutos.

À Professora Eleine Anzai, toda equipe do LacVet do Hospital Escola Veterinário da FURB e a discente Lara Teiss, por me permitirem analisar as amostras animais e me fornecerem meios para a realização dos experimentos. Vocês foram o alicerce deste projeto. Muito obrigada!

À Professora Mara Sheffer e toda equipe do HU-UFSC, bem como ao microbiologista Marcelo, por me auxiliarem atenciosamente na coleta de amostras hospitalares em Florianópolis e Blumenau.

À equipe do laboratório de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial à Adriane Maestri, por me acolherem tão carinhosamente e por toda a ajuda durante a realização deste trabalho.

Por fim, à equipe de docentes e discentes dos laboratórios de Microbiologia e Genética da Universidade Regional de Blumenau, que não mediram esforços e caridosamente abraçaram este projeto.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”
[FERNANDO PESSOA, 1982]

RESUMO

Clostridioides (Clostridium) difficile tem sido reportado como um importante patógeno em infecções relacionadas a serviços de saúde e de grande potencial zoonótico. Nenhum teste isolado é adequado para confirmar a infecção, sendo a melhor maneira de otimizar o diagnóstico combinar pelo menos dois testes no algoritmo de detecção. Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil epidemiológico da infecção por *C. difficile* em humanos sintomáticos e a prevalência de colonização em animais silvestres da região, independente da presença de sintomas, no Estado de Santa Catarina, Brasil. Entre fevereiro e setembro de 2022, foram incluídos pacientes humanos hospitalizados de duas instituições de referência no Estado, que estivessem internados há mais de 48 horas e que apresentaram diarreia ou que tiveram solicitação para pesquisa de toxinas A/B nas fezes. No mesmo período, foram coletadas 185 amostras fecais ou swab retal/cloacal de animais silvestres da região, resgatados pela Polícia Militar Ambiental e atendidos clinicamente no Hospital Escola Veterinário da Universidade Regional de Blumenau. Todas as amostras coletadas foram submetidas a um pré-tratamento e, em seguida, foram semeadas em ágar Brucella suplementado. Após a incubação, colônias sugestivas de *C. difficile* foram examinadas quanto a morfologia característica por coloração de Gram e submetidas a identificação por MALDI-TOF MS (Bruker®, Massachusetts, EUA). Em adição, as amostras humanas passaram por testes de triagem utilizando imunoensaio enzimático para glutamato desidrogenase e toxinas A/B, e foram testadas por Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) para detecção do gene da Toxina B (*tcdB*) nas fezes. A prevalência de infecção por *C. difficile* encontrada em pacientes humanos hospitalizados foi de 7,3% (3/41), através da detecção de *C. difficile* toxigênico por imunoensaio enzimático. Em animais silvestres, a prevalência do patógeno foi nula. Entretanto, os resultados encontrados são o primeiro passo para compreender os microrganismos anaeróbios esporulados que colonizam o trato gastrointestinal dos animais silvestres da região estudada, bem como o primeiro relato de prevalência de *C. difficile* em pacientes humanos sintomáticos no Estado de Santa Catarina, Brasil.

Palavras-chave: Diarreia associada a antimicrobianos. Colonização intestinal. Infecção intestinal.

ABSTRACT

Clostridioides (Clostridium) difficile has been reported as an important pathogen in healthcare-related infections and has demonstrated zoonotic potential. No single test is adequate to confirm the infection, and the best way to optimize the diagnosis is to combine at least two tests in the detection algorithm. Thus, the objective of this study was to characterize the epidemiological profile of *C. difficile* infection in symptomatic humans and the prevalence of colonization in wild animals in the region, regardless of the presence of symptoms, in the State of Santa Catarina, Brazil. Between February and September 2022, human patients hospitalized at two reference institutions in the State, who had been hospitalized for more than 48 hours and who had diarrhea or who had a request for A/B toxins in their stools, were included. In the same period, 185 fecal samples or rectal/cloacal swabs were collected from wild animals in the region, rescued by the Environmental Military Police and clinically treated at the Veterinary Hospital of the Regional University of Blumenau. All collected samples were observed at a pre-treatment and then were seeded on supplemented Brucella agar. After incubation, colonies suggestive of *C. difficile* were examined for characteristic morphology by Gram stains and observed for identification by MALDI-TOF MS (Bruker®, Massachusetts, USA). In addition, human samples underwent screening tests using enzyme immunoassay for glutamate dehydrogenase and A/B toxins, and were tested by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) for detection of the Toxin B gene (*tcdB*) in feces. The prevalence of *C. difficile* infection found in hospitalized human patients was 7.3% (3/41), through detection of toxigenic *C. difficile* by enzyme immunoassay. In wild animals, the prevalence of the pathogen was null. However, the results found are the first step towards understanding the sporulated anaerobic microorganisms that colonize the gastrointestinal tract of wild animals in the abandoned region, as well as the first report on the prevalence of *C. difficile* in symptomatic human patients in the State of Santa Catarina, Brazil.

Keywords: Antimicrobial-associated diarrhea. Intestinal colonization. Intestinal infection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROCESSOS DE COLONIZAÇÃO ASSINTOMÁTICA À INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i>	18
FIGURA 2 - PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i>	19
FIGURA 3 - ALGORITMOS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR <i>C. difficile</i>	23
FIGURA 4 – FLUXO METODOLÓGICO PARA PESQUISA DE <i>C. difficile</i>	37
FIGURA 5 – RESULTADOS DA PESQUISA DE <i>C. difficile</i> EM HUMANOS SINTOMÁTICOS	40
FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DAS AMOSTRAS DE ANIMAIS SILVESTRES	45
FIGURA 7 – RESULTADOS DA PESQUISA DE <i>C. difficile</i> EM ANIMAIS SILVESTRES	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE HUMANOS.....	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCEY	Ágar cicloserina cefoxitina gema de ovo
CCFA	Ágar cicloserina cefoxitina frutose
CCNA	Teste de neutralização de citotoxicidade celular
CDT	<i>C. difficile</i> transferase ou toxina binária
CT	Cultura toxigênica
EIE	Imunoensaio enzimático
ESCMID	Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas
GDH	Glutamato desidrogenase
ICD	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
IDSA	Sociedade de Doenças Infecciosas da América
MALDI-TOF	Espectrometria de massa de tempo de voo por dessorção/ionização à laser assistido por matriz
NAAT	Teste de amplificação de ácidos nucleicos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SHEA	Sociedade de Epidemiologia em Saúde da América
<i>tcd A</i>	Gene da toxina A
<i>tcdB</i>	Gene da toxina B
<i>tcdC</i>	Gene regulador negativo da expressão de toxina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 JUSTIFICATIVA	13
1.2 OBJETIVOS	13
1.2.1 OBJETIVO GERAL	13
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DA COLONIZAÇÃO À PATOGÊNESE	15
2.2 DIAGNÓSTICO	20
2.3 EPIDEMIOLOGIA	24
2.4 DISSEMINAÇÃO ZONÓTICA E AMBIENTAL	26
2.4.1 ANIMAIS DE PRODUÇÃO	26
2.4.2 ANIMAIS DOMÉSTICOS	29
2.4.3 ANIMAIS DE VIDA LIVRE	30
2.4.4 MEIO AMBIENTE	31
2.5 TRATAMENTO	32
3 METODOLOGIA	35
3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO	35
3.2 COLETA DE DADOS E DE AMOSTRAS CLÍNICAS	36
3.3 ANÁLISE LABORATORIAL	36
3.3.1 CULTIVO, IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA	37
3.3.2 DETECÇÃO DOS GENES DAS TOXINAS NAS FEZES POR PCR	38
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 AMOSTRAS HUMANAS	40
4.2. AMOSTRAS ANIMAIS	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE 1 – PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS HUMANAS	61
APÊNDICE 2 – PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS ANIMAIS	63
APÊNDICE 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	67
ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS	69

1 INTRODUÇÃO

Clostridioides (Clostridium) difficile é um bacilo Gram-positivo anaeróbio, formador de esporos e produtor de toxinas, transmitido por via fecal-oral sendo reconhecido como a principal causa de diarreia infecciosa associada ao uso de antimicrobianos. As infecções por *C. difficile* (ICD) podem variar desde diarreia leve e autolimitada, a quadros mais graves como colite pseudomembranosa, megacólon tóxico, sepse e até morte (CZEPIEL *et al.*, 2019). A ICD é definida por: (1) histórico de diarreia documentada (≥ 3 fezes soltas ou líquidas em < 24 horas com sintomas persistentes) sem outra etiologia conhecida, combinado a um teste positivo para *C. difficile* produtor de toxinas, ou (2) diagnóstico clínico baseado na histopatologia ou presença de pseudomembranas na colonoscopia (MCDONALD *et al.*, 2018).

A manutenção de uma microbiota intestinal rica e diversa previne que um indivíduo colonizado desenvolva ICD; por outro lado, a disbiose intestinal pode levar à proliferação de *C. difficile* e produção das toxinas A e B, principais fatores de virulência do patógeno (TERVEER *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos, quase meio milhão de casos de ICD ocorreram em 2011, e 29.000 mortes foram associadas à infecção. Dentre estes casos, 65,8% estavam associados aos serviços de saúde (LESSA *et al.*, 2015). Além disso, a disseminação de cepas hipervirulentas epidêmicas de *C. difficile*, como BI/NAP1/027, tem aumentado significativamente a incidência e a gravidade dessas infecções (GERDING *et al.*, 2014; LEFFLER; LAMONT, 2015; CZEPIEL *et al.*, 2019).

Dados epidemiológicos e sistemas de vigilância ainda são escassos em toda América Latina. No Brasil, os estudos são limitados e pontuais, indicando grande variação na prevalência de ICD, conforme revisado por Trindade, Domingues e Ferreira (2019). Ainda segundo esta revisão sistemática, os estudos brasileiros sobre ICD concentram-se nos estados do Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. Recentemente também foram publicados estudos associados ao estado do Paraná (PIRES *et al.*, 2019; MAESTRI *et al.*, 2020; SALDANHA *et al.*, 2020). Entretanto, não existem estudos sobre o perfil epidemiológico de ICD em Santa Catarina. Supõem-se que a prevalência de ICD no estado assemelha-se às prevalências de 11,8% e 17,7%, obtidas por Pires *et al.* (2019) e Maestri *et al.* (2020) nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, bem como associa-se aos mesmos fatores de risco descritos nestes estudos.

1.1 JUSTIFICATIVA

As infecções por *Clostridioides difficile* são a principal causa de diarreia associada ao uso de antimicrobianos, estando intimamente relacionada ao aumento da morbimortalidade, hospitalização prolongada e aumento dos custos em saúde. Além de um patógeno humano, *C. difficile* também é encontrado em animais para produção alimentícia (suínos, bovinos, ovinos e aves) e animais domésticos (cães e gatos); além disso, a bactéria também foi isolada de uma ampla variedade de fontes/reservatórios no ambiente. Levanta-se a hipótese de que animais domésticos e selvagens podem atuar como vetores de *C. difficile*, disseminando o patógeno entre humanos, animais e meio ambiente (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

O presente trabalho se justifica pela inexistência de informações epidemiológicas da infecção por *Clostridioides difficile* no Estado de Santa Catarina, tanto em humanos quanto em animais. Cabe reconhecer que há pouca informação sobre a incidência de ICD e a disseminação de *C. difficile* no Brasil. Alguns estudos semelhantes ao proposto foram desenvolvidos nos estados do Paraná (MAESTRI *et al.*, 2020), Rio Grande do Sul e São Paulo (PIRES *et al.*, 2019; SALDANHA *et al.*, 2020), não havendo, entretanto, dados regionais catarinenses de paciente humanos, tampouco em animais. Portanto, o presente estudo é pioneiro, e contribui para um panorama epidemiológico mais amplo de saúde única de uma infecção com alto potencial zoonótico. Outro fator relevante a ser discutido é o diagnóstico dessa infecção, o qual muitas vezes é precário ou não está disponível. O correto diagnóstico é essencial no direcionamento terapêutico, além de proporcionar redução da mortalidade, do tempo de internação, dos custos de tratamento e da disseminação do patógeno.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil epidemiológico da infecção por *Clostridioides difficile* em humanos sintomáticos e animais assintomáticos no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a prevalência de infecções por *C. difficile* em pacientes humanos que apresentaram diarreia hospitalar durante a internação nas Instituições participantes;
- b) Determinar a prevalência de colonização por *C. difficile* em animais selvagens resgatados na região do Vale do Itajaí, Santa Catarina, Brasil;
- c) 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;

2 REVISÃO DE LITERATURA

Clostridioides difficile é um bacilo Gram-positivo, anaeróbico, formador de esporos e produtor de toxinas. Anteriormente denominado *Clostridium difficile*, em 2016 foi renomeado como *Clostridioides difficile*, a fim de refletir as diferenças taxonômicas entre esta espécie e outros membros do Gênero *Clostridium* (LAWSON *et al.*, 2016). Os esporos de *C. difficile* são transmitidos pela via fecal-oral e o patógeno está amplamente presente no meio ambiente. Reservatórios incluem o intestino de humanos e de animais domésticos (cães, gatos, aves, suínos), além de ambientes contaminados, como o hospitalar, permitindo a transmissão nosocomial e comunitária do patógeno (LEFFLER; LAMONT, 2015; CZEPIEL *et al.*, 2019). Existem cepas de *C. difficile* toxigênicas e não-toxigênicas, mas apenas as primeiras são patogênicas.

2.1 DA COLONIZAÇÃO À PATOGÊNESE

Inicialmente, Hall e O'Toole (1935) descreveram a presença do microrganismo *Bacillus difficilis* (atual *Clostridioides difficile*), como parte da microbiota intestinal de recém-nascidos. Posteriormente, Bartlett e colaboradores (1977) identificaram que cepas toxigênicas de *C. difficile* eram responsáveis pelo desenvolvimento de colite pseudomembranosa após tratamento com clindamicina. A colonização intestinal assintomática por *C. difficile* ocorre em, aproximadamente, 60% a 70% dos recém-nascidos e lactentes saudáveis. Quando o indivíduo atinge 12 a 24 meses de idade, *C. difficile* é eliminado da microbiota comensal, presumivelmente pelo desenvolvimento gradual da microbiota intestinal adulta (JANGI; LAMONT, 2010).

Vários estudos avaliaram a colonização assintomática por *C. difficile* toxigênico, a qual teve prevalência de 3.1% a 15.7% no momento da admissão hospitalar (EYRE *et al.*, 2013; ALASMARI *et al.*, 2014; DUBBERKE *et al.*, 2015; TERVEER *et al.*, 2017). Embora indivíduos colonizados assintomáticos não apresentem sinais clínicos de ICD, eles podem atuar como um reservatório de *C. difficile* toxigênico, tornando-se carreadores do patógeno e possíveis fontes de infecções (MCFARLAND *et al.*, 1989; TERVEER *et al.*, 2017). Além disso, carreadores assintomáticos de *C. difficile* toxigênico têm um risco seis vezes maior de progredir para ICD, em comparação com pacientes não colonizados (ZACHARIOUDAKIS *et al.*, 2015).

O uso de antimicrobianos, especialmente de amplo espectro, causa o rompimento dessa barreira microbiana natural, constituindo o principal fator de risco

para o desenvolvimento de ICD. Alterações na composição da microbiota podem favorecer ou dificultar a germinação, crescimento e disseminação de *C. difficile* no cólon intestinal (TERVEER *et al.*, 2017). Uma redução da população bacteriana dos filos *Bacteroides* e *Firmicutes* na microbiota intestinal mostrou-se particularmente importante na fisiopatologia da infecção por *C. difficile* (BURKE; LAMONT, 2014; LEFFLER; LAMONT, 2015; AMRANE *et al.*, 2019).

O primeiro passo no estabelecimento de uma infecção é a colonização de um hospedeiro por *C. difficile* patogênico, a qual pode resultar em um portador assintomático ou infecção (EYRE *et al.*, 2013; TERVEER *et al.*, 2017). Capazes de persistir por longos períodos no ambiente, os esporos de *C. difficile* são metabolicamente inativos e altamente resistentes aos procedimentos de desinfecção padrão, como aplicação de calor, ácidos e antibióticos. Após a ingestão, os esporos podem reativar (ou germinar) em resposta a ácidos biliares específicos presentes no intestino do hospedeiro (VEDANTAM *et al.*, 2012; CZEPIEL *et al.*, 2019).

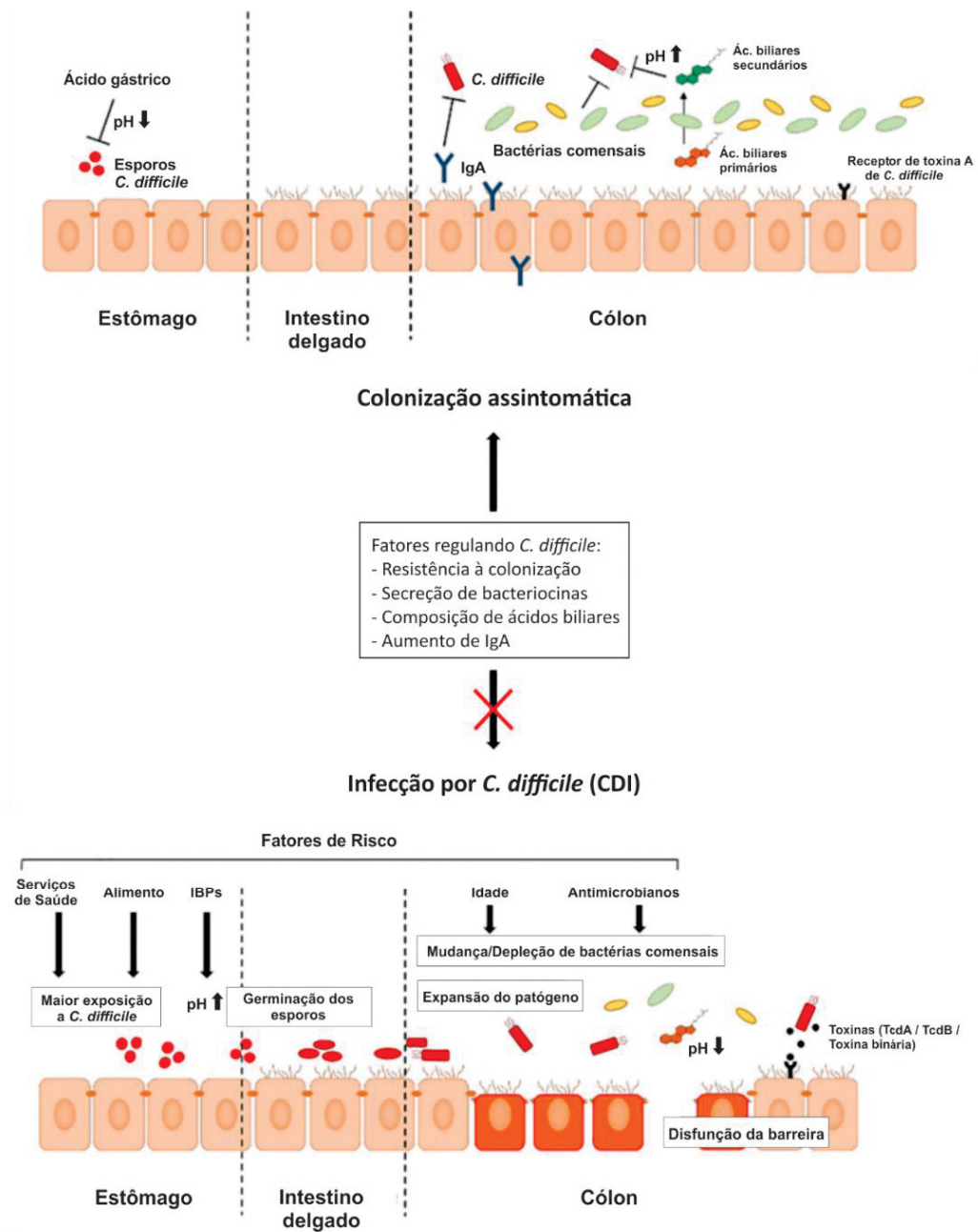
A microbiota intestinal oferece certa resistência à colonização por *C. difficile*, por meio da modulação da germinação de *C. difficile*, competição por nutrientes essenciais e locais de fixação na parede intestinal, dentre outros mecanismos (VEDANTAM *et al.*, 2012). As bactérias da microbiota intestinal são responsáveis pela metabolização dos ácidos biliares primários sintetizados no fígado, transformando-os em ácidos biliares secundários. Conforme descrito na excelente revisão de Baktash *et al.* (2018), os ácidos biliares exercem um papel importante na modulação da germinação de *C. difficile*, entretanto, este processo ainda não foi completamente elucidado. Estudos demonstraram que os ácidos biliares primários geralmente estimulam a germinação de *C. difficile*, enquanto os ácidos biliares secundários inibem este processo (THERIOT; YOUNG, 2015; THANISSERY; WINSTON; THERIOT, 2017). Todavia, esta influência é provavelmente mais complexa do que os modelos simplificados que propõe que os ácidos biliares primários promovem e os ácidos biliares secundários inibem a germinação dos esporos de *C. difficile* (CZEPIEL *et al.*, 2019).

Após à germinação, *C. difficile* adere à camada de muco dos enterócitos pela expressão de adesinas e penetra esta camada com a ajuda de flagelos e proteases. Isso resulta na primeira fase do processo patogênico, a colonização (ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016). Na presença de fatores predisponentes, como disbiose intestinal, *C. difficile* se multiplica e pode ocasionar um processo infeccioso. O

patógeno não é invasivo e a virulência se deve principalmente à ação de enzimas, como colagenase, hialuronidase, condroitina-sulfatase, bem como de toxinas, que danificam o citoesqueleto da célula epitelial e promovem resposta inflamatória local. Como resultado, tem-se a quebra da integridade da barreira intestinal e perda de funcionalidade (THANISSERY; WINSTON; THERIOT, 2017; BAKTASH *et al.*, 2018).

Portanto, diferentes fatores podem impedir que um indivíduo colonizado desenvolva ICD, assim como vários fatores elevam o risco de desenvolvimento da infecção (Figura 1). Conforme revisado por Schaeffler e Breitrueck (2018), primeiramente tem-se a produção de ácido gástrico no estômago, que evita a propagação dos esporos. No intestino, uma microbiota intestinal saudável confere resistência à colonização, pois compete pelo conteúdo nutricional e pode produzir bacteriocinas, limitando a expansão do *C. difficile*. Bridgman *et al.* (2016) demonstraram a correlação entre maior IgA fecal e diminuição da colonização por *C. difficile*, logo, a IgA pode fornecer proteção contra o desenvolvimento e recorrência de ICD. Além disso, mudanças na composição do ácido biliar também podem ter efeito sobre a expansão do *C. difficile* (VEDANTAM *et al.*, 2012; BAKTASH *et al.*, 2018; CZEPIEL *et al.*, 2019).

Por outro lado, o aumento da exposição a *C. difficile*, seja pela alimentação ou exposição frequente aos serviços de saúde, predispõe um indivíduo ao risco de colonização assintomática, que aliada a fatores de risco subjacentes pode progredir para ICD. O uso de antimicrobianos pode agredir a composição bacteriana comensal, levando a uma redução da resistência à colonização, favorecendo o desenvolvimento de ICD. O principal fator de risco associado a ICD é o uso prévio de antimicrobianos, destacando-se a ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas, clindamicina e fluoroquinolonas (LEFFLER; LAMONT, 2015; MIRANDA-KATZ *et al.*, 2020). Outros fatores de risco incluem o aumento da idade, hospitalização prévia, comorbidades, uso de drogas imunossupressoras (ex. corticosteroides), histórico de ICD e uso de medicamentos que reduzem o ácido gástrico, como inibidores da bomba de prótons (IBPs) (DUBBERKE *et al.*, 2015; CANÇADO *et al.*, 2018; SCHAEFFLER; BREITRUECK, 2018). Os fatores envolvidos no processo de colonização, expansão e patogênese de *C. difficile* estão representados na Figura 1.

FIGURA 1 - PROCESSOS DE COLONIZAÇÃO ASSINTOMÁTICA À INFECÇÃO POR *C. difficile*

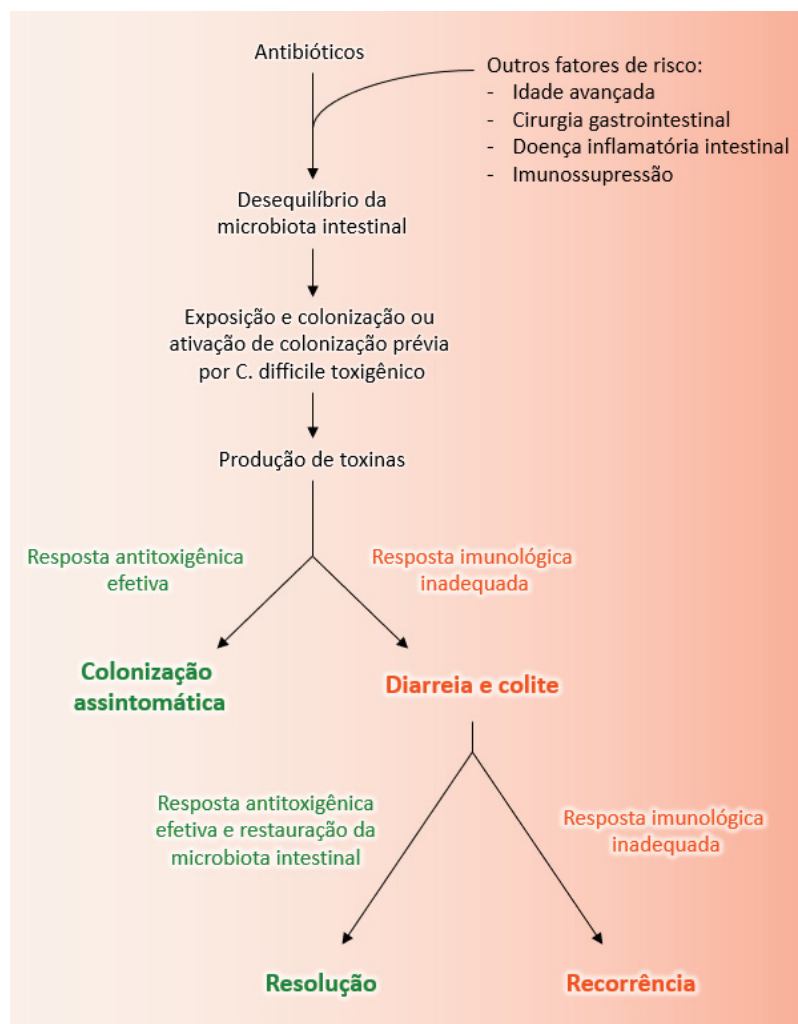
FONTE: adaptado de SCHAEFFLER; BREITRUECK (2018).

Assim, o espectro clínico de *C. difficile* varia desde a colonização assintomática ou doença leve e autolimitada, a uma colite pseudomembranosa grave com risco de vida, megacólon tóxico, sepse e até morte (BURKE; LAMONT, 2014; CZEPIEL *et al.*, 2019). A patogenicidade de *C. difficile* depende da presença de uma ou ambas as toxinas produtoras de diarreia, denominadas toxina A (*tcdA*) e toxina B (*tcdB*). Todas as cepas toxigênicas contêm o gene *tcdB*, com ou sem a presença de *tcdA*. As toxinas A e B possuem o mesmo mecanismo de ação molecular: glicosilação enzimática e

inativação de GTPases do hospedeiro (incluindo *Rac*, *Rho* e *Cdc42*), levando a alterações no citoesqueleto de actina e morte celular. Além de seus efeitos citotóxicos diretos, também estimulam uma cascata inflamatória, exacerbando o dano tecidual, o que pode levar a quadros clínicos graves de diarreia e colite pseudomembranosa (VEDANTAM *et al.*, 2012).

Uma terceira toxina patogênica, a toxina binária ou *Clostridium difficile* transferase (CDT), é produzida em adição às toxinas A e B por algumas cepas de *C. difficile*, especialmente de ribotipo 027 e 078 (VEDANTAM *et al.*, 2012; GERDING *et al.*, 2014). Todavia, a produção de toxina binária está associada à maior mortalidade em pacientes com ICD em 30 dias, independente do ribotipo da PCR (GERDING *et al.*, 2014).

FIGURA 2 - PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR *C. difficile*



FONTE: adaptado de LEFFLER; LAMONT (2015).

Além disso, as toxinas A e B são potentes indutores de numerosas citocinas que participam da patogênese de ICD, incluindo as interleucinas (IL) IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF α , INF γ e leucotrieno B4 (CZEPIEL *et al.*, 2019). Yu e colaboradores (2017), demonstraram que níveis séricos elevados de IL-2 e IL-15 estão associados a um mau prognóstico em pacientes com ICD, enquanto níveis elevados de IL-5 e interferon gama (IFN- γ) estão associados a formas mais brandas da doença. Uma resposta imunológica adequada é essencial para limitar o dano tecidual mediado pelas toxinas de *C. difficile*, além de evitar a disseminação de bactérias intestinais para a circulação. Entretanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode ser prejudicial, contribuindo para a extensão do dano tecidual, desenvolvimento de sintomas como diarreia e colite, além de influenciar o prognóstico e remissão da doença (ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016). A Figura 2 resume os principais fatores envolvidos na patogênese da infecção por *C. difficile*, bem como sua relação com a progressão da doença.

A recorrência de ICD é muito comum, levando a significativa morbidade e aumento dos custos de saúde. É definido como caso recorrente aquele em que há recidiva dos sintomas de ICD dentro de 2 a 8 semanas após tratamento bem-sucedido do episódio inicial, associada a diagnóstico laboratorial positivo para *C. difficile* (MCDONALD *et al.*, 2018).

2.2 DIAGNÓSTICO

Em 2017, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA - do inglês *Infections Diseases Society of America*) e a Sociedade de Epidemiologia da Saúde da América (SHEA – do inglês *Society for Healthcare Epidemiology of America*), atualizaram as Diretrizes de Prática Clínica para Infecção por *C. difficile* em adultos e crianças. Segundo o documento, caracteriza-se ICD quando há histórico de diarreia sintomática (três ou mais evacuações de fezes não formadas em menos de 24 horas), e pelo menos um dos seguintes critérios: ensaio laboratorial positivo para toxina A e/ou B de *C. difficile*; presença de *C. difficile* produtor de toxina em uma amostra de fezes; colite pseudomembranosa ou características histopatológicas de cólon infectado por *C. difficile* reveladas por colonoscopia (MCDONALD *et al.*, 2018).

Portanto, para o diagnóstico microbiológico de ICD busca-se detectar em uma amostra de fezes a presença de toxinas de *C. difficile*, ou detectar a presença de *C. difficile* produtor de toxinas. A detecção de toxinas de *C. difficile* é realizada comumente por imunoensaio enzimático (EIE). A técnica fornece tempo de resposta

rápido (cerca de 1–2 h) e alta especificidade, apesar da baixa sensibilidade (CROBACH *et al.*, 2016; GATEAU *et al.*, 2018; MCDONALD *et al.*, 2018).

Assim como a detecção de toxinas nas fezes, a presença de *C. difficile* pode ser detectada pela pesquisa da enzima glutamato desidrogenase (GHD) pela técnica de EIE. Apesar de apresentar alto valor preditivo negativo (80-100%) e alta sensibilidade, o GHD EIE possui baixa especificidade e não distingue se a cepa é toxigênica (CROBACH *et al.*, 2016; GATEAU *et al.*, 2018; MCDONALD *et al.*, 2018). Devido ao baixo custo e facilidade de uso, a detecção de GHD e de toxinas A/B por EIE são os testes mais utilizados pelos laboratórios (CZEPIEL *et al.*, 2019).

Outra possibilidade é utilizar os testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs), baseados em um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou amplificação isotérmica, para pesquisa dos genes das toxinas A e/ou B de *C. difficile*. As principais vantagens do método NAAT são a alta sensibilidade e seu alto valor preditivo negativo (96-100%), que permitem a exclusão de ICD quando o teste é negativo (CROBACH *et al.*, 2016; GATEAU *et al.*, 2018). Por outro lado, este método possui elevado custo e detecta apenas a presença de um gene codificador de toxina. Ou seja, o método é capaz de confirmar a presença de *C. difficile* produtor de toxina, mas isto não significa necessariamente que a cepa esteja produzindo toxinas no momento (baixa especificidade). Neste caso, a diarreia pode ter outra etiologia, e a detecção de tal cepa implicaria em tratamento errôneo de ICD (CZEPIEL *et al.*, 2019).

Existem ainda o teste de neutralização de citotoxicidade celular (CCNA) e a cultura toxigênica (CT). Considerados métodos de referência, o CCNA detecta a produção de toxinas *in vivo*, enquanto a CT detecta a presença de uma cepa toxigênica de *C. difficile* nas fezes (GATEAU *et al.*, 2018). Assim, as amostras com um CCNA positivo podem ser consideradas casos de ICD, todavia, amostras com CCNA negativo e CT positiva são difíceis de interpretar. Essas amostras podem pertencer a portadores de *C. difficile* toxigênico que não produz toxinas detectáveis naquele momento, ou ainda a pacientes com ICD com níveis de toxina abaixo do limite de detecção (CZEPIEL *et al.*, 2019). Devido à complexidade, custo e tempo para obtenção do resultado, o CCNA e a CT não são usados rotineiramente no diagnóstico de ICD (GATEAU *et al.*, 2018; MCDONALD *et al.*, 2018).

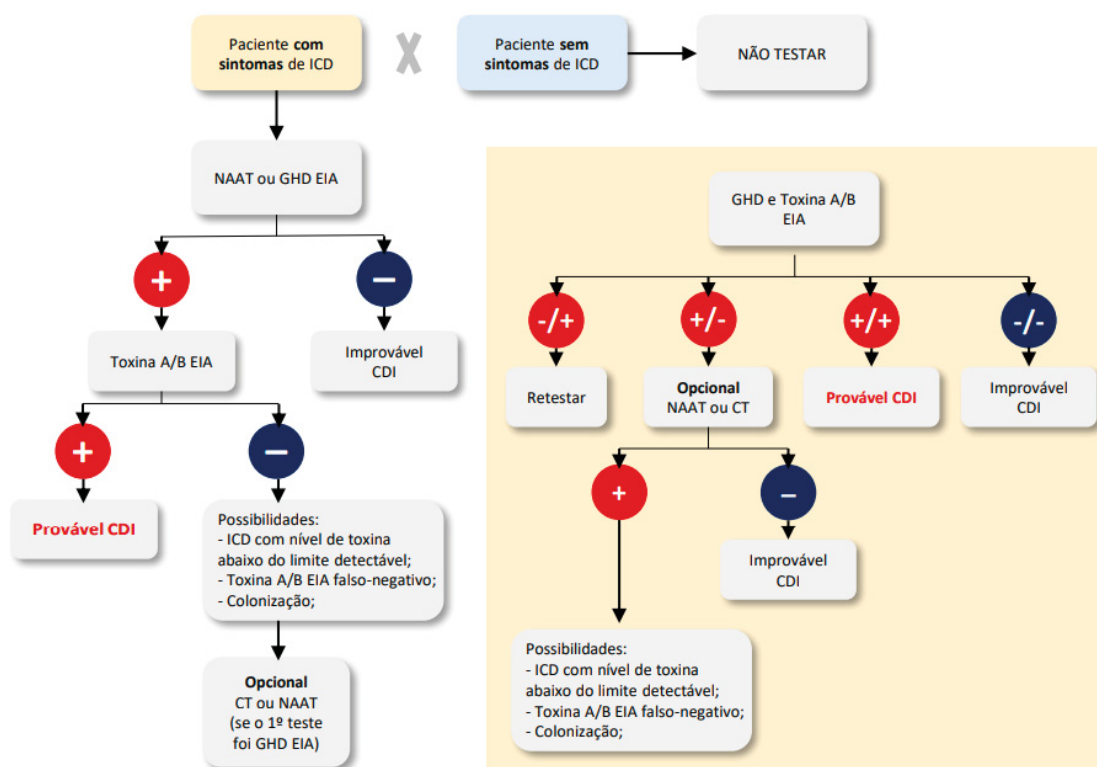
A cultura toxigênica consiste em duas etapas: primeiramente, as cepas de *C. difficile* são isoladas em um meio seletivo e, posteriormente, são testadas quanto à sua capacidade de produzir toxinas *in vitro* (GATEAU *et al.*, 2018). Entre os meios

seletivos tradicionais têm-se o ágar cicloserina-cefoxitina-frutose (CCFA) e seus derivados, como o ágar gema de ovo-cicloserina-cefoxitina (CCEY). Posteriormente, substâncias como taurocolato de sódio ou lisozima foram acrescentados aos meios seletivos a fim de favorecer a germinação dos esporos, aumentando a recuperação do patógeno. A recuperação também pode ser otimizada com o enriquecimento em caldo antes do plaqueamento em um meio sólido (cultura enriquecida), apesar da técnica acrescentar pelo menos 24 horas ao tempo de teste (HINK; BURNHAM; DUBBERKE, 2013). A amostra também pode ser submetida a um pré-tratamento com etanol ou alta temperatura antes da semeadura, visando aumentar a seleção de *C. difficile* pela redução do crescimento da microbiota normal. O pré-tratamento é indicado quando os meios de cultura têm uma baixa ou nula concentração de antibióticos. Existe ainda os meios cromogênicos, como o ágar ChromID® (bioMérieux, France), projetado para isolar e identificar *C. difficile* em 24 horas (BURNHAM; CARROLL, 2013; CROBACH *et al.*, 2016).

Posteriormente à semeadura, as placas devem ser incubadas em atmosfera anaeróbia por 48h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes da primeira leitura. Deve-se aguardar sete dias para liberação de cultura negativa. Uma vez que as colônias suspeitas de *C. difficile* são isoladas em cultura, a identificação é realizada com base na coloração de Gram (bacilos Gram-positivos), morfologia da colônia e odor característico de “celeiro”, sendo confirmada por kits comerciais de testes bioquímicos ou MALDI-TOF MS “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*”.

Finalmente, o potencial patogênico da cepa é verificado testando sua produção de toxina *in vitro*, que pode ser realizada através da pesquisa de genes toxigênicos por método molecular, ou ainda, através da pesquisa de toxinas no sobrenadante do caldo de crescimento por EIE ou CCNA (BURNHAM; CARROLL, 2013; CROBACH *et al.*, 2016). Apesar do seu longo tempo de execução não ser adequado para o diagnóstico de rotina, a cultura é essencial para a realização de tipagem, análise molecular e determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos (GATEAU *et al.*, 2018).

De acordo com as orientações da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID – do inglês *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), nenhum teste comercial pode ser usado como um teste independente para confirmar o diagnóstico de ICD (CROBACH *et al.*, 2016). O fluxograma do diagnóstico de ICD é apresentado na Figura 3 a seguir.

FIGURA 3 - ALGORITMOS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *C. difficile*

FONTE: adaptado de GATEAU *et al.* (2018).

A melhor maneira de otimizar o diagnóstico de ICD é combinar dois testes no algoritmo. O primeiro teste deve ser um teste com alto valor preditivo negativo (GDH EIE ou NAAT). O segundo teste deve possuir alto valor preditivo positivo, como é o caso de EIE das toxinas A/B. Se o primeiro teste for negativo, exclui-se ICD; já se for positivo, deve-se realizar o segundo teste (Toxina A/B EIE). Se o segundo teste for positivo, ele confirma o ICD; se for negativo, o caso precisa ser avaliado clinicamente. Neste último caso, há três possíveis explicações: (1) ICD com níveis de toxina abaixo do limite de detecção; (2) resultado de EIE de toxina A/B falso-negativo; ou (3) o paciente é portador de *C. difficile*. Adicionalmente, pode-se realizar NAAT (se o primeiro teste for GHD EIE) ou CT para confirmar se o paciente é portador de cepa toxigênica ou não (CROBACH *et al.*, 2016; GATEAU *et al.*, 2018; MCDONALD *et al.*, 2018; CZEPIEL *et al.*, 2019).

A fim de evitar a degradação de toxinas e a perda de viabilidade de *C. difficile*, o manejo adequado na fase pré-analítica é extremamente importante. Para uma recuperação ideal, as amostras de fezes devem ser cultivadas dentro de 2 horas após a coleta. Para o ensaio de toxinas, as fezes podem ser armazenadas a 4 °C por no máximo 3 dias. As amostras podem ser armazenadas em congelador à -80°C. Critério

de rejeição devem ser adotados de modo que apenas amostras de fezes não formadas sejam testadas, evitando a identificação de portadores assintomáticos. Portanto, não é recomendado realizar testes repetidos (dentro de 7 dias) durante o mesmo episódio de diarreia, tampouco testar fezes de pacientes assintomáticos. Ademais, não se recomenda a testagem de pacientes após o fim de tratamento bem-sucedido, uma vez que há uma proporção significativa de pacientes que permanecem colonizados (GATEAU *et al.*, 2018; CZEPIEL *et al.*, 2019).

Por fim, exames clínicos adicionais podem auxiliar no diagnóstico. Os achados laboratoriais incluem leucocitose, proteína C reativa elevada e, nos casos mais graves, hipoalbuminemia, bem como lesão renal aguda. Além disso, a endoscopia é indicada quando há uma apresentação típica de ICD com resultados negativos do teste de *C. difficile*, quando não há resposta ao curso padrão de antibióticos, ou quando um diagnóstico alternativo é suspeito e é necessária a visualização direta e/ou biópsia da mucosa intestinal (MCDONALD *et al.*, 2018; CZEPIEL *et al.*, 2019).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A gravidade das infecções por *C. difficile* tem aumentado paralelamente ao aumento da incidência de cepas epidêmicas com maior patogenicidade, altas taxas de transmissão e maior mortalidade (MCDONALD *et al.*, 2018). A cepa epidêmica *C. difficile* BI/NAP1/027 foi associada a surtos de ICD nos Estados Unidos desde 2001 (MCDONALD *et al.*, 2005). É classificada por análise com endonuclease de restrição (REA) como BI, por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – do inglês “*pulsed field gel electrophoresis*”) como NAP1 (tipo de campo de pulso 1 Norte Americana), e ribotipo 027 por PCR, logo, denomina-se *C. difficile* BI/NAP1/027. Esta cepa apresenta duas mutações no gene regulador de toxina *tcdC*, uma deleção de 18 pares de bases (bp), bem como uma deleção na posição 117, levando ao aumento da produção de toxinas A e B. Além disso, essa cepa é hipervirulenta e resistente às fluoroquinolonas, sendo responsável pelos casos mais graves de ICD (GERDING *et al.*, 2014; LEFFLER; LAMONT, 2015; CZEPIEL *et al.*, 2019). A incidência de ICD associados à cepa BI/NAP1/027 tem aumentado desde meados do ano 2000. Estudos registraram que, em 2005, cerca de 51% dos casos de ICD nos Estados Unidos e 84% no Canadá foram causados por essa cepa (LOO *et al.*, 2005; MCDONALD *et al.*, 2005). Já em estudo multicêntrico europeu, o ribotipo 027 foi responsável por 22% dos casos de ICD em pacientes com idade entre 18 e 65 anos (DAVIES *et al.*, 2016a).

As infecções por *C. difficile* representam um impacto econômico significativo para os sistemas de saúde. Em 2011, um estudo de vigilância nos Estados Unidos identificou 453.000 casos de infecção por *C. difficile* e 29.000 mortes associadas à infecção; 65,8% dos casos de ICD estavam associados aos serviços de saúde, e destes, 24,2% ocorreram durante a hospitalização (LESSA *et al.*, 2015). Conforme o estudo de Zhang e colaboradores (2016), nos Estados Unidos, o custo total de pacientes internados com ICD foi estimado em US\$ 6,3 bilhões em 2015. Os custos estão associados ao tempo prolongado de internação hospitalar, maior necessidade de nutrição parenteral e transfusões e o uso de antibióticos mais caros, além de custos significativos associados ao tratamento de infecções recorrentes. No caso de ICD grave ou complicada, inclui-se ainda a permanência em unidade de terapia intensiva (UTI), um dos fatores de maior impacto financeiro durante o tratamento hospitalar (HEIMANN *et al.*, 2018).

Por outro lado, a incidência de ICD adquirida na comunidade também quase dobrou na última década. Conforme revisado por Ofori *et al.* (2018), entre 2000 e 2017, aproximadamente metade de todos os casos de ICD foram atribuídos à origem comunitária. Além disso, cerca de 40% de todos os casos originados na comunidade necessitaram de hospitalização, nos quais a gravidade foi associada aos ribotipos hipervirulentos 027 e 078 com mal prognóstico. Fontes ambientais, animais colonizados, pacientes assintomáticos e pacientes sintomáticos estão entre os potenciais reservatórios de infecção na comunidade. Curiosamente, estudos demonstraram que ICD associado à comunidade tem maior probabilidade de afetar pacientes mais jovens e saudáveis, com menor probabilidade de exposição a antibióticos em comparação com casos adquiridos em hospitais (KHANNA *et al.*, 2012; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016).

Na América Latina, a dinâmica de ICD tem sido estudada principalmente no Chile, Uruguai, Costa Rica, Argentina, México e Brasil (LOPARDO *et al.*, 2015; SALDANHA *et al.*, 2020). Entretanto, dados epidemiológicos e sistemas de vigilância para essas regiões ainda são escassos. No estudo epidemiológico multicêntrico realizado por Maestri *et al.* (2020) no estado do Paraná, sul do Brasil, a prevalência de ICD foi de 17,7% em pacientes com diarreia associada a antibióticos. Dentre os pacientes com ICD, a infecção teve uma taxa de recorrência de 20,8%, mortalidade em 30 dias de 24,3% e mortalidade relacionada de 4,8%. Além disso, o estudo apontou o transporte de bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos,

hospitalização anterior e uso de cefalosporina ou carbapenêmico, como fatores associados a um maior risco de ICD. Conforme Lopardo *et al.* (2015), apesar da diarreia ser uma das principais causas de morbidade nos países em desenvolvimento, a ICD ainda é considerada uma infecção negligenciada.

2.4 DISSEMINAÇÃO ZONÓTICA E AMBIENTAL

A abordagem “One Health” ou Saúde Única, reconhece que a saúde dos seres humanos está interligada à saúde dos animais e do meio ambiente. Além de um patógeno humano, *C. difficile* também é encontrado em animais para produção alimentícia (como suínos, bovinos, ovinos e aves) e animais domésticos (cães e gatos). Além disso, a bactéria também foi isolada de uma ampla variedade de fontes/reservatórios no ambiente natural (solo, água, vegetais), assim como em ambientes domésticos (banheiros, pisos, pias de banheiro e solas de sapatos) (KACHRIMANIDOU; TZIKA; FILIOUSSIS, 2019; KNIGHT; RILEY, 2019).

Está bem estabelecido que humanos e animais compartilham ribotipos comuns de *C. difficile*, como o ribotipo 014 (BAUER; KUIJPER, 2015). A sobreposição de ribotipos sugere potencial transmissão zoonótica, todavia, o impacto da colonização animal na infecção por *C. difficile* em humanos ainda permanece incerto (KACHRIMANIDOU; TZIKA; FILIOUSSIS, 2019). Conforme revisado por Knight e Riley (2019), os isolados mais comuns são cepas de *C. difficile* RT 014 e ST11, linhagens associadas à ICD humana que possuem grandes genomas com capacidade de adaptação a amplos nichos ecológicos e possuem resistência a vários antimicrobianos da prática clínica humana e veterinária (KNIGHT *et al.*, 2019). Isso demonstra ainda mais a relevância de *C. difficile* para o conceito de saúde única.

2.4.1 Animais de Produção

Um ponto a se discutir são as rotas de disseminação de *C. difficile* entre animais de produção e humanos com agrupamento geográfico limitado. A prevalência de *C. difficile* em suínos tem sido estudada mundialmente. Os surtos em leitões são frequentemente associados ao estresse ambiental e ao tratamento com antibióticos. A infecção manifesta-se por colite neonatal levando a diarreia, desidratação e morte. Outros microrganismos patogênicos também podem estar envolvidos na infecção e, portanto, o diagnóstico e o tratamento são difíceis (GRZEŚKOWIAK; ZENTEK; VAHJEN, 2016).

Mundialmente, a prevalência de *C. difficile* em fazendas de suínos têm sido descrita: 0,8% no Japão (ASAI *et al.*, 2013); 8,5% ANDRÉS-LASHERAS *et al.*, 2017) a 25,6% na Espanha (ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2013); 15,5% no Brasil (DE OLIVEIRA JR *et al.*, 2018); 19,3% na Coreia do Sul (KIM *et al.*, 2018); 21% na Irlanda (STEIN *et al.*, 2017); 28,8% na República Tcheca (KRUTOVA *et al.*, 2018); 35% na Tailândia (PUTSATHIT *et al.*, 2019); 42% nos EUA (O'SHAUGHNESSY *et al.*, 2019); 49% em Taiwan (WU *et al.*, 2016); 67% na Austrália (KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2015); 78% na Alemanha (SCHNEEBERG *et al.*, 2013a). Na Europa, a prevalência de *C. difficile* em bovinos varia entre 5,5% e 27,7% (SCHNEEBERG *et al.*, 2013b; JANEZIC *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2017; BANDELJ *et al.*, 2018). No Irã, *C. difficile* foi isolado em 60% das amostras de fezes de bezerros (DOOSTI; MOKHTARI-FARSANI, 2014). Em matadouros na Austrália, a prevalência de *C. difficile* foi de 25,3% nas carcaças e 60,0% nas fezes de bezerros recém-nascidos (KNIGHT *et al.*, 2016).

Tratando-se dos ribotipos descritos em criações de suínos, têm-se o 412 e 005 (O'SHAUGHNESSY *et al.*, 2019); 046 (NORÉN; JOHANSSON; UNEMO, 2014), 078 (ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2013; PELÁEZ *et al.*, 2013; SCHNEEBERG *et al.*, 2013a; WU *et al.*, 2016; ANDRÉS-LASHERAS *et al.*, 2017; STEIN *et al.*, 2017; USUI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018; KRUTOVA *et al.*, 2018; O'SHAUGHNESSY *et al.*, 2019); 126 (SCHNEEBERG *et al.*, 2013a; WU *et al.*, 2016; ANDRÉS-LASHERAS *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017); 193 (STEIN *et al.*, 2017); 014 (KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2015); 038 (PUTSATHIT *et al.*, 2019).

O estudo de Alvarez-Perez *et al.* (2018) avaliou a presença e diversidade genética de *C. difficile* e *Clostridium perfringens* ao longo do processo de abate de suínos criados em sistema de confinamento. *C. difficile* e *C. perfringens* foram encontrados em 14,4% e 12,6% das amostras, respectivamente. Curiosamente, a maior porcentagem de amostras positivas para *C. difficile* foi detectada em caminhões (80%). Os mesmos genótipos de *C. difficile* foram isolados de diferentes suínos e ocasionalmente de amostras ambientais, sugerindo um risco de carnes contaminadas na linha de produção.

Conforme revisado por Lim, Knight e Riley (2020), pode haver disseminação de *C. difficile* por carne contaminada durante o processamento no matadouro, o qual sobrevive até o ponto de consumo humano devido à resistência dos esporos à temperatura de cozimento (70°C). Um estudo em Taiwan mostrou que, no matadouro,

a taxa de isolamento das carcaças foi alta (23%), variando entre 20% e 29% na carne de porco crua e pronta para consumo (WU *et al.*, 2017).

Estes esporos também podem sobreviver ao processo de tratamento de esgoto e efluentes, além de serem capazes de se disseminar no ar, a exemplo do ambiente hospitalar e ao redor de instalações de produção animal. Outro ponto é o uso de estrume de animais como compostagem ou fertilizante para agricultura, o que pode resultar na contaminação do ambiente e da produção agrícola. Cerca de 60% dos produtos compostados, como misturas de jardim e cobertura morta, estão contaminados com *C. difficile* (PERUMALSAMY; PUTSATHIT; RILEY, 2019). Assim, a capacidade de sobrevivência de *C. difficile* em composto de esterco à base de fezes de porco foi examinada por Usui e colaboradores (2017). Com uma taxa de positividade de 36%, conclui-se que a aplicação de esterco compostado à terra representa um possível risco de transferência de *C. difficile* para a cadeia alimentar.

Em ovinos, a taxa geral de detecção relatada é baixa: 2% no estudo de Esfandiari e colaboradores (2015) e 4% no estudo de Knight e Riley (2013); dessa forma, é improvável que eles sejam uma importante fonte de infecções humanas. Já em amostras de aves de produção, Abdel-glil e colaboradores (2018) obtiveram uma prevalência de 12,5% de *C. difficile*, dentre aves saudáveis e sintomáticas.

A presença de *C. difficile* também foi evidenciada em cavalos hospitalizados, variando desde 7,5% em cavalos de várias idades, com destaque para o ribotipo 033 (KECEROVA *et al.*, 2019); 13,7% em potros e cavalos adultos (RODRIGUEZ *et al.*, 2014); até 25% em éguas e potros, com predominância do ribotipo 078 (WEESE; SLOVIS; ROUSSEAU, 2021). Já no estudo de Schoster *et al.* (2019), as prevalências encontradas em cavalos foram de 19% para *C. difficile*; e 16% para *C. perfringens*. Especificamente em cavalos com diarreia, a taxa de isolamento foi de 8% para ambas as espécies.

Além dos animais de produção, *C. difficile* também pode ser carregado por pragas e pequenos roedores, ou ainda insetos, que contribuem para a disseminação do patógeno. A bactéria tem sido isolada também em ratos (HIMSWORTH *et al.*, 2014; BURT *et al.*, 2018), sugerindo que excrementos desses animais apresentam risco de transmissão zoonótica. Não obstante, um estudo demonstrou que moscas (*M. domestica*) foram capazes de transferir esporos de *C. difficile* mecanicamente por até 4h após contato subsequente com superfícies. Isto demonstra a contribuição desses

insetos como vetores para a persistência ambiental e disseminação da bactéria nos mais variados ambientes (DAVIES; ANDERSON; HILTON, 2016b).

2.4.2 Animais Domésticos

Em animais domésticos, a manifestação clínica da ICD varia de diarreia leve e autolimitada a diarreia grave e fatal. Uma alta prevalência de cepas não toxigênicas tem sido descrita em cães, ressaltando a importância da detecção de toxinas no diagnóstico dessa infecção (WETTERWIK *et al.*, 2013). Têm-se relatado a prevalência dessa bactéria em cães domésticos em diversos países pelo mundo: 6,7% (ANDRÉS-LASHERAS *et al.*, 2018) a 12,1% (ORDEN *et al.*, 2017) na Espanha; 7% na Suíça (WETTERWIK *et al.*, 2013); 10,3% na China, sendo 58% toxigênicos (WEN *et al.*, 2022); 12% no Malawi, sendo 45% toxigênicos (WEESE; MSHELBWALA; LOHR, 2019); 13,7% na Índia, sendo destes 62,5% toxigênicos (HUSSAIN *et al.*, 2015); 26% na Nigéria, sendo 55% toxigênicos (WEESE; MSHELBWALA; LOHR, 2019); 33,4% no Japão, sendo 47% toxigênicas (USUI *et al.*, 2016). Por outro lado, a prevalência relatada em gatos domésticos foi de 5,2% no Brasil, dos quais 37,5% eram toxigênicos (SILVA *et al.*, 2020); e variou de 7% (WEI *et al.*, 2019) até 8,1% na China, sendo todas cepas toxigênicas (WEN *et al.*, 2022).

O papel de cães e gatos como vetores para a transmissão de *C. difficile* foi relatado por Rodriguez-Palacios *et al.* (2013). Este estudo demonstrou que 10% dos cães domésticos eram colonizadores assintomáticos da bactéria e os esporos contaminavam 31% dos domicílios. Em outro estudo semelhante, Janezic, Mlakar e Rupnik (2018) isolaram a bactéria em 70% dos domicílios analisados. Amostras coletadas de sapatos e chinelos obtiveram as maiores taxas de isolamento de *C. difficile*, 43% e 28%, respectivamente; seguidos por 24% de positividade em patas de cães domésticos.

Já no estudo de Stone *et al.*, *C. difficile* foi isolado em 17% das amostras fecais de cães assintomáticos (STONE *et al.*, 2016). Curiosamente, 10% dos isolados eram cepas toxigênicas que causam ICD em humanos. Além disso, foi revelada similaridade entre os genótipos de cães e humanos através de análise de sequenciamento. Esses resultados sugerem que os animais domésticos podem ser fontes potenciais de infecções por *C. difficile* adquiridas na comunidade em humanos (KACHRIMANIDOU; TZIKA; FILIOUSSIS, 2019).

Através do estudo de Rodriguez *et al.* (2019), evidenciou-se pela primeira vez a presença de *C. difficile* no trato respiratório de cães (19% cães positivos), recuperado das cavidades nasais proximal e distal. Todos os isolados eram toxigênicos e pertenciam ao ribotipo 014, o qual tem se destacado em animais e em infecções por *C. difficile* adquiridas na comunidade nos últimos anos. Portanto, as secreções de cães podem ser uma via de disseminação zoonótica do patógeno.

Comumente têm-se isolado espécies do gênero *Clostridium* em diversos animais. No estudo de Álvarez-Pérez *et al.* (2017), avaliou-se a carga de *Clostridium perfringens* e *C. difficile* excretada por pequenos animais em 17 clínicas veterinárias da Espanha. *C. perfringens* foi isolado de 31% dos cães e de 20% dos gatos; enquanto *C. difficile* foi isolado de 20% dos cães, pertencentes majoritariamente aos ribotipos toxigênicos 106 (33,3%) e 154 (16,7%), e não foi isolado de nenhum dos gatos. Tais resultados corroboram com a ideia de que a prevalência de colonização/infecção por *C. difficile* é menor em gatos do que em cães domésticos (WEESE, 2011).

Com *C. difficile* sendo tão amplamente disseminado na comunidade, ambientes domésticos e animais de companhia também estão sendo colonizados e fornecem mais uma via de transmissão de ICD (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020). Uma abordagem promissora e efetiva na redução da carga ambiental de *C. difficile* seria a vacinação de animais e humanos. Embora seja uma prática comum na proteção de animais de produção contra doenças causadas por *Clostridium perfringens*, nenhuma vacina está atualmente aprovada para prevenir ICD em animais (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

2.4.3 Animais de Vida Livre

Há poucos estudos contemplando a prevalência de colonização ou infecção por *C. difficile* em animais selvagens ou de vida livre; ou ainda, tais amostras são coletadas quando estes animais se encontram em cativeiro. Álvarez-Pérez e colaboradores (2014) isolaram *C. difficile* de 7 amostras (3,5%) coletadas em zoológico, sendo provenientes das seguintes espécies animais: uma amostra de chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*), uma de cabra anã (*Capra hircus*) e uma de cabra ibérica (*Capra pyrenaica hispanica*), e 4 amostras positivas de zebra-das-planícies. A maioria dos isolados recuperados (57,1%) pertencia ao ribotipo 078, produzia as toxinas A e B e tinha os genes que codificam a toxina binária. Já a

pesquisa de Scharling e colaboradores (2021) indica que a prevalência de *Clostridium perfringens* e *C. difficile* em elefantes asiáticos e africanos saudáveis é muito baixa.

Aves, especialmente espécies migratórias, podem participar ativamente na disseminação de muitos patógenos. As andorinhas-das-chaminés (*Hirundo rustica*) estão intimamente associadas às criações de gado, portanto, Bandelj e pesquisadores (2014) encontraram uma prevalência média de *C. difficile* de 4,3% nessas aves. Os ribotipos mais frequentes foram 078, 002 e 014, comumente encontrados em animais de produção e humanos.

Tratando-se de pequenos roedores, *C. difficile* foi isolado de 9% das amostras de guaxinins canadenses (BONDO *et al.*, 2015). Apesar de ter sido isolado em diversas espécies, ainda não se sabe se *C. difficile* é, de fato, um patógeno de mamíferos silvestres de pequeno e médio porte (JARDINE *et al.*, 2013). Nos EUA, a bactéria foi isolada em cerca de 17% de gambás que habitam fazendas de suínos (BONDO *et al.*, 2019).

No Brasil, a prevalência de *C. difficile* foi determinada em quatis americanos (*Nasua nasua*) de vida livre, sendo de 6,5% (SILVA *et al.*, 2014^a). Em outro estudo de Silva e colaboradores (2014b), *C. perfringens* de 26 amostras (76,5%) de mamíferos carnívoros silvestres. Além disso, *C. difficile* foi isolado de duas (5,9%) amostras, uma de uma jaguatirica diarreica (*L. pardalis*) e outra de um lobo-guará não diarreico (*C. brachyurus*). Observa-se grande escassez em dados epidemiológicos referentes a esse patógeno em animais selvagens, resultado da grande dificuldade na obtenção e processamento dessas amostras.

2.4.4 Meio Ambiente

Tratando-se de contaminação ambiental, Rivas e pesquisadores (2020) cultivaram amostras de águas residuais (após tratamento), isolando cepas toxigênicas de *C. difficile* de 4,7% das amostras. Levantam-se questionamentos sobre a contaminação dos efluentes de estações de tratamento de água e, por conseguinte, sobre a segurança no consumo e utilização de água tratada.

Outro ponto importante a considerar é a contaminação cruzada que ocorre entre os animais de produção e o meio ambiente. Em estudo australiano conduzido por Lim *et al.* (2020), encontrou *C. difficile* em 22,5% de produtos compostados, sendo as cepas toxigênicas mais comuns RTs 020 e 056. O ribotipo 056 é frequentemente associado a ICD em humanos e também foi isolado de bovinos, tubérculos e do meio

ambiente na Austrália. De forma semelhante, Dharmasena e Jiang (2018) encontraram a bactéria em 36% das amostras de compostos orgânicos disponíveis comercialmente ou esterco animal para adubagem, sendo a maioria dos isolados de *C. difficile* toxigênicos. Tal contaminação também foi observada em hortas, em que 67% das amostras em geral continham *C. difficile*, havendo positividade na cultura de 79% das amostras do solo, 67% de composto orgânico, 83% do esterco e em 32% de solas de sapato (SHIVAPERUMAL; CHANG; RILEY, 2020).

Surpreendentemente, um estudo recente apresentou evidências de contaminação de longo prazo do solo agrícola com *C. difficile* derivado de esterco de frango de corte, demonstrando também o potencial para dispersão aérea de *C. difficile* através de emissões de poeira durante a aplicação de esterco. Estabelecendo a relação genômica entre os isolados de *C. difficile* da poeira e do solo, recuperados mais de 2 anos após a fertilização, foi evidenciado que estes isolados foram oriundos da granja específica que entregou o esterco (FRETRUP *et al.*, 2021).

A transmissão zoonótica indireta através dos alimentos e do meio ambiente é, provavelmente, a principal via de contaminação da população humana. A vigilância de *C. difficile* em um contexto de saúde única, considerando diversas fontes humanas, animais e ambientais, continuará a ser fundamental para o desenvolvimento de uma melhor compreensão dos fatores epidemiológicos e genéticos que contribuem para o surgimento, evolução e disseminação da ICD (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

2.5 TRATAMENTO

Tão logo a infecção por *C. difficile* é diagnosticada em um paciente, é essencial a implementação imediata de medidas apropriadas de controle de infecção para prevenir a propagação de ICD dentro do hospital. Dentre estas medidas, citam-se o diagnóstico precoce, vigilância epidemiológica, capacitação da equipe, uso adequado de precauções de isolamento, higiene das mãos, uso de equipamentos de proteção individual, limpeza dos ambientes e de equipamentos médicos, além da administração criteriosa de antimicrobianos. Além disso, a Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID) recomenda medidas específicas adicionais ao tratamento de ICD, que incluem a descontinuação de terapia antimicrobiana desnecessária, reposição adequada de fluídos e eletrólitos, evitar o uso de medicamentos antiespasmódicos e reavaliar o uso de inibidores da bomba de prótons (DEBAST *et al.*, 2014).

Para o tratamento de ICD, as seguintes opções são consideradas: uso de antibióticos orais e não orais; aplicação de imunoterapia; uso de probióticos; e transplante intestinal fecal ou bacteriano. O tipo de tratamento utilizado varia conforme a gravidade e recorrência da ICD, além de levar em conta limitações de grupos específicos de pacientes. A antibioticoterapia por via oral é amplamente indicada, sendo mais comumente utilizado metronidazol para ICD não grave, enquanto vancomicina é a droga de escolha para casos graves (DEBAST *et al.*, 2014). Embora a vancomicina e o metronidazol sejam eficazes no tratamento de ICD, ambos são agentes de amplo espectro que causam perda significativa da microbiota intestinal comensal (DUBBERKE *et al.*, 2015). Em 2017, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) e a Sociedade de Epidemiologia da Saúde da América (SHEA) apontaram a vancomicina e a fidaxomicina como base do tratamento de ICD (MCDONALD *et al.*, 2018).

Em casos não graves de ICD, a imunoterapia mostrou-se um tratamento alternativo ao uso de antimicrobianos. A administração intravenosa de imunoglobulinas e de anticorpos monoclonais pode ser útil tanto no tratamento quanto na prevenção de recorrências de ICD (MCDONALD *et al.*, 2018). Apesar do papel dos probióticos na prevenção de ICD ainda ser controverso, estes podem ser utilizados para redução da diarreia associada aos antibióticos. O estudo de Maziade e colaboradores (2015), demonstrou que o tratamento probiótico com três cepas de *Lactobacillus*, paralelo à aplicação de antibióticos em adultos hospitalizados, reduziu a taxa de ICD de 18,0 para 2,3 casos por 10.000 pacientes-dia, no período de 10 anos analisado. De forma semelhante, o transplante fecal tem sido proposto como um método alternativo para o tratamento de ICD recorrente, com o objetivo principal de reconstituir a microbiota intestinal perdida após a antibioticoterapia (BAKTASH *et al.*, 2018). Por fim, tratamento cirúrgico pode ser necessário em casos extremamente graves, como perfuração do cólon e megacólon tóxico (DEBAST *et al.*, 2014).

O estudo publicado em 2015 por Dubberke e colaboradores revelou que, dentre os pacientes colonizados com *C. difficile* na admissão hospitalar, 78% permaneciam colonizados no momento da alta. Este resultado assemelha-se ao resultado obtido por McFarland *et al.* (1989), em que 82% dos pacientes colonizados ou com ICD ainda eram positivos na alta. Observa-se, portanto, a grande dificuldade de descolonização por *C. difficile*, especialmente pela maior resistência aos antimicrobianos que este patógeno apresenta sob a forma de esporos. Todavia, a descolonização ou tratamento

profilático de portadores assintomáticos de *C. difficile* com vancomicina oral não é recomendado, pois demonstrou resultar em taxas mais altas de *C. difficile* ao longo do tempo (JOHNSON et al., 1992). Além disso, outra preocupação com o uso de antibióticos profiláticos é o surgimento de resistência bacteriana.

3 METODOLOGIA

Trata-se de uma coorte prospectiva envolvendo: (1) pacientes humanos com sintomatologia diarreica internados em duas Instituições do Estado de Santa Catarina: um hospital de 250 leitos e alta complexidade em Blumenau, e o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) com pouco mais de 200 leitos, na cidade de Florianópolis, ambos hospitais que são centros de referência em todo o Estado; e (2) animais silvestres atendidos pelo SAASBlu (Serviço de Atendimento de Animais Silvestres de Blumenau), na região do Vale do Itajaí, Santa Catarina.

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 (ANEXO 1). Para as demais instituições coparticipantes, também se obteve a aprovação do estudo pelo seus Comitês de Ética e Pesquisa Institucional. Todos os seres humanos participantes deste projeto autorizaram a coleta de amostras e dados clínicos através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE 3). As amostras de animais silvestres são obtidas a partir do atendimento clínicos desses animais, conforme demanda no período. Assim, o estudo da colonização intestinal destes animais dispensa aprovação por comitê de ética, uma vez que estas amostras são coletadas para atender uma demanda clínica com finalidade terapêutica.

3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO

Entre fevereiro e setembro de 2022, foram incluídos pacientes humanos hospitalizados nas duas instituições participantes que apresentaram mais de 48 horas de internação em enfermarias ou unidades de terapia intensiva, de ambos os sexos e de idade igual ou superior a 18 anos, que (I) apresentem diarreia (três ou mais evacuações de fezes líquidas em 24 horas) ou (II) que tiveram solicitação para pesquisa de toxinas A/B nas fezes. Os critérios de exclusão foram: pacientes que não concordaram e/ou não assinaram o TCLE; amostras não diarreicas; amostras repetidas dentro do mesmo episódio diarreico; e uso de laxantes/enema nas últimas 48 horas. As amostras clínicas foram triadas pelo microbiologista de cada Instituição hospitalar e, posteriormente, encaminhadas para o armazenamento no Laboratório de Microbiologia do Campus 3 da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

No caso dos animais silvestres, foram incluídos todos os animais atendidos no programa durante o período do estudo, dos quais foi possível coletar amostras, independente da presença de sintomas. A coleta em animais selvagens se deu através do SAASBlu (Serviço de Atendimento de Animais Silvestres de Blumenau), projeto de extensão da Universidade Regional de Blumenau (FURB) em parceria com a Polícia Militar Ambiental do Estado de Santa Catarina, a Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade de Blumenau e o Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina. Os animais silvestres resgatados na região do médio Vale do Itajaí – SC, Brasil, foram encaminhados ao Hospital Escola Veterinário da FURB pela Polícia Militar Ambiental, onde receberam atendimento e avaliação dos parâmetros vitais e sinais clínicos.

3.2 COLETA DE DADOS E DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas amostras de fezes diarreicas humanas e animais, coletadas a partir da evacuação espontânea de qualquer horário do dia, dentro de um frasco de coleta estéril com boca larga e uma tampa bem ajustada, de acordo com o protocolo estabelecido na Instituição. No caso dos animais, na impossibilidade de coletar amostra de fezes *in natura*, coletou-se *swab* retal. A amostra de fezes *in natura* foi transportada até o laboratório em um recipiente com gelo e os *swabs* em meio de transporte Amies. As amostras de fezes recém-emitidas ou *swab* retal/cloacal foram coletadas em animais livres bem como em cativeiro, independente da presença de sintomatologia diarreica.

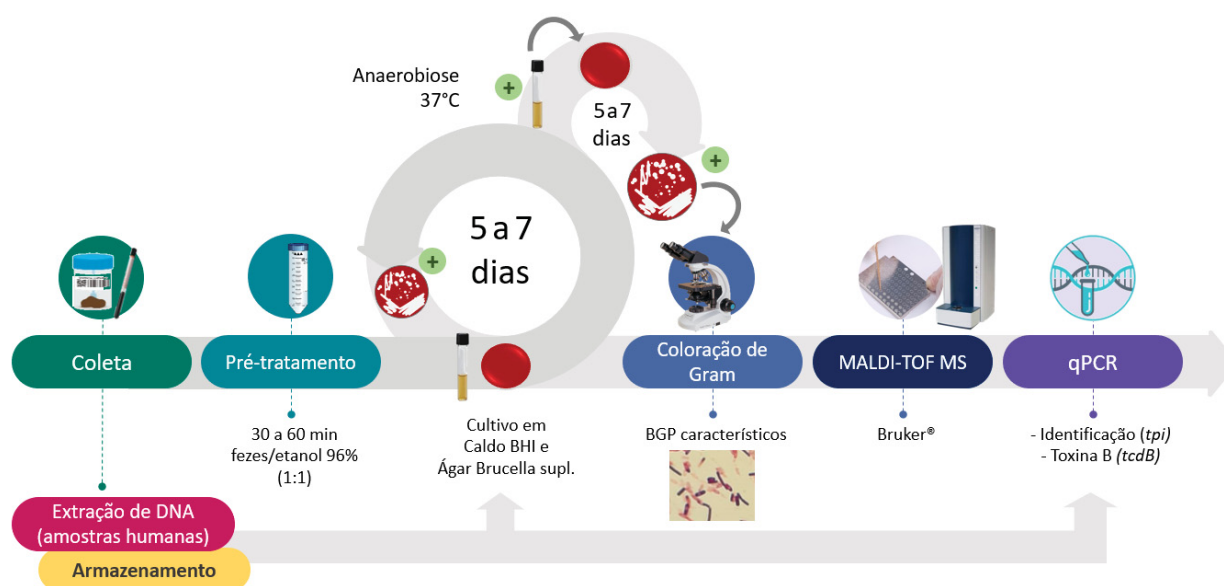
Os dados referentes a espécie, condição clínica e comportamental, além do georreferenciamento do local do resgate, foram anotados junto ao histórico do animal em ficha clínica individual. Todos os dados obtidos em todas as modalidades de coleta foram exportados para um banco de dados com identificação numérica, anonimizando quaisquer dados que permitam a identificação dos participantes.

3.3 ANÁLISE LABORATORIAL

Todas as amostras coletadas foram submetidas a um pré-tratamento e, em seguida, foram semeadas em ágar Brucella suplementado para isolamento de *C. difficile*, conforme descrito no item 3.3.1. O armazenamento, pré-tratamento, cultivo e análise microscópica foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Campus 3 da Universidade Regional de Blumenau – FURB. Em adição, amostras de humanos

com sintomatologia diarreica, sugestivo de ICD, tiveram seu DNA extraído e foram testadas por PCR para o gene espécie-específico da triose fosfato isomerase (*tpi*) e o gene codificante da toxina B (*tdB*) de *C. difficile*. Um resumo das etapas de processamento das amostras está ilustrado no fluxograma a seguir (Figura 4).

FIGURA 4 – FLUXO METODOLÓGICO PARA PESQUISA DE *C. difficile*



Fonte: o autor (2023).

3.3.1 CULTIVO, IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA

Antes do cultivo, todas amostras de fezes ou suspensão em salina dos swabs passaram por pré-tratamento com álcool etílico absoluto (Sigma-Aldrich®, Merck, Missouri, EUA), visando aumentar a recuperação de *C. difficile* pela inibição do crescimento de outros organismos fecais. Esse procedimento foi realizado em tubos de polipropileno de 15 mL estéreis, e consistiu em preparar uma suspensão de 1 mL de fezes com 1 mL de etanol a 99,5%. Esta foi misturada em vórtex e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30-60min (ECDC, 2018). Usando alça estéril descartável, entre 50-75 uL do sedimento foram semeados respectivamente em ágar Brucella (OXOID®, Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de sangue de cavalo, e em caldo de enriquecimento *Brain-Heart-Infusion* – BHI (KASVI®, Paraná, Brasil). Após o inóculo, as amostras foram incubadas por 5 a 7 dias a 37°C em anaerobiose. Amostras negativas no ágar Brucella tiveram o caldo de enriquecimento sub-cultivado em nova placa (cultura enriquecida), conforme

descrito por Tenover *et al.* (2010). Após a incubação, colônias sugestivas de *C. difficile* foram examinadas quanto a morfologia característica por coloração de Gram e submetidas a identificação por MALDI-TOF MS (Bruker®, Massachusetts, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A identificação genotípica foi confirmada pela detecção por PCR de um fragmento do gene *tpi* específico de *C. difficile* (triose fosfato isomerase), conforme Lemee *et al.* (2004).

3.3.2 DETECÇÃO DOS GENES DAS TOXINAS NAS FEZES POR PCR

As amostras de fezes foram avaliadas posteriormente no Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da UFPR, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), conforme descrito por Maestri *et al.* (2022b). Os primers usados foram: F- 5'AGCAGTTGAATATAGTGGTTTAGTTAGAGTTG3', R - 5'CATGCTTTTTTAGTTTCT GGATTGAA3', sintetizados pela Merck (KGaA, Darmstadt, Alemanha). Como controle positivo foram usados DNA de suspensões bacterianas de *C. difficile* ATCC BAA1870 em concentrações 10⁶UFC/mL e como controle negativo água ultrapura. As condições de reação foram 12,5 µL da mistura de reação PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA); 6,5 µL de água ultrapura (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA); 1 µL de primer mix (300pmol/µL); e 5 µL de DNA alvo (5–50 ng DNA/mL). Ciclos de desnaturação por 120 segundos a 94°C, seguido de amplificação a 40 ciclos de 3 etapas de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 57°C e 60 segundos a 72°C. Como controle de inibição de PCR foram utilizados primers e sonda para beta-globina humana como descrito previamente por Saiki e colaboradores (1988). Foram consideradas válidas as extrações em que o Ciclo de quantificação (C_q) do controle for igual ou menor que 36.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de determinar a prevalência de ICD, foram considerados casos de ICD resultados positivos nos testes de EIE, PCR ou cultura nos pacientes sintomáticos. Nos animais assintomáticos, desejava-se isolar a bactéria para estudos epidemiológicos e nenhum resultado foi considerado infecção. Na análise descritiva, quando pertinente, utilizou-se a média e proporções para as variáveis contínuas e categóricas, respectivamente. A tabulação de dados foi realizada no software Excel® (Microsoft, Washington, EUA). A prevalência de ICD foi calculada através do número

de amostras positivas para EIE, PCR e/ou cultura toxigênica, sobre o total de amostras testadas.

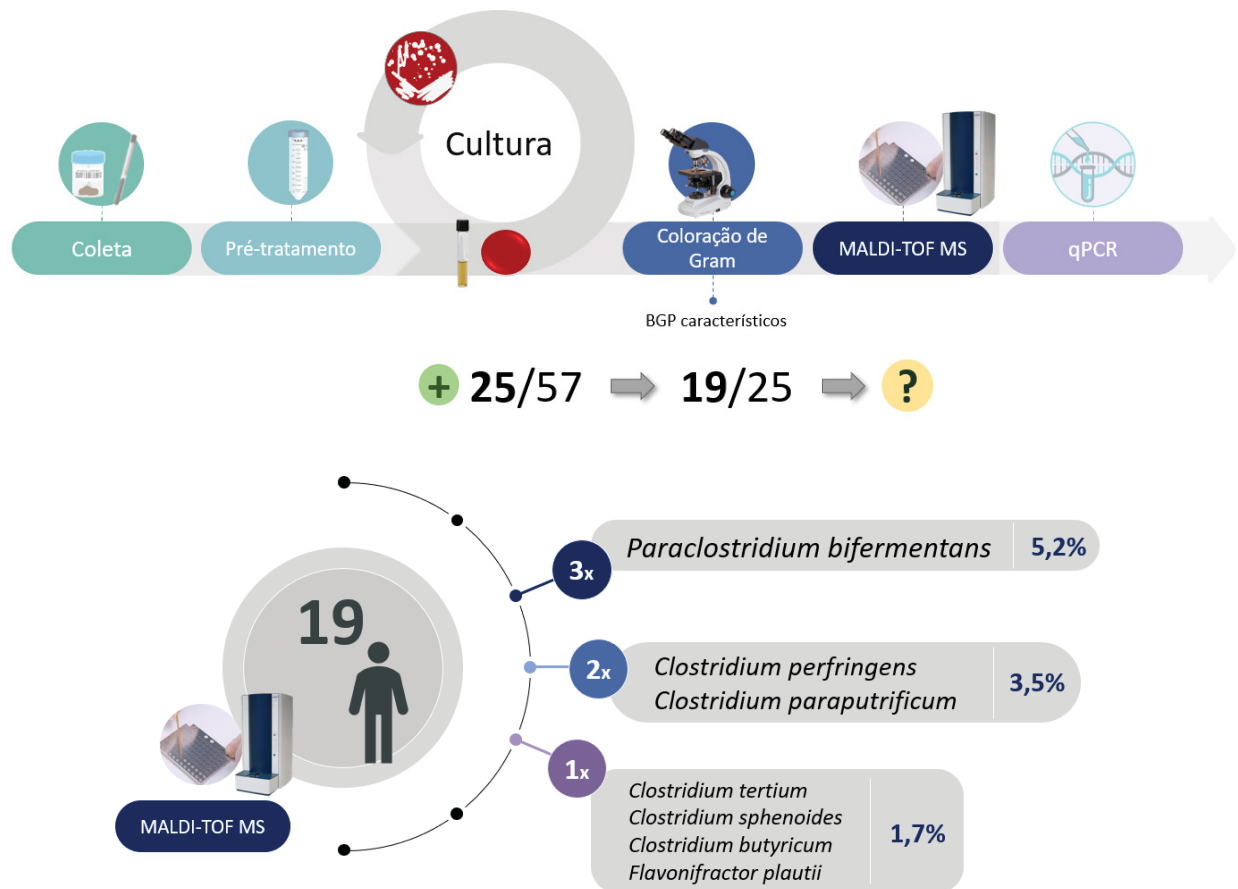
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre fevereiro e setembro de 2022, foram coletadas 57 amostras de humanos sintomáticos e 185 amostras de animais silvestres. Para melhor compreensão, a exposição dos resultados será realizada separadamente.

4.1 AMOSTRAS HUMANAS

Do total de 57 amostras de fezes submetidas a cultura, 24 apresentaram colônias sugestivas de *C. difficile*, tendo suas microscopias analisadas por coloração de Gram e sendo submetidas à identificação por MALDI-TOF. Os resultados obtidos em cada etapa do processamento, bem como as espécies bacterianas anaeróbias esporuladas identificadas nas amostras humanas estão expostos na Figura 5 a seguir. Os resultados na íntegra encontram-se no APÊNDICE 1.

FIGURA 5 – RESULTADOS DA PESQUISA DE *C. difficile* EM HUMANOS SINTOMÁTICOS



Fonte: o autor (2023).

Dentre as amostras humanas, 49 foram coletadas na cidade de Florianópolis e oito em Blumenau. A triagem com os testes de EIE para GHD e toxinas A/B foram realizados nas 41 amostras coletadas nesse hospital. Sete amostras foram positivas para GHD, dentre as quais: duas foram positivas apenas para toxina A; uma amostra foi positiva para ambas toxinas, e quatro foram negativas para a presença de toxinas (Tabela 1). Logo, a presença de *C. difficile* toxigênico foi detectado em apenas três amostras (3/41), através do teste rápido positivo para GHD e toxinas A/B.

TABELA 1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE HUMANOS

Nº CONTROLE	GHD	TOX A	TOX B	CULTURA	MALDI-TOF
01/UFSC	R	R	N/R	Positiva	Perda de viabilidade da cepa
08/UFSC	R	R	R	Negativo	
015/UFSC	R	N/R	N/R	Negativo	
024/UFSC	R	R	N/R	Positiva	Perda de viabilidade da cepa
041/UFSC	R	N/R	N/R	Positiva	<i>Paraclostridium bifermentans</i>
042/UFSC	R	N/R	N/R	Negativo	
044/UFSC	R	N/R	N/R	Positiva	<i>Clostridium tertium</i>

Fonte: o autor (2023).

Legenda: R (Reagente); N/R (Não Reagente).

Na cultura toxigênica, em 25 das 57 das amostras humanas coletadas, houve crescimento em ágar Brucella suplementado. Entre as 25, 19 foram triadas como sugestivas para *C. difficile* quanto à morfologia das colônias e microscopia pela coloração de Gram e encaminhadas para identificação por MALDI-TOF. Alguns isolados foram obtidos em um primeiro cultivo de triagem, entretanto, não houve mais crescimento em cultura nos repiques subsequentes, nem mesmo a partir da amostra original, o que impediu sua identificação por MALDI-TOF, sendo descritos neste estudo como “perda da viabilidade da cepa” (Tabela 1 e Apêndice 1). Todavia, a técnica de MALDI-TOF não identificou nenhuma das cepas selecionadas como *C. difficile*. Não houve, portanto, nenhuma cultura toxigênica positiva nesse estudo. Da mesma forma, nenhuma amostra foi positiva para o gene *tcdB*, sendo consideradas negativas todas as pesquisas de *C. difficile* por qPCR nesse estudo.

Assim, avaliando as três metodologias realizadas, houve resultados positivos apenas nos testes EIE para toxinas, sendo a prevalência de ICD entre os pacientes avaliados nesse estudo definida em 7,3% (3/41) de acordo com os critérios pré-estabelecidos.

Tratando-se da prevalência em humanos sintomáticos, esperava-se encontrar dados semelhantes aos encontrados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, como a prevalência de 11,8% obtido por Pires *et al.* (2019), e 17,7% apresentada pelo estudo de Maestri e colaboradores (2020). No presente estudo, a prevalência de ICD encontrada em pacientes humanos foi de 7,3% (3/41); foram consideradas positivas para ICD as amostras que detectaram a presença de toxinas A/B por EIE, sendo “01/UFSC” (ToxA+), “08/UFSC” (ToxA+/B+) e “24/UFSC” (ToxA+).

Assim como recomendado pelas diretrizes atuais de diagnóstico de ICD, foi utilizado um algoritmo de diagnóstico com dois testes seriados: um teste de triagem de alta sensibilidade, logo, de alto valor preditivo negativo, que detecta o antígeno glutamato desidrogenase (GDH) e determina a presença de *C. difficile*; seguido por um teste de alta especificidade para detectar a presença de toxinas, através de imunoenensaio enzimático (CROBACH *et al.*, 2016; GATEAU *et al.*, 2018; MCDONALD *et al.*, 2018). No caso de resultados discrepantes, deve-se associar testes de PCR para identificar genes codificadores das toxinas A (*tcdA*) e B (*tcdB*), permitindo distinguir cepas patogênicas e não patogênicas (GATEAU *et al.*, 2018).

Embora as técnicas de cultura toxigênica e PCR não tenham detectado a presença de *C. difficile* e o gene da toxina B, respectivamente, deve-se considerar que, neste estudo, estes ensaios foram realizados com algumas limitações. A técnica de PCR depende da qualidade da extração do DNA a partir das amostras, processo que se torna muito dificultado em fezes mucoides (KATO *et al.*, 1993). Além disso, existe grande variabilidade do gene *tcdB* dentre diferentes cepas de *C. difficile*. Conforme ilustrado por Mehlig *et al.* (2001), o gene da toxina B produzida por *C. difficile* C34 (*tcdB*-C34) apresenta uma estrutura secundária diferente da encontrada em outras cepas, como *tcdB*-1470 e *tcdB*-8864, apesar de possuir regiões conservadas comuns a outras citotoxinas clostridiais. Portanto, considerando tal variabilidade genética, é possível que a presença do gene *tcdB* não tenha sido detectado nas amostras em virtude da sequência de aminoácidos do primer utilizado neste estudo.

Da mesma maneira, a cultura de *C. difficile*, considerada padrão-ouro, pode ter sua sensibilidade reduzida em virtude do manejo inadequado da amostra na fase pré-analítica. Para uma recuperação ideal, as amostras de fezes devem ser cultivadas dentro de 2 horas após a coleta a fim de evitar a degradação de toxinas e a perda de viabilidade do patógeno (GATEAU *et al.*, 2018; CZEPIEL *et al.*, 2019). Neste estudo,

devido a questões de logística e infraestrutura, as amostras *in natura* foram armazenadas à 0°C por várias semanas até a realização do teste de esporulação e cultivo; já a extração de DNA para PCR foi armazenada à -20°C. Por outro lado, as amostras de pacientes sintomáticos foram submetidas aos testes rápidos EIE imediatamente após a coleta, sendo analisadas em menos de 2h e minimizando os erros decorrentes do armazenamento das amostras.

Recentemente, Maestri e colaboradores (2022a) encontraram uma prevalência geral de ICD de 8,7% entre os pacientes com diarreia, utilizando três diferentes algoritmos de diagnóstico. Considerando-se apenas o teste de toxina EIE, a prevalência seria de 8,4%; no entanto, a prevalência média de ICD passa a 16,7% utilizando o algoritmo de duas etapas (*C. diff* Quik Chek Complete + GeneXpert *C. difficile*) entre 2017 e 2019, período no qual foram estabelecidos critérios para aceitação/rejeição de amostras e diagnóstico laboratorial adequado (MAESTRI *et al.*, 2020). Houve um aumento de 100% na detecção dos casos de ICD com a adoção do diagnóstico em duas etapas (MAESTRI *et al.*, 2022a). Neste estudo, porém, a qPCR não adicionou nenhum novo caso de ICD aos já detectados pela detecção de toxinas.

No Brasil, os poucos estudos sobre ICD existentes possuem pequeno tamanho amostral e limitam-se a poucas instituições participantes, majoritariamente hospitais de cunho universitário. O presente estudo não apresenta grande divergência em termos de prevalência de ICD quando comparado a outros realizados no país (PIRES *et al.*, 2019; MAESTRI *et al.*, 2020; SALDANHA *et al.*, 2020). Todavia, este estudo apresenta limitações, como o pequeno número de instituições envolvidas e poucas amostras de pacientes sintomáticos, o que limitou a análise estatística.

Observa-se que ainda há uma cultura de negligência no diagnóstico e manejo adequado de doenças de cunho diarreico. Em muitas instituições, apenas casos mais graves e reincidentes acabam sendo encaminhadas para a pesquisa de ICD, devido especialmente à falta de recursos diagnósticos e custos associados. Nota-se que o maior montante de amostras humanas obtidas foi coletado na instituição acadêmica (86%; 49/57); essa diferença amostral pode ser justificada devido a coleta em Florianópolis ter sido realizada em um hospital universitário, no qual a pesquisa de toxinas de *C. difficile* já é bem estabelecida na rotina clínico-laboratorial. Além disso, o critério de coleta de diarreia após 48 horas de internação hospitalar também foi responsável pelo pequeno número de amostras obtidas.

Outro ponto a se discutir é o período em que estas amostras foram obtidas; entre fevereiro e setembro temos um clima predominantemente de outono/inverno na região. No estudo de Maestri *et al.* (2022a), a sazonalidade de ICD também foi avaliada; a prevalência estimada foi maior no inverno, bem como a maior taxa de infecção (10,5%), porém nenhuma significância estatística foi encontrada. O aumento de casos de ICD no inverno tem sido correlacionado ao pico de infecções respiratórias que ocorre na estação, o que causa um aumento de internações hospitalares e uso de antibióticos, favorecendo a ICD (BROWN *et al.*, 2013). Portanto, um novo período de coleta deve ser realizado nas estações mais quentes do ano, permitindo a comparação na prevalência de ICD.

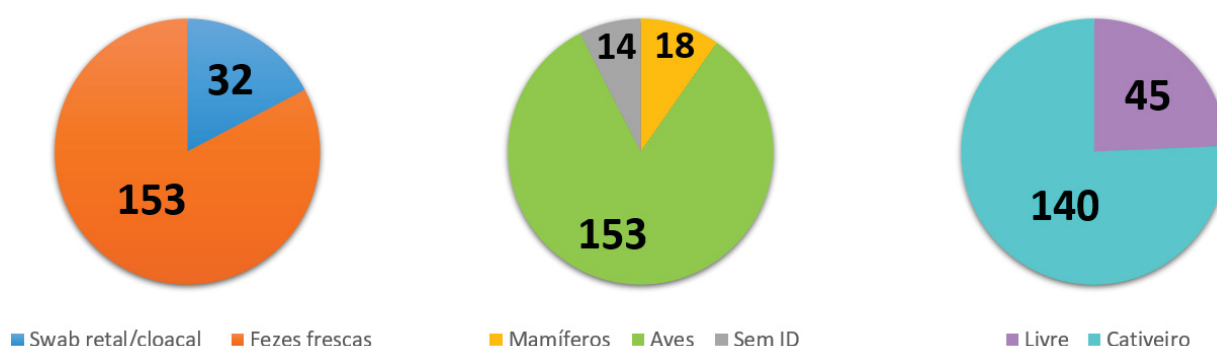
Cabe ressaltar que houveram outros fatores limitantes inesperados para a realização deste estudo. O pequeno número de amostras obtidas foi um reflexo do curto período de coleta, devido ao longo tempo de espera pela liberação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Somado ao aguardo por essa aprovação, houve o prazo para finalizar o mestrado e as dificuldades de desenvolvimento desse projeto durante a pandemia de COVID-19. Assim, essa pesquisa no estado de Santa Catarina deve ser continuada, para que dados estatisticamente significativos possam ser obtidos.

Apesar de não ter sido detectado crescimento *C. difficile*, foram identificadas nas amostras humanas diarreicas as espécies *Paraclostridium bifermentans* (3 amostras; 5,2%), *Clostridium perfringens* (2; 3,5%), *Clostridium paraputrificum* (2; 3,5%), *Clostridium tertium* (1; 1,7%), *Clostridium sphenoides* (1; 1,7%), e *Clostridium butyricum* (1; 1,7%). Dentre as espécies de *Clostridium*, *C. perfringens* é o maior produtor de toxinas e também o mais difundido, sendo encontrado como parte da microbiota de animais e humanos, e no solo (SILVA; LOBATO, 2015). A enterite necrótica causada por *C. perfringens* é uma doença gastrointestinal grave de alto impacto também na avicultura mundial. A forma clínica da doença geralmente é caracterizada por um súbito aumento na mortalidade, enquanto a forma subclínica está associada a danos intestinais, absorção prejudicada de nutrientes e baixo desempenho geral (MORA *et al.*, 2020). Além disso, como um patógeno comum de origem alimentar que também afeta humanos, *C. perfringens* representa uma séria ameaça à saúde humana por meio de aves contaminadas (GONG *et al.*, 2021).

4.2. AMOSTRAS ANIMAIS

Um total de 185 amostras foram coletadas de animais silvestres da região de Blumenau, sendo 32 amostras de swab retal/cloacal e 153 de fezes frescas recém-emitidas. Categorizando os exemplares, 153 amostras são de aves, 18 de mamíferos e 14 amostras não tiveram a espécie ou família identificadas. As amostras foram obtidas majoritariamente de animais em cativeiro, correspondendo a 140 exemplares. A distribuição categórica das amostras encontra-se na Figura 6.

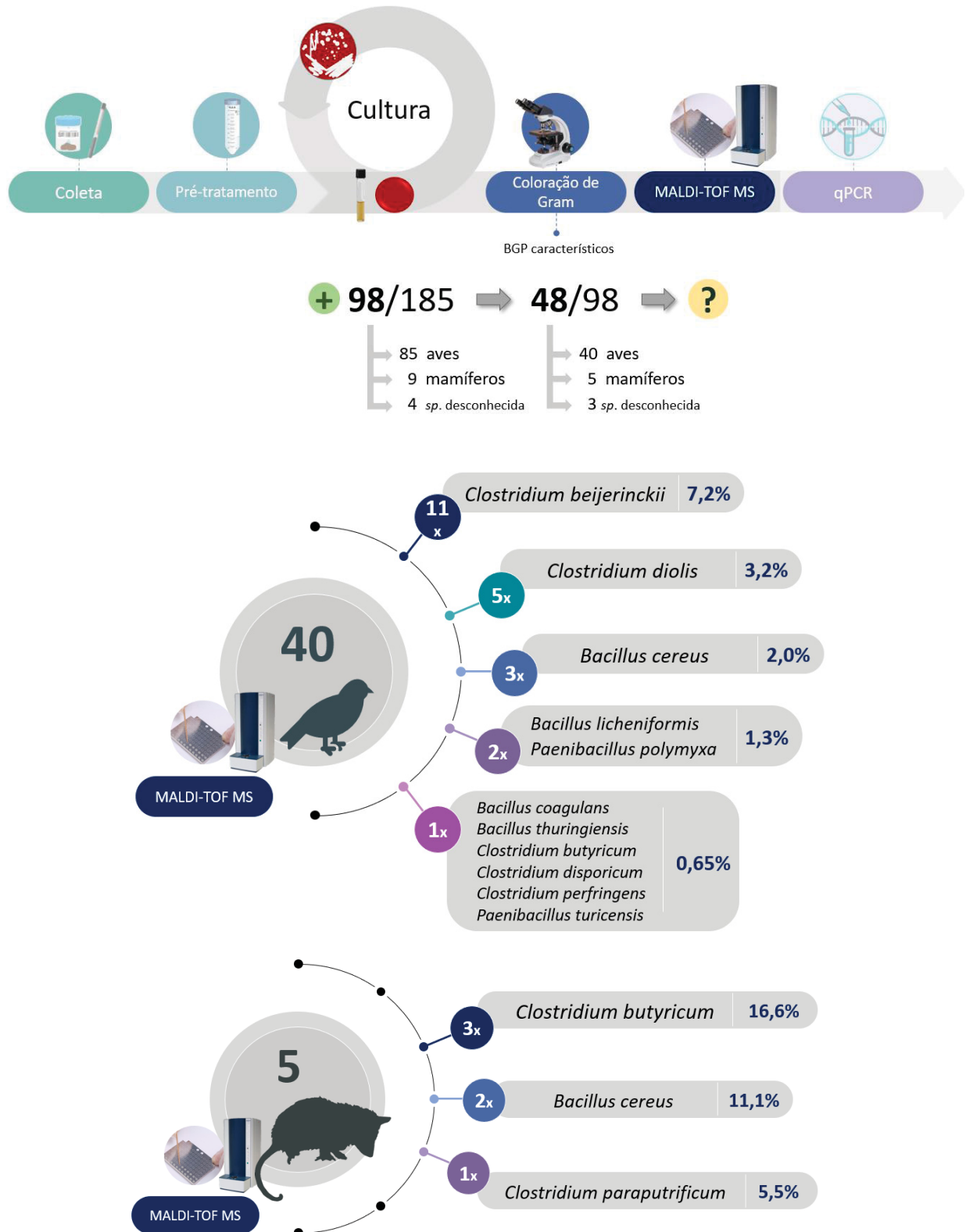
FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DAS AMOSTRAS DE ANIMAIS SILVESTRES



Fonte: o autor (2023).

Legenda: Cada gráfico representa a distribuição das 185 amostras coletadas, sendo o primeiro à esquerda a distribuição por tipo de amostra coletada; o segundo, intermediário, a distribuição taxonômica das espécies; e o gráfico mais à direita, a distribuição por habitat do animal no momento da coleta.

Devido à natureza assintomática das amostras animais, logo, da impossibilidade de correlação clínica dos achados, a pesquisa do gene *tcdB* para pesquisa da Toxina B por PCR seria realizada apenas mediante o isolamento de *C. difficile*; assim, frente aos resultados obtidos, a PCR não foi realizado nestas amostras.

FIGURA 7 – RESULTADOS DA PESQUISA DE *C. difficile* EM ANIMAIS SILVESTRES

Fonte: o autor (2023).

Como descrito por Patowary e Deka (2020), as bactérias do gênero *Paenibacillus* são microrganismos benéficos para o solo que desempenham importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas. Na região da rizosfera, várias espécies do gênero estão envolvidas na fixação de nitrogênio atmosférico, como *Paenibacillus polymyxa*, bem como na solubilização de fosfato e potássio, produção de fito-hormônios e metabólitos antimicrobianos e absorção de micronutrientes pelas plantas (PATOWARY; DEKA, 2020). *P. polymyxa*, que é capaz de fixar nitrogênio, é utilizada na agricultura e horticultura (JIMÉNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2017); dessa forma, é facilmente justificável sua presença como colonizador intestinal de aves silvestres, apesar de nenhum estudo ter descrito isto até o momento. Alguns estudos têm demonstrado inclusive, o potencial de *P. polymyxa* como probiótico em aves de produção, impedindo por exemplo a infecção por *Clostridium perfringens* (GONG *et al.*, 2021).

De forma semelhante, as espécies gram-positivas *Bacillus licheniformis* e *Bacillus coagulans* são formadoras de esporos de alto interesse biotecnológico com inúmeras aplicações, incluindo a produção de compostos bioativos que são aplicados em uma ampla gama de campos, como aquicultura, agricultura, alimentos, biomedicina e na indústria farmacêutica. Destacam-se sua ampla utilização como probióticos de uso humano e veterinário, bem como sua aplicação na biorremediação e biofortificação de matrizes ambientais (CAO *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020; MURAS *et al.*, 2021). Outra espécie do gênero, *Bacillus thuringiensis*, também tem demonstrado potencial aplicação na produção agrícola. Segundo Ehling-Schulz e colaboradores (2019), certas cepas de *B. thuringiensis* são entomopatógenos e são comercializadas para uso como biopesticidas, enquanto algumas cepas foram relatadas como causadoras de infecção em indivíduos imunocomprometidos.

Neste estudo também se detectou a colonização de animais silvestres pela espécie *Bacillus cereus*. A contaminação de alimentos por esta espécie é comum, podendo causar doenças eméticas ou diarreicas geralmente autolimitadas (EHLING-SCHULZ; LERECLUS; KOEHLER, 2019). O habitat natural para a maioria das espécies do grupo *B. cereus* é o solo, e a contaminação direta de produtos agrícolas a partir do solo é importante no que diz respeito a infecções ou intoxicações transmitidas por alimentos. Infelizmente, não há estudos até o momento que discutem o impacto da colonização de aves e mamíferos silvestres pelas espécies discutidas até aqui.

Neste estudo, a espécie mais prevalente em animais silvestres foi *Clostridium beijerinckii*, isolado em 11/185 amostras (5,9%). Embora *Clostridioides difficile* não tenha sido encontrado, algumas espécies do gênero *Clostridium* foram encontradas, como *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium diolis*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium disporicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sphenoides* e *Clostridium paraputrificum*. Infelizmente, há raros estudos relatando a prevalência de espécies do gênero *Clostridium* em animais silvestres. Para a maioria das espécies silvestres, o conhecimento se limita a poucos relatos de casos isolados, e a relação desses microrganismos com os hospedeiros animais ainda não é bem esclarecido. Além da dificuldade de acesso a amostras fecais de espécies silvestres, outro fator complicador é que os animais mais acessíveis estão em cativeiro, o que pode interferir diretamente na composição da microbiota e enviesar os resultados (SILVA; LOBATO, 2015).

A falta de dados sobre a microbiota intestinal de aves torna esses animais um caminho promissor para entender seu potencial papel na transmissão de patógenos multirresistentes (YAHIA *et al.*, 2018). Além disso, os animais silvestres, como parte integrante do ambiente, constituem um reservatório extremamente difícil de avaliar devido a menor disponibilidade de amostras e à falta de padronização para sua avaliação e interpretação (NOWAKIEWICZ *et al.*, 2020). Assim, este estudo apresenta o primeiro passo na caracterização de espécies anaeróbias esporuladas colonizadoras do trato gastrointestinal de animais silvestres da região, além de ser o primeiro estudo relatando a prevalência de *C. difficile* em humanos sintomáticos e hospitalizados no Estado de Santa Catarina, Brasil.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os esporos de *C. difficile* são transmitidos pela via fecal-oral e o patógeno está amplamente presente no meio ambiente. A presença de *C. difficile* já foi descrita em diversas espécies de mamíferos, especialmente como patógenos em humanos. Além disso, a bactéria também foi isolada em uma grande variedade de fontes no ambiente natural (solo, água, vegetais), assim como em ambientes domésticos (banheiros, pisos, pias de banheiro e solas de sapatos) (KACHRIMANIDOU; TZIKA; FILIOUSSIS, 2019; KNIGHT; RILEY, 2019). O ambiente hospitalar também constitui um reservatório importante, pois permite a transmissão nosocomial e comunitária do patógeno (LEFFLER; LAMONT, 2015; CZEPIEL *et al.*, 2019).

Observou-se notadamente através deste estudo, a importância em estabelecer a pesquisa de toxinas A/B e o diagnóstico da infecção por *C. difficile* na rotina hospitalar das instituições de saúde estudadas, assim como descrito anteriormente por Maestri e colaboradores (2022a). Tal diagnóstico ainda se mostra negligenciado, tanto em humanos quanto em animais com sintomatologia sugestiva. Sabe-se que existem cepas de *C. difficile* toxigênicas e não-toxigênicas, mas apenas as formas que produzem toxinas (toxigênicas) são patogênicas.

Conforme evidenciado pelos resultados preliminares obtidos, dentre as sete amostras positivas para GHD, apenas metade foi sugestivo para *C. difficile* na cultura. Por se tratar de testes rápidos de alta especificidade e sensibilidade, sugere-se que o cultivo não foi sensível o suficiente para recuperar o patógeno dessas três amostras em que não houve crescimento. Parte dos objetivos específicos propostos inicialmente não foram cumpridos, uma vez que não foram obtidas cepas isoladas de *C. difficile*, não sendo possível caracterizar as cepas quanto à sensibilidade a antimicrobianos, produção de toxinas, presença de fatores de virulência e genes de resistência a antimicrobianos.

Em animais silvestres, essa dinâmica de colonização e rotas de disseminação ainda não foi sistematicamente estudada. Todavia, a bactéria *C. difficile* já foi descrita em algumas espécies livres e em cativeiro, a citar diversos pássaros, ratos e outros roedores e mamíferos diversos (WEESE, 2020; ZLENDER; GOLOB; RUPNIK, 2022). Torna-se difícil discernir se *C. difficile* é um patógeno para espécies selvagens. A maior parte das informações disponíveis provém da vigilância de animais saudáveis ou com estado de saúde desconhecido, o que impossibilita a avaliação de seu papel

como potencial patógeno oportunista. Propõem-se que a contribuição dos animais silvestres seja a disseminação dos esporos de *C. difficile* por longas distâncias, por exemplo entre regiões urbanas e não urbanizadas. Para tal, ainda será necessário analisar a disseminação ambiental do patógeno, a fim de estabelecer relações clonais e epidemiológicas entre os isolados (WEESE, 2020).

Não existem estudos semelhantes de incidência de colonização de animais selvagens por *C. difficile*, tampouco sobre sua disseminação ambiental em território brasileiro. Neste sentido, este estudo torna-se de grande valia dada a grande complexidade em adquirir amostras desses animais silvestres, além da dificuldade no isolamento desse patógeno. Por fim, isolou-se grande variedade de outras espécies do gênero *Clostridium*; isto revela uma colonização desses animais, o que deve ser estudado mais a fundo a fim de compreender qual o papel dessas bactérias e se há um potencial zoonótico estabelecido.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar do pequeno tamanho amostral, espera-se revelar dados inéditos sobre a disseminação de *C. difficile* sob a perspectiva de saúde única no Estado de Santa Catarina, entrelaçando a saúde humana, animal e ambiental. Se faz necessário dar continuidade a este estudo, uma vez que o tamanho amostral ainda é muito limitado e o isolamento do patógeno é complexo. Amostras de cães e gatos domésticos sintomáticos devem ser coletadas e, se possível, também deverá ser coletado de seus donos, a fim de verificar a disseminação por contato próximo humano/animal. Também é preciso coletar amostras do solo e águas da região, a fim de verificar a viabilidade e disseminação ambiental do patógeno.

Apesar da baixa prevalência encontrada no presente estudo, futuros isolados confirmados deverão ser testados quanto à produção de toxinas e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Espera-se verificar possíveis rotas de disseminação e transmissão zoonótica do patógeno, além de estabelecer correlações entre os isolados e o histórico clínico dos pacientes infectados. Além disso, o isolamento de outras espécies do gênero *Clostridium* proporciona novas oportunidades de pesquisa epidemiológica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GLIL, M. Y. *et al.* Presence of *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat in Egypt. **Anaerobe**, v. 51, p. 21-25, 2018.
- 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.
- ALASMARI, F. *et al.* Prevalence and risk factors for asymptomatic *Clostridium difficile* carriage. **Clinical infectious diseases**, v. 59, n. 2, p. 216-222, 2014.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. *et al.* High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 358-361, 2013.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. *et al.* Prevalence and characteristics of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in dogs and cats attended in diverse veterinary clinics from the Madrid region. **Anaerobe**, v. 48, p. 47-55, 2017.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. *et al.* Shedding of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (*Equus quagga burchellii*). **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 218-222, 2014.
- AMRANE, S. *et al.* Metagenomic and culturomic analysis of gut microbiota dysbiosis during *Clostridium difficile* infection. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.
- ANDRÉS-LASHERAS, S. *et al.* Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 462-472, 2017.
- ANDRÉS-LASHERAS, S. *et al.* Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2018.
- ASAI, T. *et al.* *Clostridium difficile* isolated from the fecal contents of swine in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 4, p. 539-541, 2013.
- BAKTASH, A. *et al.* Mechanistic insights in the success of fecal microbiota transplants for the treatment of *Clostridium difficile* infections. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1242, 2018.
- BANDELJ, P. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European Barn Swallows (*Hirundo rustica*) during migration. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2014.
- BANDELJ, P. *et al.* Quantification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in feces of calves of different age and determination of predominant *Clostridioides difficile* ribotype 033 relatedness and transmission between family dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat analysis. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2018.

BARTLETT, J. G. *et al.* Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. **Journal of Infectious Diseases**, v. 136, n. 5, p. 701-705, 1977.

BAUER, M. P.; KUIJPER, E. J. Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. **Infectious Disease Clinics**, v. 29, n. 1, p. 29-35, 2015.

BONDO, K. J. *et al.* Longitudinal study of *Clostridium difficile* shedding in raccoons on swine farms and conservation areas in Ontario, Canada. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2015.

BONDO, K. J. *et al.* Salmonella, Campylobacter, *Clostridium difficile*, and antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the faeces of sympatric meso-mammals in southern Ontario, Canada. **Zoonoses and public health**, v. 66, n. 4, p. 406-416, 2019.

BRIDGMAN, S. L. *et al.* High fecal IgA is associated with reduced *Clostridium difficile* colonization in infants. **Microbes and infection**, v. 18, n. 9, p. 543-549, 2016.

BROWN, K. A. *et al.* The co-seasonality of pneumonia and influenza with *Clostridium difficile* infection in the United States, 1993–2008. **American journal of epidemiology**, v. 178, n. 1, p. 118-125, 2013.

BURKE, K. E.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. **Gut and liver**, v. 8, n. 1, p. 1, 2014.

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.

BURT, S. A. *et al.* Wild mice in and around the city of Utrecht, the Netherlands, are carriers of *Clostridium difficile* but not ESBL-producing Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp. or MRSA. **Letters in applied microbiology**, v. 67, n. 5, p. 513-519, 2018.

CANÇADO, G. G. L. *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.

CAO, J. *et al.* Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103643, 2020.

CROBACH, M. J. T. *et al.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical microbiology and infection**, v. 22, p. S63-S81, 2016.

CZEPIEL, J. *et al.* *Clostridium difficile* infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, p. 1-11, 2019.

DAVIES, K. A. *et al.* Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of

Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 29, p. 30294, 2016a.

DAVIES, M. P.; ANDERSON, M.; HILTON, A. C. The housefly *Musca domestica* as a mechanical vector of *Clostridium difficile*. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 3, p. 263-267, 2016b.

DE OLIVEIRA JR, C. A. *et al.* Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. **Anaerobe**, v. 51, p. 61-63, 2018.

DEBAST, S. B. *et al.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 1-26, 2014.

DHARMASENA, M.; JIANG, X. Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from animal manure and composts being used as biological soil amendments. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 16, p. e00738-18, 2018.

DOOSTI, A.; MOKHTARI-FARSANI, A. Study of the frequency of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB* genes in feces of Calves in south west of Iran. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2014.

DUBBERKE, E. R. *et al.* Risk factors for acquisition and loss of *Clostridium difficile* colonization in hospitalized patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4533-4543, 2015.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. **Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection**. Stockholm: ECDC; 2018.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 3, p. 7.3.6, 2019.

ESFANDIARI, Z. *et al.* Isolation and characterization of *Clostridium difficile* in farm animals from slaughterhouse to retail stage in Isfahan, Iran. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 10, p. 864-866, 2015.

EYRE, D. W. *et al.* Asymptomatic *Clostridium difficile* colonisation and onward transmission. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78445, 2013.

FRENTROP, M. *et al.* Agricultural fertilization with poultry manure results in persistent environmental contamination with the pathogen *Clostridioides difficile*. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 7591-7602, 2021.

GATEAU, C. *et al.* How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 5, p. 463-468, 2018.

GERDING, D. N. *et al.* *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. **Gut microbes**, v. 5, n. 1, p. 15-27, 2014.

GONG, L. *et al.* Protective effects of *Lactobacillus plantarum* 16 and *Paenibacillus polymyxa* 10 against *Clostridium perfringens* infection in broilers. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 628374, 2021.

GRZEŚKOWIAK, Ł.; ZENTEK, J.; VAHJEN, W. Determination of the extent of *Clostridium difficile* colonisation and toxin accumulation in sows and neonatal piglets. **Anaerobe**, v. 40, p. 5-9, 2016.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. **American journal of diseases of children**, v. 49, n. 2, p. 390-402, 1935.

HEIMANN, S. M. *et al.* Economic burden and cost-effective management of *Clostridium difficile* infections. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 48, n. 1, p. 23-29, 2018.

HIMSWORTH, C. G. *et al.* Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1299-1305, 2014.

HINK, T.; BURNHAM, C. A. D.; DUBBERKE, E. R. A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. **Anaerobe**, v. 19, p. 39-43, 2013.

HUSSAIN, I. *et al.* Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from pet dogs in Assam, India. **Anaerobe**, v. 36, p. 9-13, 2015.

JANEZIC, S. *et al.* International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.

JANEZIC, S.; MLAKAR, S.; RUPNIK, M. Dissemination of *Clostridium difficile* spores between environment and households: dog paws and shoes. **Zoonoses and public health**, v. 65, n. 6, p. 669-674, 2018.

JANGI, S.; LAMONT, J. T. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 51, n. 1, p. 2-7, 2010.

JARDINE, C. M. *et al.* Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild mammals in Southern Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 2, p. 418-421, 2013.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, A. *et al.* Plant probiotic bacteria enhance the quality of fruit and horticultural crops. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 3, p. 483, 2017.

JOHNSON, S. *et al.* Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole: a randomized, placebo-controlled trial. **Annals of internal medicine**, v. 117, n. 4, p. 297-302, 1992.

KACHRIMANIDOU, M.; TZIKA, E.; FILIOUSSIS, G. Clostridioides (*Clostridium*) *difficile* in food-producing animals, horses and household pets: a comprehensive review. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 667, 2019.

KATO, N. *et al.* Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by the polymerase chain reaction. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 2, p. 455-458, 1993.

KECEROVA, Z. *et al.* *Clostridium difficile* isolates derived from Czech horses are resistant to enrofloxacin; cluster to clades 1 and 5 and ribotype 033 predominates. **Anaerobe**, v. 56, p. 17-21, 2019.

KHANNA, S. *et al.* The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. **The American journal of gastroenterology**, v. 107, n. 1, p. 89, 2012.

KIM, H. *et al.* High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea. **Anaerobe**, v. 51, p. 42-46, 2018.

KNIGHT, D. R. *et al.* Contamination of Australian newborn calf carcasses at slaughter with *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, p. 266. e1-266. e7, 2016.

KNIGHT, D. R. *et al.* Evolutionary and genomic insights into *Clostridioides difficile* sequence type 11: a diverse zoonotic and antimicrobial-resistant lineage of global one health importance. **MBio**, 10(2), pp.e00446-19, 2019.

KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Genomic delineation of zoonotic origins of *Clostridium difficile*. **Frontiers in public health**, 7, p.164, 2019.

KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Prevalence of gastrointestinal *Clostridium difficile* carriage in Australian sheep and lambs. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5689-5692, 2013.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Nationwide surveillance study of *Clostridium difficile* in Australian neonatal pigs shows high prevalence and heterogeneity of PCR ribotypes. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 1, p. 119-123, 2015.

KRUTOVA, M. *et al.* The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 7, p. 770-775, 2018.

LAWSON, P. A. *et al.* Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95-99, 2016.

LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 16, p. 1539-1548, 2015.

LEMEE, L. *et al.* Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5710-5714, 2004.

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.

LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* and one health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 857-863, 2020.

LIM, S. C. *et al.* *Clostridium difficile* in soil conditioners, mulches and garden mixes with evidence of a clonal relationship with historical food and clinical isolates. **Environmental Microbiology Reports**, v. 12, n. 6, p. 672-680, 2020.

LOO, V. G. *et al.* A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*–associated diarrhea with high morbidity and mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 23, p. 2442-2449, 2005.

LOPARDO, G. *et al.* Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 8-14, 2015.

MAESTRI, A. C. *et al.* Multicenter study of the epidemiology of *Clostridioides difficile* infection and recurrence in southern Brazil. **Anaerobe**, v. 64, p. 102238, 2020.

MAESTRI, A. C. *et al.* Prevalence and Seasonality of *Clostridioides difficile* over 12 Years at a Tertiary Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 354, 2022a.

MAESTRI, A. C. *et al.* Standardisation and validation of an in-house quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) assay for the diagnosis of *Clostridioides difficile* infection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 193, p. 106399, 2022b.

MARTIN, J. S.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. 13(4):206-16, 2016.

MAZIADE, P. J.; PEREIRA, P.; GOLDSTEIN, E. J. C. A decade of experience in primary prevention of *Clostridium difficile* infection at a community hospital using the probiotic combination *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+). **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. suppl_2, p. S144-S147, 2015.

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.

MCDONALD, L. C. *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 7, p. e1-e48, 2018.

MCFARLAND, L. V. *et al.* Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. **New England journal of medicine**, v. 320, n. 4, p. 204-210, 1989.

MEHLIG, M. *et al.* Variant toxin B and a functional toxin A produced by *Clostridium difficile* C34. **FEMS microbiology letters**, v. 198, n. 2, p. 171-176, 2001.

MIRANDA-KATZ, M. *et al.* Epidemiology and Risk Factors for Community Associated *Clostridioides difficile* in Children. **The Journal of Pediatrics**, 2020.

MORA, Z. V. *et al.* Clostridium perfringens as foodborne pathogen in broiler production: pathophysiology and potential strategies for controlling necrotic enteritis. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1718, 2020.

MURAS, A. *et al.* Biotechnological applications of Bacillus licheniformis. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609-627, 2021.

NORÉN, T.; JOHANSSON, K.; UNEMO, M. Clostridium difficile PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. O2-O6, 2014.

NOWAKIEWICZ, A. *et al.* A significant number of multi-drug resistant Enterococcus faecalis in wildlife animals; long-term consequences and new or known reservoirs of resistance?. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135830, 2020.

O'SHAUGHNESSY, R. A. *et al.* Clostridioides difficile on Ohio swine farms (2015): A comparison of swine and human environments and assessment of on-farm risk factors. **Zoonoses and public health**, v. 66, n. 7, p. 861-870, 2019.

OFORI, E. *et al.* Community-acquired Clostridium difficile: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 4, p. 436-442, 2018.

ORDEN, C. *et al.* Isolation of Clostridium difficile from dogs with digestive disorders, including stable metronidazole-resistant strains. **Anaerobe**, v. 43, p. 78-81, 2017.

PATOWARY, R.; DEKA, H. Paenibacillus. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 339-361.

PELÁEZ, T. *et al.* Characterization of swine isolates of Clostridium difficile in Spain: a potential source of epidemic multidrug resistant strains?. **Anaerobe**, v. 22, p. 45-49, 2013.

PERUMALSAMY, S.; PUTSATHIT, P.; RILEY, T.V. High prevalence of Clostridium difficile in soil, mulch and lawn samples from the grounds of Western Australian hospitals. **Anaerobe**, 60, p.102065, 2019.

PIRES, R. N. *et al.* High frequency of Clostridium difficile infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 40, n. 4, p. 484-485, 2019.

PUTSATHIT, P. *et al.* Molecular epidemiology of Clostridium difficile isolated from piglets. **Veterinary microbiology**, v. 237, p. 108408, 2019.

RIVAS, L. *et al.* Isolation and characterization of Clostridium difficile from a small survey of wastewater, food and animals in New Zealand. **Letters in applied microbiology**, v. 70, n. 1, p. 29-35, 2020.

RODRIGUEZ, C. *et al.* Carriage and acquisition rates of Clostridium difficile in hospitalized horses, including molecular characterization, multilocus sequence typing and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 309-317, 2014.

RODRIGUEZ, C. *et al.* Clostridium difficile beyond stools: dog nasal discharge as a possible new vector of bacterial transmission. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01629, 2019.

RODRIGUEZ, C. *et al.* Clostridium difficile in beef cattle farms, farmers and their environment: assessing the spread of the bacterium. **Veterinary microbiology**, v. 210, p. 183-187, 2017.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A. *et al.* Clostridium difficile in foods and animals: history and measures to reduce exposure. **Animal health research reviews**, v. 14, n. 1, p. 11-29, 2013.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

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. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

SCHAEFFLER, H.; BREITRUECK, A. Clostridium difficile—From colonization to infection. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 646, 2018.

SCHARLING, F. S. *et al.* Prevalence of salmonella species, clostridium perfringens, and clostridium difficile in the feces of healthy elephants (loxodonta species and elephas maximus) in europe. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 51, n. 4, p. 752-760, 2021.

SCHNEEBERG, A. *et al.* Clostridium difficile genotypes in piglet populations in Germany. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3796-3803, 2013a.

SCHNEEBERG, A. *et al.* Presence of Clostridium difficile PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1190-1198, 2013b.

SCHOSTER, A. *et al.* Prevalence of Clostridium difficile and Clostridium perfringens in Swiss horses with and without gastrointestinal disease and microbiota composition in relation to Clostridium difficile shedding. **Veterinary microbiology**, v. 239, p. 108433, 2019.

SHIVAPERUMAL, N.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. High prevalence of Clostridium difficile in home gardens in Western Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 1, p. e01572-20, 2020.

SILVA, R.O.S.; LOBATO, F.C.F. Clostridium perfringens: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. **Anaerobe**, v. 33, p. 14-17, 2015.

SILVA, R.O.S. *et al.* Carriage of Clostridium difficile in free-living South American coati (Nasua nasua) in Brazil. **Anaerobe**, v. 30, p. 99-101, 2014a.

SILVA, R.O.S. *et al.* Clostridium difficile and Clostridium perfringens from wild carnivore species in Brazil. **Anaerobe**, v. 28, p. 207-211, 2014b.

SILVA, R.O.S. *et al.* Isolation of *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* in diarrheic and nondiarrheic cats. **Anaerobe**, v. 62, p. 102164, 2020.

SQUIRE, M.M.; RILEY, T.V. *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a 'One Health' opportunity. **One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases**, p. 299-314, 2012.

STEIN, K. *et al.* PCR-ribotype distribution of *Clostridium difficile* in Irish pigs. **Anaerobe**, v. 48, p. 237-241, 2017.

STONE, N. E. *et al.* More than 50% of *Clostridium difficile* isolates from pet dogs in Flagstaff, USA, carry toxigenic genotypes. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164504, 2016.

TENOVER, F. C. *et al.* Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3719-3724, 2010.

TERVEER, E. M. *et al.* Detection of *Clostridium difficile* in feces of asymptomatic patients admitted to the hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 403-411, 2017.

THANISSERY, R.; WINSTON, J. A.; THERIOT, C. M. Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. **Anaerobe**, v. 45, p. 86-100, 2017.

THERIOT, C. M.; YOUNG, V. B. Interactions between the gastrointestinal microbiome and *Clostridium difficile*. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 445-461, 2015.

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.

USUI, M. *et al.* Distribution and characterization of *Clostridium difficile* isolated from dogs in Japan. **Anaerobe**, v. 37, p. 58-61, 2016.

USUI, M. *et al.* Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. **Anaerobe**, v. 43, p. 15-20, 2017.

VEDANTAM, G. *et al.* *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. **Gut microbes**, v. 3, n. 2, p. 121-134, 2012.

WEESE, J.S. Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 287-309, 2011.

WEESE, J.S. *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* in animals. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 32, n. 2, p. 213-221, 2020.

WEESE, J.S.; MSHELBWALA, P.P.; LOHR, F. *Clostridium difficile* shedding by healthy dogs in Nigeria and Malawi. **Zoonoses and public health**, v. 66, n. 6, p. 618-621, 2019.

WEESE, J.S.; SLOVIS, N.; ROUSSEAU, J. Clostridioides (Clostridium) difficile in neonatal foals and mares at a referral hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 35, n. 2, p. 1140-1146, 2021.

WEI, Y. *et al.* Prevalence, genotype and antimicrobial resistance of Clostridium difficile isolates from healthy pets in Eastern China. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2019.

WEN, G. L. *et al.* Isolation, molecular typing and antimicrobial resistance of Clostridium difficile in dogs and cats in Lanzhou city of Northwest China. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

WETTERWIK, K. J. *et al.* Clostridium difficile in faeces from healthy dogs and dogs with diarrhea. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 1-4, 2013.

WU, Y. C. *et al.* Potentially hypervirulent Clostridium difficile PCR ribotype 078 lineage isolates in pigs and possible implications for humans in Taiwan. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 2, p. 115-122, 2016.

WU, Y. C. *et al.* Prevalence and molecular characterization of Clostridium difficile isolates from a pig slaughterhouse, pork, and humans in Taiwan. **International journal of food microbiology**, v. 242, p. 37-44, 2017.

YAHIA, H. B; *et al.* Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds: Emergence of vanA and vanB2 harbouring Enterococcus faecalis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 52, n. 6, p. 936-941, 2018.

ZACHARIOUDAKIS, I. M. *et al.* Colonization with toxinogenic C. difficile upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 381-390, 2015.

ZHANG, S. *et al.* Cost of hospital management of Clostridium difficile infection in United States—a meta-analysis and modelling study. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 447, 2016.

ZHOU, Y. *et al.* Application of Bacillus coagulans in animal husbandry and its underlying mechanisms. **Animals**, v. 10, n. 3, p. 454, 2020.

ZLENDER, T.; GOLOB, Z.; RUPNIK, M. Low Clostridioides *difficile* positivity rate in wild animal shelter in Slovenia. **Anaerobe**, v. 77, p. 102643, 2022.

APÊNDICE 1 – PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS HUMANAS

Nº CONTROLE	MATERIAL	GHD	TOX A	TOX B	CULTURA	GRAM	MALDI-TOF	qPCR ToxB
01/UFSC	Fezes frescas	R	R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
02/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
03/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP esporulado	<i>Clostridium perfringens</i>	Negativo
04/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
05/UFSC	Fezes frescas				Negativo			Negativo
06/UFSC	Fezes frescas				Positiva	BGP	<i>Flavonifractor plautii</i>	Negativo
07/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
08/UFSC	Fezes frescas	R	R	R	Negativo			Negativo
09/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
010/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
011/UFSC	Fezes frescas				Negativo			Negativo
012/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
013/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
014/UFSC	Fezes frescas				Negativo			Negativo
015/UFSC	Fezes frescas	R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
016/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	<i>Clostridium paraputrificum</i>	Negativo
017/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
018/UFSC	Fezes frescas				Negativo			Negativo
019/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
020/UFSC	Fezes frescas				Positiva	BGN		Negativo
021/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
022/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
023/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	<i>Clostridium perfringens</i>	Negativo
024/UFSC	Fezes frescas	R	R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
025/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
026/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
027/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
028/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
029/UFSC	Fezes frescas				Positiva	BGP	<i>Paraclostridium bifermentans</i>	Negativo
030/UFSC	Fezes frescas				Negativo			Negativo
031/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
032/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
033/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
034/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
035/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	CGP		Negativo
036/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	CGP		Negativo
037/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
038/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
039/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
040/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
041/UFSC	Fezes frescas	R	N/R	N/R	Positiva	BGP	<i>Paraclostridium bifermentans</i>	Negativo
042/UFSC	Fezes frescas	R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
043/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
044/UFSC	Fezes frescas	R	N/R	N/R	Positiva	BGP esporulado	<i>Clostridium tertium</i>	Negativo
045/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
046/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	CGP	Não realizado.	Negativo
047/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo

048/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Positiva	CGP/BGN		Negativo
049/UFSC	Fezes frescas	N/R	N/R	N/R	Negativo			Negativo
1/BNU	Fezes frescas				Positiva	CGP		Negativo
2/BNU	Fezes frescas				Positiva	BGP/CGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
3/BNU	Fezes frescas				Negativa			Negativo
4/BNU	Fezes frescas				Positiva	BGP	<i>Paraclostridium bifermentans</i>	Negativo
5/BNU	Fezes frescas				Positiva	BGP/CGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
6/BNU	Fezes frescas				Negativa			Negativo
7/BNU	Fezes frescas				Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa	Negativo
8/BNU	Fezes frescas				Positiva	BGP esporulado	<i>Clostridium paraputrificum</i> , <i>Clostridium sphenoides</i> , <i>Clostridium butyricum</i>	Negativo

FONTE: o autor (2023).

LEGENDA	
R	Reagente
N/R	Não Reagente
CGP	Coco Gram-Positivo
BGP	Bacilo Gram-Positivo
BGN	Bacilo Gram-Negativo

APÊNDICE 2 – PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS ANIMAIS

Nº CONTROLE	ESPÉCIE	MATERIAL	CULTURA	GRAM	MALDI-TOF
02/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Paenibacillus turicensis</i>
03/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGN	Não realizado
04/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Bacillus cereus</i>
05/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Bacillus thuringiensis</i>
07/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGN	Não realizado
08/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
09/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP c/ esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i>
10/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP c/ esporos+ CGP	<i>Clostridium beijerinckii</i>
11/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGN	Não realizado
13/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGN	Não realizado
14/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Bacillus licheniformis</i>
15/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i>
16/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
17/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
19/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
21/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i>
22/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Clostridium diolis</i>
23/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i>
30/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium diolis</i>
31/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Bacillus cereus</i>
34/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecalis</i>
35/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Clostridium disporicum</i>
36/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
37/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecium</i>
38/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
39/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecalis</i>
40/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Bacillus coagulans</i>
43/22	Canário	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i>
50/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Clostridium diolis</i>
54/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i>
57/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
60/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
61/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecalis</i>
62/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecium</i>
63/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecalis</i>
66/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecalis</i>
68/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Enterococcus faecalis</i>
70/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
71/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
73/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
74/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
75/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
76/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
78/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
79/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
80/22	Canário	Fezes frescas	Negativo		
82/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		

83/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
85/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
86/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
87/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
88/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGP não característico	Não realizado
90/22	Canário	Fezes frescas	Positiva	CGP +BGN	Não realizado
92/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
93/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP esporulado	Perda de viabilidade da cepa
94/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
95/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
97/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
99/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Bacillus licheformis</i>
100/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Negativo		
102/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
103/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGN	Não realizado
106/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGP	Perda de viabilidade da cepa
107/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGN+CGP	Não realizado
110/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+ BGP	<i>Clostridium diolis</i>
112/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+BGP não característico	Não realizado
114/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Clostridium beijerinckii</i>
116/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGN+CGP	Não realizado
120/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Clostridium diolis</i>
123/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP não característico+ CGP	Não realizado
124/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP fino e longo+ CGP+BGN	Não realizado
125/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
126/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+ BGP	<i>Lactococcus garvieae</i>
128/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP+ BGN	Não realizado
131/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP não característico, CGP	Não realizado
133/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP não característico	Não realizado
134/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP não característico + CGP	Não realizado
135/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP longo não característico	Não realizado
137/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
138/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
143/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP não característico + CGP	Não realizado
144/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGN + CGP	Não realizado
145/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP+CGP	<i>Bacillus licheniformis</i>
146/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
147/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGN +CGP	Não realizado
148/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
150/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
154/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
156/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
162/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
169/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	Leveduras + BGP	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
171/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGP com esporos	<i>Clostridium beijerinckii</i> e <i>C. diolis</i>
173/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
176/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP + BGP	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
180/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP + BGP	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

182/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
185/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	BGN + CGP	Não realizado
186/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
188/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
191/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
Bugio	Bugio	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
013/22	Murucututu	Swab cloacal	Negativo		
022/22	Bem-te-vi	Swab cloacal	Negativo		
044/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
045/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
046/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Swab cloacal	Positiva	BGP	<i>Bacillus cereus, Clostridium butyricum</i>
047/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Swab cloacal	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa
048/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
049/22	<i>Sicalis flaveola pelzeni</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
050/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
051/22	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
052/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
053/22	<i>Sicalis flaveola flaveola</i> (Canário)	Swab cloacal	Negativo		
263/22	Maitaca	Swab cloacal	Negativo		
348/22	Rolinha Roxa	Swab cloacal	Negativo		
363/22	Tucano	Swab cloacal	Negativo		
364/22	Bacurau	Swab cloacal	Negativo		
366/22	Graxaim	Swab retal	Positiva	BGP	<i>Clostridium paraputrificum</i>
380/22	Graxaim	Swab retal	Positiva	BGP	Perda de viabilidade da cepa
410/22	Trinca-ferro 1	Fezes frescas	Negativo		
411/22	Cutia	Swab retal	Negativo		
412/22	Bugio	Fezes frescas	Negativo		
418/22	Cutia	Swab retal	Positiva	CGP + BGN	Não realizado
424/22	Murucututu	Swab cloacal	Negativo		
429/22	Gambá	Swab retal	Negativo		
432/22	Falção relógio	Swab cloacal	Negativo		
445/22	Cardeal	Fezes frescas	Negativo		
459/22	Azulão	Fezes frescas	Negativo		
460/22	Azulão	Fezes frescas	Positiva	BGN	Não realizado
461/22	Trinca-ferro 2	Fezes frescas	Negativo		
481/22	Gambá	Swab retal	Negativo		
491/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
501/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
523/22	Murucututu	Fezes frescas	Negativo		
525/22	Coruja do mato	Swab cloacal	Negativo		
563/22	Gato-do-mato pequeno	Fezes frescas	Positiva	BGP + CGP	<i>Clostridium butyricum, Enterococcus gallinarum, Bacillus cereus</i>
567/22	Tamanduá-mirim	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Clostridium butyricum</i>
576/22	Murucututu	Fezes frescas	Negativo		
584/22	Sabiá-una 2	Fezes frescas	Negativo		
585/22	Capivara	Fezes frescas	Positiva	BGP esporulado	<i>Bacillus cereus, Enterococcus gallinarum, Clostridium butyricum</i>
591/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
592/22	Sabiá-una 1	Fezes frescas	Negativo		
618/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
624/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Clostridium sphenoides</i>

625/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
626/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
627/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Positiva	BGP	<i>Bacillus cereus, Clostridium butyricum</i>
630/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
644/22	Gambá de orelha branca	Swab retal	Negativo		
657/22	Tiê sangue	Fezes frescas	Positiva	BGP esporulado	<i>Clostridium perfringens</i>
666/22	Bico de pimenta	Fezes frescas	Negativo		
670/22	Trinca-ferro	Fezes frescas	Negativo		
715/22	Bico de pimenta	Fezes frescas	Negativo		
716/22	Bico de pimenta	Fezes frescas	Negativo		
717/22	Trinca-ferro	Fezes frescas	Negativo		
718/22	Trinca-ferro	Fezes frescas	Negativo		
719/22	Pintassilgo	Fezes frescas	Negativo		
720/22	Coleirinho	Fezes frescas	Negativo		
721/22	Coleirinho	Fezes frescas	Negativo		
722/22	Coleirinho	Fezes frescas	Negativo		
723/22	Coleirinho	Fezes frescas	Negativo		
724/22	Curio	Fezes frescas	Negativo		
820/22	Aracuã	Fezes frescas	Negativo		
822/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Positiva	CGP	Não realizado
824/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
883/22	Capivara	Fezes frescas	Negativo		
893/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
894/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
895/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
896/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
897/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
899/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
901/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
902/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Positiva	BGP esporulado	<i>Clostridium sphenoides, Clostridium butyricum</i>
903/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
904/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		
944/22	Rolinha roxa	Fezes frescas	Negativo		
Mika	Bugio	Fezes frescas	Positiva	CGP + BGN	Não realizado
Berno	Bugio	Swab retal	Positiva	CGP	Não realizado
Papagaio roxo	Papagaio roxo	Swab retal	Negativo		
Zeca	Bugio	Swab retal	Negativo		
Berna	Bugio	Swab retal	Negativo		
B003	Espécie não identificada	Swab retal	Negativo		
Mica	Bugio	Swab retal	Negativo		
843/22	Espécie não identificada	Fezes frescas	Negativo		

FONTE: o autor (2023).

LEGENDA	
Aves	amarelo-claro 2
Mamíferos	laranja-claro 1
Animais de cativeiro	vermelho-cereja-claro 2
CGP	Coco Gram-Positivo
BGP	Bacilo Gram-Positivo
BGN	Bacilo Gram-Negativo

APÊNDICE 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está **sendo convidado(a) a participar** do projeto de pesquisa abaixo identificado. Este documento contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir, a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

1. Identificação do Projeto de Pesquisa	
Título do projeto: Epidemiologia de infecções por <i>Clostridioides difficile</i> em Santa Catarina	
Curso: Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Universidade Federal do Paraná (UFPR)	
Número de participantes no centro: 100	Número total de participantes: 300
Instituição onde será realizada: Hospital Santa Isabel – Blumenau/SC; Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) – Florianópolis/SC; Hospital Azambuja – Brusque/SC.	
Nome dos pesquisadores e colaboradores: Fernanda de Castilho, Keite da Silva Nogueira, Alessandro Conrado de Oliveira Silveira; Mara Cristina Scheffer, Débora Horn.	

2. Identificação do Participante da Pesquisa	
Nome:	
Telefone:	E-mail:

3. Identificação do Pesquisador Responsável	
Nome: Keite da Silva Nogueira	
Profissão: Farmacêutica microbiologista	Número do registro no Conselho: CRF/PR 14648
Telefone: (41) 99900-3513	E-mail:

Eu, participante da pesquisa, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do projeto de pesquisa acima identificado. Discuti com o pesquisador responsável sobre a minha decisão em participar e estou ciente de que:

1. O **objetivo** desta pesquisa é avaliar os fatores clínicos e laboratoriais relacionados ao desenvolvimento de diarreia infecciosa em adultos atendidos em hospitais de Santa Catarina.
2. O **procedimento** para a coleta de dados será através da coleta de amostra de fezes diarreica, que será realizado por profissional do laboratório do hospital. As informações do histórico de saúde, exames, doenças prévias, cirurgias e medicamentos utilizados no tratamento serão coletadas pelos pesquisadores no prontuário médico. Todas as informações serão organizadas em uma tabela com identificação numérica, mantendo os dados pessoais e identificação do participante anônimos.
3. Os **benefícios** de participar desta pesquisa é que o Sr.(a) terá à disposição exames que poderão ajudar o médico assistente a identificar a causa da diarreia, melhorando o seu tratamento.
4. Os **desconfortos** e os **riscos** esperados são desconforto no momento da coleta das fezes. 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), que tornará a coleta da amostra mais confortável. A coleta poderá ser feita pelo próprio participante ou por seu responsável, diminuindo o constrangimento.
5. A **minha participação** neste projeto contribuirá para o diagnóstico de diarreia infecciosa no ambiente hospitalar, auxiliando a identificar os fatores de risco para o desenvolvimento da diarreia e seus fatores agravantes, assim como contribuirá para um tratamento mais eficaz dessas infecções.
6. A **minha participação é isenta de despesas**, entretanto tenho ciência de que não serei remunerado(a) pela minha participação na pesquisa.

7. Tenho **direito** a assistência e tratamento por eventuais danos ou constrangimentos decorrentes da minha participação na presente pesquisa. 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 tempo que for necessário em caso de danos comprovadamente decorrentes da pesquisa.
8. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa a qualquer momento/no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A minha **desistência** não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem-estar físico, social, psicológico, emocional, espiritual e cultural. Minha desistência não interferirá no atendimento prestado durante o período de internação hospitalar, nem no tratamento oferecido.
9. Meus dados pessoais serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados os resultados da pesquisa em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.
10. Poderei consultar o **pesquisador responsável** (acima identificado) sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação na pesquisa.
11. Tenho a garantia de tomar conhecimento, pessoalmente, do(s) resultado(s) parcial(is) e final(is) desta pesquisa.
12. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos da FURB (telefone 47 3321-0122).

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual teor (conteúdo) e forma, ficando uma delas em minha posse.

_____, ____ de _____ de _____.

**Nome do pesquisador responsável pela
 obtenção do consentimento**

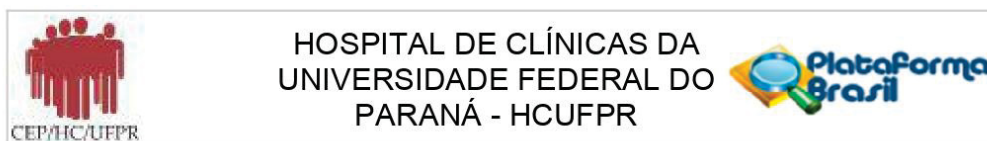
Participante da pesquisa e/ou responsável

Testemunhas (exigidas caso o voluntário não possa, por algum motivo, assinar o termo):

Nome:
RG/CPF:
Telefone:

Nome:
RG/CPF:
Telefone:

ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Adriane Ceschin Maestri

Área Temática:

Versão: 11

CAAE: 59027716.5.1001.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Fundação Araucária
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.075.276

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda onde os pesquisadores propõem: mudança na equipe, cronograma e inclusão de casuística

Serão incluídas no projeto quatro instituições de Santa Catarina e os respectivos pesquisadores responsáveis em cada instituição: Hospital Santa Isabel, na cidade de Blumenau; Hospital, Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC), na cidade de Florianópolis; e Hospital Azambuja, na cidade de Brusque/SC e Universidade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau. As coletas nessas instituições serão realizadas pelo período de um ano após aprovação pelo comitê de ética. O processamento será simultâneo a coleta de amostras pela mesma metodologia já aprovada e executada na versão anterior. As amostras serão coletadas nos três hospitais pelo período de um ano e processados no laboratório de Bacteriologia da FURB e no Laboratório de Bacteriologia do HC/UFPR.

Os pesquisadores incluídos foram:

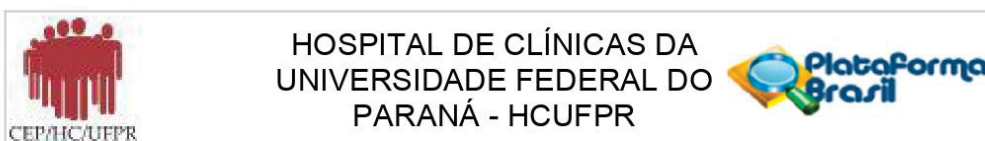
Fernanda de Castilho

Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

Mara Cristina Scheffer

Débora Horn

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: 5.075.276

Objetivo da Pesquisa:

Sem relatos de alterações em relação ao projeto original, complementando agora com a possibilidade de comparar os isolados de *Clostridium difficile* do Paraná e Santa Catarina quanto ao perfil de sensibilidade, genes de virulência e demais características.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem relatos de alterações em relação ao projeto original

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes, com duas cartas de justificativa da emenda, uma assinada pela pesquisadora principal Adriane Ceschin Maestri e outra pela pesquisadora Keite da Silva Nogueira

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada

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 N° 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação da Emenda.

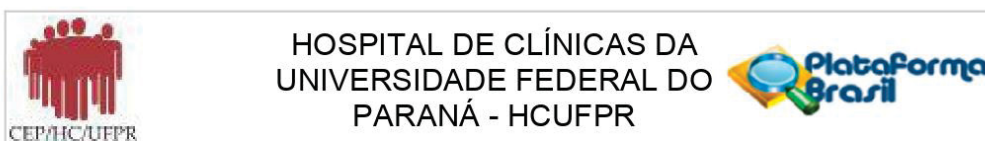
Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

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_1820507_E8.pdf	30/09/2021 16:01:02		Aceito
Outros	CARTA_EMENDA.pdf	28/09/2021 17:34:31	Adriane Ceschin Maestri	Aceito

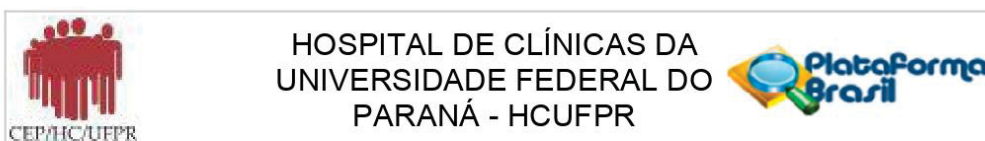
Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 5.075.276

Outros	CARTA_EMENDA.doc	28/09/2021 17:34:01	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	CARTA_EMENDA_fernanda.pdf	02/09/2021 21:31:22	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	modificacao_projeto.doc	02/09/2021 21:27:30	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	assinaturas.pdf	02/09/2021 21:23:35	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Cronograma	E10.doc	14/12/2020 18:56:14	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_modificado2019.doc	16/07/2019 09:38:42	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	carta_alter_jul2019.doc	16/07/2019 09:37:19	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	utilizacao_dados.pdf	01/10/2018 19:07:26	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	responsabilidade.pdf	01/10/2018 19:07:14	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_cep_setembro.doc	01/10/2018 19:06:02	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_modificado_2018.doc	16/06/2018 11:12:24	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	cartapesq_cep_junho.doc	16/06/2018 11:09:51	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	comprpesq_2018.pdf	16/06/2018 11:07:48	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromisso_2.pdf	16/06/2018 11:05:37	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_comppesq_2018.pdf	16/06/2018 11:04:36	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale12_18junho.doc	16/06/2018 10:59:46	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale07_12junho.doc	16/06/2018 10:59:21	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado_junho.doc	16/06/2018 10:47:41	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	proj_mod_2018.pdf	26/04/2018 19:50:13	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração de	HT_carta.pdf	26/04/2018	Adriane Ceschin	Aceito

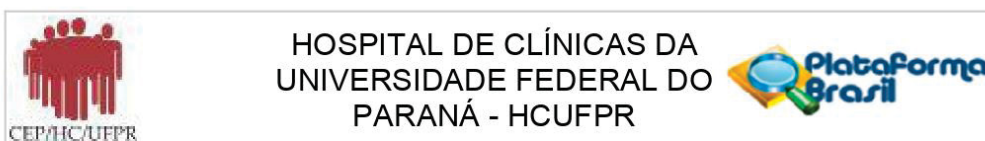
Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181**Bairro:** Alto da Glória**CEP:** 80.060-900**UF:** PR**Município:** CURITIBA**Telefone:** (41)3360-1041**Fax:** (41)3360-1041**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 5.075.276

Pesquisadores	HT_carta.pdf	19:45:08	Maestri	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_encam_pesq_cep.doc	26/04/2018 19:43:03	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	projeto_modificado2018.pdf	26/04/2018 19:38:27	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	carta_exclusao.doc	12/12/2017 21:34:14	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mod_hpp.pdf	21/11/2017 21:10:04	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Nacoes_declaracao.pdf	21/11/2017 21:06:05	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Hosp_nacoes.pdf	21/11/2017 21:05:16	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale_hpp.doc	21/11/2017 21:00:00	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado_HPP.doc	21/11/2017 20:58:59	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Autorizacao_HPP_DIRETOR_CHEFE_D E_SERVICO.pdf	21/11/2017 20:53:18	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	carta_encam_alter.doc	21/11/2017 20:48:38	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	compromisso.pdf	26/07/2017 08:01:35	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	carta_encam_pesq.doc	20/07/2017 19:47:36	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Erasto.pdf	20/07/2017 18:41:58	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	HNSG.pdf	20/07/2017 18:36:16	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Hospital_do_Idoso.pdf	19/07/2017 21:24:19	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Pequeno_Principe.pdf	19/07/2017 21:10:09	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Declaração do Patrocinador	certificado_financiamento.pdf	19/07/2017 21:09:28	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Santa_Casa.pdf	19/07/2017 21:03:06	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_3.doc	16/07/2017 20:42:49	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Onix.pdf	16/07/2017 20:40:05	Adriane Ceschin Maestri	Aceito
Outros	Sao_Vicente.pdf	16/07/2017	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: 5.075.276

Outros	Sao_Vicente.pdf	20:39:16	Maestri	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
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
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	guarda.pdf	04/06/2016 09:07:53	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, 02 de Novembro de 2021

Assinado por:
Niazy Ramos Filho
(Coordenador(a))

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