

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO**

Fernando Antônio Castro Carvalho

**PERFIL EVOLUTIVO E ESTUDO RIBOTÍPICO DA INFECÇÃO POR
CLOSTRIDIODES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE EM COORTE DE PACIENTES
COM DIARREIA INTERNADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG**

Belo Horizonte
2021

Fernando Antônio Castro Carvalho

**PERFIL EVOLUTIVO E ESTUDO RIBOTÍPICO DA INFECÇÃO POR
CLOSTRIDIODES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE EM COORTE DE PACIENTES
COM DIARREIA INTERNADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Garcia Vilela.

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Belo Horizonte
2021

C331p Carvalho, Fernando Antônio Castro.
Perfil evolutivo e estudo ribotípico da infecção por Clostridioides (Clostridium) difficile em coorte de pacientes com diarreia internados no Hospital das Clínicas da UFMG [manuscrito]. / Fernando Antônio Castro Carvalho. - - Belo Horizonte: 2021.

83f.: il.

Orientador (a): Eduardo Garcia Vilela.

Coorientador (a): Rodrigo Otávio Silveira Silva.

Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Infecções por Clostridium. 2. Recidiva. 3. Mortalidade. 4. Dissertação Acadêmica. I. Vilela, Eduardo Garcia. II. Silva, Rodrigo Otávio Silveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 368



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

PERFIL EVOLUTIVO E ESTUDO RIBOTÍPICO DA INFECÇÃO POR CLOSTRIDIÓIDES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE EM COORTE DE PACIENTES COM DIARREIA INTERNADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG

FERNANDO ANTONIO CASTRO CARVALHO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte e cinco de março de dois mil e vinte e um, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Eduardo Garcia Vilela - Orientador
UFMG

Rodrigo Otávio Silveira - Coorientador
UFMG

Luiz Gonzaga Vaz Coelho
UFMG

Ligia Yukie Sasaki
UNESP

Belo Horizonte, 25 de março de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Gonzaga Vaz Coelho**, Membro de comissão, em 25/03/2021, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otavio Silveira Silva**, Professor do Magistério Superior, em 25/03/2021, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ligia Yukie Sasaki**, Usuário Externo, em 26/03/2021, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Garcia Vilela**, Professor do Magistério Superior, em 13/04/2021, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0601114** e o código CRC **BBA67BD0**.

A Deus, pelas oportunidades, vitórias e aprendizados nos momentos difíceis.

A minha esposa, pais e irmãos, pelo incentivo no crescimento profissional.

A minha filha, por ser fonte de inspiração e força para os desafios da vida.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Juliana, pelo apoio em todos os momentos e incentivo profissional.

A minha filha Gabriela, por tornar os dias mais leves e alegres.

Aos meus pais, pelo exemplo de bons valores e por me dar as condições para alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Bruno e Luís, parceiros e amigos para todas as horas.

Às funcionárias Telma e Simone, pela gentileza e presteza de sempre no auxílio durante a pesquisa com prontuários no SAME.

À aluna Bárbara, pelo empenho em contribuir com a coleta de dados dos prontuários.

À toda equipe do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, pela contribuição.

Ao professor Rodrigo Otávio Silveira Silva, pelos conselhos na condução do projeto, pela disponibilidade e por viabilizar a realização da propedêutica especializada envolvida na pesquisa.

Ao professor Eduardo Garcia Vilela, pelos ensinamentos, pelo exemplo de excelência, pela orientação em todas as etapas do trabalho, pelo apoio e paciência.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton (1643 – 1727)

RESUMO

Introdução: a infecção pelo *Clostridioides difficile* (ICD) é a principal causa de diarreia associada a cuidados de saúde. O surgimento de estirpes hipervirulentas a partir dos anos 2000 em países desenvolvidos foi responsável pelo aumento da incidência, da gravidade e da mortalidade relacionada a infecção e motivou estudos de vigilância, visando melhor controle e manejo dessa afecção. Objetivos: avaliar o perfil evolutivo da ICD no que tange seus critérios de gravidade, recorrência, tempo de internação hospitalar e óbito e, caracterizar seus ribotipos (RT). Pacientes e métodos: foram incluídos 65 pacientes com ICD confirmada por meio de testes de detecção das toxinas A e B ou cultura toxigênica e feita pesquisa do gene produtor de toxina binária nas amostras de fezes. A ribotipagem foi realizada em 44 estirpes bacterianas. Os pacientes foram avaliados em relação aos aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais e em relação aos critérios de gravidade. Resultados: 34 pacientes eram do sexo masculino e 31 do sexo feminino. A mediana de idade foi de 59 (20 – 87) anos. Ocorreram 16 óbitos (24,6%) durante o período de internação. A mediana do índice de comorbidades de Charlson (ICC) foi de 4 (0 -15) e a pontuação ≥ 8 esteve presente em 11 pacientes (16,9%). Dentre as comorbidades, as doenças neoplásicas foram as mais prevalentes e estiveram presentes em 29 pacientes (44,6%) e as doenças cardiovasculares em 23 (35,4%). Quatorze pacientes (21,5%) haviam sido submetidos a transplantes previamente e, apenas um paciente não fez uso antibióticos (ATB) nos três meses que antecederam o diagnóstico. A recorrência esteve associada ao ICC > 7 (OR = 24,52, IC 95% 1,67 – 360,22). O maior período de internação hospitalar esteve relacionado aos múltiplos cursos de ATB (OR = 1,64, IC 95% 1,29 – 1,82) e à necessidade de nutrição enteral (OR = 1,66, IC 95% 1,36 – 1,82). O período de internação entre o diagnóstico da ICD e a alta foi maior entre os pacientes que fizeram uso de múltiplos cursos de ATB (OR = 1,58, IC 95% 1,13 – 1,80), início de novo antibiótico após o diagnóstico (OR = 1,75, IC 95% 1,48 – 1,88) e internação em terapia intensiva (OR = 1,57, IC 95% 1,18 – 1,78). O escore de ATLAS (OR = 1,76, IC 95% 1,08 – 2,86) e a não melhora da diarreia (OR = 1,08, IC 95% 1,008 – 1,747) estiveram relacionados a maior mortalidade. Foram identificadas 8 estirpes produtoras de toxina binária. O ribotipo

mais prevalente foi o 106 (43,2%), seguido pelo 014/020 (9,1%), sendo identificados 20 ribotipos diferentes. O RT 027 não foi isolado. A presença da toxina binária e os ribotipos não se relacionaram com desfechos estudados. Conclusão: ICD esteve presente em amostra de pacientes mais complexos, portadores de doenças mais graves. Foram identificados fatores associados a maior chance de morte, maior período de internação hospitalar e recorrência. Foi observada uma diversidade de ribotipos, ainda que o RT 106 tenha sido mais prevalente. A presença da toxina binária e as estirpes de *C. difficile* não se relacionaram aos desfechos estudados.

Palavras-chave: Infecção por *Clostridioides difficile*. Ribotipos. Escore de gravidade ATLAS. Recorrência. Mortalidade.

ABSTRACT

Introduction: *Clostridioides difficile* infection (CDI) is the main cause of health care-associated diarrhea. The emergency of hypervirulent strains since the 2000s in developed countries has been responsible for the increasing incidence, severity and mortality related to the infection and has motivated the surveillance studies, aiming for better control and management of this disease. Objectives: assess the CDI evolutionary profile and characterize its ribotypes. Patients and methods: 65 patients whose diagnosis was confirmed by testing for toxins A and B and toxigenic culture performed in stool specimens were included. 44 bacterial strains were subjected to ribotyping and binary toxin gene search by the polymerase chain reaction. The patients were characterized in relation to demographics, clinical, laboratory aspects and severity criteria. Results: 34 patients were male and 31 were female. The age median was 59 (20-87) years old. There were 16 (24,6%) deaths during the period of hospitalization. The median of the Charlson Comorbidity Index was 4 (0-15). The score greater or equal to 8 was present in 16,9% of the sample (11 patients). Among the comorbidities, the neoplasms were the most prevalent, present in 29 patients (44.6%), followed by cardiovascular diseases, in 23 patients (35.4%). Fourteen patients had been transplanted and only one patient had not been treated with antibiotics in the three months preceding the diagnosis. Recurrence was associated with the Charlson Comorbidity Index > 7 (OR = 24.52; IC 95% 1.67 – 360.22). The longer length of hospitalization was related to multiple antibiotics treatments (OR = 1.64; IC 95% 1.29 – 1.82) and to the need for enteral nutrition (OR = 1.66; IC 95% 1.36 – 1.82). The period of hospitalization between the CDI diagnosis and the hospital discharge was longer among the patients with multiple antibiotic treatments (OR = 1.58; IC 95% 1.13 – 1.80), new antibiotic after diagnosis (OR = 1.75; IC 95% 1.48 – 1.88) and need of intensive care unit (OR = 1.57; IC 95% 1.18 – 1.78). The ATLAS score (OR = 1.76; CI 95% 1.08 – 2.86) and the non improvement of the diarrhea (OR = 1.08; CI 95% 1.008 – 1.747) were related to a higher mortality. Eight binary toxin positive strains were identified. The most common ribotype (RT) was the 106 (43.2%), followed by 014/020 (9.1%), with 20 different ribotypes being identified. RT027 has not been isolated. The identification of the binary toxin and the type of C.

difficile did not correlate with the studied outcomes. Conclusion: CDI was present in the samples of complex patients and carriers of severe diseases. Factors associated with a higher chance of death, longer hospitalization and recurrence were identified. A higher diversity of ribotypes was observed, although the RT106 was the most prevalent. The identification of the binary toxin and the type of *C. difficile* did not correlate with the studied outcomes.

Keywords: *Clostridioides difficile*. Ribotypes. ATLAS score. Recurrence. Mortality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfis de ribotipos (RT) por reação em cadeia de polimerase (PCR), exemplificado com a identificação de estirpes pertencentes aos RT 81 ao 90. 32

Figura 2: Diagrama que mostra o universo amostral, incluindo exclusões, perdas e número final de participantes. 45

Figura 3: Interpretação do teste de imunocromatografia para detecção do *C. difficile*.

48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de gravidade da infecção pelo *Clostridioides difficile* adotado pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) e pela *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) 27

Tabela 2: Escore de gravidade da infecção pelo *Clostridioides difficile* definido pelo ATLAS 28

Tabela 3: Resultados dos modelos finais das análises de regressão logística e regressão de Cox 62

LISTA DE ABREVIATURAS

ATB: antibiótico

ATLAS: escore de gravidade da infecção pelo *C. difficile*

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CDT: toxina binária

Cdta e Cdtb: genes codificadores da toxina binária

CT: cultura toxigênica

DII: doença inflamatória intestinal

DM – *diabetes mellitus*

DRC – doença renal crônica

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima

ENCC: ensaio de neutralização de citotoxicidade

EUA: Estados Unidos da América

GDH: glutamato desidrogenase

IC: Intervalo de confiança

ICC: índice de comorbidades de Charlson

ICD: infecção por *Clostridioides (Clostridium) difficile*

IDSA: *Infectious Disease Society of America*

IMC: índice de massa corpórea

LG: leucócitos globais

MLST: *Multilocus sequence typing*

NAAT: teste de amplificação de ácido nucléico

NAP-1: *North American pulsed-field type 1*

OR: *odds ratio*

PAM: pressão arterial média

PCR: *polymerase chain reaction* – reação em cadeia de polimerase

PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*

REA: *restriction endonuclease analysis*

RNA_m: ácido ribonucleico ribossômico mensageiro

rRNA: ácido ribonucleico ribossômico

RT: ribotipo

SHEA: *Society for Healthcare Epidemiology of America*

ST: tipo sequencial

tcdA: gene codificador da toxina A

TcdA: toxina A

tcdB: gene codificador da toxina B

TcdB: toxina B

tcdC: gene inibidor do PaLoc

tcdR: gene que estimula PaLoc

tcdE: gene que regula liberação de toxinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	17
1.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA GERAL	17
1.2 MECANISMOS PATOGÊNICOS E FATORES DE RISCO RELACIONADOS À ICD..	21
1.3 FATORES PREDITORES DE PIOR PROGNÓSTICO RELACIONADOS À ICD	24
1.4 DIAGNÓSTICO E PROPEDÊUTICA.....	29
1.5 TÉCNICAS DE TIPAGEM DO <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i>	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVOS GERAIS	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 PACIENTES E LOCAL DO ESTUDO	44
3.2 DEFINIÇÕES DE CASOS.....	45
3.3 DESENHO DO ESTUDO.....	46
3.4 ANÁLISE LABORATORIAL FECAL	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4. RESULTADOS	51
4.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	51
4.2 ANÁLISE DE DESFECHOS	60
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTAS FUTURAS	72

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
9. ANEXO	79

1. INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

1.1 História e epidemiologia geral

O *Clostridioides (Clostridium) difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio obrigatório, formador de esporos, pertencente ao filo *Firmicutes*, cujas toxinas causam doença gastrointestinal, que varia desde diarreia leve até quadros de colite pseudomembranosa, podendo ainda evoluir sob a forma de megacólon tóxico e levar ao óbito. Descrito pela primeira vez em 1935 por Hall e O'Toole, depois de ter sido identificado na microbiota intestinal de recém-nascidos saudáveis, inicialmente, foi denominado de *Bacillus difficilis*, isto porque seu cultivo era dificultoso.¹ Somente em 1978, quando estudado por Bartlett, então denominado de *Clostridium difficile*, verificou-se que era o responsável pela produção da citotoxina encontrada nas fezes de pacientes com colite pseudomembranosa associada ao uso de antibióticos.² Mais recentemente, a partir da realização da análise genética da molécula 16S do ácido ribonucleico ribossômico mensageiro (RNAm), foi reclassificado em novo gênero e passou a ser denominado de *Clostridioides difficile*.³

A despeito do aspecto dinâmico de sua epidemiologia, ao longo das últimas décadas, a infecção pelo *C. difficile* passou a ser reconhecida como a principal causa bacteriana de diarreia associada à antibioticoterapia e patógeno nosocomial de grande importância epidemiológica, relacionado à morbimortalidade crescente em diversos países.⁴ Nos Estados Unidos da América (EUA), nos anos 90, a incidência dessa afecção permaneceu estável, tendo sido registrados cerca de 30-40 casos por 100.000 indivíduos por ano. Em 2001, esse número aumentou para 50 e, em 2005, para 84 casos por 100.000 indivíduos.^{5,6} Segundo dados do sistema de vigilância do Programa de Infecções Emergentes do Center for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA, em 2011, a incidência atingiu 147,2 casos por 100.000.⁷ Este aumento aconteceu de modo concomitante com a gravidade das infecções, culminando com aumento da mortalidade associada a esta infecção.

Em estudo realizado em Quebec, Canadá, foi evidenciado que a taxa de infecção pelo *C. difficile* aumentou de 65,6/100.000 indivíduos no ano de 1991 para 156,3/100.000 indivíduos em 2003 e foi acompanhada pelo aumento da taxa de complicações (megacólon, perfuração intestinal, necessidade de colectomia e

choque), de 7,1% para 18,2% ($p < 0,001$). Neste mesmo estudo, ainda foi relatado aumento da mortalidade em 30 dias de 4,7% para 13,8% ($p < 0,001$).⁸ Essa elevação do número de casos registrados esteve associada, sobretudo, ao uso, muitas vezes indiscriminado, de drogas antimicrobianas (principal fator de risco para essa infecção), ainda que, notadamente, ocorreram avanços científicos que permitiram a utilização de métodos diagnósticos mais acurados para o seu diagnóstico.

Nas duas últimas décadas, foram registrados também surtos de estirpes mais virulentas, com destaque para o ribotipo (RT) 027, verificados em países desenvolvidos.⁹ A disseminação desta cepa hipervirulenta, denominada *North American pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) type 1, PCR-ribotype 27 (NAP1/027)* na América do Norte e Europa foi apontada como fator mais relevante para alteração do comportamento epidemiológico da doença, assim como o perfil evolutivo da infecção, a partir dos anos 2000. O RT 027 apresenta como fator patogênico mais importante, a maior capacidade de produção de toxinas (número 16 vezes maior para produção de toxina A e 23 vezes maior para toxina B), quando comparado com outras estirpes. Possui também a propriedade de sintetizar a toxina binária e está relacionada à maior resistência à ação das fluorquinolonas.^{10, 11}

Mais recentemente, estudos epidemiológicos que analisaram a expressão fenotípica do *C. difficile*, verificaram redução no número de casos de infecções relacionadas ao ribotipo 027 na América do Norte. Enquanto taxas de incidência próximas de 40%, tanto nos EUA quanto no Canadá, vinham sendo registradas entre 2009 e 2011, estes números reduziram para 18% e 24%, respectivamente, entre 2012 e 2015 ($p < 0,001$). Concomitante, foi observado aumento do número de casos relacionados aos ribotipos 014/20 e 106 em ambos os países, sabidamente estirpes não hipervirulentas.^{12, 13} Apesar disso, atualmente, o *C. difficile* continua sendo o patógeno mais comum associado a infecções nosocomiais nos EUA, responsável por 15% de todas as infecções hospitalares.¹⁴ Na Inglaterra, foi observado queda de 55% para 21% nas taxas de incidência desta estirpe entre 2007 e 2010, coincidindo com redução na incidência e na mortalidade da ICD. Tal fenômeno foi atribuído a medidas adotadas pelo sistema de saúde neste país, com desaque para controle rigoroso do uso de fluorquinolonas.^{15, 16}

No leste europeu, houve registro do aumento do número de casos relacionados ao RT 027 no ano de 2015, diferentemente de outras regiões do continente, onde as taxas de incidência permaneceram estáveis.¹² Não obstante, tem sido observado emergência de outras estirpes de maior virulência, incluindo os ribotipos 078 (*restriction endonuclease analysis* do grupo BK) e 244 (REA do grupo AF).

O RT 244 foi descrito inicialmente na Austrália em 2011 e, assim como os RT 027 e 078, também produz toxinas A, B e binária, o que gera infecções mais graves e maior mortalidade. É, portanto, estirpe hipervirulenta e, sob o ponto de vista filogenético, pertence ao mesmo clado do RT 027. Entretanto, diferentemente desta estirpe, é susceptível ao moxifloxacino, o que sugere a presença de um outro mecanismo de seleção e emergência de cepa hipervirulenta não relacionado à resistência a fluorquinolonas.^{17, 18}

Na América Latina, os dados epidemiológicos sobre a ICD são escassos, pois existem limitações nos sistemas de vigilância e a disponibilidade de suporte laboratorial adequado também é reduzida. O primeiro relato de infecção pela estirpe hipervirulenta RT 027 no continente ocorreu em 2009, em meio a um surto infeccioso em um hospital da Costa Rica. Quase metade das infecções (45%) foi secundária a esta estirpe e tinha capacidade de produzir toxinas A e B e toxina binária. Além disso, foi constatada a deleção do gene *tcdC* e alta resistência a fluorquinolonas e clindamicina.¹⁹ Em estudo posterior, realizado no mesmo país, no qual foram analisadas amostras de 68 pacientes internados por diarreia entre 2010 e 2012, sem registro de surtos no período, o RT 027 não foi encontrado. As estirpes predominantes passaram a ser o RT 017 e uma variante local, o RT 012, que também apresentavam alta resistência a fluorquinolonas e clindamicina, o que reforça o conceito da característica dinâmica da epidemiologia da ICD.²⁰ Posteriormente, outros países da América Latina também notificaram a ocorrência de infecção pelo RT 027, como Chile, Panamá, Honduras e México, o que gerou alerta para a necessidade de maior vigilância na prevenção da disseminação de cepas hipervirulentas.²¹⁻²³

No Brasil, não existem dados robustos para avaliar incidência da ICD de modo mais preciso e os estudos apresentam vieses metodológicos no que tange o diagnóstico da ICD.²⁴ Balassiano *et al.*, em 2009, reportaram taxa de 28,5% (6/21) de ICD em amostras fecais de pacientes imunossuprimidos submetidos à antibioticoterapia de

amplo espectro em um hospital no Rio de Janeiro. Os ribotipos encontrados foram 014 e 106, ambos sensíveis a metronidazol e resistentes a ciprofloxacino. Foi o primeiro relato da presença do ribotipo 106 no Brasil, comumente descrito em estudos mais recentes realizados no Reino Unido.²⁵ Em outra publicação do mesmo grupo em 2011, foi relatada taxa de 27,1% (19 entre 70 pacientes internados e imunossuprimidos) de ICD e a bactéria foi isolada em apenas 8 amostras para realização da ribotipagem. Foram identificados 4 ribotipos diferentes (133, 233, 020, 010). A metade referia-se ao RT 133. Todos eram sensíveis a metronidazol, vancomicina e moxifloxacino e resistentes a ciprofloxacino, levofloxacino e clindamicina.²⁶

Em estudos realizados na Universidade Federal de Minas Gerais também foi evidenciada diversidade de ribotipos, contudo também foram identificadas estirpes que produzem toxina binária, em amostras de fezes coletadas entre 2008 e 2017. Os RT 014/020 e RT106 perfaziam 20,5% da amostra, cada. Os outros ribotipos encontrados foram 001/072 (8,8%), 046 (5,9%), BR1 (5,9%) e 050, 109, 111, 126, 131, 602, BR2 a BR8, em um paciente cada.^{27, 28} Em outra publicação do mesmo grupo, Diniz *et al* analisaram 38 cepas toxigênicas do *C. difficile* pelo método *Multilocus sequence typing* (MLST) e foram identificados 20 tipos sequenciais (ST) diferentes, 6 dos quais ainda não descritos, reforçando a teoria da diversidade. Foi observado ainda que 5 dos 6 tipos sequenciais pertenciam ao clado 2, o mesmo das cepas hipervirulentas, o que sugere a possibilidade de circulação de outras cepas hipervirulentas diferentes da ST1/RT027 em nosso meio.²⁹

Em 2018, Pires *et al* detectaram pela primeira vez o RT 027 no Brasil em amostra de fezes de um paciente internado em hospital de Porto Alegre, no Sul do país, com história de diarreia por 2 meses e uso de diversos antimicrobianos de amplo espectro. Por meio da técnica de PCR em tempo real, identificou-se, além da presença dos genes produtores das toxinas A e B, deleção do *tcdC*. Esta estirpe foi classificada como tipo sequencial (ST) 67 pelo método MLST, alocada no clado 2, que contém grande diversidade de tipos sequenciais, incluindo ST1/RT027, como descrito previamente.³⁰

Em dezembro de 2020, foi publicado estudo que envolveu 5 hospitais localizados regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil e a prevalência da infecção foi de 15%, variando entre 0 e 37%. Foi realizada a tipagem molecular, na qual metade das

amostras analisadas pertenciam ao ST42, que corresponde quase exclusivamente ao RT106.³¹

Além do impacto negativo nos desfechos clínicos dos pacientes internados, o impacto econômico da ICD sobre o sistema de saúde é relevante. Seu custo anual estimado nos EUA varia de 1,1 a 3,2 bilhões de dólares.^{32, 33} O gasto com um paciente com infecção nosocomial por *C. difficile* varia de \$9.179,00 a \$16.464,00, considerando a possibilidade de recorrências.³⁴

Fica portanto evidente a importância do aprimoramento da vigilância epidemiológica do *C. difficile* no Brasil para melhor conhecimento do seu comportamento em nosso meio, o que possibilitará medidas mais efetivas na prevenção e tratamento.

1.2 Mecanismos patogênicos e fatores de risco relacionados à ICD

A exposição ao *C. difficile* está associada a manifestações e respostas variadas no hospedeiro, que inclui desde diarreia leve até colite fulminante. Contudo, em uma parcela menor, pode ocorrer apenas a colonização.³⁵ O amplo espectro de apresentação relaciona-se tanto à estirpe bacteriana quanto a fatores relacionados ao hospedeiro.

A virulência do *C. difficile* deve-se a ação das toxinas A (TcdA) e B (TcdB), que apresentam efeito citotóxico e enteropático. São codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente, localizados no locus de patogenicidade PaLoc, que mede 19,6 kb. Nesse mesmo locus encontram-se também os genes reguladores, que são, o *tcdC*, regulador negativo da expressão do referido locus, o *tcdR* que atua como regulador positivo e o *tcdE* que atua na liberação das toxinas ao codificar proteínas com função de porinas.

As toxinas exercem seu efeito citotóxico e enteropático por meio da ação da enzima glicosiltransferase que inativa a RhoA (Ras homolog family member A) e Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), GTPases no citosol das células alvo, o que promove a ruptura das fibras de actina do citoesqueleto e das junções firmes entre as células epiteliais colônicas, ocasionando acúmulo de líquido intracelular e perda da integridade epitelial. Secundariamente, ocorre estímulo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e infiltração neutrofílica, gerando maior dano à barreira intestinal.³⁶⁻

³⁹ Uma terceira toxina, denominada toxina binária (CDT), também pode fazer parte do processo fisiopatogênico da ICD. Descrita em 1987, seu mecanismo patogênico

não depende da glicosilação. É composta por dois componentes (CDTa e CDTb). O primeiro atua por meio de ribosilação dependente da adenosina difosfato, que interfere na polimerização da rede de actina subjacente à membrana celular e o segundo, CDTb, facilita a internalização da toxina para o citosol celular. Codificada pelos genes *cdtA* e *cdtB*, no Cdt locus ou CdtLoc, não relacionado ao PaLoc, mede 6.2 kb. Neste locus, encontra-se também o gene regulatório *cdtR*. A prevalência estimada da presença do gene codificador da toxina binária entre as cepas toxigênicas é de 6,4%.⁴⁰ Acredita-se que essa toxina aumente a capacidade de colonização bacteriana devido à formação de protrusões de microtúbulos que promovem adesão bacteriana às células epiteliais, o que explica a maior virulência das estirpes que a produzem, como por exemplo o RT027.⁴⁰

Dentre os fatores de risco relacionados ao hospedeiro, o uso prévio de antibióticos (ATB) e a idade acima de 65 anos são considerados os mais importantes para o desenvolvimento da ICD.⁴¹ A hospitalização prolongada também é fator importante e se associa, intrinsecamente, a outras duas condições relevantes, o maior número de comorbidades e o maior comprometimento sistêmico.⁴² Também são consideradas condições predisponentes cirurgia gastrointestinal, internação em terapia intensiva e necessidade de intubação orotraqueal.^{43, 44}

A respeito do uso de ATB, o risco é proporcional à duração do tratamento, número de antibióticos utilizados e à classe de cada um.⁴⁵ Os mais frequentemente implicados na ICD são ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas, clindamicina e fluorquinolonas, apesar de qualquer um poder estar associado, inclusive aqueles que apresentam atividade *in vitro* contra *C. difficile*.⁴⁶ O mecanismo está relacionado à alteração da microbiota e ao ambiente metabólico intestinal, o que facilitaria a colonização pela bactéria. Muitos dos metabólitos que influenciam o desenvolvimento do *C. difficile* desde a germinação de seus esporos até a formação de colônias são produtos ou pertencem ao próprio microbioma e metaboloma intestinal, incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e sais biliares. Em relação aos sais biliares, que atuam como inibidores da germinação de esporos de *C. difficile*, há diminuição da concentração intestinal dos mesmos relacionada ao uso de antibióticos. Uso de ATB também está associado a diminuição de subpopulações bacterianas pertencente ao filo *Firmicutes*, como exemplo a *Roseburia*, naturalmente presente na microbiota, e que exerceria papel simbiótico

para com o organismo humano e aumento persistente da população de algumas bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, tais como *Bacteroides* e *E. coli*, que apresentam potencial patogênico. Além disso também ocorre redução da diversidade microbiana.⁴⁷

Determinadas comorbidades estão relacionadas a maior risco e a formas mais graves da doença. Pacientes com doença inflamatória intestinal, especificamente aqueles que tem acometimento colônico, apresentam maior chance de ICD. Os pacientes com retocolite ulcerativa ainda tem risco maior de recorrência, entre 30 e 35% e taxas maiores de colectomia após a infecção.⁴⁸⁻⁵⁰ A doença renal crônica aumenta risco de infecção em até 2,5 vezes, assim como aumento das taxas de recorrência.^{51, 52} Outra população com prevalência aumentada são os receptores de transplante, como é o caso dos pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas, que apresentam risco 9 vezes maior de ICD e também aumento nas taxas de mortalidade.⁵³⁻⁵⁵ Neste cenário, a imunidade é fator crucial para resposta menos efetiva contra as toxinas, na medida que a não atuação adequada do sistema imunológico constitui-se em mecanismo importante para desenvolvimento de quadros mais graves da doença. Pacientes com câncer também são mais susceptíveis a ICD. Uma vez hospitalizados, até 15% tornam-se colonizados.⁵⁶ Deve-se ressaltar ainda que estas populações de pacientes, não raramente, apresentam maior tempo de internação, uso mais prolongado e de maior espectro de antibióticos, necessidade de uso de medicamentos quimioterápicos e imunossupressores.

A terapia supressora de ácido gástrico também está na lista das condições associadas ao desenvolvimento da ICD. A diminuição da acidez gástrica facilitaria a colonização pelo *C. difficile*, mas também poderia alterar microbiota intestinal.⁵⁷⁻⁵⁹ Ademais, existem evidências acerca do maior risco de recorrência de infecção nos pacientes em uso de inibidores de bomba de prótons.^{52, 60, 61} Entretanto, esta associação epidemiológica pode ser resultado da presença concomitante de outros fatores, como gravidade da doença de base e tempo de internação hospitalar, portanto, deve ser interpretada com cuidado.

1.3 Fatores preditores de pior prognóstico relacionados à ICD

O amplo espectro de apresentação da ICD traduz a necessidade de ter boas ferramentas para estadiamento e predição de casos mais graves, o que auxiliaria na escolha acertada do tratamento.^{7, 9, 62} Desfechos indesejáveis, tais como recorrência da infecção, não resposta ao tratamento e complicações que necessitam de tratamento cirúrgico, aumentam a morbidade e os custos com o cuidado destes pacientes. A recorrência é uma complicação muito relevante e está presente em cerca de 20 e 30% dos pacientes após uso do metronidazol e em taxas pouco menores após tratamento com vancomicina.^{62, 63} Nesta situação, a taxa de mortalidade é cerca de 30% maior, quando comparada ao grupo de pacientes sem recorrência, até 6 meses após o evento.⁶⁴

Até então, estudos que avaliaram modelos preditivos de evolução da infecção foram sustentados por número amostral pequeno e/ou metodologia pouco adequada. Com isso, as variáveis utilizadas para determinar o prognóstico da infecção apresentam limitações e vieses. Parâmetros de predição objetivos, facilmente mensurados na prática clínica e disponíveis no momento do diagnóstico de ICD seriam desejáveis neste cenário e, muito provavelmente, impactaria favoravelmente nos desfechos clínicos.

Gujja *et al*, em estudo retrospectivo que incluiu 200 pacientes com ICD confirmada laboratorialmente, evidenciaram que a injúria renal aguda, definida a partir da elevação da creatinina acima de 50% do basal, apresentou acurácia de 73% em prever mortalidade e a leucocitose maior que 30.000 células/mm³ esteve associada à necessidade de colectomia e sua acurácia foi de 62%.⁶⁵ Bauer *et al*, após realizarem análise *pos hoc* de dois ensaios clínicos que tiveram como objetivo comparar a eficácia entre fidaxomicina e vancomicina, verificaram que as médias dos níveis séricos de creatinina e da contagem de leucócitos globais apresentaram relação com falha terapêutica (persistência da diarreia ou necessidade de terapia adicional), enquanto a recorrência esteve associada a níveis séricos de creatinina > 1,5 mg/dL. Nesse mesmo estudo, os pacientes com creatinina > 1,5 mg/dL também apresentaram menor probabilidade de resolução da diarreia dentro de 10 dias.⁶⁶ A explicação fisiopatológica para a leucocitose atuar como marcador de gravidade está relacionada à propriedade da toxina A (TcdA) em apresentar potente efeito quimiotático de neutrófilos, que resultaria em elevação dos leucócitos globais.^{39, 67} O

ponto de corte mais aceito do valor da leucocitose como critério de gravidade é a partir de 15.000 células/mm³.⁶⁸ Valores iguais ou maiores que 35.000 células/mm³ ou menores que < 2000 células/mm³ são também adotados como fatores preditivos para infecção complicada.^{7, 67}

A hipoalbuminemia (< 3 g/dL), também tem sido implicada em pior prognóstico. Taxas de mortalidade, recorrência e abordagem cirúrgica foram maiores nesses pacientes.⁶⁸⁻⁷¹ Contudo, não existe unanimidade acerca do seu *cut off*. Knafl *et al*, em 2019, após avaliar retrospectivamente 144 pacientes com ICD confirmada, evidenciaram que valores da albumina < 3,3 g/dL estavam relacionados a sensibilidade de 56% e especificidade de 80% em prever a recorrência e, valores < 2,9 g/dL, foram preditores de mortalidade por causas gerais em 1 ano (sensibilidade de 75% e especificidade de 70%). Ainda, valores < 3,5 g/dL estiveram relacionados ao aumento de complicações (necessidade de CTI, megacolon tóxico, íleo paralítico, necessidade de abordagem cirúrgica).⁷² Já Henrich *et al*, em estudo retrospectivo que envolveu 336 pacientes diagnosticados com ICD em um hospital universitário americano, relataram que níveis séricos de albumina < 2,5 g/dL estiveram relacionados à infecção grave, definida por necessidade de internação em CTI, colectomia ou perfuração intestinal e óbito em 30 dias (OR = 3,44; IC 95% 1,56 – 7,57).⁷¹

Sabidamente, níveis séricos de albumina reduzidos indicam alterações nutricionais e metabólicas e se relacionam à resposta imunológica diminuída. Nestas situações, a albumina atua como marcador inflamatório negativo de fase aguda. Além disso, apresenta propriedades anti-oxidativas e anti-inflamatórias. Em estudo realizado por di Masi *et al*, foi evidenciado, *in vitro*, que a cultura de células humanas epiteliais de adenocarcinoma colônicos na presença de albumina humana, apresentou maior viabilidade após exposição às toxinas A e B do *C. difficile*. Ainda nesse estudo, foi observado menor intensidade de lesão da barreira epitelial, quando as toxinas A e B foram aplicadas conjuntamente com albumina humana em células-tronco humanas diferenciadas em organóide intestinal. Em outro estudo, desta vez *in vivo*, o efeito patogênico da toxina B em embriões de peixe foi atenuado no grupo pré-tratado com albumina humana e, segundo os autores, esteve relacionada à sobrevida maior (65% x 45%, p<0,0001). Após análise bioquímica dos experimentos, observou-se que a albumina humana ligava-se ao domínio II das toxinas (TcdA e TcdB),

induzindo sua proteólise e impedindo sua internalização para as células do hospedeiro, reduzindo a glicolização toxina-dependente das proteínas Rho.⁷³ Em estudo caso-controle, Dansiger *et al* reportaram manifestação atípica de colite pseudomembranosa, caracterizada pela piora clínica secundária à enteropatia perdedora de proteínas, com hipoalbuminemia, ascite e edema periférico.⁷⁴

A idade a partir dos 65 anos, além de ser um fator de risco para ICD, também está associada a maior taxa de mortalidade, colectomia e recorrência e, com o avançar da idade, as infecções tornam-se, potencialmente, mais graves.^{52, 70, 71, 75, 76} No estudo de Henrich *et al*, citado anteriormente, não foram registrados óbitos pela ICD em pacientes com menos de 50 anos. Contudo, a partir desta idade, quando a faixa etária foi dividida a cada 10 anos, ocorreu aumento gradativo do percentual de óbitos até os 90 anos de idade.⁷¹ A idade maior que 70 anos ainda esteve associada ao aumento de 3,35 vezes a chance doença grave (OR 3,35; IC 95% 1,48 – 7,57).⁷¹

A recorrência da ICD também relaciona-se a idade do paciente. Deshpande *et al* relataram taxas de recorrência em pacientes de 0 a 17 anos, 18 a 64 anos e com 65 anos ou mais de 25%, 27,1% e 58,4%, respectivamente.⁷⁷ Em metanálise publicada no ano de 2015 na qual foram incluídos 33 estudos e envolveu 18.530 pacientes, a idade acima de 65 anos novamente foi fator de risco independente para recorrência de ICD (p= 0,0005; RR 1,63, IC 95% 1,24 – 2,13).⁵²

Acerca da evolução para formas mais graves, dois estudos citaram que a febre acima de 38,5°C, presente no momento diagnóstico, seria um fator prognóstico independente, contudo, foram constituídos por amostras heterogêneas e de tamanho reduzido.^{70, 78} Comorbidades também relacionam ao prognóstico da infecção, como foi abordado anteriormente.

Outros fatores, geralmente presentes em uma fase evolutiva mais tardia da doença, estão, de forma mais clara e natural, relacionados ao pior prognóstico e fazem parte dos critérios de definição de ICD fulminante. Enquadram-se nesse grupo o choque séptico, definido pela presença de hipotensão (PAM \leq 65 mmHg) a despeito de ressuscitação volêmica adequada, necessidade do uso de vasopressores e lactato sérico $>$ 2 mmol/L. O íleo paralítico, que predispõe o megacólon tóxico, peritonite e perfuração intestinal também é reconhecido como fator de pior prognóstico. Tais condições tem sido incluídas como marcadores de gravidade.^{67, 78}

Diante deste contexto, no qual estudos não determinaram com clareza e reprodutibilidade marcadores ideais ou, pelos menos, seus níveis de ponto de corte, grupo de especialistas que representaram a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) e a *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) adotaram, conjuntamente, o nível de leucocitose e a elevação da creatinina como parâmetros para diferenciar infecção grave e não grave e, ainda, definir forma fulminante da doença. (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios de gravidade da ICD adotados pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) e pela *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA)

Não grave	LG \leq 15000 células/mm ³ e creatinina \leq 1,5 mg/dL
Grave	LG $>$ 15000 células/mm ³ ou creatinina $>$ 1,5 mg/dL
Fulminante	Hipotensão ou choque, íleo, megacólon

E, na tentativa de preencher as lacunas acerca da ausência de fatores prognósticos mais acurados, foram elaborados escores com a finalidade de prever resposta ao tratamento com vancomicina ou fidaxomicina, como é caso do ATLAS (Tabela 2), cuja denominação deriva das iniciais das variáveis que o constituem, a saber, idade, tratamento concomitante com antibiótico sistêmico, contagem de leucócitos, creatinina, albumina e temperatura.⁷⁹ Cada variável possui uma graduação de pontuação que varia de 0 a 2, exceto uso concomitante de antimicrobiano que pontua 0 ou 2, totalizando 12 pontos. O estudo de Louie *et al* foi utilizado na fase analítica e o segundo de Crook *et al*, para validação do escore de ATLAS.^{80, 81} Um total de 1105 pacientes foram incluídos em ambas as fases. Entretanto, pacientes com colite fulminante ou sinais clínicos e laboratoriais ameaçadores a vida considerados pelos autores (contagem de leucócitos $>$ 30.000 células/mm³, temperatura corpórea $>$ 40°C ou evidência de hipotensão, choque séptico ou peritonite) e ainda com diagnóstico de megacólon tóxico ou óbito provável em 72 horas foram excluídos. Conseqüentemente, o ATLAS não deve ser utilizado para este grupo de pacientes. Ainda que o índice de correlação de Pearson para predição

de cura tenha sido muito alto (ρ de Pearson de 0,95%), o mesmo não aconteceu quando a acurácia do escore foi avaliada pela área sob a curva ROC, 0,71, ou seja, inferior a 0,8, *cutoff* relacionado a bom desempenho. Quando foi avaliada a reprodutibilidade, a concordância de Kappa foi também muito alta (95,2%). Em relação a predição de recorrência em 28 dias, o desempenho do escore foi insuficiente.⁷⁹

Tabela 2. Escore de gravidade para ICD definido pelo ATLAS

Parâmetros	Escore ATLAS		
	pontuação		
	0 pontos	1 ponto	2 pontos
Idade	< 60 anos	60 – 79 anos	≥ 80 anos
Tratamento com ATB sistêmico concomitante à terapia de ICD	Não	-----	Sim
Temperatura	≤ 37,5°C	37,6 – 38,5°C	≥ 38,6°C
Leucócitos globais	< 16000 células/mm ³	16000 – 25000 células/mm ³	> 25000 células/mm ³
Albumina sérica	> 3,5 g/dL	2,6 – 3,5 g/dL	≤ 2,5 g/dL
Creatinina sérica	≤1,35 mg/dL	1,36 - 1,99 mg/dL	≥ 2,00 mg/dL

Obs.: quanto maior a pontuação, maior a gravidade da infecção. ATB: antibiótico; ICD: infecção por *C. difficile*.

Fatores relacionados ao agente infeccioso também vem sendo cada vez mais estudados e compreendidos. Produção aumentada de toxinas A e B, presença da toxina binária e resistência a fluorquinolonas são fatores associados a maior patogenicidade da infecção e estão presentes em cepas hipervirulentas, tais como o RT 027. Sabidamente, correlacionaram-se com aumento de incidência, gravidade e mortalidade associados a ICD. O aumento da produção de toxinas A e B é explicado

pela deleção no gene inibitório *tcdC*. Em relação a toxina binária, seu papel na patogênese da ICD ainda não é bem compreendido, já que cepas de *C. difficile* que produzem toxina binária mas não produzem toxinas A e B, não são patogênicas. Postula-se que a toxina binária possa atuar de forma sinérgica com as toxinas A e B, causando colites graves.⁹

1.4 Diagnóstico e propedêutica

A pesquisa etiológica da ICD deve ser realizada em pacientes que apresentam três ou mais evacuações por dia com fezes não formadas, não explicada por condições pré-existentes (doença inflamatória intestinal (DII), uso de laxativos, quimioterápicos, dentre outros).⁷ Se realizada fora desse contexto, pacientes colonizados pelo *C. difficile* podem vir a ser identificados. A confirmação do diagnóstico da infecção necessita da detecção das toxinas A e B ou da cepa toxigênica, isto é, produtora de toxinas, nas fezes desses pacientes.

Atualmente, dois fluxos diagnósticos são utilizados para avaliação propedêutica dos pacientes com suspeita de infecção e, a adoção de cada um deles depende da disponibilidade ou não de recursos técnicos e de pessoal treinado. A primeira opção baseia-se na realização, unicamente, do teste de amplificação de ácido nucléico (NAAT), desde que seguido o critério de suspeita clínica mencionado anteriormente. De modo alternativo, pode-se realizar a abordagem em etapas. Na primeira etapa, faz-se o teste da pesquisa da glutamato desidrogenase (GDH), idealmente em paralelo com a pesquisa de toxinas A e B pelo método do ensaio imunoenzimático. Na segunda etapa, caso a pesquisa da GDH seja positiva e a pesquisa das toxinas seja negativa, faz-se o NAAT ou a cultura toxigênica (CT).^{7, 82}

A glutamato desidrogenase é uma enzima que se encontra presente em altos níveis na parede de todas as linhagens do *C. difficile* e se caracteriza por ser facilmente preservada. É responsável pela deaminação oxidativa do glutamato em α -cetoglutarato e amônia.⁸³ Quando utilizada para o diagnóstico da ICD, sua sensibilidade é alta (86% - 99%), assim como valor preditivo negativo (98,4% - 100%), o que permite exclusão do diagnóstico diante de um resultado negativo. Contudo, não é capaz de diferenciar cepas toxigênicas e não toxigênicas. Dessa forma, deve ser usada como método de triagem, seguido por testes que confirmem a toxicidade da estirpe, tais como a pesquisa das toxinas A e B por ELISA, o ensaio de

neutralização de citotoxicidade para *C. difficile* (ENCC), a cultura toxigênica (CT) ou o teste de amplificação de ácido nucléico para *C. difficile* (NAAT).^{44, 82, 84, 85}

Os ensaios imunoenzimáticos realizados para detecção das toxinas A e B do *C. difficile*, diferentemente da pesquisa da GDH, apresentam baixa sensibilidade. Silva *et al*, em 2014, analisaram o rendimento de três testes comerciais disponíveis em nosso meio e foram observadas taxas de sensibilidade entre 59% e 68%. A especificidade dos três testes foi maior que 90%, quando comparados a CT e ENCC.⁸⁶ Em estudo multicêntrico, prospectivo, realizado no Japão, a sensibilidade dos testes de ELISA foi de 41%, quando comparados a CT.⁸⁷

O ensaio de neutralização de citotoxicidade celular detecta diretamente a toxina nas fezes por meio da aplicação de filtrado fecal em meio composto por linhagens celulares que são incubadas para avaliação de efeito citopático. Posteriormente, aplicam-se anticorpos neutralizantes contra *Clostridium sordelii* ou *C. difficile* para assegurar-se de que o efeito citopático foi causado por toxinas do *C. difficile*. É considerado por alguns autores como método padrão-ouro, pois apresenta sensibilidade e especificidade altas, porém não aplicável à prática clínica por ser laborioso e seu resultado se estender por 48 horas ou mais.⁷ Além disso, não é uniformemente padronizado. Os centros que o fazem utilizam técnicas próprias.⁷

A cultura toxigênica é o segundo método considerado referência, pois assim como a ENCC, apresenta níveis de sensibilidade e especificidade elevados. É realizado pela técnica de isolamento do *C. difficile* em meio de cultura específico, a qual permite a identificação de colônias de bastonetes Gram positivos por meio de sua morfologia típica, em aspecto de “vidro moído”.⁸⁸ Na segunda parte do exame, faz-se necessária a demonstração da capacidade de produção de toxinas pelo agente identificado, seja pelo ensaio imunoenzimático *in vitro* ou, mais comumente, por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR, da sigla em inglês “*polymerase chain reaction*”). Este último permite a identificação dos genes constitucional (TPI), dos genes codificadores das toxinas e é mais sensível que o ELISA. Por meio do PCR, pode-se ainda detectar os fatores de virulência adicionais, como a presença da toxina binária e a deleção *tcdC*. Contudo, também é menos utilizado na prática devido a necessidade de técnicas e estrutura especializadas e pelo tempo de execução prolongado (pelo menos 96 horas).^{85, 89}

Com relação ao NAAT, trata-se de um teste que também se baseia na técnica de PCR, por meio da amplificação de ácido nucléico e se tornou disponível comercialmente a partir de 2009. O método pode identificar, a partir da análise direta da amostra fecal, genes codificadores de toxinas A/B (*tcdA* e *tcdB*), além dos genes codificadores da toxina binária (*cdt*) e a deleção no gene *tcdC*. Apresenta sensibilidade alta (95%), assim como seu valor preditivo negativo (maior que 90%). A especificidade também é alta, superior a 90%, e dispensa o cultivo do microrganismo, o que torna o resultado mais rápido. Por outro lado, existe a possibilidade de exames positivos em pacientes carreadores assintomáticos. Além disso, pode ocorrer variação nas regiões codificadoras dos genes *tcdA* e *tcdB*, alvos para os *primers* do teste de amplificação de ácido nucléico, o que pode gerar resultados falso-negativos. Sua disponibilidade nos países emergentes como o Brasil é muito restrita. Ademais, seu custo é alto e requer aparato tecnológico mais complexo (PCR em tempo real).^{85, 90, 91}

1.5 Técnicas de tipagem do *Clostridioides difficile*

A tipagem bacteriana é importante ferramenta para estudo epidemiológico da ICD, em especial na investigação de surtos. Por meio dela, é possível identificar novas cepas, avaliar a virulência, caracterizar recorrências e definir rotas de transmissão. Inicialmente, os métodos restringiam-se a caracterização fenotípica da bactéria, contudo, com o desenvolvimento técnico-científico, estas técnicas foram sendo substituídas por métodos moleculares, que apresentam capacidade discriminatória maior, o que gera análise mais detalhada. Com isso, o objetivo destas técnicas passou a ser o acesso ao perfil genético. Idealmente, o método de tipagem deve ter alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade.

Existe um número crescente de métodos moleculares utilizados para melhor caracterização genética do *C. difficile*. Os mais utilizados são realizados por meio do PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), REA (*restriction endonuclease analysis*), toxinotipagem e ribotipagem por PCR. O PFGE e o REA usam todo o DNA genômico que é quebrado por enzimas de restrição, seguido pela leitura em gel de poliacrilamida ou de agarose em eletroforese. No entanto, carregam consigo limitações. O PFGE, além de ser muito trabalhoso, pode gerar degradação do DNA. Para realização de análises comparativas, é mandatório a utilização do mesmo gel.

O REA, por sua vez, depende de um grau de subjetividade para sua interpretação, ainda que o poder discriminatório seja alto. A técnica que utiliza a toxinotipagem avalia, de modo detalhado, a área genômica do PaLoc (lôcus de patogenicidade), o que permite obter informações acerca da detecção de polimorfismos nos genes responsáveis pela produção das toxinas A e B e dos genes reguladores. A reprodutibilidade do método é de 100% e seu grande diferencial é a capacidade de detalhar o *status* da toxina da cepa em estudo. Entretanto, sua capacidade discriminatória é menor do que o PFGE.^{92, 93}

A ribotipagem por PCR baseia-se na amplificação da região espaçadora intergenética entre as subunidades 16S e 23S do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA). Essa região genética é um *operon*, conjunto de genes expressos em um único RNA mensageiro, que pode ser quebrado por primers específicos, gerando bandas de diferentes tamanhos e características, visualizadas em gel de agarose, como demonstrado na figura 1. A análise pode ser feita visualmente ou por *software* apropriado (por ex. BioNumerics e Applied Maths). Uma diferença presente em uma única banda representa um novo ribotipo. Sua capacidade discriminatória é maior que o PFGE.⁹⁴

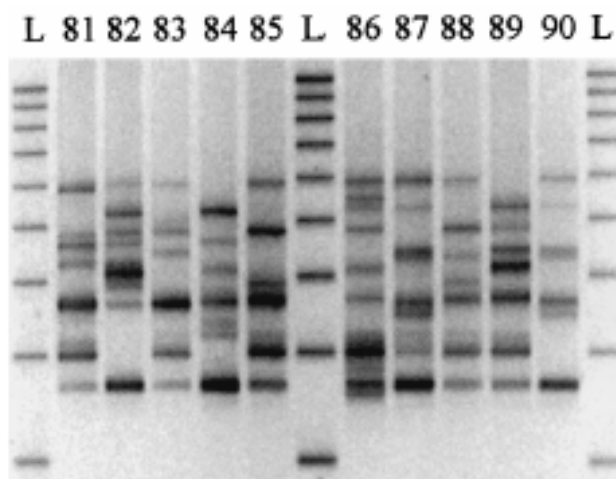


Figura 1. Perfis de ribotipos (RT) por reação em cadeia de polimerase (PCR), exemplificado com a identificação de estirpes pertencentes aos RT 81 ao 90.⁹⁴

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O estudo tem como objetivo avaliar o perfil evolutivo e caracterizar os ribotipos relacionados à infecção pelo *Clostridiodes difficile* em pacientes com diarreia internados no Hospital das clínicas da UFMG.

2.2 Objetivos específicos

- a) caracterizar o perfil clínico-epidemiológico da infecção pelo *C. difficile*, com foco na gravidade e recorrência da doença;
- b) avaliar a prevalência dos genes codificadores da toxina binária do *C. difficile*, identificar seus ribotipos e relacioná-los com os aspectos evolutivos da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *JAMA Pediatrics*. 1935;49(2):390-402.
2. Bartlett JG. *Clostridium difficile* infection: historic review. *Anaerobe*. Dec 2009;15(6):227-9. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.09.004
3. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. Aug 2016;40:95-9. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.06.008
4. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. Jan 2002;346(5):334-9. doi:10.1056/NEJMcp011603
5. Depestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract*. Oct 2013;26(5):464-75. doi:10.1177/0897190013499521
6. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. Mar 2006;12(3):409-15. doi:10.3201/eid1205.051064
7. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, 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). *Clin Infect Dis*. Mar 2018;66(7):987-994. doi:10.1093/cid/ciy149
8. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. Aug 2004;171(5):466-72. doi:10.1503/cmaj.1041104
9. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N Engl J Med*. Oct 2008;359(18):1932-40. doi:10.1056/NEJMra0707500
10. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005 Sep 24-30 2005;366(9491):1079-84. doi:10.1016/S0140-6736(05)67420-X

11. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. Dec 2005;353(23):2433-41. doi:10.1056/NEJMoa051590
12. Cheknis A, Johnson S, Chesnel L, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains recovered from clinical trials in the US, Canada and Europe from 2006-2009 to 2012-2015. *Anaerobe*. Oct 2018;53:38-42. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.05.009
13. See I, Mu Y, Cohen J, et al. NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. May 2014;58(10):1394-400. doi:10.1093/cid/ciu125
14. Magill SS, O'Leary E, Janelle SJ, et al. Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med*. 11 2018;379(18):1732-1744. doi:10.1056/NEJMoa1801550
15. Wilcox MH, Shetty N, Fawley WN, et al. Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national ribotyping-based surveillance scheme in England. *Clin Infect Dis*. Oct 2012;55(8):1056-63. doi:10.1093/cid/cis614
16. Dingle KE, Didelot X, Quan TP, et al. Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. *Lancet Infect Dis*. Apr 2017;17(4):411-421. doi:10.1016/S1473-3099(16)30514-X
17. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis*. Nov 2008;47(9):1162-70. doi:10.1086/592257
18. Lim SK, Stuart RL, Mackin KE, et al. Emergence of a ribotype 244 strain of *Clostridium difficile* associated with severe disease and related to the epidemic ribotype 027 strain. *Clin Infect Dis*. Jun 2014;58(12):1723-30. doi:10.1093/cid/ciu203
19. Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado MeM, et al. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *J Clin Microbiol*. Feb 2010;48(2):669-70. doi:10.1128/JCM.02196-09
20. López-Ureña D, Quesada-Gómez C, Montoya-Ramírez M, et al. Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAPCR1 and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. *Emerg Microbes Infect*. May 2016;5:e42. doi:10.1038/emi.2016.38

21. Aguayo C, Flores R, Lévesque S, et al. Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. *Epidemiol Infect.* Oct 2015;143(14):3069-73. doi:10.1017/S0950268815000023
22. López-Ureña D, Quesada-Gómez C, Miranda E, Fonseca M, Rodríguez-Cavallini E. Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: case reports in Panama. *J Med Microbiol.* Feb 2014;63(Pt 2):322-324. doi:10.1099/jmm.0.066399-0
23. Guerrero-Araya E, Meneses C, Castro-Nallar E, et al. Origin, genomic diversity and microevolution of the. *Microb Genom.* May 2020;6(5)doi:10.1099/mgen.0.000355
24. Trindade CNR, Domingues RMCP, Ferreira EO. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. *Anaerobe.* Aug 2019;58:13-21. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.03.002
25. Balassiano IT, Miranda KR, Boente RF, et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe.* Jun 2009;15(3):61-4. doi:10.1016/j.anaerobe.2008.12.007
26. Balassiano IT, dos Santos-Filho J, Vital-Brazil JM, et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* Feb 2011;99(2):249-55. doi:10.1007/s10482-010-9483-8
27. Silva RO, Rupnik M, Diniz AN, Vilela EG, Lobato FC. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Dec 2015;110(8):1062-5. doi:10.1590/0074-02760150294
28. Lopes Cançado GG, Silveira Silva RO, Rupnik M, et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Anaerobe.* Dec 2018;54:65-71. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.08.005
29. Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe.* Apr 2019;56:34-39. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.01.010

30. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 03 2018;39(3):371-373. doi:10.1017/ice.2017.280
31. Girão ES, de Melo Tavares B, Alves Dos Santos S, et al. Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study. *Anaerobe*. Dec 2020;66:102267. doi:10.1016/j.anaerobe.2020.102267
32. Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. Feb 2002;34(3):346-53. doi:10.1086/338260
33. O'Brien JA, Lahue BJ, Caro JJ, Davidson DM. The emerging infectious challenge of *clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Nov 2007;28(11):1219-27. doi:10.1086/522676
34. McGlone SM, Bailey RR, Zimmer SM, et al. The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*. Mar 2012;18(3):282-9. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03571.x
35. Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile*--associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. May 1998;26(5):1027-34; quiz 1035-6. doi:10.1086/520276
36. Cohen SH, Tang YJ, Silva J. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J Infect Dis*. Feb 2000;181(2):659-63. doi:10.1086/315248
37. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb Pathog*. Oct 1995;19(4):203-13. doi:10.1016/s0882-4010(95)90263-5
38. Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. Jul 2001;50(7):613-619. doi:10.1099/0022-1317-50-7-613
39. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*. 10 2016;14(10):609-20. doi:10.1038/nrmicro.2016.108

40. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. Clostridium difficile binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*. 2014 Jan-Feb 2014;5(1):15-27. doi:10.4161/gmic.26854
41. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. Jul 2009;7(7):526-36. doi:10.1038/nrmicro2164
42. Kyne L, Sougioultzis S, McFarland LV, Kelly CP. Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial Clostridium difficile diarrhea. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Nov 2002;23(11):653-9. doi:10.1086/501989
43. Zerey M, Paton BL, Lincourt AE, Gersin KS, Kercher KW, Heniford BT. The burden of Clostridium difficile in surgical patients in the United States. *Surg Infect (Larchmt)*. Dec 2007;8(6):557-66. doi:10.1089/sur.2006.062
44. Ananthakrishnan AN. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Jan 2011;8(1):17-26. doi:10.1038/nrgastro.2010.190
45. Brown KA, Fisman DN, Moinuddin R, Daneman N. The magnitude and duration of Clostridium difficile infection risk associated with antibiotic therapy: a hospital cohort study. *Plos One*. 2014;9(8):e105454.
46. Leffler DA, Lamont JT. Clostridium difficile infection. *N Engl J Med*. Apr 2015;372(16):1539-48. doi:10.1056/NEJMra1403772
47. Theriot CM, Young VB. Microbial and metabolic interactions between the gastrointestinal tract and Clostridium difficile infection. *Gut Microbes*. 2014 Jan-Feb 2014;5(1):86-95. doi:10.4161/gmic.27131
48. Negrón ME, Rezaie A, Barkema HW, et al. Ulcerative Colitis Patients With Clostridium difficile are at Increased Risk of Death, Colectomy, and Postoperative Complications: A Population-Based Inception Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 05 2016;111(5):691-704. doi:10.1038/ajg.2016.106
49. Peng JC, Shen J, Zhu Q, Ran ZH. The impact of Clostridium difficile on surgical rate among ulcerative colitis patients: A systemic review and meta-analysis. *Saudi J Gastroenterol*. 2015 Jul-Aug 2015;21(4):208-12. doi:10.4103/1319-3767.161644

50. Razik R, Rumman A, Bahreini Z, McGeer A, Nguyen GC. Recurrence of Clostridium difficile Infection in Patients with Inflammatory Bowel Disease: The RECIDIVISM Study. *Am J Gastroenterol*. 08 2016;111(8):1141-6. doi:10.1038/ajg.2016.187
51. Phatharacharukul P, Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Edmonds PJ, Mahaparn P, Bruminhent J. The Risks of Incident and Recurrent Clostridium difficile-Associated Diarrhea in Chronic Kidney Disease and End-Stage Kidney Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci*. Oct 2015;60(10):2913-22. doi:10.1007/s10620-015-3714-9
52. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C. Risk Factors for Recurrent Clostridium difficile Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(4):452-460.
53. Donnelly JP, Wang HE, Locke JE, Mannon RB, Safford MM, Baddley JW. Hospital-onset Clostridium difficile infection among solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. Nov 2015;15(11):2970-7. doi:10.1111/ajt.13491
54. Zacharioudakis IM, Ziakas PD, Mylonakis E. Clostridium difficile infection in the hematopoietic unit: a meta-analysis of published studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. Oct 2014;20(10):1650-4. doi:10.1016/j.bbmt.2014.06.001
55. Amberge S, Kramer M, Schröttner P, et al. Clostridium Difficile infections in patients with AML or MDS undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation identify high risk for adverse outcome. *Bone Marrow Transplant*. Feb 2020;55(2):367-375. doi:10.1038/s41409-019-0678-y
56. Alasmari F, Seiler SM, Hink T, Burnham CA, Dubberke ER. Prevalence and risk factors for asymptomatic Clostridium difficile carriage. *Clin Infect Dis*. Jul 2014;59(2):216-22. doi:10.1093/cid/ciu258
57. Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired Clostridium difficile-associated disease. *JAMA*. Dec 2005;294(23):2989-95. doi:10.1001/jama.294.23.2989
58. Dial S, Alrasadi K, Manoukian C, Huang A, Menzies D. Risk of Clostridium difficile diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. *CMAJ*. Jul 2004;171(1):33-8. doi:10.1503/cmaj.104086
59. Turco R, Martinelli M, Miele E, et al. Proton pump inhibitors as a risk factor for paediatric Clostridium difficile infection. *Aliment Pharmacol Ther*. Apr 2010;31(7):754-9. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04229.x

60. Tariq R, Singh S, Gupta A, Pardi DS, Khanna S. Association of Gastric Acid Suppression With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 06 2017;177(6):784-791. doi:10.1001/jamainternmed.2017.0212
61. Mehta P, Nahass RG, Brunetti L. Acid suppression medications during hospitalization as a risk factor for recurrence of *Clostridioides difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* May 2020;doi:10.1093/cid/ciaa545
62. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis.* Aug 2007;45(3):302-7. doi:10.1086/519265
63. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis.* Sep 2005;5(9):549-57. doi:10.1016/S1473-3099(05)70215-2
64. Olsen MA, Yan Y, Reske KA, Zilberberg MD, Dubberke ER. Recurrent *Clostridium difficile* infection is associated with increased mortality. *Clin Microbiol Infect.* Feb 2015;21(2):164-70. doi:10.1016/j.cmi.2014.08.017
65. Gujja D, FriedenberG FK. Predictors of serious complications due to *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* Mar 2009;29(6):635-42. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03914.x
66. Bauer MP, Hensgens MP, Miller MA, et al. Renal failure and leukocytosis are predictors of a complicated course of *Clostridium difficile* infection if measured on day of diagnosis. *Clin Infect Dis.* Aug 2012;55 Suppl 2:S149-53. doi:10.1093/cid/cis340
67. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment and prevention of *Clostridium difficile* infections. *American Journal of Gastroenterology.* 2013;108:478-498.
68. Moshkowitz M, Ben-Baruch E, Kline Z, Shimoni Z, Niven M, Konikoff F. Risk factors for severity and relapse of pseudomembranous colitis in an elderly population. *Colorectal Dis.* Feb 2007;9(2):173-7. doi:10.1111/j.1463-1318.2006.01013.x
69. Rubin MS, Bodenstein LE, Kent KC. Severe *Clostridium difficile* colitis. *Dis Colon Rectum.* 1995;38(4):350-354.

70. Abou Chakra CN, Pepin J, Valiquette L. Prediction tools for unfavourable outcomes in *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(1):e30258. doi:10.1371/journal.pone.0030258
71. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. *Emerg Infect Dis*. Mar 2009;15(3):415-22. doi:10.3201/eid1503.080312
72. Knafl D, Vossen MG, Gerges C, et al. Hypoalbuminemia as predictor of recurrence of *Clostridium difficile* infection. *Wien Klin Wochenschr*. Feb 2019;131(3-4):68-74. doi:10.1007/s00508-018-1432-y
73. di Masi A, Leboffe L, Polticelli F, et al. Human Serum Albumin Is an Essential Component of the Host Defense Mechanism Against *Clostridium difficile* Intoxication. *J Infect Dis*. 09 2018;218(9):1424-1435. doi:10.1093/infdis/jiy338
74. Dansinger M, Johnson S, Jansen P, Opstad N, Bettin K, Gerding D. Protein-losing enteropathy is associated with *Clostridium difficile* diarrhoea but not with asymptomatic colonisation: a prospective, case-control study. *Clin Infect Dis*. 1996;22:932-937.
75. Bartlett JG. *Clostridium difficile* Infection. *Infect Dis Clin North Am*. 09 2017;31(3):489-495. doi:10.1016/j.idc.2017.05.012
76. Sailhamer EA, Carson K, Chang Y, et al. Fulminant *Clostridium difficile* colitis: patterns of care and predictors of mortality. *Arch Surg*. May 2009;144(5):433-9; discussion 439-40. doi:10.1001/archsurg.2009.51
77. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis*. Jun 2005;40(11):1591-7. doi:10.1086/430315
78. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, Diseases ESoCMal. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. Mar 2014;20 Suppl 2:1-26. doi:10.1111/1469-0691.12418
79. Miller MA, Louie T, Mullane K, et al. Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for *Clostridium difficile* infection which predicts response to therapy. *BMC Infect Dis*. Mar 2013;13:148. doi:10.1186/1471-2334-13-148

80. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. Feb 2011;364(5):422-31. doi:10.1056/NEJMoa0910812
81. Crook DW, Walker AS, Kean Y, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection: meta-analysis of pivotal randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. Aug 2012;55 Suppl 2:S93-103. doi:10.1093/cid/cis499
82. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. Aug 2016;22 Suppl 4:S63-81. doi:10.1016/j.cmi.2016.03.010
83. Anderson BM, Anderson CD, Van Tassell RL, Lysterly DM, Wilkins TD. Purification and characterization of *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. Jan 1993;300(1):483-8. doi:10.1006/abbi.1993.1065
84. Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, et al. The Role of Glutamate Dehydrogenase (GDH) Testing Assay in the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections: A High Sensitive Screening Test and an Essential Step in the Proposed Laboratory Diagnosis Workflow for Developing Countries like China. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144604. doi:10.1371/journal.pone.0144604
85. Guery B, Galperine T, Barbut F. : diagnosis and treatments. *BMJ*. Aug 2019;366:l4609. doi:10.1136/bmj.l4609
86. Silva RO, Vilela EG, Neves MS, Lobato FC. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. Jul 2014;47(4):447-50. doi:10.1590/0037-8682-0100-2014
87. Senoh M, Kato H, Honda H, et al. Performance of laboratory tests for detection for *Clostridioides difficile*: A multicenter prospective study in Japan. *Anaerobe*. Dec 2019;60:102107. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.102107
88. Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect*. Aug 2001;7(8):411-6. doi:10.1046/j.1198-743x.2001.00294.x
89. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. Dec 2004;42(12):5710-4. doi:10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004

90. Kraft CS, Parrott JS, Cornish NE, et al. A Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis of Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) and Algorithms Including NAATs for the Diagnosis of. *Clin Microbiol Rev.* 06 2019;32(3)doi:10.1128/CMR.00032-18
91. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, et al. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. *JAMA Intern Med.* Nov 2015;175(11):1792-801. doi:10.1001/jamainternmed.2015.4114
92. Kuijper EJ, van den Berg RJ, Brazier JS. Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. *Methods Mol Biol.* 2009;551:159-71. doi:10.1007/978-1-60327-999-4_13
93. Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol.* Feb 2008;46(2):431-7. doi:10.1128/JCM.01484-07
94. Janezic S, Rupnik M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol.* 2010;646:55-65. doi:10.1007/978-1-60327-365-7_4

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes e local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HCUFG), direcionado a atendimento de média e alta complexidade e que presta atendimento exclusivamente aos pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS). Os exames de triagem, teste rápido por imunocromatografia para pesquisa da glutamato desidrogenase (GDH) e das toxinas A e B do *C. difficile*, foram direcionados e realizados no Laboratório Central do HCUFG. O Laboratório de Bacteriose e Pesquisa (LBP) da Escola de Veterinária da UFMG, nível 2 de biossegurança, equipado para estudo de biologia molecular, cultivo celular e bacteriologia aplicada, recebeu as amostras fecais e realizou cultura toxigênica e parte da ribotipagem do *C. difficile*. O restante da ribotipagem foi realizada no Centro Médico da Universidade de Leiden, Holanda.

Foram incluídos 65 pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, com diagnóstico de infecção nosocomial por *C. difficile*, conforme os critérios elencados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, Estados Unidos da América, nos períodos de novembro de 2011 a dezembro de 2015 e novembro de 2017 a dezembro de 2019.¹ (Figura 2)

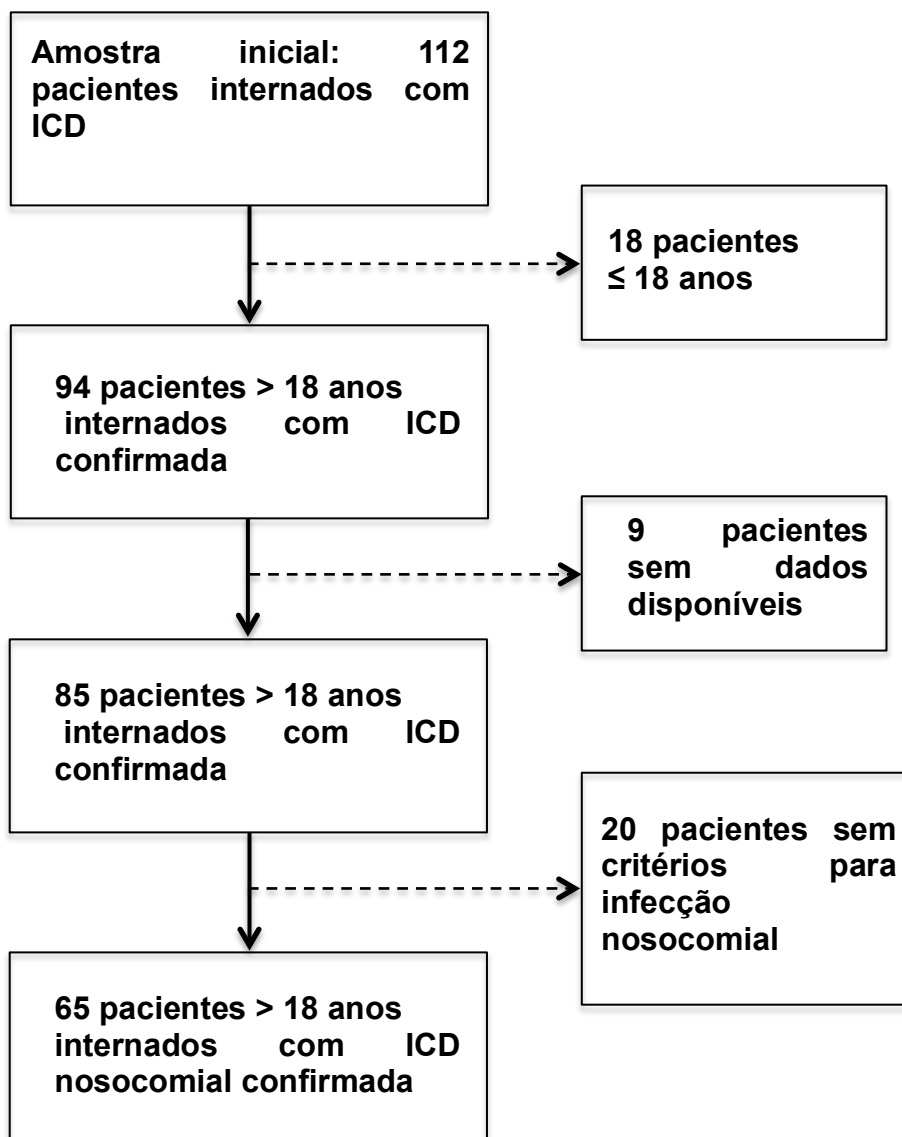


Figura 2. Diagrama que mostra o universo amostral, exclusões, perdas e número final de participantes para análise.

3.2 Definições de casos

a) definição de caso de infecção nosocomial por *C. difficile*: presença de diarreia (três ou mais evacuações com fezes não formadas por dia) nas últimas 48 horas, após 72 horas de internação, em pacientes com teste positivo para *C. difficile* toxigênico (positividade para toxinas A/B pelo teste de imunoensaio ou cultura toxigênica positiva e identificação dos genes codificadores de toxinas A (*tcdA*) ou B (*tcdB*) por PCR);^{1, 2}

b) definição de recorrência: novo quadro de diarreia em paciente que apresentou nova amostra fecal positiva para presença do *C. difficile* toxigênico ou, novo episódio

de diarreia em paciente que respondeu ao tratamento específico, mesmo sem confirmação laboratorial, no período entre 2 e 8 semanas após caso índice de ICD confirmado laboratorialmente;¹

c) definição de refratariedade ao tratamento: troca do tratamento inicial implementado frente a ausência de resposta clínica, conforme avaliação da equipe assistente;

d) resposta ao tratamento: melhora da consistência das fezes e redução da frequência evacuatória, definida pela diminuição do número de evacuações para menos de três episódios em 24 horas;³

e) definição de paciente imunossuprimido: pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), portadores de neoplasia, transplantados ou uso de terapia imunossupressora ou quimioterápico nos últimos três meses;

f) necessidade de segundo tratamento: uso de novo esquema antimicrobiano no mesmo episódio infeccioso, seja por troca ou acréscimo de um segundo antibiótico ou outro tratamento antimicrobiano em um intervalo de tempo de até duas semanas após diagnóstico de ICD, por não resposta clínica;

g) óbito relacionado a ICD: pacientes que evoluíram a óbito em vigência de ICD ativa e em tratamento.

3.3 Desenho do estudo

Trata-se de uma coorte histórica, realizada a partir do seguimento longitudinal de pacientes com diagnóstico de infecção nosocomial por *C. difficile*, cujos dados foram obtidos por meio da revisão de prontuários médicos, realização de exames específicos para pesquisa e ribotipagem do *C. difficile* toxigênico e complementação de informações por telefone na ausência de registros nas 8 semanas que sucederam a infecção.

Foram incluídas variáveis demográficas (sexo e idade), variáveis clínicas e laboratoriais que poderiam estar associadas à gravidade, recorrência ou mesmo se constituírem fatores de risco para infecção e variáveis relacionadas ao tratamento:

a) variáveis clínicas: data de internação, data de início da diarreia, data da coleta das fezes, índice de massa corpórea (IMC), sinais vitais (pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura corporal), sintomas da data do diagnóstico,

motivo da internação, comorbidades (*diabetes mellitus*, HIV, DII, doença renal crônica, cirrose, insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico prévio, doença arterial periférica), índice de comorbidades de Charlson, passado de transplante de órgãos, uso de antibióticos, classes e período de uso durante a internação e nos 3 meses que antecederam o diagnóstico, internação e tempo de permanência em centro de terapia intensiva (CTI), necessidade de cirurgia durante a internação, uso de imunossupressores ou quimioterápicos nos últimos 3 meses, uso de corticoide durante a internação e antes do diagnóstico, uso de inibidores de bomba de prótons (IBP) ou inibidores de receptores de histamina H2 na internação, necessidade de suporte nutricional por via enteral ou parenteral, data da alta ou óbito e causa *mortis*. Foi também calculado o escore de ATLAS e aplicado os critérios de gravidade idealizados pelo IDSA/SHEA;

b) variáveis laboratoriais: proteína C reativa, leucócitos totais, albumina e creatinina séricas no momento do diagnóstico. O nível sérico prévio de creatinina antes do diagnóstico foi também incluído para definição de injúria renal aguda.

c) variáveis relacionadas ao tratamento: tipo de tratamento utilizado (metronidazol oral, vancomicina oral, vancomicina oral associado ao metronidazol endovenoso, metronidazol oral seguido pelo uso da vancomicina oral), duração e resposta ao tratamento, tempo em dias para melhora da diarreia e necessidade de um segundo tratamento.

Foram definidos como desfechos, tempo de internação, recorrência, melhora da diarreia em até 5 dias, necessidade de segundo tratamento por refratariedade e óbito durante a internação.

3.4 Análise laboratorial fecal

As amostras de fezes não formadas foram coletadas em recipientes estéreis e armazenadas e refrigeradas a -20°C.

3.4.1 Detecção de toxinas A e B do *Clostridioides difficile* por ensaio imunoenzimático e teste da glutamato desidrogenase (GDH)

Na fase de triagem diagnóstica, todas as 65 amostras de fezes foram enviadas para o Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, onde

foram realizadas as pesquisas das toxinas A/B por meio do ensaio imunoenzimático (*C. difficile* Tox A/B II Techlab Inc., EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em 40 amostras, também foi realizado o teste rápido de triagem por imunocromatografia visando a detecção concomitante do antígeno glutamato desidrogenase (GDH) e das toxinas A/B (*C. difficile* Quik Check Complete assay Techlab, EUA), no Laboratório Central do HCUFMG, seguindo as recomendações do fabricante (Figura 3).

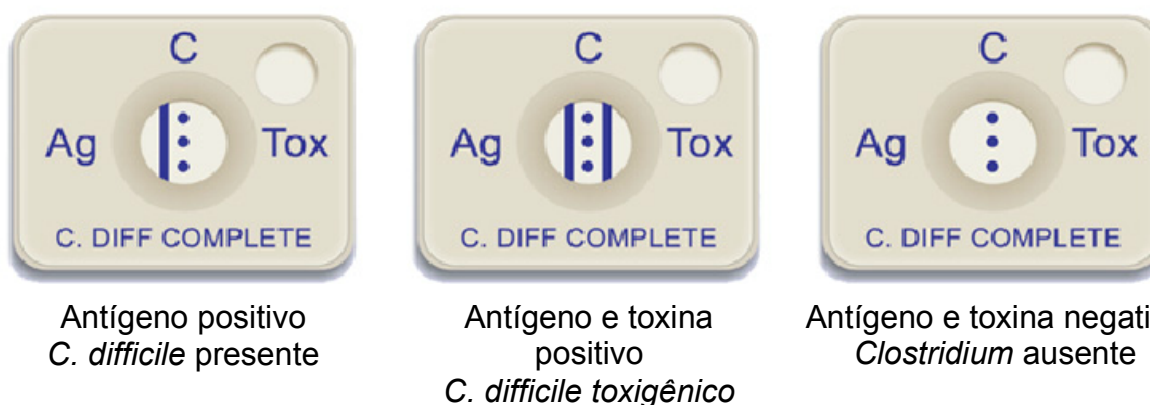


Figura 3. Interpretação do teste de imunocromatografia para detecção do *C. difficile*.
Fonte: <https://www.techlab.com/diagnostics/c-difficile/c-diff-quik-check-complete>

A positividade no ensaio imunoenzimático ou a positividade do GDH e/ou da pesquisa das toxinas pelo método da imunocromatografia, no momento em que ambos estavam disponíveis, foi premissa para continuidade da pesquisa laboratorial do *C. difficile*.^{4, 5}

3.4.2 Cultura toxigênica

Todas as amostras foram submetidas a cultura toxigênica como descrito por Delmée *et al.*⁶ Para o isolamento, volumes iguais de amostras de fezes e etanol a 96% (v/v) foram misturados e, após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, 20 µL foram inoculadas em placas de ágar cicloserina-cefoxitina-frutose (Hi-media, Mumbai, Índia), suplementada com sangue de equino a 7% e taurocolato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich Co., Sto Louis, EUA). Após a incubação em ambiente de anaerobiose a 37 °C por 72 horas, todas as colônias com morfologia sugestiva foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção simultânea do gene constitutivo (*tpi*) e dos genes codificadores das toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) e toxina binária (*cdtB*) do *C. difficile*. Todas as estirpes que possuíam pelo menos um

dos dois principais genes de virulência (*tcdA* ou *tcdB*) foram consideradas toxigênicas.

3.4.3 Ribotipagem

A ribotipagem foi realizada como preconizado por Janezic e Rupnik *et al* (2010)⁷. Os liofilizados foram reconstituídos em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, EUA) e incubados em tubo rosca por 48 horas a 37°C em ambiente de anaerobiose. Para obtenção de colônias isoladas, as estirpes foram plaqueadas em ágar BHI (Difco Laboratories, EUA) suplementado com 5% de sangue equino e incubadas em anaerobiose por 48 horas. Uma colônia de cada estirpe foi adicionada a 100 µl de água ultrapura e fervida por 12 minutos. Após centrifugação a 15.000 x g por 10 minutos, 5 µl do sobrenadante foi utilizado como molde para realização da reação em cadeia da polimerase de tal modo que 50 µl deste molde continha 1 µM de primers 5'-CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-3' e 5'-GCGCCCTTTGTAGCTTGACC-3', 2 U de taq polimerase (Pharmacia Biotech Inc., EUA) e 2.25 mM de MgCl₂. O mix foi submetido a 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C for 2 min.

Após a reação, o produto foi concentrado para um volume final de aproximadamente 25 µl por aquecimento a 75°C por 105 min e então submetido a eletroforese por 6 horas a 8°C com 150 mA em gel de agarose a 3%. Para facilitar a leitura, o marcador de peso molecular foi adicionado a cada cinco canaletas de amostras (100 bp; Advanced Biotechnologies, Epsom, Reino Unido). As bandas resultantes foram observadas após coloração com brometo de etídio por 20 min (0.5 µg/µl) e comparadas com a biblioteca de ribotipos do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG por meio do software Bionumerics (Applied Maths NV, Bélgica). Ribotipos não identificados na tabela foram enviados ao National Reference Laboratory for *C. difficile* (University of Leeds, United Kingdom) para confirmação e criação de novo número de referencia em caso de novo ribotipo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 13552719.3.0000.5149).

3.5 Análise estatística

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) para Windows. As variáveis categóricas foram apresentadas sob a forma de valores absolutos e percentuais. As variáveis numéricas foram avaliadas quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) para a seleção da apresentação dos dados. As variáveis contínuas foram expressas em média (\pm desvio-padrão) ou mediana (amplitude) e comparadas utilizando-se o teste t de Student ou Mann-Whitney (de acordo com a distribuição dos dados). O teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado, foi utilizado para comparação entre as variáveis categóricas. Foi realizada a análise univariada para determinar os fatores associados aos desfechos estudados para a infecção *C. difficile*. As variáveis com $p < 0,2$, obtidas por meio da análise univariada, foram incluídas nas análises de regressão logística. O ajuste do modelo de regressão logística foi verificado pelo teste de Hosmer-Lemeshow. O modelo de regressão de Cox foi utilizado para avaliação do tempo de internação. O nível de significância foi fixado em 5%.

4. RESULTADOS

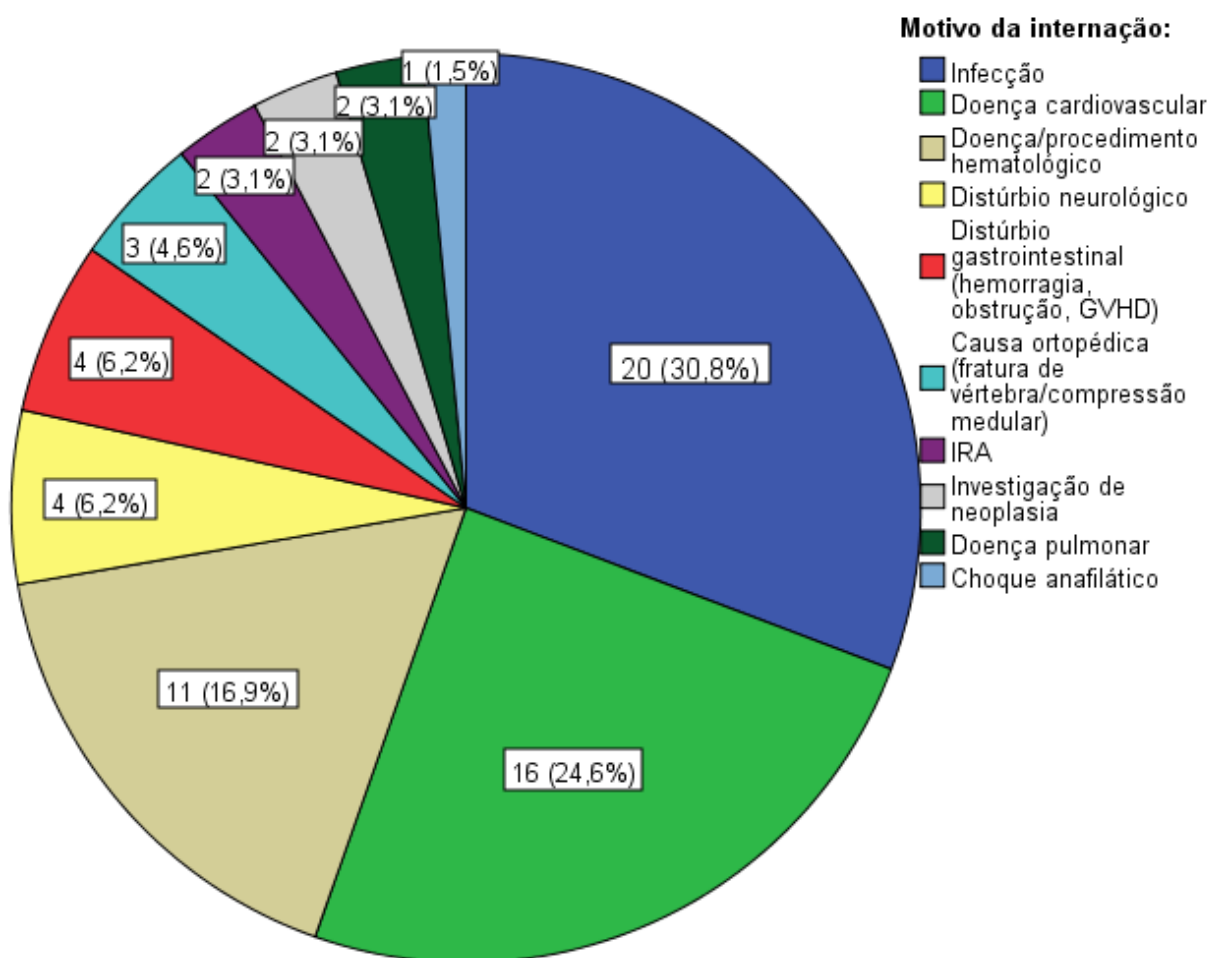
4.1 Análise descritiva

Foram incluídos 65 pacientes, sendo 34 do sexo masculino e 31 do sexo feminino. A mediana de idade foi de 59 (20 – 87) anos e 32,3% dos pacientes apresentavam idade maior ou igual a 65 anos. O intervalo de tempo entre o início da diarreia e a coleta das fezes foi de 4 (0 – 17) dias e entre a admissão hospitalar e a coleta das fezes foi de 28 (4 -117) dias. Entre coleta e alta hospitalar ou óbito, a mediana foi de 17 (1 -116) dias. A mediana do tempo de internação foi de 44 (10 – 150) dias.

Foram verificados 16 óbitos (24,6% da amostra) durante o período de internação. Sepses relacionadas a outros focos de infecção (trato urinário superior, partes moles, intra-abdominal e indefinido) e pneumonia foram as principais causas, sendo responsáveis por 8 óbitos (50%) e 5 óbitos (31,3%), respectivamente. Entre os 13 pacientes que tiveram como causa *mortis* processos infecciosos, três apresentavam, concomitantemente, infecção ativa pelo *C. difficile*. Infarto agudo do miocárdio, doença renal crônica agudizada evoluindo com disfunção de múltiplos órgãos e neoplasia de ovário foram a causa *mortis* dos outros três pacientes.

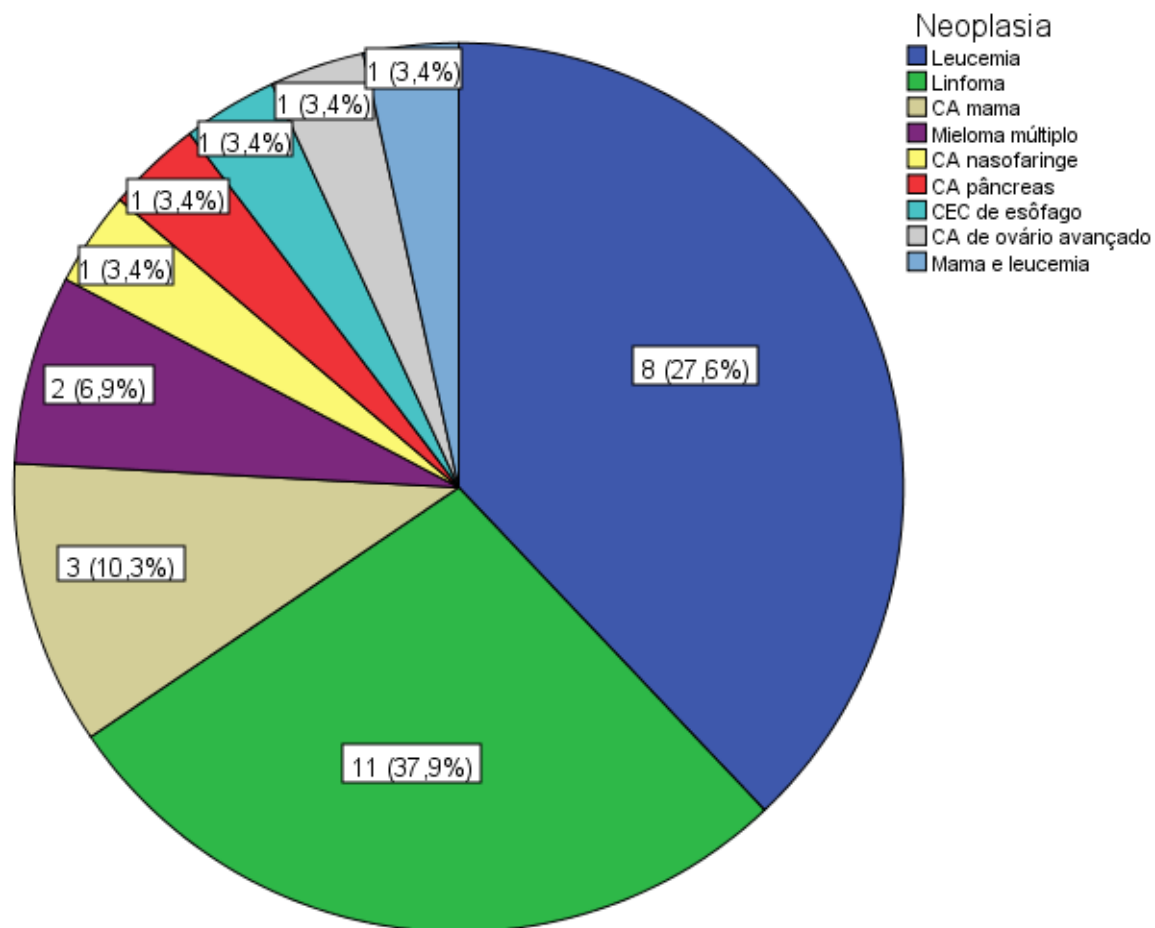
Em relação às causas de internação, as infecções foram responsáveis por 20 admissões hospitalares (30,7%) e o sítio mais comum foi o pulmão, acometendo 5 pacientes. Os eventos cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, dissecação aguda de aorta, internação para troca de valva cardíaca, tromboembolismo pulmonar, trombose venosa profunda e doença arterial periférica) foram responsáveis por 16 internações, perfazendo 24,6% da casuística, seguido por doenças e/ou procedimentos hematológicos em 11 pacientes (16,9%). O gráfico 1 mostra os motivos de internação.

Gráfico 1. Motivos da internação dos pacientes que desenvolveram ICD



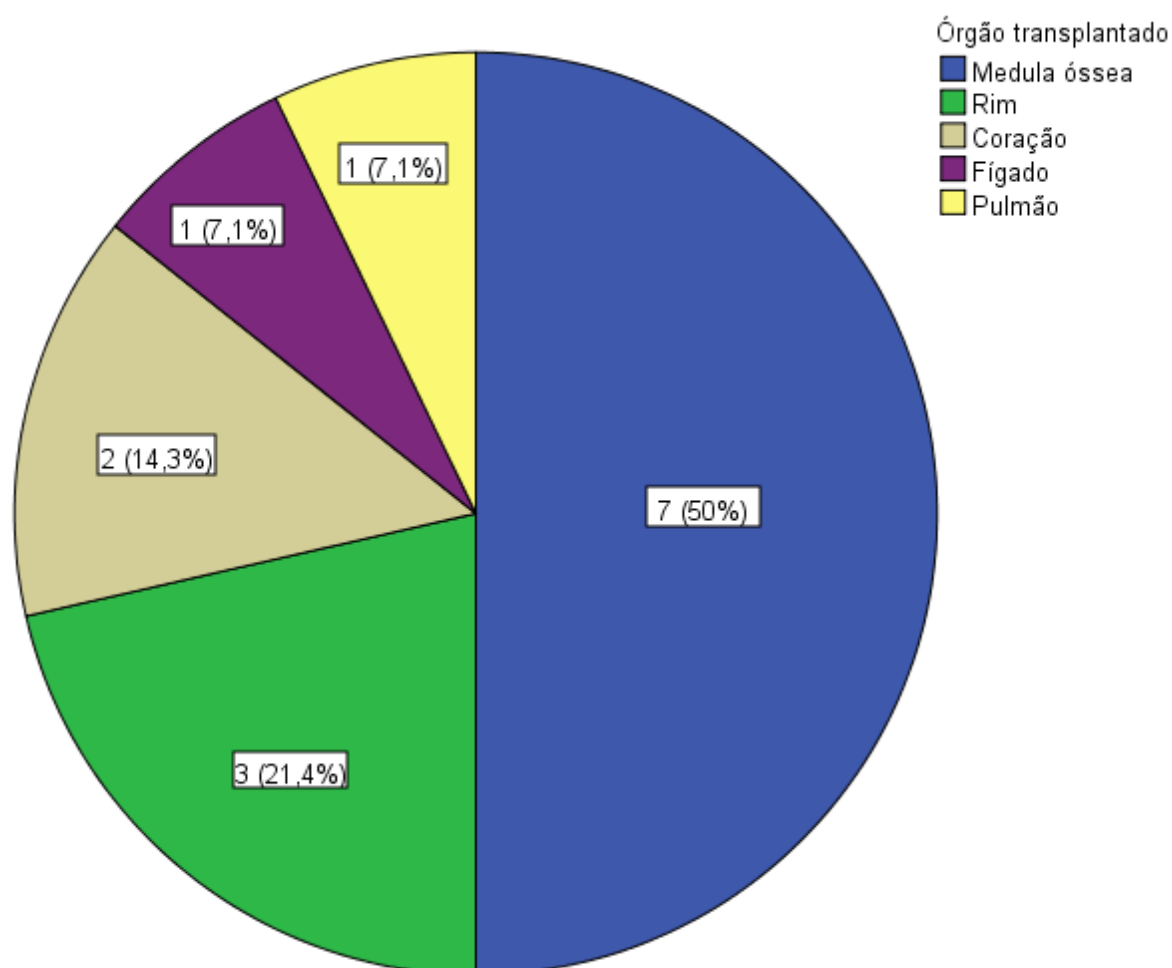
O índice de comorbidades de Charlson (ICC) ajustado por idade foi calculado para cada paciente e apresentou mediana de 4 (0 -15). A pontuação maior ou igual a 8 esteve presente em 16,9% da amostra (11 pacientes). Dentre as comorbidades, as doenças neoplásicas foram as mais prevalentes e estiveram presentes em 29 (44,6%) pacientes, sendo que as doenças onco-hematológicas (leucemias, linfomas e mieloma múltiplo) perfizeram 75,9% desse subgrupo (33,8% do total da amostra), seguido pelo câncer de mama, presente em 4 (13,8%) pacientes. (Gráfico 2).

Gráfico 2. Relação das neoplasias presentes nos pacientes com ICD.



As doenças cardiovasculares, nominalmente doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico e doença arterial periférica estavam presentes em 23 pacientes (35,4%). Injúria renal aguda (IRA) no momento do diagnóstico da ICD estava presente em 18 pacientes (27,7%) e doença renal crônica em 15 pacientes (23,1%). O diabetes mellitus foi verificado em 13 pacientes (20%) e a doença pulmonar obstrutiva crônica em 6 (9,2%). Apenas um paciente tinha o diagnóstico de doença inflamatória intestinal e um paciente, cirrose hepática. Quatorze pacientes da casuística haviam sido transplantados (21,5%). O transplante de medula óssea foi responsável pela metade dos casos (Gráfico 3).

Gráfico 3. Relação do número e taxa de cada transplante nos pacientes que desenvolveram ICD



Acerca da necessidade de internação nos últimos três meses, foi possível ser avaliada em 56 pacientes e, deste total, 25 (44,5%) pacientes estiveram internados anteriormente. Ainda sobre os três meses que antecederam a coleta da amostra, 18 pacientes (27,7%) foram submetidos a procedimentos cirúrgicos a nível hospitalar.

O suporte nutricional enteral foi necessário em 32 (49,2%) pacientes. Desta casuística, a gastrostomia foi a via utilizada por 2 (3,1%) pacientes. A nutrição parenteral foi necessária em 3 pacientes (4,6%).

A ocorrência de sangramento do trato gastrointestinal no momento da apresentação da ICD, caracterizado pelo relato de melena ou hematoquezia, ocorreu em 9 (13,8%) pacientes. O diagnóstico de íleo paralítico, definido pela não eliminação de fezes, distensão abdominal e vômitos, foi feito em um paciente, que também apresentou hematoquezia e evoluiu para óbito.

Em relação ao uso prévio de antimicrobianos, apenas um paciente não fez uso antibióticos (ATB) nos três meses que antecederam a coleta das fezes. A mediana do número de ATB usados por paciente foi de 4 (0 - 10). O único paciente não tratado previamente com antibiótico foi internado com diagnóstico de leucemia mielóide aguda para tratamento quimioterápico e, evoluiu com diarreia nosocomial após 10 dias de internação e confirmação de ICD por amostra coletada com 48 horas do início do quadro clínico. Apresentou boa resposta ao tratamento com vancomicina oral após suspensão do metronidazol, por suspeita de intolerância gástrica. Na evolução, teve episódio de recorrência da diarreia após a alta, com boa resposta ao tratamento empírico com metronidazol ambulatorialmente.

O uso concomitante de ATB por outras causas no momento do diagnóstico da ICD foi verificado em 44 pacientes (67,7%). Em 48 (73,8%) pacientes, houve a necessidade do uso de múltiplos cursos de ATB (dois ou mais). O tempo de uso mais prolongado de antimicrobianos, de 15 dias ou mais, foi observado em 43 (65,2%) pacientes. Os antimicrobianos mais empregados foram os carbapenêmicos em 72,3% dos pacientes, cefalosporinas em 61,5%, glicopeptídeos em 53,8%, penicilinas em 46,2% e polimixina em 35,4%. Com relação às fluorquinolonas, foram prescritas em 20% dos pacientes. O principal motivo para o uso de ATB foi pneumonia (21,5%), seguido por neutropenia febril (20%). Após o diagnóstico de ICD, 41,5% dos pacientes ainda foram expostos a novos cursos de antimicrobianos. A internação em centro de terapia intensiva (CTI) foi constatada em 42 pacientes (64,6%) e a mediana do tempo de permanência foi de 5 (0 – 41) dias.

Acerca dos inibidores de secreção ácida gástrica, 40 (61,5%) pacientes fizeram uso de inibidores de bombas de prótons (IBP) e 22 (33,8%), antagonistas H₂ da histamina. Nos três meses que antecederam a ICD, quimioterápicos (QT) ou imunossupressores foram utilizados em 33 (50,8%) pacientes e 31 (47,7%) pacientes fizeram uso de corticoide durante a internação e antes do diagnóstico.

Dentre as 65 amostras de fezes coletadas, não foi possível identificar os genes produtores das toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB*) por meio da cultura toxigênica em 6 (9,2%) casos. Nestes pacientes, o diagnóstico foi alicerçado por meio da identificação das toxinas por imunocromatografia. Em 58 (89,2%) amostras, foram identificados os genes produtores de ambas as toxinas e em uma amostra (1,5%) foi identificado apenas gene *tcdB*. A cultura toxigênica identificou o gene *cdtB*,

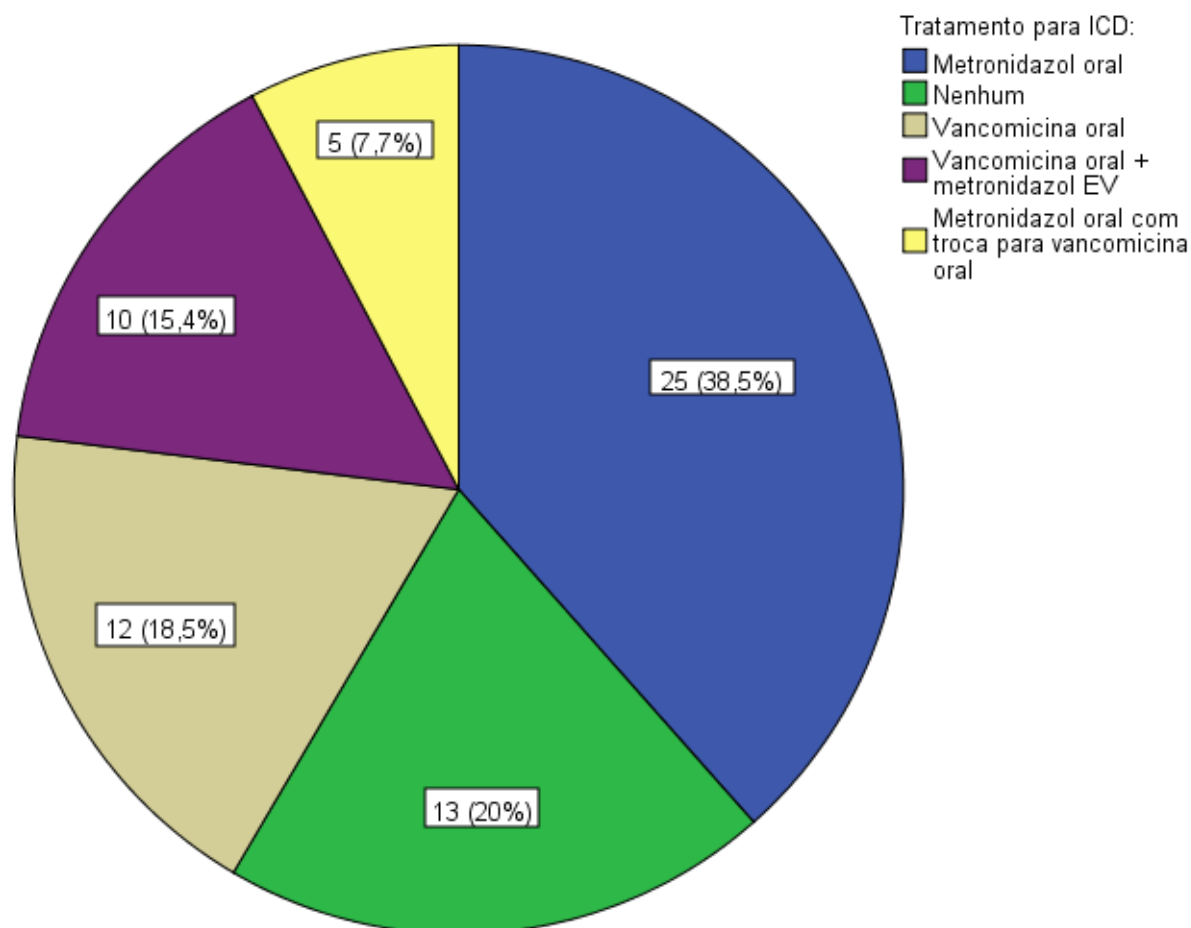
responsável pela produção da toxina binária, em 8 amostras (12,3%). Acerca da realização da pesquisa direta de toxina nas fezes pelo método de imunocromatografia, 42 (64,6%) foram positivas, reproduzindo resultados anteriores do nosso grupo.⁸

Entre os 17 pacientes submetidos a exames de imagem, 8 apresentaram sinais de inflamação no intestino grosso que poderiam ser atribuídos a ICD. Foi possível identificar as pseudomembranas em um dos três pacientes submetidos a colonoscopia.

Em relação à gravidade da ICD, baseado nos critérios IDSA/SHEA, foi possível fazer a avaliação em 64 pacientes. Em 18 (28,1%) pacientes a infecção foi considerada grave e 4 (6,3%) apresentaram a forma fulminante da doença. Entre estes, a definição da forma fulminante esteve relacionada a hipotensão com instabilidade hemodinâmica e necessidade de aminas ao diagnóstico em 3 pacientes e no quarto paciente, pela presença do íleo paralítico. Em 42 (65,6%) pacientes não houve critérios de gravidade. Quando foi aplicado o escore ATLAS, calculado em 57 pacientes, o valor da mediana foi de 4 (0 - 7), o que se associa a taxa de cura de 81,1%.⁹ A correlação entre ambos, mensurada por meio do teste de Spearman, foi de 0,318 (baixa). Ao avaliar a relação entre os escores de gravidade e a identificação direta de toxinas na amostra, por meio da imunocromatografia, as formas mais brandas de infecção caracterizadas pela classificação IDSA/SHEA foram relacionadas a maior detecção das toxinas por meio desta técnica ($p = 0,025$), o contrário do esperado. Não foi observada qualquer relação entre a classificação de ATLAS e detecção de toxinas por meio da imunocromatografia ($p = 0,69$).

Sobre a terapêutica empregada no tratamento da ICD, 25 (38,5%) pacientes receberam metronidazol por via oral, 12 (18,5%) vancomicina oral, 10 (15,4%) vancomicina oral associado a metronidazol endovenoso e 5 (7,7%) metronidazol oral seguido pelo uso vancomicina oral. Treze (20%) pacientes não fizeram uso de qualquer antimicrobiano direcionado para o tratamento (Gráfico 4).

Gráfico 4. Forma de abordagem terapêutica dos pacientes com ICD

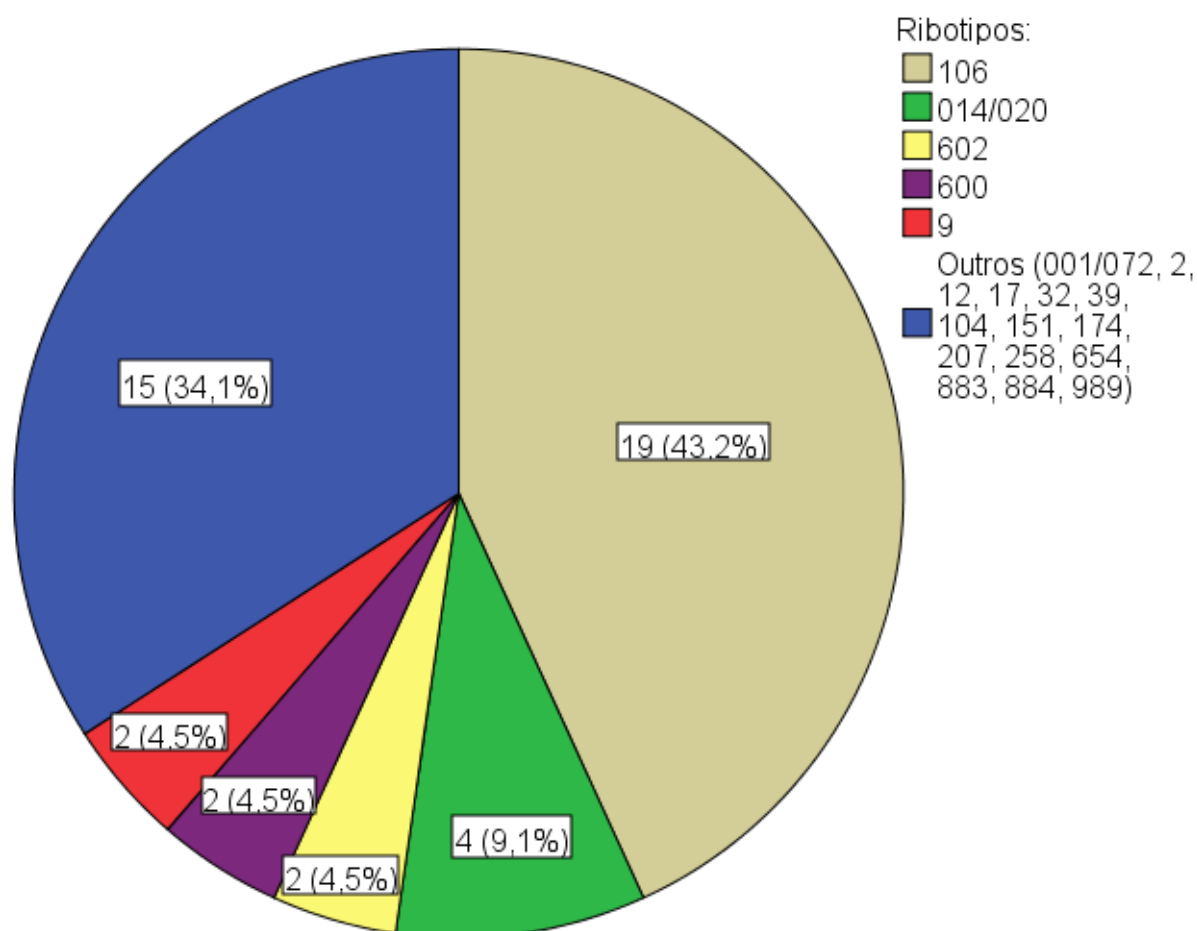


A resposta ao tratamento foi verificada em 44 (84,6%) dos 52 pacientes tratados com ATB e ocorreu, em média, entre o 4° e o 5° dia (± 3). A maioria, 64,3%, apresentou melhora até o 5° dia. Seis pacientes precisaram de um segundo tratamento durante o mesmo curso infeccioso. A recorrência foi identificada em 7 pacientes (14%) entre os 50 pacientes em que essa análise foi possível. Em dois pacientes, houve confirmação laboratorial e nos outros 5, o diagnóstico foi feito a partir da suspeita clínica e associado à resposta ao tratamento para ICD. A infecção foi caracterizada como grave pelos critérios da IDSA/SHEA em três pacientes, contudo apenas um deles foi tratado com vancomicina. Um dos três pacientes que teve o óbito relacionado a ICD apresentou recorrência confirmada laboratorialmente e evoluiu para o óbito durante o tratamento da recorrência. Um dos pacientes apresentou duas recorrências. Tratava-se de uma mulher com diagnóstico de diabetes mellitus e adenocarcinoma de mama em uso de quimioterapia paliativa, internada para tratamento de erisipela. Evoluiu para o óbito secundário a falência de múltiplos órgãos relacionada a neoplasia.

Entre os pacientes que não receberam tratamento direcionado para ICD, dois deles não tiveram a colite pelo *C. difficile* como etiologia do quadro clínico pela equipe assistente, pois não tiveram acesso ao resultado da cultura toxigênica positiva. O ELISA para toxinas nestes pacientes foi negativo, contudo, o GDH foi positivo. Segundo a classificação de gravidade do IDSA/SHEA, 11 pacientes não tratados não apresentaram formas graves da doença e dois preencheram critérios de gravidade. Todos apresentaram um curso autolimitado, coincidindo com a suspensão dos antimicrobianos que estavam em uso.

A ribotipagem foi realizada em 43 pacientes. Um paciente teve a ribotipagem feita a partir de duas coletas realizadas com intervalo de 7 dias, durante o mesmo quadro infeccioso. Este paciente apresentou o RT106 na primeira coleta e o RT2 na segunda. O RT106 foi identificado em 19 (43,2%) amostras, o RT014/020 foi o segundo mais frequente, em 4 (9,1%) casos, seguido pelos RT602, RT600 e RT9 em 2 (4,5%) pacientes cada. Os outros ribotipos foram identificados em um paciente cada, como está detalhado no gráfico 5.

Gráfico 5. Distribuição dos ribotipos identificados nos pacientes com ICD.



Entre os 19 casos relacionados ao RT106, 5 evoluíram para o óbito. Desta casuística, fazia parte apenas um dos três pacientes que tiveram o óbito associado a ICD. O segundo óbito ocorreu em paciente com RT104 e o terceiro caso não teve a cepa submetida a ribotipagem. Nenhuma destas cepas eram produtoras de toxina binária. Realizada análise comparativa entre o grupo de pacientes infectados pelo RT106 e a infecção pelos outros ribotipos. A infecção provocada pelo RT106 não se relacionou a maior ou menor gravidade clínica mensurada pelos escores ATLAS ($p = 0,60$) ou IDSA/SHEA ($p = 0,75$).

Entre os 7 pacientes que evoluíram com recorrência, dois casos estiveram associados ao RT106, um ao RT104 e o outro ao RT12. Nos outros 3 pacientes, não foi realizada a ribotipagem. Neste subgrupo, a toxina binária foi identificada em apenas um dos pacientes, que teve a ICD causada pelo RT106.

Na análise das 8 cepas produtoras de toxina binária, duas pertenciam ao RT602 e uma aos ribotipos RT106, RT654, RT883, RT884, RT989, cada. Uma não foi

submetida a ribotipagem. A presença da toxina binária não se relacionou às formas mais graves da doença, seja pelo escore de ATLAS ($p = 0,31$), seja pelo IDSA/SHEA ($p = 1$).

4.2 Análise de desfechos

Por meio da análise multivariada (regressão logística e regressão de Cox), foram avaliados os seguintes desfechos: óbito, tempo de internação, necessidade de segundo tratamento no mesmo episódio infeccioso por refratariedade, melhora clínica em até 5 dias após início do tratamento e recorrência. As variáveis independentes que apresentavam na análise univariada valor de $p < 0.2$ foram incluídas no modelo inicial.

Em relação ao desfecho óbito, fizeram parte do modelo inicial, idade acima de 65 anos, índice de comorbidades de Charlson > 7 (valor de corte associado a maior mortalidade em contexto da ICD)¹⁰, doença renal crônica, classificação de gravidade IDSA/SHEA dicotômica (não grave X grave/fulminante), internação em CTI, recorrência, escore de gravidade de ATLAS, novo ATB para tratamento de outras infecções após o diagnóstico, necessidade de segundo tratamento e a melhora clínica. Permaneceram no modelo final o escore de ATLAS ($p = 0,021$; OR = 1,76; IC 95% 1,08 – 2,86) e a não melhora da diarreia ao tratamento ($p = 0,002$; OR = 1,08; IC 95% 1,008 – 1,747).

Para o desfecho tempo de internação relacionado aos pacientes que não evoluíram para o óbito, fizeram parte do modelo inicial o uso de múltiplos cursos de ATB, tempo de uso de ATB maior do que 15 dias, novo curso de ATB após diagnóstico, internação em CTI, nutrição enteral, infecção pelo RT106, ICC > 7 e necessidade de segundo tratamento. No modelo final, permaneceram o uso de múltiplos cursos de ATB ($p = 0,003$; OR = 1,64, IC 95% 1,29 – 1,82) e a necessidade de nutrição enteral ($p = 0,001$; OR = 1,66, IC 95% 1,36 – 1,82). Para o desfecho tempo de internação dos pacientes que não evoluíram a óbito após o diagnóstico de ICD, apresentaram valor de $p < 0,2$ a infecção pelo RT106, múltiplos cursos de ATB, novo ATB após coleta, nutrição enteral e internação em CTI. Permaneceram no modelo final o uso de múltiplos cursos de ATB ($p = 0,02$; OR = 1,58, IC 95% 1,13 – 1,80), novo ATB após diagnóstico ($p = 0,00$; OR = 1,75, IC 95% 1,48 – 1,88) e internação em CTI ($p = 0,01$; OR = 1,57, IC 95% 1,18 – 1,78).

O desfecho recorrência teve como variáveis no modelo inicial, necessidade de segundo tratamento no mesmo episódio infeccioso, melhora em até 5 dias, duração do tratamento em dias, novo curso de ATB após coleta da amostra, uso de macrolídeo, ICC > 7, presença de DM, presença de DRC e tempo de permanência em CTI. Permaneceu no modelo final, apenas o ICC > 7 ($p = 0,02$; OR 24,52, IC 95% 1,67 – 360,22).

Em relação ao desfecho necessidade de um segundo tratamento por refratariedade, tiveram o valor de $p < 0,2$, ICC > 7, leucócitos globais > 15000/mm³, creatinina na data da coleta das fezes, gravidade da ICD segundo classificação IDSA/SHEA entre não grave e grave/fulminante, nutrição enteral, DRC, DM e melhora em até 5 dias de tratamento. Nenhum das variáveis persistiu no modelo final com significância estatística.

Acerca do desfecho de melhora clínica em até 5 dias, as variáveis novo ATB após diagnóstico de ICD, ICC > 7 e contagem de leucócitos globais no momento do diagnóstico apresentaram $p < 0,2$, porém nenhuma permaneceu no modelo final.

A tabela 3 mostra os resultados das análises multivariadas dos desfechos avaliados.

Tabela 3. Resultados dos modelos finais das análises de regressão logística e regressão de Cox

Desfecho	Variável	Valor de p	Odds ratio	Intervalo de confiança 95%
Óbito durante internação	ATLAS	0,021	1,76	1,08 – 2,86
	Não melhora da diarreia	0,002	1,08	1,008 – 1,747
Tempo de internação não óbitos	Múltiplos cursos de ATB	0,003	1,64	1,29 – 1,82
	Nutrição enteral	0,001	1,66	1,36 – 1,82
Tempo de internação não óbitos após diagnóstico ICD	Múltiplos cursos de ATB	0,02	1,58	1,13 – 1,80
	Novo ATB após diagnóstico	0,000	1,75	1,48 – 1,88
	Internação em CTI	0,01	1,57	1,18 – 1,78
Recorrência	ICC > 7	0,02	24,52	1,67 – 360,22

5. DISCUSSÃO

O *C. difficile* é considerado o principal agente bacteriano causador de diarreia associada à antibioticoterapia e patógeno nosocomial de grande importância epidemiológica, relacionado à morbimortalidade crescente em diversos países.¹¹ Neste contexto, a caracterização clínico-epidemiológica associada ao estudo do perfil ribotípico da infecção nosocomial por *C. difficile* em um centro brasileiro de referência pode contribuir para melhor entendimento do comportamento desta afecção no nosso meio. Da mesma forma, informações sobre os aspectos evolutivos, complicações e fatores prognósticos também podem ser úteis no sentido de direcionar para um manejo mais apropriado. Ademais, conhecer o comportamento de estirpes que causam a infecção pode auxiliar na prevenção de surtos e favorecer a introdução precoce de medidas de controle mais específicas.

Nesta casuística, foi observada maior complexidade dos casos. Quase metade dos pacientes (44,6%) tinham diagnóstico de neoplasias e 21,5% da amostra eram pacientes transplantados. A internação prévia foi observada em mais 40% dos pacientes e o suporte nutricional foi necessário em quase 50% da amostra. Mais de 60% dos pacientes necessitaram de suporte em centro de tratamento intensivo. A mediana do tempo de internação foi prolongada (44 dias) e a mortalidade geral foi de 24,6%. O número de óbitos relacionados à infecção por *C. difficile*, 3 pacientes, ou seja 18,8% do total de óbitos, pode ser considerado expressivo. Mesmo que em um deles a pneumonia tenha ocorrido concomitantemente, provavelmente a ICD contribuiu ou mesmo exerceu ação somatória no desfecho desfavorável. A ICD hospitalar tem sido relacionada ao aumento de mortalidade nestes pacientes, particularmente nos primeiros 30 dias após a infecção.¹² Em estudo prospectivo realizado na Áustria, foi verificado que pacientes hospitalizados com ICD apresentaram risco 2,74 vezes maior de óbito durante a internação do que outros pacientes, independentemente da idade ou gravidade das comorbidades.¹³

Nesta série, os fatores de risco relacionados ao óbito, após realização da análise multivariada, foram o score de ATLAS e a não melhora clínica da colite (diarreia) pelo *C. difficile*. Ambas as variáveis estão intrinsecamente relacionadas à gravidade da ICD, o que reforça o conceito dessa afecção como complicação hospitalar

importante, com implicações no prognóstico dos pacientes. O risco de óbito aumentou em 76% a cada acréscimo de um ponto no escore de gravidade de ATLAS. Quando o escore de ATLAS foi validado, a mortalidade não foi avaliada, já que os pacientes graves foram excluídos das análises das coortes. Contudo, os resultados indicaram boa acurácia para prever resposta ao tratamento com vancomicina ou fidaxomicina.⁹ A mediana do ATLAS nos 57 pacientes nos quais foi possível avaliá-lo, foi de 4, o que prediz taxa de cura de 81,1%, bem próximo à taxa de resposta clínica observada neste estudo (84,6%).⁹ Em uma coorte constituída por 308 pacientes com 60 anos ou mais com ICD que teve como objetivo avaliar a capacidade de predição de mortalidade baseado no escore ATLAS, foi constatado que os pacientes que apresentaram mediana de 6 tiveram maior mortalidade que os pacientes com mediana de 5 ($p = 0,0002$).¹⁴ Outro estudo prospectivo que envolveu 102 pacientes com ICD, o ATLAS esteve relacionado à necessidade de colectomia e à mortalidade. Pacientes com ATLAS entre 5 e 7 apresentaram maior probabilidade de colectomia e o óbito esteve associado a pontuação ≥ 8 .¹⁵ Com relação à não melhora da diarreia, esta variável esteve relacionada ao aumento de 8% de mortalidade (IC 95% 1,008 – 1,747). Entre os 16 pacientes que evoluíram para o óbito, 44% faleceram sem atingir critérios de cura.

A classificação da gravidade da infecção pelo *C. difficile* é motivo de diversos estudos com o objetivo de prever evolução desfavorável e, assim, possibilitar antecipação de intervenções mais específicas.¹⁶ Em nossa análise, foram utilizadas duas classificações de gravidade (IDSA/SHEA e ATLAS) e a correlação entre elas foi fraca ($\rho = 0,318$). Estudo retrospectivo que incluiu 64 pacientes com ICD confirmada durante internação evidenciou concordância moderada entre as duas classificações (valor de Kappa de 0,48) apenas para forma grave da doença, definida pela pontuação ATLAS ≥ 6 . Na data do estudo, a classificação IDSA/SHEA considerava o aumento de 50% da creatinina em relação ao valor basal do paciente, e não o valor fixo de 1,5 mg/dL tal como é utilizado atualmente para definição de critério de gravidade.¹⁷ Ainda em relação aos critérios de gravidade, cabe ressaltar a limitação desses dois escores quando aplicados em pacientes com comorbidades hematológicas e em pacientes com doença renal crônica, uma vez que a expressão de leucócitos globais e a dosagem da creatinina sérica nessas respectivas

populações não refletem necessariamente a gravidade da infecção, mas também a doença de base.

Ainda sobre possíveis achados que pudessem estar relacionados à gravidade da infecção, a detecção das toxinas por ELISA na amostra fecal não se relacionou com os desfechos negativos ou ocorrência aumentada de complicações. Pelo contrário, foi observada menor gravidade da infecção nesses 42 indivíduos, baseado no critério IDSA/SHEA. Na literatura, existem evidências que relacionam a identificação das toxinas de forma direta com quadros mais graves.^{18, 19} Longtin *et al*, em estudo observacional, prospectivo, em centro único, que incluiu 228 amostras toxigênicas, evidenciaram ocorrência menor de uma ou mais complicações (mortalidade em 30 dias, colectomia, admissão em CTI, readmissão por ICD) entre os pacientes diagnosticados apenas com o uso da reação em cadeia de polimerase para detecção do gene *tcdB* quando comparado a indivíduos diagnosticados por meio da utilização de algoritmo mais complexo com ensaio imunoenzimático (GDH e toxinas A e B) e cultura toxigênica (3% contra 39%, $p < 0,001$).¹⁸ Esse achado pode ser atribuído a maior sensibilidade do PCR, assim como a possibilidade de diagnóstico de casos leves, de forma mais precoce, que apresentam menor risco de evoluir para complicação ou ainda pela detecção de carreadores apenas.

O tempo de internação é um importante desfecho clínico e também econômico. Wilcox *et al*, em 2017, relatou que os gastos hospitalares direcionados para ICD é responsável por mais de 85% dos custos totais do tratamento, seja para o primeiro episódio de infecção, seja para infecção recorrente em um estudo multicêntrico realizado na Grã-Bretanha.²⁰ O desfecho tempo de internação foi analisado entre os pacientes que não evoluíram a óbito. Os fatores relacionados ao maior período de tempo de internação foram o uso de múltiplos cursos de antibióticos (aumento em 64%; IC 95% 1,29 a 1,82) e a necessidade de nutrição enteral (aumento em 66%; IC 95% 1,36 a 1,82). Com o objetivo de reduzir a interferência de outros fatores e afecções relacionadas a este desfecho, foi também avaliado o período de tempo de internação após o diagnóstico de ICD. Nesta subanálise, a necessidade de terapia intensiva aumentou em 57% o tempo de internação (IC 95% 1,18 – 1,78), o uso de novo antimicrobiano para outro foco infeccioso após o diagnóstico em 75% (IC 95% 1,48 – 1,88) e, novamente, o uso de múltiplos cursos de ATB, desta vez em 58% (IC 95% 1,13 – 1,8). Notadamente, as variáveis independentes que relacionaram a uma

maior internação hospitalar, são eventos presentes em pacientes com evolução clínica mais grave e que apresentaram mais intercorrências infecciosas de outras causas durante a internação. Considerando-se que o uso de antimicrobianos seja o principal fator predisponente para ICD, nota-se também que o uso de mais de um antibiótico durante a hospitalização relaciona-se a um maior tempo de internação entre esses pacientes, o que reforça a necessidade do uso racional dos mesmos e a importância sobre o controle e prevenção de infecções nosocomiais. Em metanálise realizada pela Cochrane sobre a efetividade e segurança de intervenções para melhorar a eficácia e qualidade das prescrições de antibióticos em pacientes hospitalizados, foi observado que a redução da quantidade e da duração do uso de antimicrobianos proporcionou diminuição do tempo de internação em 1,12 dia e ainda, não aumentou as taxas de mortalidade.²¹

As taxas de recorrência da ICD são altas e variam entre 10% e 30%.^{22, 23} O risco aumenta a cada infecção subsequente que, por sua vez relaciona-se ao aumento de mortalidade.²⁴ O mecanismo patogênico resulta da interação de fatores tais como a persistência de esporos, incompetência do sistema imune e alteração na diversidade da microbiota intestinal e, pode ocorrer com a mesma estirpe ou estirpe diferente do episódio prévio. Dentre os fatores de risco, a administração de um novo ATB durante ou após o início do tratamento para ICD, idade avançada (> 65 anos), maior gravidade da doença de base, com destaque para a insuficiência renal e, por fim, o uso contínuo de IBP são apontados como os mais importantes.²⁵⁻²⁹ Nesta casuística, foi possível identificar 7 casos de recorrência, o que corresponde a uma taxa de 14% entre os 50 pacientes com dados disponíveis para essa avaliação. Em dois pacientes, o diagnóstico foi confirmado pela presença do *C. difficile* patogênico e nos outros cinco pacientes, foi realizado tratamento antimicrobiano direcionado para a infecção e houve resposta clínica. Esse dado retrata uma taxa mediana de recorrência em nosso meio, contudo, uma tendência de menor testagem dos casos que recorrem com diarreia após um episódio de infecção pelo *C. difficile*. Há de se ressaltar que a limitação da metodologia empregada neste estudo inerente a coleta de dados de modo retrospectivo pode ter dificultado o registro mais acurado e detalhado dos casos de recorrência, em especial aqueles ocorridos após a alta. O único fator de risco relacionado ao aumento da recorrência identificado por meio da regressão logística foi o índice de comorbidades de Charlson (ICC) acima de 7. Tal

valor de corte reflete a presença de comorbidades mais graves e, também está relacionado a maior mortalidade no contexto da ICD, ainda que isto não foi observado neste estudo.¹⁰ A pontuação acima de 7 nesta amostra de pacientes aumentou em 24,52 vezes (IC 95% 1,67 – 360,22) a chance de recorrência. Em estudo prévio realizado neste mesmo centro, o ICC > 7 aumentou o risco infecção pelo *C. difficile* entre pacientes com diarreia nosocomial associada a antibiótico em 4,74 vezes.³⁰ Esse fato pode ser explicado pelo comprometimento do sistema imune secundário a gravidade e multiplicidade de comorbidades.³¹

A necessidade de um segundo tratamento no contexto de refratariedade ou recaída clínica antes de duas semanas após o diagnóstico é um desfecho importante a ser analisado. Contudo, existem questões conceituais a serem consideradas acerca do termo refratariedade da ICD. Em dois ensaios clínicos que avaliaram a eficácia do transplante de microbiota fecal, foram utilizados critérios distintos.^{32, 33} O primeiro definiu refratariedade como manutenção de sintomas de infecção grave por pelo menos 3 semanas a despeito da terapia antimicrobiana padrão para ICD.³³ O segundo definiu como persistência da diarreia associada a dor abdominal ou febre > 38°C ou contagem de leucócitos > 15.000/mL, em vigência do tratamento com vancomicina oral na dose de 500 mg quatro vezes ao dia por no mínimo 5 dias.³² No presente estudo, dada a dificuldade relacionada ao seu caráter retrospectivo e à escassez de dados para se ter um critério formal para este conceito, a refratariedade clínica baseou-se na perspectiva de refratariedade da equipe assistente, justificada pela troca do tratamento inicial implementado frente a ausência de resposta clínica. Na análise univariada, a melhora clínica até o quinto dia apresentou valor de p que permite falar em tendência a menor refratariedade (p = 0,07, OR = 0,12, IC 95% 0,012 – 1,19), o que corrobora com a literatura médica como marcador de falha terapêutica, como já citado anteriormente.³⁴ Entretanto, após análise multivariada, nenhuma das variáveis apresentou significância.

A resposta clínica em até 5 a 7 dias relaciona-se a bom prognóstico no curso evolutivo da doença, assim como tempo maior para melhora retrata infecções potencialmente mais graves, falhas terapêuticas e recorrências.³⁴ No presente estudo, foi avaliada a possibilidade de identificar fatores que pudessem interferir com este desfecho, porém não foram observados fatores de risco que se correlacionaram a melhora em 5 dias.

Os dados epidemiológicos sobre a prevalência de ribotipos no Brasil são fragmentados e escassos. Na casuística avaliada neste estudo, foi observado predomínio do RT106, encontrado em 43% dos pacientes. Tal dado corrobora com a teoria relacionada à ampla distribuição mundial desta estirpe. Entre 2004 e 2005, o RT106 foi considerado como a estirpe mais prevalente no Reino Unido. Posteriormente, foi identificado em outros países da Europa e, mais recentemente, na Ásia.³⁵ Contudo, caracterizando o comportamento dinâmico da epidemiologia da infecção, atualmente, vem sendo observado tendência de queda na sua incidência na Europa. Em contrapartida, vem ocorrendo aumento acentuado de sua incidência em outras partes do mundo, incluindo a América do Norte.³⁵ Nos EUA, foi identificado pela primeira vez entre 2008 e 2009 e sua prevalência, que era de 1% nestes anos, aumentou para 11% em 2014, superando o RT027.³⁶ Situação semelhante foi observada no Canadá, onde passou a ser uma das estirpes mais prevalentes entre os anos de 2013 e 2015.³⁷ Algumas características desse ribotipo ajudam a entender sua emergência global. O RT106 é uma estirpe que apresenta, segundo alguns estudos, maior capacidade de produção de esporos, o que facilitaria sua disseminação, tanto pela maior resistência aos saneantes, quanto a resistência que estas formas esporuladas apresentam à ação da vancomicina.³⁸ Por outro lado, sua capacidade de produção de toxinas é considerada intermediária quando comparada a outros ribotipos, o que também favorece sua perpetuação entre os hospedeiros.^{35, 39} Com relação ao potencial de germinação, é considerado baixo em relação aos ribotipos 027 e 078, o que pode explicar menor gravidade das infecções.⁴⁰ Evidências apontam ainda para alta resistência a eritromicina, clindamicina e flourquinolonas, apesar de estudo canadense mais recente apontar menor resistência a moxifloxacino quando comparado a outros ribotipos prevalentes, como 002, 014, 020 e 027.^{36, 37} Por fim, o RT106 também tem sido isolado em diversas espécies de animais, incluindo cães sintomáticos, além de estar presente em espaços públicos e em produtos para adubação, o que permite inferir acerca do potencial de transmissibilidade por estas fontes.⁴¹⁻⁴³ Com relação a desfechos clínicos, em estudo realizado no Reino Unido que incluiu 97 pacientes com ICD nosocomial, 39% da casuística estava representada pelo RT106 e 45% pelo RT027. Durante a análise dos dados, foi constatado menor ocorrência de casos graves entre o grupo pertencente ao RT106 (8% versus 16% do grupo RT027) e menor

mortalidade pela ICD em 28 dias (11% versus 23% do grupo RT027). O desfecho recorrência foi o mesmo entre os dois ribotipos.⁴⁴ Situação semelhante foi observada nesta série, cujo grupo de pacientes infectados pelo RT106 não apresentou gravidade maior quando comparado às ICD por outros ribotipos.

Apesar de quase metade dos ribotipos terem sido caracterizados como RT106, foi observado nesta amostra diversidade grande de estirpes. Estudo anterior publicado por Silva *et al* já havia observado o mesmo.⁴¹ Silva *et al* analisaram 76 amostras com *C. difficile* de humanos (n = 25) e animais (n = 51) com diarreia, no estado de Minas Gerais, entre 2008 e 2015, obtendo-se 24 diferentes ribotipos, dos quais 14 foram isolados em humanos e 9 deles também em animais. Nesse período, entre as estirpes toxigênicas, o RT014/020 foi o mais prevalente (18,4%) e o segundo o RT106 (10,5%). Importante ressaltar que nesse mesmo estudo, foi identificado o RT078 em três potros, sendo considerada a primeira estirpe produtora de toxina binária descrita no Brasil.⁴¹ Essa diversidade reforça a importância da vigilância epidemiológica em nosso meio, uma vez que existe o risco da emergência de novas estirpes hipervirulentas.

No Brasil, Diniz *et al* e Costa *et al* já identificaram, em humanos, estirpes de *C. difficile* pertencentes ao clado 2, o mesmo que engloba linhagens hipervirulentas, tais como a 027 e a 078.^{45, 46} Nesta linha, Pires *et al*, no estado do Rio Grande do Sul, descreveram a detecção da primeira infecção em humano por estirpe hipervirulenta (RT027) no país, no ano de 2018.⁴⁷ Em estudo prévio, prospectivo, realizado em dois hospitais de Porto Alegre-RS pelo mesmo grupo de pesquisa, cujo objetivo foi identificar a presença dos ribotipos hipervirulentos 027 e 078, não foram encontradas nenhuma das duas estirpes. Foram avaliadas 116 amostras de pacientes com diarreia nosocomial. Desse total, 11 apresentaram *C. difficile*, porém apenas um era toxigênico e sem características moleculares que permitisse caracterizá-lo como estirpe hipervirulenta.⁴⁸ Tal fato aponta para falta de estudos relacionados em nosso meio ou para o surgimento mais recente dessas linhagens antes não identificadas.

Em publicação mais recente, Girão *et al*, avaliaram 29 estirpes toxigênicas em um estudo que envolveu 5 hospitais localizados regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. O tipo sequencial mais encontrado foi o ST42, correspondente ao RT106, o

que reforça o achado deste estudo. Observou-se também diversidade, com dezoito tipos sequenciais diferentes encontrados.⁴⁹

O RT 014/020 foi o segundo mais prevalente, presente em 9,1% da amostra. Esse ribotipo também havia sido descrito por Costa *et al* como um dos mais frequentes em sua amostra e, na Europa, é responsável por 10% das ICD, sendo o terceiro mais frequente, segundo estudo prospectivo, multicêntrico, sobre prevalência de infecção pelo *C. difficile* que avaliou a ribotipagem em pacientes hospitalizados com diarreia (EUCLID) em 482 hospitais de 20 países do continente entre 2012 e 2013.⁵⁰

⁵¹ No Brasil, já foi identificada resistência a quinolona associada a este ribotipo. Estudo realizado em hospital universitário do Rio de Janeiro identificou 4 casos de ICD, por meio de pesquisa de toxinas A e B por ELISA e cultura toxigênica, a partir de 74 amostras fecais de pacientes com diarreia, durante internação hospitalar entre 2009 e 2010. Os pacientes infectados apresentavam imunossupressão por leucemia mielóide ou linfóide aguda. Foram três estirpes submetidas a ribotipagem, que pertenciam aos ribotipos 014, 043 e 046, sensíveis a metronidazol e vancomicina. Entretanto, o RT014 demonstrou resistência a moxifloxacino. Foi ainda identificada a mutação do gene *gyrB*, responsável por essa característica.⁵² Esse achado chama a atenção para o possível mecanismo de resistência a quinolonas como forma de perpetuação de determinadas estirpes em nosso meio e a possibilidade de surtos por agentes infecciosos de maior virulência.

Os RT133 e RT233, previamente relatados como circulantes no Brasil não foram identificados em nosso estudo.⁵⁰ Tal relato permite inferir na possibilidade de uma diferença do perfil epidemiológico entre as regiões do país assim como no dinamismo da epidemiologia da infecção que pode justificar sob o ponto de vista temporal na composição diferente dos ribotipos.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se portanto que a ICD esteve presente em amostra de pacientes mais complexos, portadores de doenças mais graves. A não melhora clínica após a instituição do tratamento da ICD e o escore de gravidade ATLAS relacionaram-se a maior risco de óbito nessa população, o que demonstra o impacto direto dessa afecção sobre o prognóstico dos pacientes durante a internação. O escore de ATLAS pode auxiliar na identificação de infecções mais graves e de pior prognóstico. O emprego de múltiplos antimicrobianos e a necessidade de nutrição enteral estiveram implicados em maior tempo de internação entre os pacientes que não evoluíram a óbito. Na análise sobre o tempo de internação após o diagnóstico de ICD, o uso de novo antibiótico para outra finalidade, a internação em terapia intensiva e o emprego de múltiplos cursos de antimicrobianos relacionaram-se ao aumento desse período da hospitalização. O controle e a prevenção de infecções hospitalares, assim como o uso racional de antimicrobianos pode evitar o prolongamento da internação, suas complicações e diminuir os custos assistenciais demandados por estes pacientes. A gravidade das comorbidades, caracterizada pelo índice de comorbidades de Charlson maior do que 7 esteve relacionada a maior recorrência. Apesar da predominância do RT106, foi observada uma diversidade grande de estirpes nesta amostra. Não foi identificada relação entre o ribotipo ou capacidade de produção de toxina binária e a evolução para formas graves da infecção.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTAS FUTURAS

Desde 2013, o grupo tem estudado o perfil de resistência aos antimicrobianos e, mais recentemente, passou a realizar a vigilância epidemiológica molecular das estirpes de *C. difficile* de nosso meio. No nosso laboratório, temos outras mais de 100 amostras de fezes de pacientes com diagnóstico de *C. difficile* para realização da ribotipagem e estudo da resistências aos antimicrobianos, muitas delas já analisadas. Algumas dessas amostras também foram submetidas ao teste de amplificação de ácido nucléico (NAAT) como método diagnóstico, para estudo de sua aplicabilidade e eficácia em nosso meio. Portanto, dessa maneira, daremos continuidade a esta linha de pesquisa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prevention CfDca. Multidrug-resistant organism and Clostridium difficile infections:. 2020.
2. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, 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). *Clin Infect Dis*. Mar 2018;66(7):987-994. doi:10.1093/cid/ciy149
3. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, Diseases ESoCMal. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clin Microbiol Infect*. Mar 2014;20 Suppl 2:1-26. doi:10.1111/1469-0691.12418
4. Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, et al. The Role of Glutamate Dehydrogenase (GDH) Testing Assay in the Diagnosis of Clostridium difficile Infections: A High Sensitive Screening Test and an Essential Step in the Proposed Laboratory Diagnosis Workflow for Developing Countries like China. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144604. doi:10.1371/journal.pone.0144604
5. Cançado GGL, Silva ROS, Nader AP, Lobato FCF, Vilela EG. Impact of simultaneous glutamate dehydrogenase and toxin A/B rapid immunoassay on Clostridium difficile diagnosis and treatment in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *J Gastroenterol Hepatol*. Feb 2018;33(2):393-396. doi:10.1111/jgh.13901
6. Delmée M. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease. *Clin Microbiol Infect*. Aug 2001;7(8):411-6. doi:10.1046/j.1198-743x.2001.00294.x
7. Janezic S, Rupnik M. Molecular typing methods for Clostridium difficile: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol*. 2010;646:55-65. doi:10.1007/978-1-60327-365-7_4
8. Silva RO, Vilela EG, Neves MS, Lobato FC. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of Clostridium difficile-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. Jul 2014;47(4):447-50. doi:10.1590/0037-8682-0100-2014
9. Miller MA, Louie T, Mullane K, et al. Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for Clostridium difficile infection which predicts

response to therapy. *BMC Infect Dis.* Mar 2013;13:148. doi:10.1186/1471-2334-13-148

10. Baiomi AM, Abbas HM, Pirzada UM, Zaidi BM, Saturno DM, Nayudu SKM. Charlson Comorbidity index (CCI): An independent predictor of outcomes in *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Gastroenterology* 2018.

11. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* Jan 2002;346(5):334-9. doi:10.1056/NEJMcp011603

12. Gao T, He B, Pan Y, et al. Association of *Clostridium difficile* infection in hospital mortality: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control.* Dec 2015;43(12):1316-20. doi:10.1016/j.ajic.2015.04.209

13. Wenisch JM, Schmid D, Tucek G, et al. A prospective cohort study on hospital mortality due to *Clostridium difficile* infection. *Infection.* Oct 2012;40(5):479-84. doi:10.1007/s15010-012-0258-1

14. Chopra T, Miller M, Severson R, Marchaim D, Kate KS, Alangaden G. ATLAS - A bedside scoring system predicting mortality due to *Clostridium difficile* infection (CDI) in elderly hospitalised patients. 48th Annual meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Vancouver, BC2010. p. 21-24.

15. Hernández-García R, Garza-González E, Miller M, Arteaga-Muller G, Galván-de los Santos AM, Camacho-Ortiz A. Application of the ATLAS score for evaluating the severity of *Clostridium difficile* infection in teaching hospitals in Mexico. *Braz J Infect Dis.* 2015 Jul-Aug 2015;19(4):399-402. doi:10.1016/j.bjid.2015.05.005

16. Fujitani S, George WL, Murthy AR. Comparison of clinical severity score indices for *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Mar 2011;32(3):220-8. doi:10.1086/658336

17. Mulherin DW, Hutchison AM, Thomas GJ, Hansen RA, Childress DT. Concordance of the SHEA-IDSA severity classification for *Clostridium difficile* infection and the ATLAS bedside scoring system in hospitalized adult patients. *Infection.* Dec 2014;42(6):999-1005. doi:10.1007/s15010-014-0671-8

18. Longtin Y, Trottier S, Brochu G, et al. Impact of the type of diagnostic assay on *Clostridium difficile* infection and complication rates in a mandatory reporting program. *Clin Infect Dis.* Jan 2013;56(1):67-73. doi:10.1093/cid/cis840

19. Planche TD, Davies KA, Coen PG, et al. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection. *Lancet Infect Dis*. Nov 2013;13(11):936-45. doi:10.1016/S1473-3099(13)70200-7
20. Wilcox MH, Ahir H, Coia JE, et al. Impact of recurrent *Clostridium difficile* infection: hospitalization and patient quality of life. *J Antimicrob Chemother*. 09 2017;72(9):2647-2656. doi:10.1093/jac/dkx174
21. Davey P, Marwick CA, Scott CL, et al. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database Syst Rev*. 02 2017;2:CD003543. doi:10.1002/14651858.CD003543.pub4
22. Fekety R, McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Mulligan ME. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis*. Mar 1997;24(3):324-33. doi:10.1093/clinids/24.3.324
23. McFarland LV, Surawicz CM, Rubin M, Fekety R, Elmer GW, Greenberg RN. Recurrent *Clostridium difficile* disease: epidemiology and clinical characteristics. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Jan 1999;20(1):43-50. doi:10.1086/501553
24. Olsen MA, Yan Y, Reske KA, Zilberberg MD, Dubberke ER. Recurrent *Clostridium difficile* infection is associated with increased mortality. *Clin Microbiol Infect*. Feb 2015;21(2):164-70. doi:10.1016/j.cmi.2014.08.017
25. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*. Jan 2001;357(9251):189-93. doi:10.1016/S0140-6736(00)03592-3
26. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C. Risk Factors for Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(4):452-460.
27. Nair S, Yadav D, Corpuz M, Pitchumoni CS. *Clostridium difficile* colitis: factors influencing treatment failure and relapse--a prospective evaluation. *Am J Gastroenterol*. Oct 1998;93(10):1873-6. doi:10.1111/j.1572-0241.1998.00541.x
28. Kim YG, Graham DY, Jang BI. Proton pump inhibitor use and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease: a case-control analysis matched by propensity score. *J Clin Gastroenterol*. 2012 May-Jun 2012;46(5):397-400. doi:10.1097/MCG.0b013e3182431d78

29. Linsky A, Gupta K, Lawler EV, Fonda JR, Hermos JA. Proton pump inhibitors and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med*. May 2010;170(9):772-8. doi:10.1001/archinternmed.2010.73

30. Lopes Cançado GG, Silveira Silva RO, Rupnik M, et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Anaerobe*. Dec 2018;54:65-71. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.08.005

31. Kyne L, Sougioultzis S, McFarland LV, Kelly CP. Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Nov 2002;23(11):653-9. doi:10.1086/501989

32. Lee CH, Steiner T, Petrof EO, et al. Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. Jan 2016;315(2):142-9. doi:10.1001/jama.2015.18098

33. Youngster I, Sauk J, Pindar C, et al. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin Infect Dis*. Jun 2014;58(11):1515-22. doi:10.1093/cid/ciu135

34. Musher DM, Aslam S, Logan N, et al. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis*. Jun 2005;40(11):1586-90. doi:10.1086/430311

35. Carlson TJ, Blasingame D, Gonzales-Luna AJ, Alnezary F, Garey KW. *Clostridioides difficile* ribotype 106: A systematic review of the antimicrobial susceptibility, genetics, and clinical outcomes of this common worldwide strain. *Anaerobe*. Apr 2020;62:102142. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.102142

36. Cheknis A, Johnson S, Chesnel L, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* strains recovered from clinical trials in the US, Canada and Europe from 2006-2009 to 2012-2015. *Anaerobe*. Oct 2018;53:38-42. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.05.009

37. Karlowsky JA, Adam HJ, Kosowan T, et al. PCR ribotyping and antimicrobial susceptibility testing of isolates of *Clostridium difficile* cultured from toxin-positive diarrheal stools of patients receiving medical care in Canadian hospitals: the Canadian *Clostridium difficile* Surveillance Study (CAN-DIFF) 2013-2015. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Jun 2018;91(2):105-111. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.017

38. Vohra P, Poxton IR. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading)*. May 2011;157(Pt 5):1343-1353. doi:10.1099/mic.0.046243-0
39. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005 Sep 24-30 2005;366(9491):1079-84. doi:10.1016/S0140-6736(05)67420-X
40. Moore P, Kyne L, Martin A, Solomon K. Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure. *J Med Microbiol*. Sep 2013;62(Pt 9):1405-1413. doi:10.1099/jmm.0.056614-0
41. Silva RO, Rupnik M, Diniz AN, Vilela EG, Lobato FC. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Dec 2015;110(8):1062-5. doi:10.1590/0074-02760150294
42. Silva ROS, de Oliveira Júnior CA, Blanc DS, et al. *Clostridioides difficile* infection in dogs with chronic-recurring diarrhea responsive to dietary changes. *Anaerobe*. Jun 2018;51:50-53. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.03.011
43. Orden C, Neila C, Blanco JL, et al. Recreational sandboxes for children and dogs can be a source of epidemic ribotypes of *Clostridium difficile*. *Zoonoses Public Health*. 02 2018;65(1):88-95. doi:10.1111/zph.12374
44. Sundram F, Guyot A, Carboo I, Green S, Lilaonitkul M, Scourfield A. *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 106: clinical outcomes and risk factors. *J Hosp Infect*. Jun 2009;72(2):111-8. doi:10.1016/j.jhin.2009.02.020
45. Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe*. Apr 2019;56:34-39. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.01.010
46. Costa CL, Mano de Carvalho CB, González RH, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. *Anaerobe*. Dec 2017;48:232-236. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.10.001
47. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 03 2018;39(3):371-373. doi:10.1017/ice.2017.280

48. Monteiro AeA, Pires RN, Persson S, Rodrigues Filho EM, Pasqualotto AC. A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014 Nov-Dec 2014;18(6):672-4. doi:10.1016/j.bjid.2014.08.004
49. Girão ES, de Melo Tavares B, Alves Dos Santos S, et al. Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study. *Anaerobe*. Dec 2020;66:102267. doi:10.1016/j.anaerobe.2020.102267
50. Balassiano IT, Miranda KR, Boente RF, et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*. Jun 2009;15(3):61-4. doi:10.1016/j.anaerobe.2008.12.007
51. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, 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. *Euro Surveill*. Jul 2016;21(29)doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294
52. Secco DA, Balassiano IT, Boente RF, et al. *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. *Anaerobe*. Aug 2014;28:85-9. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.05.013

9. ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS E ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM PACIENTES COM DIARREIA INTERNADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG.

Pesquisador: Eduardo Garcia Vilela

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13552719.3.0000.5149

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.434.588

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto da grande área das Ciências da Saúde que propõe uma análise clínico-epidemiológica em prontuário de pacientes com diarreia nosocomial por *Clostridium difficile* e correlacionar com os testes diagnósticos realizados no Hospital das Clínicas e na Escola de Veterinária da UfmG (Gdh, pesquisa de toxinas por Elisa, cultura toxigênica e soroneutralização celular). O projeto teve aprovação anterior à Plataforma Brasil e o proponente solicita extensão do prazo por dois anos adicionais.

Conforme o proponente, *Clostridium difficile*, inicialmente denominado *Bacillus difficilis*, foi descrito pela primeira vez em 1935, tendo recebido este nome devido à dificuldade em cultivá-la em meio de cultura. Contudo, em 1893, uma paciente que desenvolveu diarreia aguda após procedimento cirúrgico, e foram demonstradas "membranas diftéricas" em seu intestino – quadro que muitos anos depois seria reconhecido como possível primeiro relato de caso de colite pseudomembranosa. Somente em 1974 esta bactéria foi definitivamente reconhecida como patógeno humano produtor de citotoxinas responsáveis pela colite pseudomembranosa. Ao longo das décadas, a infecção pelo *Clostridium difficile* passou a ser reconhecida como a principal causa bacteriana de diarreia associada a antibioticoterapia prolongada e patógeno nosocomial de grande importância, relacionado morbimortalidade crescente em diversos países. O aumento do número de casos registrados deve-se aos avanços científicos que permitem a utilização de métodos

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4392

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.434.588

diagnósticos mais precisos, mas também ao uso, muitas vezes indiscriminado, de drogas antimicrobianas, considerado o principal fator de risco para essa infecção. Acredita-se que o uso dessas medicações seja responsável pelo desequilíbrio da microbiota intestinal, da qual o *Clostridium difficile* é constituinte, permitindo seu crescimento descontrolado e produção aumentada de toxinas.

Outra questão a ser considerada é o surgimento de novas cepas de *Clostridium difficile*, potencialmente mais graves. O uso disseminado de fluoroquinolonas parece estar relacionado ao surgimento de cepas denominadas NAP-1/B1/0277. Tal cepa tem sido cada vez mais relacionada a surtos, de maior gravidade, em países desenvolvidos, sendo isolada em 36% de amostras americanas e 8% européias. Ainda não existem evidências desta cepa no Brasil, mas os estudos realizados até então são pouco robustos e não permitem afirmações mais categóricas. Torna-se evidente que um detalhamento maior do retrato dessa afecção em nosso meio poderá responder várias questões associadas à infecção pelo *Clostridium difficile*. O estudo visa a incluir pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que apresentem quadro de diarreia até três meses após uso de antimicrobianos ou que iniciem quadro diarreico durante internação hospitalar. Será feita busca ativa na unidade Clínica Médica e Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da UFMG, visando a identificar pacientes com critério de elegibilidade para o estudo. Todos os pacientes incluídos deverão concordar em participar do estudo e assinar o TCLE.

Amostras de fezes de todos os participantes serão colhidas e enviadas ao Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, onde serão realizadas simultaneamente a pesquisa de toxina A/B por meio do ensaio imunoenzimático (três kits de ELISA), soroneutralização celular e cultura toxigênica. Todas as amostras recebidas serão ainda submetidas ao isolamento de *Clostridium difficile* e subsequente pesquisa dos genes relativos à codificação das toxinas A, B e toxina binária por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Será realizada coleta de dados clínicos e epidemiológicos de todos os pacientes com infecção confirmada por *C. difficile* toxigênica por meio de revisão de prontuário, com ênfase nos fatores de risco para essa patologia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O trabalho tem como objetivo avaliar prevalência e comportamento da infecção por *Clostridium difficile* em pacientes com diarreia internados no hospital das Clínicas da UFMG. **Objetivo Secundário:** Verificar a acurácia diagnóstica de dois ensaios imunoenzimáticos quando comparados à soroneutralização celular considerado padrão-ouro para o diagnóstico da doença.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.434.588

Avaliar a prevalência dos genes codificadores das toxinas A, B e toxina binária em estirpes isoladas de pacientes com diarreia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O proponente descreve que " não há riscos diretos ao paciente, uma vez que será realizada apenas a coleta de fezes para realização dos testes diagnósticos. As demais informações serão colhidas através de registros em prontuários médicos. Os pacientes serão informados sobre a pesquisa e terão as suas dúvidas esclarecidas. Serão incluídos no estudo apenas os pacientes que concordarem em participar. Estes assinarão o termo de consentimento. O paciente não irá receber qualquer intervenção por causa da pesquisa, sendo as decisões terapêuticas reservadas ao médico assistente. O estudo é observacional. Pode existir a possibilidade de disseminação de informações oriundas do prontuário que será informada no TCLE, mas enfatizado também o baixo risco de ocorrência de tal evento, uma vez que os prontuários são guardados pelo SAME do HC-UFMG e as informações serão acessadas apenas por membros aprovados da equipe de pesquisa". Como Benefícios, informa: "Ter propedêutica diagnóstica mais acurada para diarreia nosocomial para *Clostridium difficile*. Colaborar para maior conhecimento do comportamento e evolução da infecção pelo *Clostridium difficile*."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de cadastro anterior a Plataforma Brasil, que consta a seguinte informação no Formulário de Informações Básicas, item "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador": "Trata-se de introdução do projeto já existente na plataforma Brasil, sobre investigação epidemiológica do *Clostridium difficile* no Hospital das Clínicas da UFMG com aprovação do COEP UFMG em 2012 e solicitação de extensão do mesmo por mais dois anos para continuidade da investigação como informado nos itens acima." Prevê participantes acima de 18 anos. Previsão de término em 2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Folha de Rosto assinada pelo Diretor da Escola de Medicina-UFMG, datada em 2019
- Parecer consubstanciado aprovado pela Câmara Departamental do Departamento de Clínica Médica-UFMG, datado da submissão anterior a Plataforma Brasil, em 2011
- Formulário de Informações Básicas
- Projeto completo/Brochura da investigação

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.434.588

- Aprovação do Projeto anterior à Plataforma Brasil com parecer de 16 de junho de 2012.
- Termo de Constituição de Biorrepositório
- TCLE com alterações inseridas conforme solicitado na diligência.
- Carta resposta à diligência

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SMJ, o projeto AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS E ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM PACIENTES COM DIARREIA INTERNADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG do pesquisador Eduardo Garcia Vilela, está aprovado. Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1310535.pdf	27/06/2019 20:13:49		Aceito
Outros	carta_resposta_cep_tcle_termo_biorrepositorio.pdf	27/06/2019 20:12:59	Eduardo Garcia Vilela	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4582 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.434.588

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_constituicao_de_biorrepositorio.pdf	27/06/2019 20:12:28	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_final.pdf	27/06/2019 20:09:40	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto2012.docx	04/05/2019 12:11:20	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompletoCoop.pdf	04/05/2019 12:01:28	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aprovacao_camara_departamental.pdf	04/05/2019 11:20:41	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_final.pdf	04/05/2019 11:17:01	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer_alfa.pdf	26/03/2019 12:37:30	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Cronograma	cronogramacoop.docx	13/03/2019 10:30:23	Eduardo Garcia Vilela	Aceito
Parecer Anterior	coepdifficile.pdf	13/03/2019 10:10:23	Eduardo Garcia Vilela	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 03 de Julho de 2019

Assinado por:

Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br