

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Avaliação do método de disco-difusão e pontos de corte epidemiológicos para rifampicina, eritromicina e tetraciclina em isolados de *Clostridioides difficile* humanos e animais

Gabriela Muniz Carvalho

Belo Horizonte

2023

Gabriela Muniz Carvalho

Avaliação do método de disco-difusão e pontos de corte epidemiológicos para rifampicina, eritromicina e tetraciclina em isolados de *Clostridioides difficile* humanos e animais

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Campos Tavares

C331a Carvalho, Gabriela Muniz, 1996 -
Avaliação do método de disco-difusão e pontos de corte epidemiológicos para rifampicina, eritromicina e tetraciclina em isolados de Clostridioides difficile humanos e animais / Gabriela Muniz Carvalho. – 2023.
70f; il

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva
Coorientador: Guilherme Campos Tavares
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Bibliografias: f. 41 a 54.

1- Clostridium difficile - Teses – 2. Clostridioses - Teses – 3. Diarreia em animais – Teses - I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira – II. Tavares, Guilherme Campos – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELA MUNIZ CARVALHO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 15 de fevereiro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Rodrigo Otavio Silveira Silva - Orientador(a)

Dr.(a). Carlos Augusto Gomes Leal

Dr.(a). Guilherme Guerra Alves



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otavio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior**, em 15/02/2023, às 11:47, 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 **Carlos Augusto Gomes Leal, Membro**, em 15/02/2023, às 11:48, 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 **Guilherme Guerra Alves, Usuário Externo**, em 15/02/2023, às 16:42, 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 **2042862** e o código CRC **ED658558**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os membros da equipe do Laboratório de Anaeróbios que tive o prazer de conhecer desde o estágio. Obrigada pelo convívio tranquilo, pelos ensinamentos, pela parceria, pelo bom humor e, em especial, pela amizade.

Agradeço ao professor Rodrigo Otávio por sua orientação, por sua disponibilidade, pela compreensão e pelas oportunidades durante todo o período do curso.

Agradeço a todos os professores (as) das disciplinas que tive oportunidade de realizar, por todo o aprendizado que enriqueceu minha formação.

Agradeço ao professor Guilherme Guerra, por confiar no meu trabalho desde o início, por me ajudar a dar os primeiros passos para traçar o caminho para meu futuro na Medicina Veterinária, por seus conselhos e, principalmente, pela parceria durante todos esses anos.

Agradeço aos meus pais, Elton Carvalho e Christina Muniz, por todo apoio e incentivo para me dedicar aos estudos durante minha vida.

Agradeço à minha irmã, Bárbara Muniz, por todo carinho e parceria durante todo esse período. Obrigada por estar presente em minha vida e fazer dela um pouco mais tranquila, mesmo de longe.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial a Isabel Chaltein, Gabrielle Müller, Natasha Nanogaki, Bruna Queiroz, Maria Roberta Cunha, Victor Fabri, Pedro Roberto Zara, Arthur Schelb, Laís Muniz, Mateus Lopes e Thiago Ribeiro. Obrigada por me proporcionarem muitos momentos de risada e diversão, por me ajudarem a relaxar e por toda a paciência e apoio.

Agradeço a todos os meus colegas de república pelos momentos de descontração e conselhos. Agradeço a todos os meus familiares, por acompanharem meu progresso e torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, em especial a Escola de Veterinária, pela sua estrutura de ensino e pesquisa.

Agradeço ao CNPq e CAPES, pela concessão da bolsa e disponibilidade de acesso ao Portal Periódico.

Agradeço às agências de fomento pelo financiamento das atividades.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, de forma direta ou indireta.

RESUMO

Clostridioides (prev. *Clostridium*) *difficile* é um enteropatógeno responsável por causar quadros entéricos em seres humanos e animais, podendo levar ao óbito. Entre os diferentes fatores de risco para a infecção por *C. difficile*, destaca-se a antibioticoterapia. Além de sua relação com o desenvolvimento da doença, o uso de antimicrobianos exerceu ainda uma pressão seletiva em *C. difficile*, que resultou no desenvolvimento de estirpes classificadas como “hipervirulentas”. Apesar da relevância da resistência à antimicrobianos na epidemiologia e tratamento de *C. difficile*, os testes de suscetibilidade a antimicrobianos disponíveis para esse patógeno baseiam-se exclusivamente na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), métodos onerosos e demorados. Neste estudo, o método de disco difusão, um teste rápido e de menor custo, foi utilizada para avaliar a suscetibilidade de *C. difficile* frente à eritromicina, rifampicina e tetraciclina. Um total de 155 estirpes isoladas no Brasil entre 2011 e 2022 foram testadas utilizando a técnica de fita graduada (*episolometer test* - Etest). Dados como ribotipo dos isolados, hospedeiro de origem e ano de isolamento foram utilizados para avaliar possíveis associações com a resistência aos antimicrobianos testados. O presente estudo sugere que o método de disco difusão pode ser uma ferramenta útil para triagem de estirpes de *C. difficile* resistentes à eritromicina e rifampicina, apresentando alta correção com a classificação obtida pela CIM. O presente trabalho estabeleceu ainda os pontos de corte epidemiológico WT \geq 20mm e WT \geq 28 mm para classificação de eritromicina e rifampicina, respectivamente, tendo também margens de erro de 0% entre os métodos testados. Já para a tetraciclina, o método de disco difusão não apresentou um desempenho satisfatório, classificando erroneamente 5,8% dos isolados. No presente estudo, isolados de ribotipos pertencentes ao clado 5 apresentaram maior probabilidade de serem resistentes a eritromicina, tetraciclina e rifampicina, enquanto isolados de animais e estirpes não-toxigênicas apresentaram um maior porcentual de resistência a tetraciclina e rifampicina, respectivamente. Isolados resistentes à tetraciclina apresentaram ainda associação estatística positiva a serem resistentes também à rifampicina. O presente estudo sugere que o método disco difusão pode ser uma ferramenta útil para avaliação da sensibilidade de *C. difficile* frente a eritromicina e rifampicina, porém não sendo adequada para tetraciclina.

Palavras-chave: *Clostridioides difficile*; disco de difusão; *episolometer test*; ponto de corte epidemiológico;

ABSTRACT

Clostridioides (prev. *Clostridium*) *difficile* is an enteropathogen responsible for causing diarrhea and pseudomembranous colitis, which can lead to death. Among the different risk factors for *C. difficile* infection, antibiotic therapy stands out. In addition to its relationship with the development of the disease, the use of antimicrobials exerts selective pressure on *C. difficile*, which has resulted in the development of strains classified as “hypervirulent”. Despite the relevance of antimicrobial resistance in the epidemiology and treatment of *C. difficile*, the susceptibility tests available for this pathogen still use the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), being expensive and laborious. Such methods are not optimized for routine laboratory work and are expensive. In this study, disk diffusion was used to assess the susceptibility of *C. difficile* to erythromycin, rifampicin and tetracycline. A total of 155 strains isolated in Brazil between 2011 and 2022 were tested using the disk diffusion and episolometer test (Etest) methods. Data such as isolates’ ribotypes, host of origin and year of isolation were used to assess possible associations with resistance to the antimicrobials tested. The present study suggests that disk diffusion can be an interesting tool for screening erythromycin and rifampicin-resistant *C. difficile* strains, showing a high correlation to the classification obtained through MIC evaluation. The present study suggests cutoff points at WT ≥ 20 mm and WT ≥ 28 mm for classification of erythromycin and rifampicin, respectively. However, for tetracycline, disk diffusion did not perform satisfactorily, misclassifying 5,8% of the isolates. In the present study, isolates of ribotypes belonging to clade 5 were more likely to be resistant to erythromycin, tetracycline and rifampicin, while isolates from animals and non-toxigenic strains showed a higher percentage of resistance to tetracycline and rifampicin, respectively. Tetracycline-resistant isolates also showed a positive statistical association with being resistant to rifampicin as well. The present study suggests that disk diffusion can be a useful tool for assessing the sensitivity of *C. difficile* to erythromycin and rifampicin, however it is not suitable for tetracycline.

Keywords: *Clostridioides difficile*; episolometer test; disk diffusion; cutoff;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização filogenética dos diferentes clados referentes ao MLST de <i>C. difficile</i>	18
Figura 2 – Distribuição da frequência de diferentes espécies de hospedeiros segundo os ribotipos mais comuns encontrados.	31
Figura 3 – Padrão de leitura do Etest.	34
Figura 4 – Testes de suscetibilidade antimicrobiana para eritromicina.	35
Figura 5 – Scattergram obtido a partir dos resultados para eritromicina.	36
Figura 6 – Distribuição das zonas de inibição e suas respectivas MICs referente a eritromicina.....	37
Figura 7 – Testes de suscetibilidade antimicrobiana para rifampicina.	38
Figura 8 – Scattergram obtido a partir dos resultados para rifampicina.	39
Figura 9 – Distribuição das zonas de inibição e suas respectivas MICs referentes a rifampicina.	40
Figura 10 – Testes de suscetibilidade antimicrobiana para tetraciclina.	41
Figura 11 – Scattergram obtido a partir dos resultados para tetraciclina.	42
Figura 12 – Distribuição das zonas de inibição e suas respectivas MICs referentes a tetraciclina.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atual divisão de clados de <i>C. difficile</i>	17
Tabela 2 – Descrição dos primers utilizados para identificação de <i>C. difficile</i>	32
Tabela 3 – Pontos de corte do método de disco difusão propostos para categorização de Clostridioides difficile entre wild type (WT) e non-wild type (NWT) utilizando teste graduado (Etest) como referência para concentração de inibição mínima (CIM), de acordo com ECOFF determinados pelo EUCAST, juntamente com os resultados dos cálculos para erros de grande importância (VME), erros de importância (ME), CIM50, e CIM90.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

[]	Concentração
AST	Ágar sangue suplementado com taurocolate
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBA	<i>Brucella Blood Agar</i> - Ágar Brucella suplementado com sangue ovino, hemina e vitamina K
BHI	<i>Brain heart infusion</i> - Infusão de cérebro-coração
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDT	<i>C. difficile</i> transferase
CdtLoc	<i>Locus Cdt</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono (gasoso)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
ECOFF	<i>Epidemiological cutoff values</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Etest	<i>Episolometer test</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
F	<i>Forward</i>
GDH	<i>Glutamate dehydrogenase</i> – glutamato desidrogenase
H ₂	Hidrogênio (gasoso)
HsmRA	<i>Heme-sensing membrane protein system</i>
ICD	Infecção por <i>C. difficile</i>
IJSEM	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>
Mb	Megabase
ME	<i>Major error</i> – erros de importância
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
N ₂	Nitrogênio (gasoso)
NAAT	<i>Nucleic acid amplification test</i> – teste de amplificação de ácido nucleico
NRI	<i>Normalized Resistance Interpretation</i>
NT	Não toxigênico
NWT	<i>Non wild type</i>
°C	Graus Celsius

PaLoc	<i>Locus</i> de patogenicidade
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PhLOPS _A estreptogramina A	Fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e
PYG	<i>peptone - yeast extract – glucose</i>
R	<i>Reverse</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
RT	Ribotipo
SISGEN Tradicional Associado	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento
ST	<i>Sequence type</i>
TMF	Transplante de microbiota fecal
VME	<i>Very major error</i> – erros de grande importância
WT	<i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Contexto geral	13
2.2. Caracterização do micro-organismo.....	15
2.3. Epidemiologia	16
2.4. Patogenia	19
2.5. Doença em humanos	20
2.6. Doença em animais	21
2.7. Diagnóstico.....	22
2.8. Tratamento	23
2.9. Resistência antimicrobiana.....	24
2.9.1. Testes de suscetibilidade antimicrobiana.....	24
2.9.2. Mecanismos de resistência de <i>C. difficile</i>	25
2.10. Controle e prevenção.....	27
3. OBJETIVO	29
3.1. Objetivo geral.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Caracterização de isolados	30
4.1.1. Isolados oriundos da bacterioteca	31
4.1.2. Isolamento e identificação de novas estirpes	31
4.2. Testes de suscetibilidade	32
4.2.1. Antibiograma	32
4.2.2. Teste de fita graduada (<i>Epsilometer test</i> - Etest)	33
4.3. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A	62

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças atuais à saúde pública. Sem um esforço global focado, ela pode vir a causar dez milhões de mortes por ano até 2050 (O'NEILL, 2014). Neste contexto, *Clostridioides difficile* (prev. *Clostridium difficile*) é uma grande ameaça à saúde e um relevante reservatório de genes de resistência (CDC, 2022; O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021b). Além disso, recentes estudos sugerem que *C. difficile* é um potencial patógeno zoonótico, destacando a importância da abordagem de "One Health" para seu controle (BJÖERSDORFF et al., 2021; LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

A resistência antimicrobiana pode afetar o tratamento de infecção por *C. difficile* (ICD), que é baseado na administração de metronidazol, vancomicina ou fidaxomicina (CZEPIEL et al., 2019; OKSI; ANTTILA; MATTILA, 2020). Em adição, a resistência a antimicrobianos tem um importante papel na patogenia e propagação de ICD (IMWATTANA et al., 2021), visto que tratamento antimicrobiano é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença ao impactar a microbiota do trato digestório (SPIGAGLIA; MASTRANTONIO; BARBANTI, 2018). Ainda, a resistência a antimicrobianos aparenta ser um impulsionador do surgimento de novas cepas de *C. difficile*, incluindo as chamadas cepas epidêmicas ou "hipervirulentas" (DINGLE et al., 2019; SPIGAGLIA; MASTRANTONIO; BARBANTI, 2018; STABLER et al., 2012). O exemplo mais conhecido é o ribotipo (RT) 027 de *C. difficile*, que causou surtos em diversos países e foi associado ao aumento do uso de fluoroquinolonas (RAZAVI; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; FREEMAN et al., 2010). Além do RT027, diversas outras cepas resistentes a diferentes antimicrobianos foram associadas a surtos em todo o mundo, incluindo isolados resistentes a lincosamidas e rifampicina (CURRY et al., 2009; IMWATTANA et al., 2021; KUIJPER et al., 2001). Outro estudo recente sugere que a utilização intensa de tetraciclina em animais de produção está associada à disseminação do RT078 e ao aumento da ocorrência de ICD adquirida na comunidade, inclusive em pacientes não idosos e sem nenhum histórico de hospitalização (DINGLE et al., 2019).

Apesar da nítida importância da resistência antimicrobiana na epidemiologia e tratamento de *C. difficile*, o teste de suscetibilidade antimicrobiana para este patógeno é ainda baseado na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em ágar, caldo ou por fita graduada (*episolometer test* – Etest). De forma geral, tais testes são demorados e onerosos (ERIKSTRUP et al., 2012). Já o método de disco difusão é uma técnica simples e de baixo custo que, uma vez padronizada, pode ser realizada facilmente na rotina

laboratorial (ERIKSTRUP et al., 2012; HOLT; DANIELSEN; JUSTESEN, 2015). Estudos com *C. difficile* comparando resultados do CIM com o método de difusão em disco são limitados principalmente à moxifloxacina, metronidazol e vancomicina (ERIKSTRUP et al., 2012; HOLT; DANIELSEN; JUSTESEN, 2015; HUHULESCU et al., 2011; LEVETT, 1988; WONG et al., 1999). Até o momento, poucos estudos foram focados em outros antimicrobianos relevantes para a patogenia e epidemiologia de ICD. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os resultados de testes em difusão em disco comparados aos de CIMs para eritromicina, rifampicina e tetraciclina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contexto geral

Clostridioides difficile (prev. *Clostridium difficile*) foi inicialmente descrito em 1935, ao ser encontrado na microbiota de recém-nascidos; este foi nomeado inicialmente como *Bacillus difficilis*, remetendo a sua morfologia e dificuldade de isolamento *in vitro* (HALL; O'TOOLE, 1935). O patógeno foi reclassificado para o gênero *Clostridium* em 1938, caracterizado por bacilos gram-positivos formadores de esporos e contendo espécies que produzem diversos tipos de toxinas (PRÉVOT, 1938 apud KAMIYA; NAKAMURA, 1993; MCCLUNG, 1956). Já em 2016, foi sugerido a separação deste gênero para inclusão apenas de *Clostridium butyricum* e outros que se derivavam deste (LAWSON; RAINEY, 2016).

Este fato resultou na separação de *Clostridioides difficile* do gênero *Clostridium*, uma vez que análises realizadas na porção 16S do RNA ribossômico mostrou-se filogeneticamente distante com o que foi determinado para o gênero. Além disso, *C. difficile* também apresenta diferenças fenotípicas, como aminoácidos específicos em suas cadeias de peptidoglicanos, e diferentes marcadores quimiotaxonômicos, como a produção de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeias lineares e ramificadas, e produção em grandes quantidades de H₂ quando em meio de cultivo peptona - extrato de levedura - glicose (*peptone - yeast extract - glucose, PYG*) (LAWSON et al., 2016). Dessa forma, a sua reclassificação foi reconhecida pelo “*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*” (IJSEM), sendo que ambos os gêneros *Clostridium* e *Clostridioides* podem ser utilizados para todos fins clínicos, científicos ou comerciais ao se tratar deste patógeno (OREN; RUPNIK, 2018).

Por ser um bacilo anaeróbio estrito, *C. difficile* depende de seu processo de formação de esporos aerotolerantes para sua disseminação do ambiente e entre hospedeiros (BRITTON;

YOUNG, 2012). A formação destes ocorre como uma resposta a fatores externos estressantes, como alteração do pH do ambiente ou redução da nutrientes disponíveis (EDWARDS; MCBRIDE, 2014; WETZEL; MCBRIDE, 2020). Diferentemente de outros microorganismos cujo os esporos são germinados na presença de aminoácidos ou açúcares, o gatilho principal para germinação de *C. difficile* são os sais biliares, em especial o taurocolate, exclusivo de vertebrados. Este é responsável por alterações de pH que induzem o processo de germinação, também permitindo controle parcial sobre a porção anatômica em que *C. difficile* será germinado devido as suas condições específicas (SHEN, 2020).

No final do século XX, *C. difficile* começou a ser relatado como um importante patógeno entérico, responsável por casos de diarreia e colite pseudomembranosa, sinais causados pela ação de suas toxinas principais (A e B), responsáveis por danos teciduais, alterações na permeabilidade intestinal e inflamação (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; LARSON et al., 1978; MARRIE et al., 1978). Na mesma época, observou-se a relação da doença com a disbiose causada pelo uso prévio de antimicrobianos (BARTLETT, 1994; CHANG et al., 1978). Hoje, sabe-se que o uso de antimicrobianos altera a microbiota intestinal, gerando maiores níveis dos sais biliares utilizados para germinação de *C. difficile*, bem como outros metabólitos úteis para o patógeno, e resultando no desenvolvimento da doença (THERIOT et al., 2014).

Além de sua relação com o desenvolvimento clínico da doença, os antimicrobianos ainda se destacam por exercer uma pressão seletiva em *C. difficile*, potencialmente selecionando estirpes de grande relevância clínica. Nesse contexto, destaca-se o ribotipo 027, selecionado graças ao uso indiscriminado de fluoroquinolonas. Tais estirpes causaram grandes surtos com aumento da letalidade e recorrência da doença e que afetaram diversos países do mundo (KOCIOLEK; GERDING, 2016; KUWATA et al., 2015; VALIENTE; CAIRNS; WREN, 2014).

No cenário atual, a emergência de estirpes “hipervirulentas” e o aumento dos casos de ICD geraram preocupações a nível mundial (BURKE; LAMONT, 2014; CDC, 2022). Apesar da presença de tais estirpes ser mais comum em países da América do Norte e Europa, países da América Latina e Ásia recentemente relataram estirpes “hipervirulentas” (ACUÑA-AMADOR; QUESADA-GÓMEZ; RODRÍGUEZ, 2022; GUO et al., 2021; KUIJPER et al., 2006), inclusive no Brasil (PIRES et al., 2018). Além disso, foram constatados números crescentes de casos comunitários, ou seja, não relacionados ao ambiente hospitalar, bem como a possibilidade de que a ICD seja considerada uma zoonose (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020; RODRÍGUEZ-PALLARES et al., 2022; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; TSAI et al., 2021).

Os animais têm grande relevância na epidemiologia de *C. difficile*, uma vez que diversas espécies são acometidas, como suínos, equinos e cães (ALVAREZ-PEREZ et al., 2009; BÅVERUD et al., 2003; KRIJGER et al., 2019; RODRÍGUEZ-PALLARES et al., 2022). A apresentação de ICD em animais pode ter influência do uso de antimicrobianos, mas caracteriza-se também pelo acometimento de animais que não possuem sua microbiota completamente formada, possibilitando a colonização por *C. difficile* (BRITTON; YOUNG, 2012; GONZALEZ RONQUILLO; ANGELES HERNANDEZ, 2017; SONGER; UZAL, 2005). Por fim, já existem relatos de estirpes “hipervirulentas” sendo encontradas em animais, fato que reitera a necessidade de abordar a ICD como parte do conceito de Saúde Única (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2013; HAIN-SAUNDERS et al., 2022; LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

2.2. Caracterização do micro-organismo

C. difficile é classificado como uma bactéria gram-positiva, com formato de bastonete e tamanho $0,5 \mu\text{m} - 1,9 \mu\text{m} \times 3,0 \mu\text{m} - 16,9 \mu\text{m}$, possuindo estruturas flagelares por sua célula que permitem motilidade (KARPIŃSKI et al., 2022; LAWSON et al., 2016). Este possui um genoma de 4.3 Mb, presentes em um único cromossomo circular; este contém cerca de 11% de elementos genéticos móveis que permitem a transmissão horizontal de diferentes genes de importância, como os que conferem resistência aos antimicrobianos (KNIGHT et al., 2015).

Seu metabolismo não envolve a molécula de oxigênio (O_2) como aceptor final de elétrons, dependendo então do processo de fermentação para geração de energia, sendo classificado como anaeróbio estrito (DÜRRE, 2014). O micro-organismo em questão também é capaz de formar esporos, estrutura que garante resistência a ambientes não favoráveis e permite sua disseminação ampla no ambiente (BRITTON; YOUNG, 2012; DÜRRE, 2014). Este também está presente na microbiota de diversos vertebrados, como mamíferos, répteis e aves (SHEN, 2020).

Algumas estirpes de *C. difficile* são capazes de produzir toxinas, responsáveis pelo dano causado no intestino de seu hospedeiro. Estas se diferenciam das estirpes não toxigênicas (NT) pela presença de um *locus* de patogenicidade (PaLoc), contendo genes como *tcdA* e *tcdB*, responsáveis pela codificação da toxina A e B, respectivamente. A regulação de produção dessas toxinas é através de outros genes também presentes no mesmo PaLoc, sendo *tcdR* (regulação positiva) e *tcdC* (regulação negativa), e influenciadas por fatores externos, como a temperatura, concentrações subinibitórias de antimicrobianos, presença de aminoácidos

específicos, entre outros (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; KARASAWA et al., 1997; NAKAMURA et al., 1982).

Além das toxinas A e B, certas estirpes são capazes de produzir uma terceira toxina, denominada toxina binária (*C. difficile* transferase - CDT). Por possuir duas subunidades, a CDT é codificada por dois genes, *cdtA* e *cdtB*. Estes estão presentes em outra região cromossômica, denominada *locus* Cdt (CdtLoc), presente apenas em estirpes capazes de produzir a toxina em questão. Assim como as toxinas A e B, a toxina binária possui um gene específico que influencia sua produção positivamente, sendo este o *cdtR* (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017). Apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente elucidado, suspeita-se de que esta tem papel importante na patogenia da doença, facilitando a adesão de *C. difficile* ao epitélio intestinal e também sendo relacionada a casos de maior recorrência e de maior gravidade da doença em seres humanos (SCHWAN et al., 2014; STEWART; BERG; HEGARTY, 2013).

2.3. Epidemiologia

A ribotipagem permanece como método de primeira escolha para otimização dos estudos de avaliação do perfil epidemiológico de *C. difficile*, permitindo inferências de padrões de distribuição geográfica e aspectos clínicos, por exemplo. O método consiste na ampliação, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), da região espaçadora dos genes 16S e 23S presentes no rRNA, de modo que cada padrão encontrado das bandas ao realizar a eletroforese corresponde a um ribotipo (RT) (BIDET et al., 1999). Além da utilização da ribotipagem, a técnica de *multilocus sequence typing* (MLST) também é utilizada para estudo da variabilidade genética de *C. difficile*. Esta resulta na separação de estirpes em agrupamentos filogenéticos denominados “clados” pela técnica de MLST, também permitindo a demonstração do perfil evolutivo (JANEZIC; RUPNIK, 2010). Ambas as técnicas podem funcionar de forma complementar, apresentando alta correlação entre os resultados. Em algumas situações, inclusive, é possível prever qual o *sequence type* (ST) a partir do RT pertencente, da mesma forma que é possível prever o RT de uma estirpe a partir de seu ST (BAKTASH et al., 2022; COLLINS et al., 2018). Atualmente, a divisão evolutiva de *C. difficile* consiste em seis clados, de forma que RTs com características similares encontram-se agrupados entre eles (Tabela 1). Destes, o clado 1 apresenta maior quantidade de estirpes de alta prevalência ao redor do mundo, enquanto o clado 4 inclui estirpes de maior importância em alguns países. O clado 2 contém o

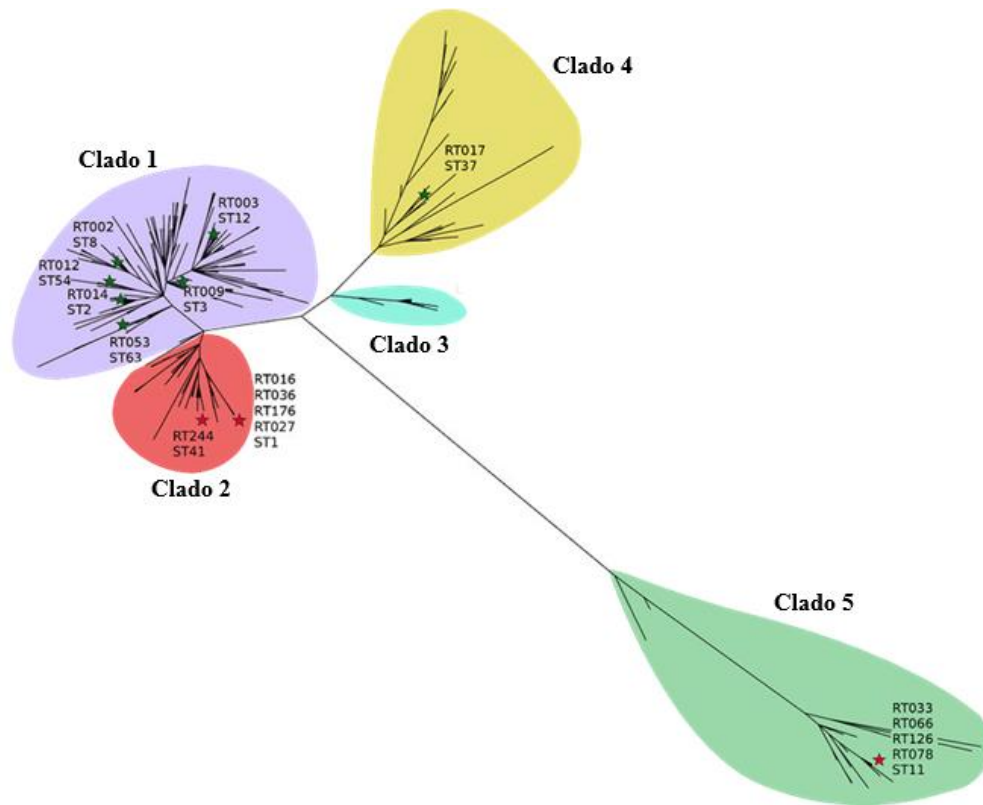
RT027, conhecidamente “hipervirulento” e responsável por diversos surtos mundialmente. Por fim, o clado 5 engloba ribotipos associados principalmente a casos comunitários e animais, potencialmente zoonótico, e que inclui ribotipos “hipervirulentos”, como o RT078 (Figura 1) (JANEZIC; RUPNIK, 2015).

Tabela 1 – Atual divisão de clados de *C. difficile*

Clado (MLST)	Ribotipos principais	Comentários
1	001, 012, 014	Maior diversidade; Possui estirpes toxigênicas e não toxigênicas
2	027, 016, 036, 176	Clado que abriga o RT027 e outros “hipervirulentos”
3	23	Clado infrequente, dominado pelo RT023
4	17	Possui estirpes toxigênicas e não toxigênicas; Inclui o RT017, de padrão A-B+
5	078, 126, 033	Altamente divergente dos outros clados; Possui estirpes toxigênicas e não toxigênicas. Comum em animais de produção e têm sido associado a casos comunitários em humanos
6	–	Possui apenas estirpes não toxigênicas e linhagem evolutiva altamente diferenciada; Existem considerações de que se este deve representar uma nova espécie

Fonte: Adaptado de Weese, 2020.

Figura 1 – Organização filogenética dos diferentes clados referentes ao MLST de *C. difficile*



Fonte: Adaptado de Collins et al., 2018.

Nas últimas décadas, houve o surgimento do RT027, responsável por causar surtos no Canadá, Estados Unidos da América e Europa. O número de casos causados pelo RT027 na Europa tem diminuído, porém esta estirpe ainda gera grandes preocupações na América do Norte (ABDRABOU et al., 2022; FREEMAN et al., 2020; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016). Apesar do número de casos causados pelo RT027 ter diminuído na Europa, a emergência de ribotipos do clado 5, principalmente o RT078, é preocupante. Além de ser também ser considerado “hipervirulento”, este possui relação com casos comunitários e ICD em animais (DINGLE et al., 2019; GOORHUIS et al., 2008; TRAMUTA et al., 2021).

Em outras regiões do mundo, a distribuição de ribotipos difere da encontrada na América do Norte e Europa. Na Ásia, o principal ribotipo circulante é o RT017, considerado endêmico, porém a circulação dos ribotipos 001, 002, 014 e 018, todos pertencentes ao clado 1, também é de importância. Interessantemente, o RT017 não produz toxina binária, porém está relacionado a menor suscetibilidade a fluorquinolonas e clindamicina (BURKE; LAMONT, 2014; KHUN; RILEY, 2022; LI et al., 2019). A Austrália, por sua vez, registrou surtos atribuídos à emergência do RT244, considerado “hipervirulento” e pertencente ao clado 2, e relacionado a infecções nosocomiais e comunitárias (EYRE et al., 2015; PERUMALSAMY;

LIM; RILEY, 2022).

Apesar dos estudos epidemiológicos em relação a *C. difficile* na África serem limitados principalmente a África do Sul, a ICD possui relevância emergente no continente. Devido ao acometimento da população por comorbidades que podem influenciar a infecção, como tuberculose e imunodeficiência humana, os indivíduos afetados tendem a ser mais jovens do que os principais grupos de risco de outros continentes (>65 anos). Apesar da ribotipagem não ser realizada com frequência, o principal ribotipo encontrado no continente africano até o momento é o 017, porém outros já foram relatados, como os ribotipos 078, 097, 012 e 046 (KULLIN et al., 2022; LEGENZA et al., 2018).

Assim como na África, o Brasil não possui muitos estudos disponíveis em relação a epidemiologia de *C. difficile*. Até o momento, os trabalhos sugerem que a maioria dos ribotipos circulantes pertencem ao clado 1, tendo como principais os ribotipos 014/020 e 106 (BRAGA et al., 2022; DINIZ et al., 2022; SILVA et al., 2015). Apesar da estirpe “hipervirulenta” clássica pertencente ao RT027 ter sido relatada no Brasil apenas uma vez, três novos ribotipos pertencentes ao clado 2, RT883, RT884 e RT885, foram relatados e apresentam características potencialmente “hipervirulentas”, sugerindo uma possível mudança no cenário epidemiológico do país e enfatizando a necessidade de vigilância epidemiológica (DINIZ et al., 2022; PIRES et al., 2018).

2.4. Patogenia

A infecção causada por *C. difficile* se inicia principalmente através da ingestão esporos pela via fecal-oral, liberados originalmente por indivíduos saudáveis ou já infectados. Devido a sua resistência, tais esporos são capazes de resistir ao pH do estômago e chegar até o intestino delgado, onde germinam na presença da maior concentração de ácidos biliares. Devido a disbiose causada pelo uso de antimicrobianos ou formação incompleta da microbiota, as células vegetativas iniciam o processo de colonização do cólon (CZEPIEL et al., 2019; SHEN, 2020).

Após a colonização, as estirpes toxigênicas de *C. difficile* se aderem a porção apical de enterócitos, e iniciam o processo de produção de toxinas A e B. As toxinas trabalham de maneira sinérgica, de forma que a toxina A é endocitada pela porção apical da célula e causa danos ao citoesqueleto, desestruturando as zonas de oclusão e causando enfraquecimento da barreira epitelial. A partir disso, a toxina B liga-se à membrana celular basolateral, e ambas as toxinas atuam estimulando a liberação imunomoduladores responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e inflamação. Por consequência de tais processos, a permeabilidade intestinal é

comprometida, promovendo a liberação de líquidos, maior absorção de toxinas e infiltração de neutrófilos, causando mais dano tecidual e podendo resultar no desenvolvimento de pseudomembranas, placas amarelo-esbranquiçadas dispersas pela mucosa intestinal (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Algumas estirpes são capazes de produzir uma terceira toxina, *C. difficile* transferase (CDT), também conhecida como toxina binária; apesar de sua forma de ação não ser completamente elucidada, estirpes produtoras dessa toxina aparentam induzir uma resposta inflamatória exacerbada e produzir microtubos que facilitam sua adesão à mucosa intestinal (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; SCHWAN et al., 2014).

A apresentação clínica da doença é diversa, de forma que diferentes indivíduos podem apresentar quadros com intensidades variadas; estes incluem pacientes assintomáticos, apresentação de diarreia leve a moderada, ou até colite fulminante. O quadro leve a moderado da doença consiste principalmente em diarreia aquosa, febre baixa, dores abdominais, vômito, fraqueza e falta de apetite. Em casos severos, os sintomas são exponencializados, levando a desidratação intensa, distensão abdominal e hipoalbuminemia. Algumas das complicações de ICD incluem megacólon tóxico, septicemia, íleo paralítico, reação inflamatória sistêmica e morte (MCDONALD et al., 2018). Em animais, a patogênese é similar a de seres humanos, mas a gravidade da doença parece variar bastante a depender da espécie. Em potros, por exemplo, a ICD comumente é aguda e potencialmente fatal. Já em leitões, a doença apresenta alta morbidade porém baixa letalidade, sendo comum ainda animais que apresentam quadros subclínicos (com lesões intestinais mas sem sinais de diarreia) (WEESE, 2020).

2.5. Doença em humanos

A infecção por *C. difficile* é uma doença altamente relevante para os sistemas de saúde, sendo responsável por casos de diarreia e colite pseudomembranosa (LARSON et al., 1978). Em humanos, os fatores mais relacionados ao desenvolvimento da doença incluem o uso de antimicrobianos, hospitalização prévia, imunossupressão e idade. Tais fatores, especialmente a idade, também são determinantes na apresentação clínica da doença, afetando a severidade do quadro do paciente (LEFFLER; LAMONT, 2015; REVOLINSKI; MUNOZ-PRICE, 2019). Apesar da maioria dos casos estarem relacionados ao ambiente hospitalar, o número de casos comunitários de ICD tem aumentado, atingindo pessoas que anteriormente eram consideradas de baixo risco para a doença, como jovens e indivíduos sem histórico de hospitalização (ADAMS; BARONE; NYLUND, 2021; CZEPIEL et al., 2019; SAMMONS; TOLTZIS, 2013).

Estudos indicam que a ocupação profissional também é de importância, uma vez que o contato contínuo pode levar à colonização por *C. difficile* e possivelmente desenvolvimento da doença no futuro (CZEPIEL et al., 2019). Funcionários que trabalham com suinocultura, por exemplo, apresentam maior risco de colonização em comparação com o restante da população, especialmente pelo RT078, reconhecidamente “hipervirulento” e relacionado a casos comunitários mundialmente (GOORHUIS et al., 2008; O’SHAUGHNESSY et al., 2019). Tal fato também reitera a necessidade de mais investigações sobre a transmissibilidade de *C. difficile* entre diferentes espécies (KNETSCH et al., 2014).

2.6. Doença em animais

Apesar de ter fatores de risco similares a doença em humanos, como a utilização de antimicrobianos, a doença possui maior variação ao se tratar da medicina veterinária, especialmente de acordo com a espécie e a formação de microbiota. Dessa forma, a ICD pode se apresentar de diversas maneiras a depender do animal, variando de acordo com a suscetibilidade da respectiva espécie afetada (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Dentre as diversas espécies que podem ser acometidas, destacam-se suínos e equinos. Em suínos, *C. difficile* é um importante causador de diarreia neonatal, podendo gerar significativas perdas econômicas. Nessa espécie, os leitões são extremamente sensíveis a ação das toxinas A/B. Como não possuem uma microbiota capaz de impedir a colonização, a ICD afeta leitões de 1 a 7 dias. Após esse período, a microbiota, ainda imatura e em processo de formação, já é capaz de impedir o desenvolvimento da doença por parte desse patógeno (SONGER; ANDERSON, 2006). Já em equinos, além do quadro clássico de diarreia neonatal, similar aos suínos, os animais podem desenvolver quadros após uso de antimicrobianos (HAIN-SAUNDERS et al., 2022). Apesar de menos frequente, a ICD pode acometer diversos outros vertebrados, como cães, gatos, roedores e diversos animais silvestres tais como elefantes, felídeos e primatas (BOJESSEN; OLSEN; BERTELSEN, 2006; DE CARVALHO et al., 2022; SILVA et al., 2013)

Além de sua importância econômica e clínica, a colonização e infecção por *C. difficile* é de alta relevância para a epidemiologia do patógeno. Alternativamente, diversas espécies podem ser colonizadas e não apresentar a doença, mas contribuir para sua disseminação (FINSTERWALDER et al., 2022; RODRÍGUEZ-PALLARES et al., 2022; TSAI et al., 2021). Nesse contexto, diversas espécies, em adição aos animais domésticos, já foram relatadas como potenciais reservatórios ou disseminadores, como pombos, répteis, roedores sinantrópicos, quatis e outros (DE OLIVEIRA et al., 2018; KRIJGER et al., 2019; RAMOS et al., 2019;

SANTANA et al., 2022; SILVA et al., 2014).

2.7. Diagnóstico

Devido a disseminação de esporos contaminantes de *C. difficile* no ambiente, o diagnóstico precoce é essencial. Este permite não só tomar as medidas de isolamento necessárias, como também o direcionamento correto do tratamento (DINLEYICI; VANDENPLAS, 2019). Em seres humanos o diagnóstico de *C. difficile* consiste principalmente na identificação do agente etiológico e/ou suas toxinas, porém outros exames complementares como histopatologia e colonoscopia podem ser utilizados como ferramentas úteis. Os testes devem ser realizados em pacientes hospitalizados que tiveram no mínimo três episódios de evacuação sem fezes formadas num período de 24 horas, ou em pacientes com diarreia após uso de antimicrobianos, porém sem histórico de hospitalização, e sem resposta ao tratamento convencional ou com resultado negativo de pesquisa de enteropatógenos comuns (BAGDASARIAN; RAO; MALANI, 2015; GUERY; GALPERINE; BARBUT, 2019)

Os testes disponíveis para diagnóstico de ICD são: testes rápidos (imunocromatografia lateral) para detecção da glutamato desidrogenase (*glutamate dehydrogenase* – GDH) e/ou toxinas A/B, a cultura toxigênica, teste de amplificação de ácido nucleico (*nucleic acid amplification tests* – NAAT) e ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) para detecção das toxinas A e B. Estes possuem diferentes sensibilidades e especificidades, muitas vezes utilizados de forma complementares uns aos outros. Os testes que se baseiam na detecção do GDH, enzima liberada em grande quantidade por *C. difficile*, destacam-se pela alta sensibilidade (próxima a 100%), sendo utilizado principalmente como método de triagem. Os testes de detecção de GDH, porém, são incapazes de diferenciar entre estirpes toxigênicas e não toxigênicas. Já a cultura toxigênica (isolamento seguido da detecção dos genes codificadores das toxinas A e B) permite a diferenciação entre estirpes toxigênicas e NT, além de permitir a obtenção do isolado para futuros testes de suscetibilidade ou avaliações epidemiológicas. Por outro lado, requer equipamentos específicos, já que o cultivo deve ser em anaerobiose, e demanda no mínimo cinco dias para o resultado. Os testes moleculares (NAATs) também são capazes de diferenciar a presença de estirpe toxigênica ou NT nas fezes, porém é um teste oneroso e pouco específico, resultando em taxas altas de positividade mesmo em indivíduos não colonizados; por fim, os testes de ELISA para a detecção das toxinas A e B apresentam baixa sensibilidade e alta especificidade, levando a um grande número de falso-negativos se aplicados de forma isolada

(CROBACH et al., 2016; GATEAU et al., 2018; GUERY; GALPERINE; BARBUT, 2019).

Em suma, devido a limitação dos testes disponíveis, o diagnóstico de ICD é desafiador. A inexistência de um teste simultaneamente de alta sensibilidade e especificidade, de baixo custo e com tempo de resposta rápido faz com que sejam necessárias pelo menos duas etapas, escolhidas de forma algorítmica para otimizar o diagnóstico (CROBACH et al., 2016). Em países emergentes, o diagnóstico é particularmente desafiador: uma vez que são onerosos, a economia do país exponencializa a dificuldade de acesso amplo aos testes necessários (CANÇADO et al., 2021).

Devido à falta de testes especialmente produzidos para animais, as ferramentas para diagnóstico de *C. difficile* são as mesmas utilizadas para humanos. Os índices de sensibilidade e especificidade dos testes disponíveis também variam entre as diferentes espécies e a manifestação clínica da doença. Em suínos, por exemplo, os testes de alta sensibilidade e especificidade intermediária são favorecidos, uma vez que são realizados, em sua maioria, em rebanhos e buscam triar a presença do patógeno. Neste cenário, a utilização do GDH como teste de triagem se mostra eficiente, sendo associado a cultura toxigênica para determinação da presença de genes produtores de toxina. Já em equinos, testes de detecção das toxinas nas fezes possuem bons resultados, de forma que a utilização de ELISAs se mostra eficiente. Além disso, as toxinas permanecem estáveis nas fezes quando mantidas a 4°C, reiterando a confiabilidade do teste. Reitera-se a importância da possível associação de diferentes testes e métodos, como a histopatologia, para conclusão do diagnóstico (CARVALHO et al., 2022; RAMOS et al., 2020).

2.8. Tratamento

O protocolo de tratamento de *C. difficile* em humanos é baseado principalmente na utilização de três antimicrobianos: metronidazol, para casos moderados, e vancomicina ou fidaxomicina, para casos graves ou após recorrência. Apesar disso, a utilização de metronidazol como antimicrobiano de primeira escolha para casos moderados tem caído em desuso, uma vez que as taxas de sucesso do tratamento têm diminuído devido a emergência de estirpes resistentes (KELLY et al., 2021; MOURA et al., 2013; SURAWICZ et al., 2013). Deve-se enfatizar que a fidaxomicina e vancomicina apresentam menores riscos a microbiota e maior sucesso em casos de recorrência (AL MOMANI et al., 2018). Além dos antimicrobianos já citados, recomenda-se a utilização de rifampicina ou tigeciclina como tratamentos alternativos para casos específicos (GAREY et al., 2008; KECHAGIAS et al., 2020). Em animais, o tratamento limita-

se especialmente ao metronidazol e a terapia de suporte, uma vez que a utilização de vancomicina e fidaxomicina não é recomendada na medicina veterinária, limitando também as opções em casos recorrentes de ICD (DINIZ et al., 2021a; KEESEN et al., 2011).

Além da utilização de antimicrobianos, uma forma alternativa de tratamento para casos de ICD, especialmente recorrentes, é o transplante de microbiota fecal (TMF). Este tem como o principal objetivo a reconstituição da microbiota, utilizando fezes que passaram por uma diversidade de testes microbiológicos, de um doador saudável que deve atender vários requisitos (KHORUTS; STALEY; SADOWSKY, 2021). Apesar de ser uma técnica recente e sem esclarecimento dos efeitos a longo prazo, esta se mostra uma ferramenta promissora no tratamento de ICD, tanto para humanos quanto animais (DINIZ et al., 2021a; KHORUTS; STALEY; SADOWSKY, 2021; NARULA et al., 2017). O primeiro centro de TMF foi estabelecido recentemente no Brasil, sendo situado especificamente em Belo Horizonte, Minas Gerais (CLAUDIAC, 2022; TERRA et al., 2020).

2.9. Resistência antimicrobiana

2.9.1. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Atualmente, existem diferentes formas de monitoramento da suscetibilidade de microorganismos. Para *C. difficile*, os métodos atuais reconhecidos são os de caráter quantitativo, sendo eles diluição em ágar, microdiluição em caldo e Etest; entre eles, o recomendado pelo CLSI e EUCAST é a diluição em ágar, também sendo a referência comparativa de outros testes (BROOK; WEXLER; GOLDSTEIN, 2013; CLSI, 2021, EUCAST, 2022).

A técnica de diluição em ágar é utilizada em estudos que avaliam a suscetibilidade de *C. difficile* devido a sua precisão e flexibilidade de escolha de antimicrobianos a serem testados (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). Apesar disso, a técnica possui desvantagens em determinados contextos. Além de uma execução que exige profissionais altamente qualificados, o teste normalmente é realizado em vários isolados simultaneamente, demanda tempo e não apresenta otimização para rotina de laboratórios clínicos (REIGADAS et al., 2017; WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

Apesar de não ser considerado padrão-ouro, a microdiluição em caldo já foi utilizada em diversos estudos (IGAWA et al., 2016; PENG et al., 2017a; PIRŠ et al., 2013; WOLFE et al., 2018). Esta técnica, porém, não é recomendada para utilização em *C. difficile* devido a

relatos de percentual de isolados falsamente susceptíveis e falsamente resistentes mais alto do que o recomendado pelo CLSI (CLSI, 2021; HASTEY et al., 2017).

Diante este cenário, a utilização do Etest na rotina laboratorial para testes de suscetibilidade de *C. difficile* se tornou atrativa, uma vez que apresenta boa concordância com o padrão-ouro e é de fácil execução. Esta técnica consiste na utilização de uma fita graduada com concentrações do antimicrobiano de crescimento exponencial. Apesar de sua facilidade de execução quando comparada aos métodos citados anteriormente, é uma técnica onerosa e com limitação quanto ao número de antimicrobianos disponíveis, dificultando sua utilização na rotina laboratorial (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

Apesar de não ser uma técnica recomendada pelo CLSI para *C. difficile*, estudos sugerem que o teste de disco difusão pode ser uma importante ferramenta na triagem da suscetibilidade antimicrobiana deste patógeno (CLSI, 2021; ERIKSTRUP et al., 2012; HOLT; DANIELSEN; JUSTESEN, 2015). Este teste promove a formação de um halo de inibição ao redor do disco posicionado na placa inoculada com o micro-organismo, de forma em que este diâmetro é utilizado na classificação do isolado entre resistente, intermediário ou sensível, caso exista já um padrão determinado, ou em *wild type* (WT; sem mecanismo de resistência fenotípico detectável) e *non wild type* (NWT; com mecanismos presumidos ou conhecidos de resistência adquirida) (MOURA et al., 2013; POILANE et al., 2007). (VALSESIA et al., 2015). Ressalta-se que o disco contém uma concentração única do antimicrobiano e não permite a determinação de CIM, sendo considerado um teste apenas qualitativo (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Apesar de estudos sugerirem que a técnica de disco difusão pode ser utilizada para triagem de resistência à vancomicina, metronidazol e moxifloxacina para *C. difficile*, o cenário para outros antimicrobianos ainda não foi tão explorado (ERIKSTRUP et al., 2012; HOLT; DANIELSEN; JUSTESEN, 2015).

2.9.2. Mecanismos de resistência de *C. difficile*

Devido à grande importância da pressão seletiva realizada em *C. difficile*, os mecanismos de resistência deste micro-organismo têm sido cada vez mais estudados (SPIGAGLIA; MASTRANTONIO; BARBANTI, 2018). Por possuir um genoma com alta capacidade de adaptação, este patógeno foi reconhecido como uma das principais ameaças no contexto de resistência antimicrobiana (CDC, 2022; SEBAIHIA et al., 2006). Os mecanismos de resistência de *C. difficile* e suas formas de aquisição são variados, incluindo a mutações resultantes de pressão seletiva *in vivo*, aquisição de genes de resistência através de transferência

de elementos genéticos móveis e alterações em vias metabólicas (SPIGAGLIA; MASTRANTONIO; BARBANTI, 2018).

Nesse contexto, estudos nas últimas décadas voltaram seu foco para resistência ao metronidazol e vancomicina, fármacos comumente utilizados no tratamento da doença. A resistência a metronidazol é de caráter multifatorial, envolvendo fatores metabólicos como a formação de biofilme, reparação de DNA associada à proteína RecA, atividade de nitrorredutases e captação de ferro. Além dos mecanismos citados acima, a resistência a metronidazol também pode ser conferida através de um plasmídeo, pCD-METRO, porém o mecanismo de ação deste ainda não foi completamente elucidado (O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021a; SMITS et al., 2022). A resistência à vancomicina é pouco compreendida. Apesar de um estudo recente associar mutações no sensor *VanS/R*-quinase, responsáveis por desencadear a expressão do gene *VanG*, em isolados pertencentes ao RT027, ainda não se sabe ao certo quais outros possíveis gatilhos para sua expressão em *C. difficile* (O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021a; SHEN et al., 2020).

Por fim, há um mecanismo regulado pelo *operon hemesensing membrane protein system* (HsmRA), que é capaz de reduzir a suscetibilidade de *C. difficile* à vancomicina e metronidazol através da utilização do grupo heme como proteção ao estresse oxidativo, que acontece durante a resposta inflamatória do organismo contra ICD, servindo como proteção aos antimicrobianos citados (KNIPPEL et al., 2020).

Os estudos dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas também ganharam destaque na última década devido a marcante presença desses em estirpes “hipervirulentas” (VALIENTE; CAIRNS; WREN, 2014). A resistência a essa classe acontece principalmente pela pressão seletiva *in vivo*, de forma que concentrações incapazes de eliminar o agente podem induzir mutações nos genes *gyrA* *gyrB*, responsáveis pela codificação da enzima DNA-girase, e assim conferir resistência a classe em questão (O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021a; SPIGAGLIA; MASTRANTONIO; BARBANTI, 2018).

A resistência a rifampicina consiste principalmente nas mutações no gene *rpoB*, modificando sua conformação e consequentemente impedindo a ligação do antimicrobiano em questão em seu sítio de ação, sendo este o RpoB, subunidade β da RNA-polimerase (HARTMANN et al., 1967; O'CONNOR et al., 2008; WICKRAMAGE; SPIGAGLIA; SUN, 2021). Suspeita-se que tais alterações no gene *rpoB* também são responsáveis, em alguns isolados, pela redução de suscetibilidade a fidaxomicina (LEEDS et al., 2014).

O principal mecanismo de resistência à família de antimicrobianos macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLS_B) se dá pela presença do gene das metilases ribossômicas

da eritromicina de classe B (*ermB*), responsável pela metilação de parte do rRNA 23S. Este gene também possui grande relevância devido a sua transmissibilidade horizontal, uma vez que pode ser transmitido via conjugação (SPIGAGLIA; BARBANTI; MASTRANTONIO, 2008; WICKRAMAGE; SPIGAGLIA; SUN, 2021). Além da presença do gene *ermB*, outros dois genes foram identificados, sendo eles *cfrB* e *cfrC*. Estes são responsáveis pela codificação de uma metiltransferase que garante resistência aos antimicrobianos PhLOPS_A (fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e estreptogramina A) (CANDELA et al., 2017).

A resistência a tetraciclina difere dos outros, uma vez que é mediada por uma grande variedade de genes, destacando-se quatro frequentemente relatados em isolados de *C. difficile*: *tetM*, *tetW*, *tet40* e *tet44*. Cada gene *tet* possui um mecanismo de ação específico, variando entre bombas de efluxo, atuações enzimáticas e mudanças na conformação do sítio de ação da subunidade ribossomal 30S (CHOPRA; ROBERTS, 2001; IMWATTANA et al., 2021; SPIGAGLIA; BARBANTI; MASTRANTONIO, 2008). Além de um maior número de genes capazes de conferir resistência, estes são reconhecidamente capazes de serem transmitidos por conjugação, aumentando sua distribuição entre microorganismos (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

2.10. Controle e prevenção

Devido a habilidade de esporulação de *C. difficile*, o controle da disseminação é focado na eliminação dos esporos no ambiente, especialmente em áreas com indivíduos susceptíveis, como ambientes hospitalares, haras, galpões de criação de suínos e clínicas veterinárias. A utilização de esporocidas, como hipoclorito, é essencial, diminuindo as chances de infecção destes indivíduos (MARKS et al., 2011; SONGER; ANDERSON, 2006; SRINIVASA et al., 2019). Caso houverem casos confirmados, as medidas deverão ser mais rigorosas a fim de evitar novas contaminações, de forma que os indivíduos positivos sejam isolados e o contato de externos com estes deve ser minimizado (BARBUT, 2015; MARKS et al., 2011; SRINIVASA et al., 2019). Ressalta-se também as medidas de higienização pessoal ao manipular animais domésticos, especialmente suas fezes, e no preparo de alimentos, devido a transmissão de esporos via fecal-oral que podem ser encontrados em diversos tipos de alimentos a depender de sua origem (RODRIGUEZ DIAZ; SEYBOLDT; RUPNIK, 2018).

Pelo perfil de colonização de *C. difficile*, que ocorre quase exclusivamente em indivíduos em disbiose ou sem a microbiota completamente formada, métodos que envolvem o impedimento da proliferação do patógeno tem sido uma área explorada. A utilização de certas

estirpes não toxigênicas (NT) de *C. difficile* tem se mostrado promissora no impedimento da colonização por estirpes toxigênicas (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019; VILLANO et al., 2012). Nesse contexto, destaca-se a Z31, que foi capaz de reduzir a ocorrência de ICD em suínos neonatos (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019).

Outra forma de controle de ICD é através da racionalização de uso de antimicrobianos, de forma que o tempo de tratamento deve ser minimizado, bem como a frequência de utilização destes quando possível, uma vez que este é um dos principais fatores de risco para ICD (DINLEYICI; VANDENPLAS, 2019; VONBERG et al., 2008). Por fim, a vacinação também é uma forma em potencial do controle de ICD. No momento, existem várias em desenvolvimento, também em diferentes estágios, porém ainda sem a aprovação de órgãos regulamentadores para utilização em larga escala (RILEY; LYRAS; DOUCE, 2019).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Determinar a eficiência do teste de disco difusão e sugerir pontos de corte epidemiológicos para avaliar a suscetibilidade de estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos e animais frente a eritromicina, tetraciclina e rifampicina.

3.1. Objetivos específicos

Comparar a confiabilidade da técnica de disco difusão com os resultados obtidos no Etest.

Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *C. difficile* frente a rifampicina, eritromicina e tetraciclina.

Analisar a possível relação de clados, hospedeiro e toxigenicidade com suscetibilidade antimicrobiana.

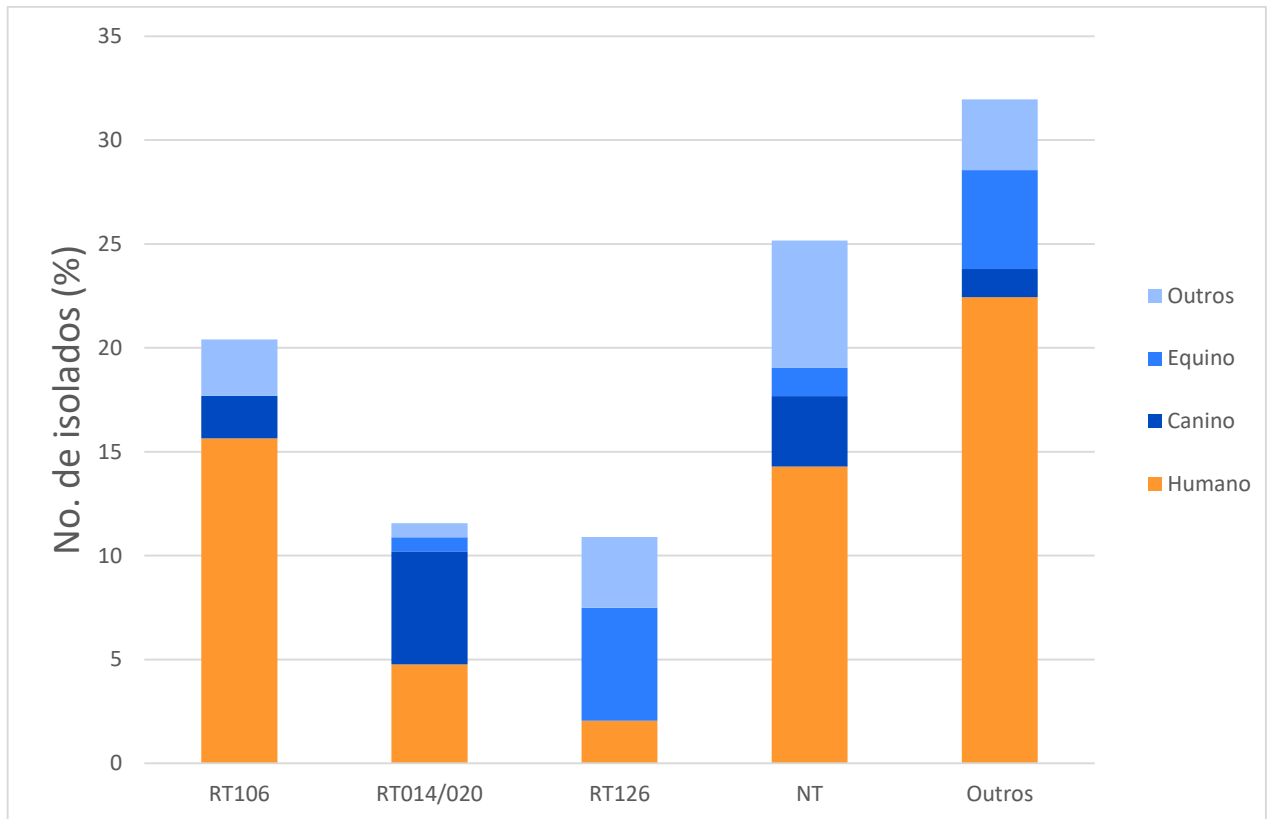
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização de isolados

Foram utilizadas 155 estirpes de *C. difficile* no total, sendo 115 isoladas no Brasil entre 2008 e 2020, pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Cadastro SISGEN: AEC0B9A) (ANEXO A), obtidos em estudos realizados anteriormente (DINIZ et al., 2018, 2021b, 2022; LOPES CANÇADO et al., 2018; RAMOS et al., 2019; SILVA et al., 2015, 2020). Em adição, outros 40 novos isolados identificados entre março de 2021 e junho de 2022 foram incluídos. Tais isolados foram obtidos a partir de amostras submetidas ao diagnóstico diferencial de diarreia no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG (Projeto SIEX 303237). A metodologia de isolamento e caracterização desses isolados é descrita em detalhe a seguir.

Dentre as espécies hospedeiras, inclui-se: humanos (n = 93), cães (n = 18), equinos (n = 18), suínos (n = 10), felinos (n = 8), roedores (n = 2) e outros animais (n = 6). No total, 116 (74,8%) estirpes eram toxigênicas e 39 (25,2%) eram não-toxigênicas; entre as toxigênicas, destacam-se o RT106, RT014/020 e RT126 (Figura 1).

Figura 2 – Distribuição da frequência de diferentes espécies de hospedeiros segundo os ribotipos mais comuns encontrados.



4.1.1. Isolados oriundos da bacterioteca

Isolados de *C. difficile* oriundos da bacterioteca (n=115) foram plaqueados em meio seletivo, composto por ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid) suplementado com 5% de sangue equino e 1% de Ácido Taurocólico de Sódio Hidratado (Sigma-Aldrich) (Ágar Sangue Taurocolate – AST) e incubadas na câmara de anaerobiose (Thermo Fisher Scientific), com atmosfera composta por 10% H₂, 10% CO₂, e 80% N₂, a 37°C, durante 24 a 36 horas para verificação visual da pureza dos isolados. Após a verificação, os isolados foram submetidos aos testes de suscetibilidade antimicrobiana descritos a seguir.

4.1.2. Isolamento e identificação de novas estirpes

Amostras de fezes submetidas entre 2021 e 2022 foram testadas para a presença de *C. difficile*. Para tal, realizou-se o choque com álcool do material fecal (diluição em etanol absoluto na proporção 1:1 por 30 minutos), seguido de plaqueamento em AST e incubação na câmara de anaerobiose a 37° C por 120 horas. As colônias suspeitas foram repicadas novamente em AST (plaqueamento placa a placa) e incubadas na câmara de anaerobiose por 72 horas. Para

identificação, colônias suspeitas foram diluídas em um microtubo contendo 500 µl de água ultra-pura, e subsequentemente submetidas ao método de extração térmica do DNA. Para tal, os microtubos foram aquecidos a 98°C por 20 minutos. Em sequência, foi realizada a centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi pipetado em outro microtubo e armazenado a 4°C. Posteriormente, o material extraído foi submetido a PCR *multiplex* para os genes codificadores das toxinas A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) e do gene constitutivo *tpi* (Tabela 2), visando a diferenciação de *C. difficile* toxigênico e não toxigênico (NT) (LEMEE et al., 2004; SILVA et al., 2011; TIAN et al., 2016). Aquelas identificadas como toxigênicas foram ainda submetidas a uma reação de PCR *monoplex*, sendo esta para o gene codificador da toxina binária (*cdtB*) (TERHES et al., 2004) (Tabela 2). Amostras toxigênicas também foram, em sua maioria, submetidas a ribotipagem (JANEZIC; RUPNIK, 2010).

Tabela 2 – Descrição dos primers utilizados para identificação de *C. difficile*.

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	[]	Banda	Referência
<i>tcdA</i>	tcdA-F	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	0,6µM	629pb	Tian et al., 2016
	tcdA-R	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG			
<i>tcdB</i>	tcdB-F	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA	0,4µM	160pb	Lemee et al., 2004
	tcdB-R	ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT			
<i>tpi</i>	tpi-F	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	0,2µM	210pb	Lemee et al., 2004
	tpi-R	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC			
<i>cdtB</i>	cdtB-F	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	0,2µM	510pb	Terhes et al., 2004
	cdtB-R	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC			

Legenda: F: *forward*; R: *reverse*; []: concentração; pb: pares de bases

4.2. Testes de suscetibilidade

4.2.1. Teste de disco difusão

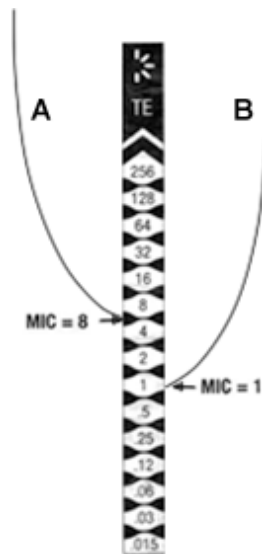
Foi realizada a técnica de disco difusão para avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *C. difficile* frente a rifampicina, eritromicina e tetraciclina. O procedimento baseia-se nas recomendações do CLSI para determinação da sensibilidade antimicrobiana de microorganismos anaeróbios (CLSI, 2018). As colônias dos isolados foram diluídas em salina tamponada até escala McFarland 1,0 e, com um suabe estéril, cada solução foi estriada em uma placa previamente pré-reduzida de ágar Brucella (Difco Laboratories) suplementado com

sangue ovino (5% v/v), hemina (5 µg/mL) e vitamina K (1 µg/mL) (*Brucella Blood Agar* – BBA). O estriamento foi realizado em toda a placa em quatro sentidos sobrepostos com ângulo de 90°. Em seguida, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de rifampicina (5 µg), de eritromicina (15 µg) e de tetraciclina (30 µg) foram adicionados na placa em posições equidistantes. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas em câmara de anaerobiose. Após o período de incubação, as placas que apresentaram zona de inibição do crescimento bacteriano tiveram o halo medido através de um paquímetro. Durante todos os processamentos foram utilizadas duas estirpes controles: *B. fragilis* ATCC® 25285™, incubado em anaerobiose, e *S. aureus* ATCC® 29213™ incubado em aerobiose (CLSI, 2021).

4.2.2. Etest

Simultaneamente ao disco de difusão, os isolados foram submetidos ao Etest a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para os seguintes antimicrobianos: eritromicina, rifampicina e tetraciclina. O Etest foi realizado de acordo como o recomendado pelo fabricante (BioMérieux, Bélgica). As colônias foram diluídas em salina tamponada até escala 1,0 do padrão McFarland, estriadas toda a placa em quatro sentidos sobrepostos com ângulo de 90°, e as fitas foram colocadas com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas em câmara de anaerobiose e lidos de acordo com a recomendação do fabricante (Figura 2). Para cada antimicrobiano, as fitas apresentam graduação crescente variando de 0,002 µg/mL a 32 µg/mL para rifampicina, 0,016 µg/mL a 256 µg/mL de eritromicina e 0,016 µg/mL a 256 µg/mL de tetraciclina. As estirpes foram classificadas como WT se obtivessem $CIM \leq 4$ para eritromicina, $CIM \leq 0.004$ para rifampicina, e $CIM \leq 0.25$ mg/L para tetraciclina (EUCAST, 2022).

Figura 3 – Padrão de leitura do Etest.



Legenda: A. Quando o halo de inibição está no intervalo entre dois números da fita de Etest, a CIM considerada deverá ser a do valor acima; B. Quando o halo de inibição está na mesma altura que o valor da fita de Etest, a CIM é igual ao valor de sua posição.

Fonte: Adaptado de BioMérieux.

4.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando STATA/IC 14.0 (Statacorp, Texas, EUA); Erros de grande importância (“*very major error*”, VME) foram registrados quando os isolados eram “*non wild type*” (NWT) de acordo com o Etest mas “*wild type*” (WT) de acordo com o método de disco difusão (“falso susceptível”), e erros de importância (“*major error*”, ME) foram registrados quando os isolados eram WT de acordo com o Etest mas NWT de acordo com o método de disco difusão (“falso resistente”). Os valores de CIM50 e CIM90 foram definidos como as concentrações antimicrobianas mais baixas que inibiram 50 e 90% dos isolados, respectivamente. Para determinação do *breakpoint* do método de disco difusão, o método de “*Normalized Resistance Interpretation*” (NRI) foi utilizado com permissão do titular da patente, Bioscand AB, TÄBY, Suécia (patente europeia No. 1383913, patente americana No. 7,465,559). A análise de regressão bivariada foi aplicada para comparar os resultados de Etest e disco difusão, e avaliar a previsibilidade entre os diâmetros e CIMs obtidas. Associações entre a susceptibilidade para cada antimicrobiano, ribotipos, hospedeiros, e isolados toxigênicos/não-toxigênicos foram investigados utilizando o teste Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fischer.

5. RESULTADOS

Para eritromicina, 65 (41.9%) isolados foram identificados como *non-wild type* (NWT) com a variação de CIM sendo de 4 a ≥ 256 mg/L, e 96.9% com zonas de inibição de 6 mm utilizando o método de disco difusão (Figura 3). Um total de 89 (57.4%) isolados foram classificados como WT (CIM ≤ 4 mg/L), com zona de inibição >27 mm (77.5% dos isolados). Assim, o ponto de corte de WT ≥ 20 mm foi calculado, levando a 0% ME e VME (Figura 4, Figura 5, Tabela 3). Durante os testes, o controle utilizado *B. fragilis* ATCC® 25285™ apresentou intervalos de 0,5 a 2 mg/L; já o controle *S. aureus* ATCC® 29213™ apresentou intervalos de 0,12 a 0,5 mg/L. Ambos se encontram dentro das recomendações do CLSI (CLSI, 2021) para a técnica.

Figura 4 – Testes de suscetibilidade antimicrobiana para eritromicina.

Legenda: A. Teste de disco difusão com isolado resistente a eritromicina (seta) em BBA; B. Etest com isolado apresentando CIM ≥ 256 μ g/mL.

Fonte: Arquivo pessoal.

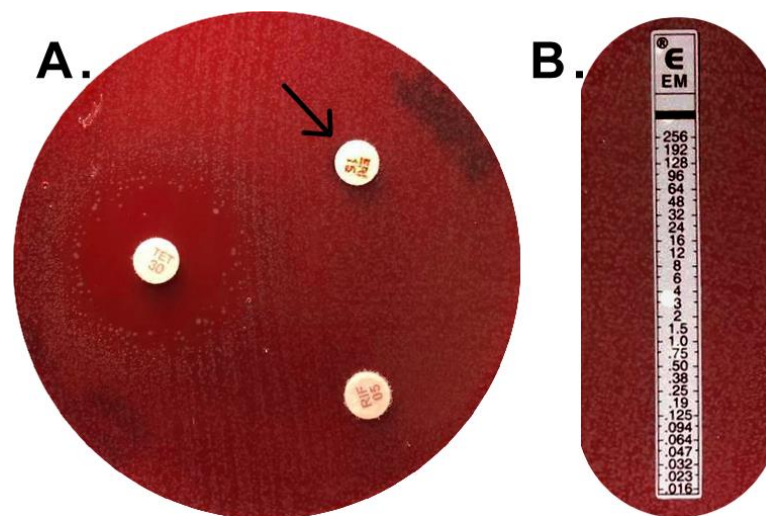


Figura 5 – Scattergram obtido a partir dos resultados para eritromicina.

Legenda: Scattergram comparando as zonas de inibição obtidas pelo antibiograma de eritromicina (disco de 15 µg) e as CIMs obtidas através do Etest. A linha vertical representa o ponto de corte referente ao método de disco difusão, obtido por NRI; a linha horizontal representa o ECOFF segundo o EUCAST. Todos os isolados classificados como NWT foram identificados com a cor vermelha.

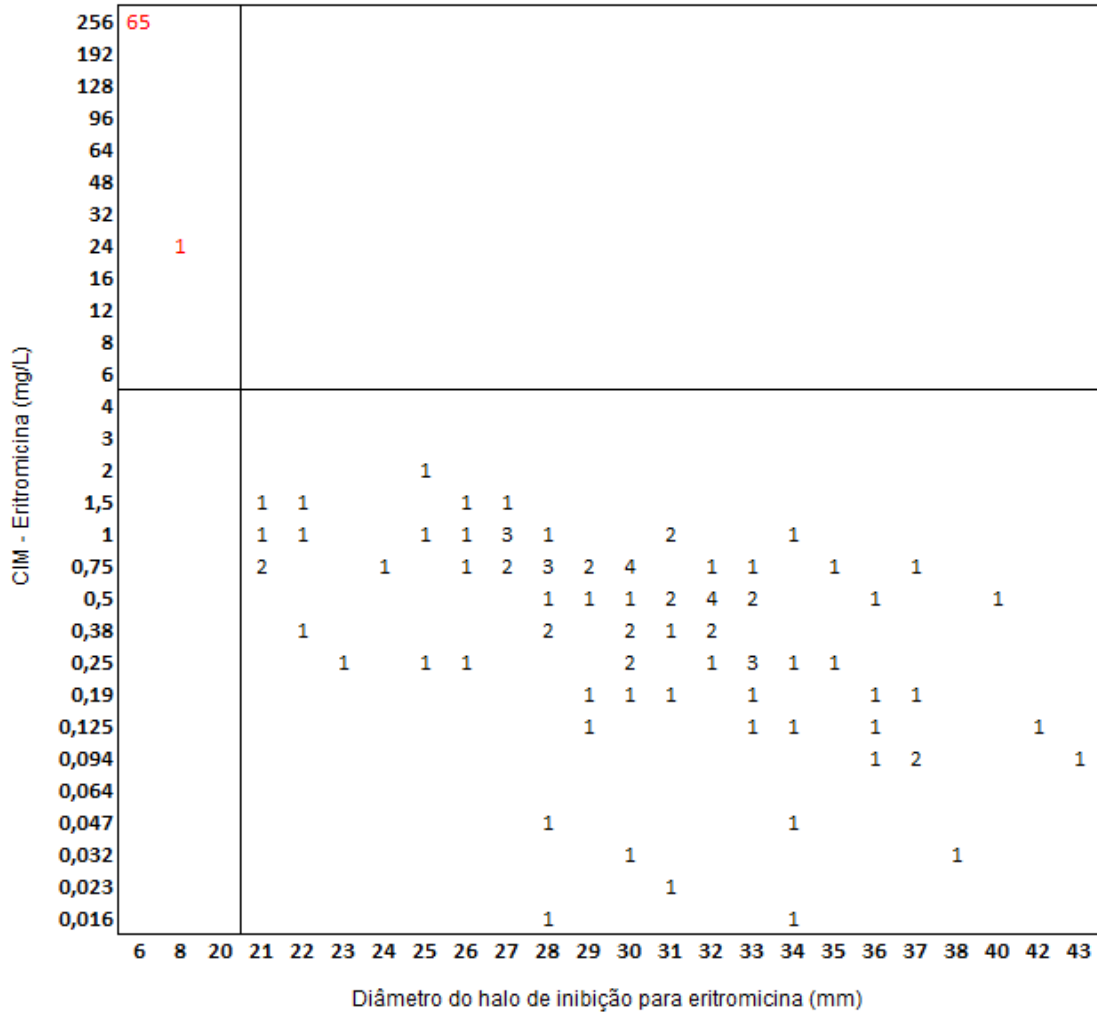
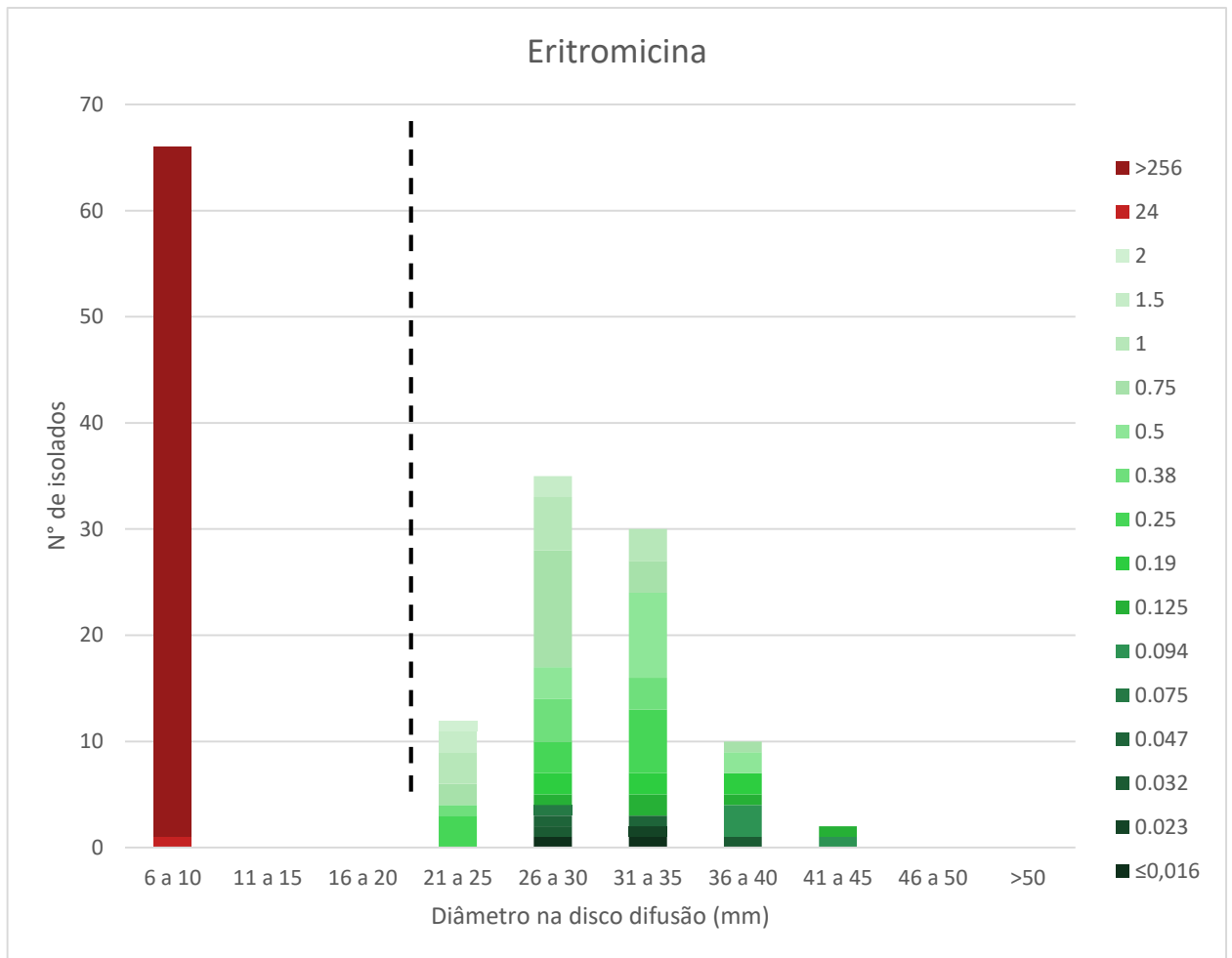


Figura 6 – Distribuição das zonas de inibição e suas respectivas MICs referente a eritromicina.

Legenda: Distribuição dos diâmetros obtidos por disco difusão e CIMs obtidas pelo Etest referentes a eritromicina. Cada cor representa uma CIM obtida (coluna a direita; verde: WT, vermelho: NWT) relacionada com sua respectiva zona de inibição, de acordo com o número de isolados. A linha vertical pontilhada representa o ponto de corte obtido através do NRI para eritromicina ($WT \geq 20$ mm).



Para rifampicina, 28 (18.1%) isolados foram classificados como NWT, 75% dos quais apresentaram $CIM \geq 32$ mg/L e zonas de inibição de 6 mm utilizando disco difusão (Figura 6). Os 127 isolados remanescentes (81.9%) foram classificados como WT, com $CIM \leq 0.002$ mg/L, e 78% possuíam zonas de inibição entre 40 mm e 50 mm em disco difusão. O ponto de corte calculado foi $WT \geq 28$ mm, com taxa de 0% ME e VME (Figura 7, Figura 8, Tabela 3).

Figura 7 – Testes de suscetibilidade antimicrobiana para rifampicina.

Legenda: A. Teste de disco difusão com isolado resistente a rifampicina (seta) em BBA; B. Etest com isolado apresentando CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Arquivo pessoal.

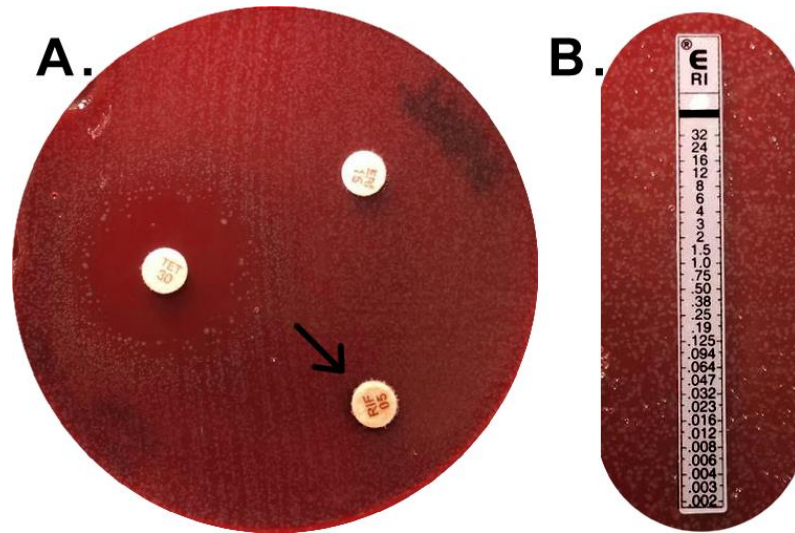


Figura 8 – Scattergram obtido a partir dos resultados para rifampicina.

Legenda: Scattergram comparando as zonas de inibição obtidas pelo antibiograma de rifampicina (disco de 5 µg) e as CIMs obtidas através do Etest. A linha vertical representa o ponto de corte referente ao método de disco difusão, obtido por NRI; a linha horizontal representa o ECOFF segundo o EUCAST. Todos os isolados classificados como NWT foram identificados com a cor vermelha.

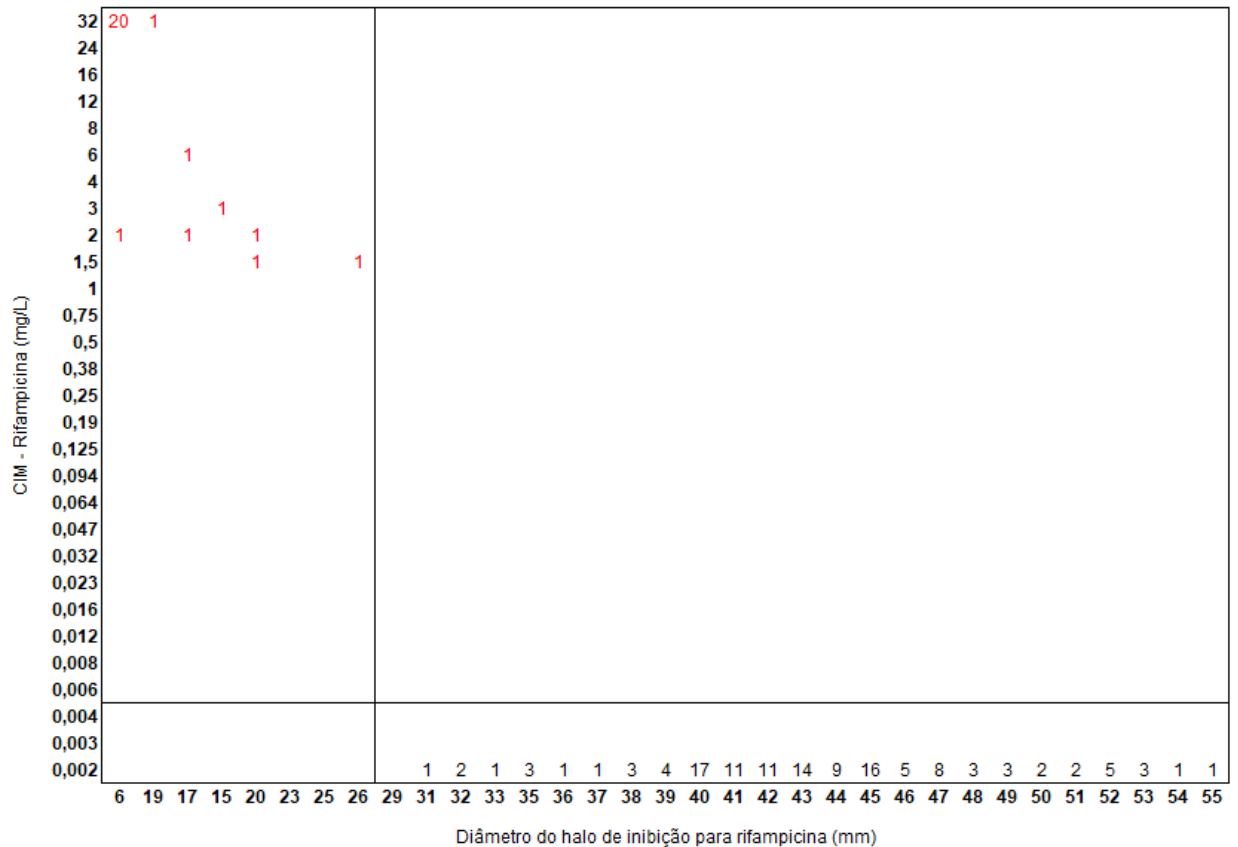
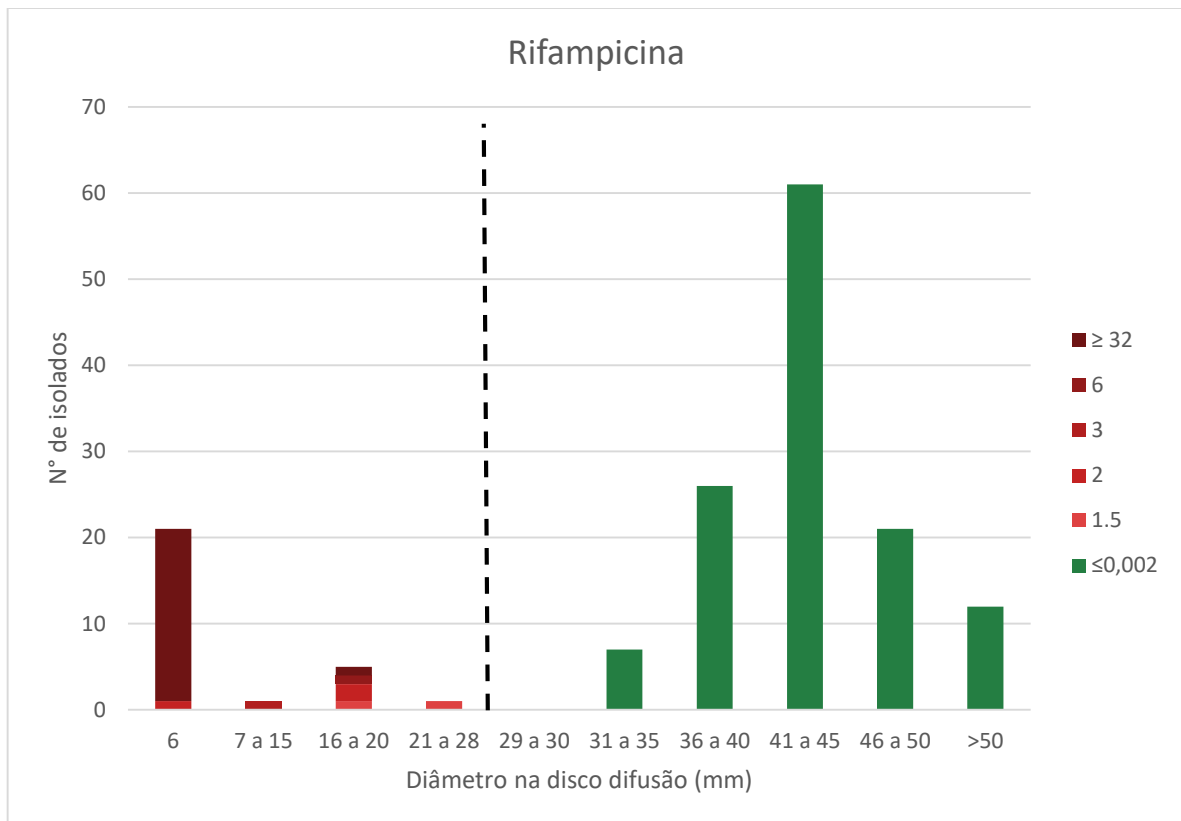


Figura 9 – Distribuição das zonas de inibição e suas respectivas MICs referentes a rifampicina.

Legenda: Distribuição dos diâmetros obtidos por disco difusão e CIMs obtidas pelo Etest referentes a rifampicina. Cada cor representa uma CIM obtida (coluna a direita; verde: WT, vermelho: NWT) relacionada com sua respectiva zona de inibição, de acordo com o número de isolados. A linha vertical pontilhada representa o ponto de corte obtido através do NRI para rifampicina ($WT \geq 28$ mm).



Para tetraciclina, 44 (28.4%) isolados foram classificados como NWT com valores de CIM entre 0.38 mg/L e 96 mg/L. As zonas de inibição para a maioria dos isolados NWT (56.8%) variam entre 13 a 23 mm (Figura 9). Os 111 isolados remanescentes (71.6%) foram classificados como WT e possuíam CIMs variando entre ≤ 0.016 e 0.25 mg/L. A maioria dos isolados (75.7%) possuía zonas de inibição entre 36 mm e 46 mm no método de disco difusão. O ponto de corte calculado foi $WT \geq 25$ mm, levando a 5.2% e 0.6% de taxa de VME e ME, respectivamente (Figura 10, Figura 11, Tabela 3).

Figura 10 – Testes de suscetibilidade antimicrobiana para tetraciclina.

Legenda: A. Teste de disco difusão com isolado resistente a tetraciclina (seta) em BBA; B. Etest com isolado apresentando CIM = 4 µg/mL.

Fonte: Arquivo pessoal.

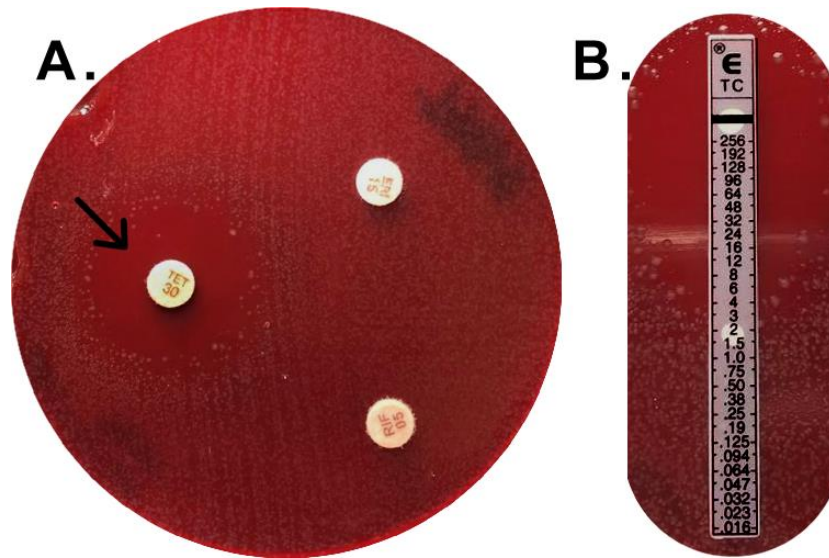


Figura 11 – Scattergram obtido a partir dos resultados para tetraciclina.

Legenda: Scattergram comparando as zonas de inibição obtidas pelo antibiograma de tetraciclina (disco de 30 µg) e as CIMs obtidas através do Etest. A linha vertical representa o ponto de corte referente ao método disco difusão, obtido por NRI; a linha horizontal representa o ECOFF segundo o EUCAST. Todos os isolados classificados como NWT foram identificados com a cor vermelha.

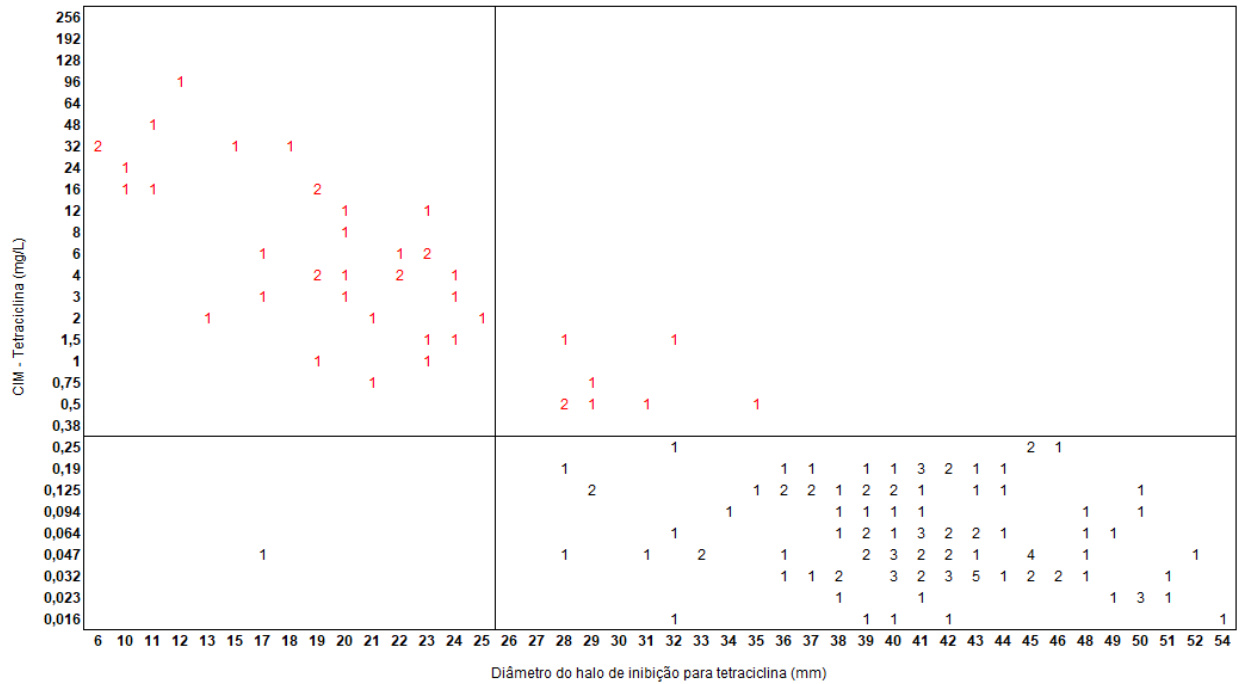


Figura 12 – Distribuição das zonas de inibição e suas respectivas MICs referentes a tetraciclina.

Legenda: Distribuição dos diâmetros obtidos por disco difusão e CIMs obtidas pelo Etest referentes a tetraciclina. Cada cor representa uma CIM obtida (linha inferior; verde: WT, vermelho: NWT) relacionada com sua respectiva zona de inibição, de acordo com o número de isolados. A linha vertical pontilhada representa o ponto de corte obtido através do NRI para rifampicina (WT ≥ 25 mm).

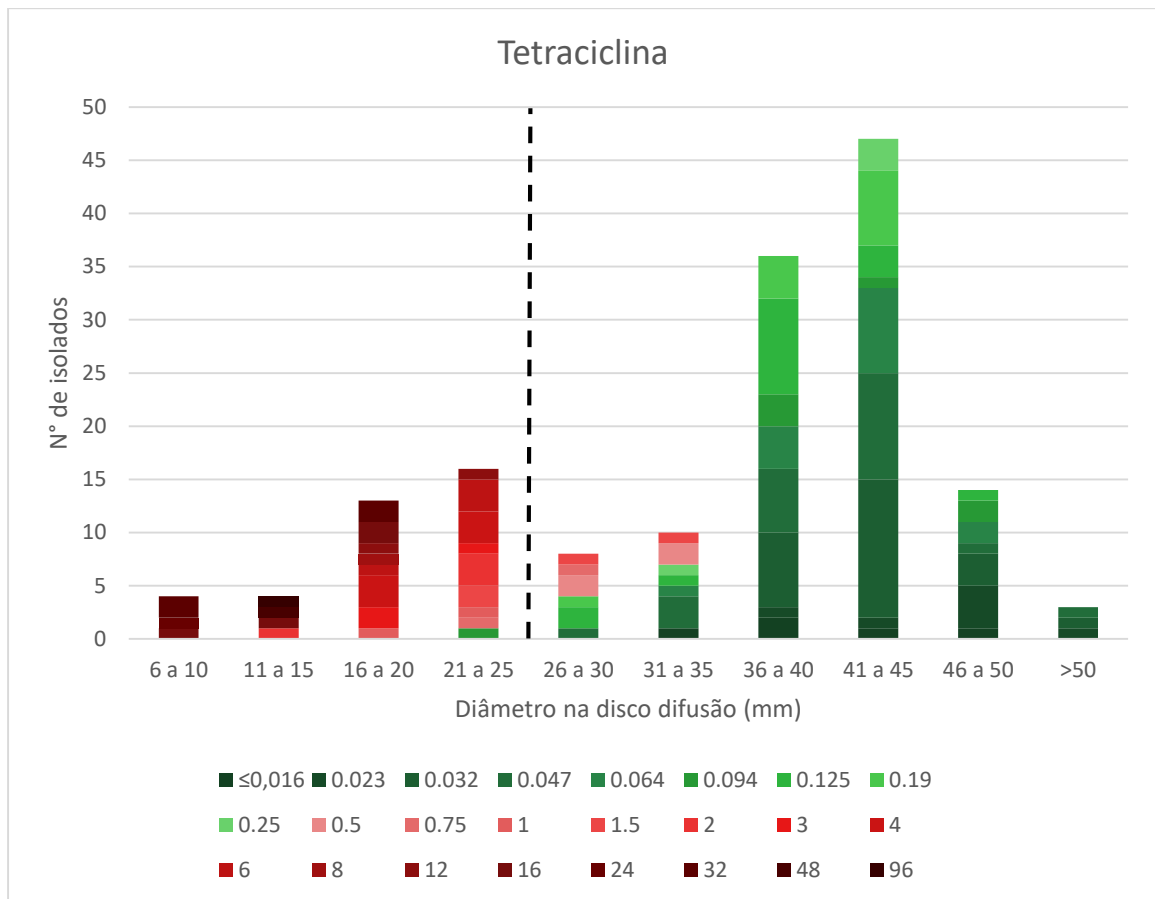


Tabela 3 – Pontos de corte do método de disco difusão propostos para categorização de *Clostridioides difficile* entre wild type (WT) e non-wild type (NWT) utilizando teste graduado (Etest) como referência para concentração de inibição mínima (CIM), de acordo com ECOFF determinados pelo EUCAST, juntamente com os resultados dos cálculos para erros de grande importância (VME), erros de importância (ME), CIM50, e CIM90.

Antimicrobiano	Diâmetro da zona de inibição* (mm)	Pontos de corte - ECOFF (mg/L)	Erros (%) VME	Erros (%) ME	CIM50 (mg/L)	CIM90 (mg/L)
Eritromicina	WT ≥ 20	WT ≤ 4	0	0	1	≥ 296
Rifampicina	WT ≥ 28	WT ≤ 0.004	0	0	≤ 0.002	≥ 32
Tetraciclina	WT ≥ 25	WT ≤ 0.25	5.2	0.6	0.094	6

*Ponto de corte da zona de inibição calculado pelo método NRI

Os isolados de ribotipos do clado 5 apresentaram associação com a resistência a eritromicina, tetraciclina e rifampicina ($p=0.0051$, $p<0.0001$ e $p=0.0077$, respectivamente). Já isolados de animais e não-toxigênicos foram associados a resistência a tetraciclina ($p=0.0003$) e rifampicina ($p=0.0012$). Isolados resistentes à tetraciclina tinham mais chances de serem resistentes também à rifampicina ($p<0.0001$). Tanto rifampicina e eritromicina apresentaram uma alta correlação entre CIMs e disco difusão através da análise de regressão bivariada, (R^2 em 0.81 e 0.93, respectivamente). No entanto, a correlação para tetraciclina foi baixa ($R^2=0.33$), indicando previsibilidade baixa da classificação via CIM pela técnica de disco difusão.

6. DISCUSSÃO

C. difficile é um patógeno importante para humanos e animais, e uma das ameaças mais desafiadoras entre os patógenos que apresentam perfil de resistência à antimicrobianos relevante (CDC, 2022). Portanto, monitorar a epidemiologia da resistência desse patógeno é de extrema importância (BUFFIE, 2012; CDC, 2022; MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016; VALIENTE; CAIRNS; WREN, 2014). O método de disco difusão, uma técnica simples para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana, mostrou resultados promissores para moxifloxacina, vancomicina, e metronidazol em estudos anteriores (ERIKSTRUP et al., 2012; HOLT; DANIELSEN; JUSTESEN, 2015). Apesar de diversos outros estudos reportarem índices de suscetibilidade para outros antimicrobianos de *C. difficile* utilizando o método de disco difusão, poucos estudos avaliaram esta metodologia (POILANE et al., 2007; RAHIMI; JALALI; WEESE, 2014; SISAKHTPOUR et al., 2021).

No presente estudo, o método de disco difusão mostrou um grande potencial para uso na rotina laboratorial ao apresentar alta correlação com os valores obtidos através da CIM. As taxas de VME e ME para eritromicina e rifampicina (0%) estavam abaixo do que aquelas relatadas em estudos anteriores avaliando o método de disco difusão para metronidazol, vancomicina e moxifloxacina (ERIKSTRUP et al., 2012; HOLT; DANIELSEN; JUSTESEN, 2015).

O resultado de disco difusão para tetraciclina também revelou uma taxa admissível de ME (abaixo de 3%, como recomendado pelo documento CLSI M23) (CLSI, 2018), mas a taxa de VME (5,3%) fora mais alta que o limite de 1,5% sugerido pelo CLSI (CLSI, 2018). Este resultado sugere que o método de disco difusão, no protocolo testado no presente estudo, não é uma técnica apropriada para avaliação da resistência de *C. difficile* a esse antimicrobiano,

classificando erroneamente parte dos isolados resistentes como susceptíveis. Não está claro o que pode ter afetado os resultados do método de disco difusão neste caso. Estudos prévios sugerem que discos de tetraciclina contendo 30 µg do antimicrobiano podem levar a um diâmetro maior mesmo em isolados de baixa suscetibilidade; sendo assim, discos com baixas concentrações podem vir a resultar em taxas de VME mais baixas (MAL et al., 2016; PD et al., 1997; TANG et al., 2020). Futuramente, é possível repetir os testes com discos de tetraciclina contendo 5 µg para verificar tal hipótese. Deve-se salientar que os discos de tetraciclina contendo 5 µg são menos disponíveis comercialmente do que aqueles contendo 30 µg, comumente utilizados na rotina em diversos laboratórios de pesquisa e de rotina.

O índice de resistência à rifampicina descrita neste estudo (18,1%) é similar àqueles reportados em estudos prévios (CURRY et al., 2009; FREEMAN et al., 2020; KIM et al., 2021; PUTSATHIT et al., 2021). É de relevância mencionar que a rifampicina é um importante fator de risco para ICD em humanos, mas também pode ser usado como tratamento alternativo para ICD em casos específicos (CURRY et al., 2009; GAREY et al., 2008; GROBBELAAR et al., 2019; O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021b). Notavelmente, este antimicrobiano é comumente utilizado no tratamento de tuberculose, uma doença reemergente que requer um tratamento de longa duração com antimicrobianos (CORTEZ et al., 2021). Nesse contexto, casos infecção por *C. difficile* resistente à rifampicina tem sido amplamente reportada em pacientes com tuberculose (KURAHARA et al., 2022; LEE et al., 2016; OBUCH-WOSZCZATYŃSKI et al., 2013).

Neste estudo, 41,9% dos isolados foram resistentes à eritromicina, valor ligeiramente abaixo do intervalo de 45–53% encontrado em outros estudos (PENG et al., 2017b; PUTSATHIT et al., 2021). É importante ressaltar que a resistência à antimicrobianos macrolídeos em *C. difficile* comumente ocorre pela presença do gene *ermB*, que é frequentemente localizado em elementos genéticos móveis, facilitando sua disseminação (IMWATTANA et al., 2021). Essa resistência é mais comumente observada em ribotipos específicos, incluindo os conhecidos “hipervirulentos” (O'GRADY; KNIGHT; RILEY, 2021b). Neste estudo, ribotipos do clado 5, que incluem os “hipervirulentos” RT078 e RT126, se mostraram com maior probabilidade de serem resistentes a esse antimicrobiano.

A taxa de resistência à tetraciclina neste trabalho (28,4%) corrobora com os resultados de estudos prévios que reportam taxas de resistências de até 38% (BOUDJELAL et al., 2022; DILNESSA et al., 2022; WEI et al., 2019). Trabalhos recentes sugerem que a utilização intensa de tetraciclina, principalmente em animais de produção, é responsável por uma pressão evolutiva relevante em *C. difficile*, participando da seleção de estirpes do clado 5 (DINGLE et

al., 2019; IMWATTANA et al., 2021; TAORI et al., 2014). Interessantemente, resistência à tetraciclina é comum em isolados de animais e ribotipos normalmente classificados no clado 5 (como os ribotipos 078 e 126). Todos os isolados RT126 deste estudo eram resistentes à tetraciclina, e 57,1% eram resistentes à rifampicina. Estes isolados também tinham maior probabilidade de serem resistentes à eritromicina e tetraciclina, como reportado anteriormente (ZHANG et al., 2020). Esta descoberta é preocupante, visto que cepas de *C. difficile* pertencentes ao clado 5 tem sido associadas a um aumento na ocorrência de casos comunitários de ICD em vários países (FINSTERWALDER et al., 2022; OFORI et al., 2018; STABLER et al., 2012) e reforça o papel de animais na epidemiologia de ICD em humanos, destacando a necessidade de uma abordagem de “Saúde Única” para compreender e controlar essa doença (LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

Este é o primeiro trabalho a avaliar o método de disco difusão para suscetibilidade de *C. difficile* à tetraciclina, eritromicina e rifampicina. Os resultados sugerem que o método de disco difusão pode ser uma ferramenta de rotina interessante para identificar isolados de *C. difficile* resistentes à eritromicina e rifampicina. No entanto, o método de disco difusão testado não parece adequado para tetraciclina devido ao percentual de VME observado nas classificações.

Embora os resultados encontrados neste estudo ofereçam mais esclarecimentos sobre o uso do método de disco difusão para *C. difficile*, existem alguns pontos de atenção a serem discutidos. Uma grande porcentagem de isolados utilizados neste estudo foram obtidos de humanos (61,1%), e a maioria destes foi obtida no mesmo hospital, o que leva a uma menor representatividade de diferentes padrões de suscetibilidade do ponto de vista epidemiológico. Além disso, não haviam dados sobre o uso prévio de antimicrobianos dos pacientes, impossibilitando a comparação de metadados para determinação de uma correlação entre os tratamentos anteriores e a possível pressão seletiva exercida. Por fim, este estudo não utilizou o padrão-ouro para determinação de CIM em *C. difficile*. Apesar de confiável, os resultados do Etest podem apresentar variações de CIM quando comparados a diluição em ágar (POILANE et al., 2000).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a técnica de disco difusão é uma ferramenta útil para a triagem da caracterização da suscetibilidade de isolados de *C. difficile* frente a rifampicina e eritromicina. A técnica, porém, não apresentou bom desempenho para tetraciclina, levando a classificação errônea de um percentual inaceitável dos isolados. O estudo também sugere que estirpes pertencentes ao clado 5 estão associadas a resistência a tetraciclina, rifampicina e eritromicina, reforçando a necessidade de estudos epidemiológicos para entender os padrões de resistência em *C. difficile*.

REFERÊNCIAS

- ABDRABOU, A. M. M. et al. Implementation of a *Clostridioides difficile* sentinel surveillance system in Germany: First insights for 2019-2021. **Anaerobe**, v. 77, p. 102548, out. 2022.
- ACUÑA-AMADOR, L.; QUESADA-GÓMEZ, C.; RODRÍGUEZ, C. *Clostridioides difficile* in Latin America: A comprehensive review of literature (1984-2021). **Anaerobe**, v. 74, p. 102547, abr. 2022.
- ADAMS, D. J.; BARONE, J. B.; NYLUND, C. M. Community-Associated *Clostridioides difficile* Infection in Children: A Review of Recent Literature. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 10, n. Supplement_3, p. S22–S26, 17 nov. 2021.
- AL MOMANI, L. A. et al. Fidaxomicin vs Vancomycin for the Treatment of a First Episode of *Clostridium Difficile* Infection: A Meta-analysis and Systematic Review. **Cureus**, v. 10, n. 6, p. e2778, 11 jun. 2018.
- ALVAREZ-PEREZ, S. et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 302–305, 12 jun. 2009.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. et al. High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 358–361, 1 out. 2013.
- BAGDASARIAN, N.; RAO, K.; MALANI, P. N. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. **JAMA**, v. 313, n. 4, p. 398–408, 27 jan. 2015.
- BAKTASH, A. et al. Comparison of Whole-Genome Sequence-Based Methods and PCR Ribotyping for Subtyping of *Clostridioides difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 2, p. e0173721, 16 fev. 2022.
- BARBUT, F. How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment. **Journal of Hospital Infection**, Proceedings from the 9th Healthcare Infection Society International Conference. v. 89, n. 4, p. 287–295, 1 abr. 2015.
- BARTLETT, J. G. *Clostridium difficile*: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge about the Organism. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. S265–S272, 1994.
- BÅVERUD, V. et al. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 465–471, 2003.
- BIDET, P. et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, n. 2, p. 261–266, 1 jun. 1999.
- BJÖERSDORFF, O. G. et al. Dogs are carriers of *Clostridioides difficile* lineages associated with human community-acquired infections. **Anaerobe**, v. 67, p. 102317, 1 fev. 2021.

- BOJESEN, A. M.; OLSEN, K. E. P.; BERTELSEN, M. F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 329–335, 10 set. 2006.
- BOUDJELAL, Y. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance patterns of *Clostridioides difficile* isolates in Algerian hospitals. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 16, n. 06, p. 1055–1063, 30 jun. 2022.
- BRAGA, D. S. et al. Incidence of healthcare-associated *Clostridioides difficile* infection in a quaternary referral university hospital in Brazil. **Anaerobe**, v. 79, p. 102672, 26 nov. 2022.
- BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 313–319, 1 jul. 2012.
- BROOK, I.; WEXLER, H. M.; GOLDSTEIN, E. J. C. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 526–546, jul. 2013.
- BUFFIE, C. G. **Profound Alterations of Intestinal Microbiota following a Single Dose of Clindamycin Results in Sustained Susceptibility to *Clostridium difficile*-Induced Colitis.** Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/IAI.05496-11>>. Acesso em: 6 mar. 2022.
- BURKE, K. E.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. **Gut and Liver**, v. 8, n. 1, p. 1–6, jan. 2014.
- CANÇADO, G. G. L. et al. A cost of illness comparison for toxigenic *Clostridioides difficile* diagnosis algorithms in developing countries. **Anaerobe**, v. 70, p. 102390, ago. 2021.
- CANDELA, T. et al. A cfr-like gene cfr(C) conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 496–500, 1 set. 2017.
- CARVALHO, G. M. et al. Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. **Anaerobe**, v. 75, p. 102574, 1 jun. 2022.
- CDC. **The biggest antibiotic-resistant threats in the U.S.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>>. Acesso em: 27 nov. 2022.
- CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 6, p. 723–750, 1 nov. 2017.
- CHANG, T. W. et al. Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. **Infection and Immunity**, v. 20, n. 2, p. 526–529, maio 1978.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 65, n. 2, p. 232–260 ; second page, table of contents, jun. 2001.

CLAUDIAC. Experience of the first Brazilian fecal microbiota transplantation center in treating recurrent *Clostridioides difficile* infection. Disponível em: <<https://www.microbiotajournal.com/article/806>>. Acesso em: 21 jan. 2023.

CLSI. **M23: Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters**. 5. ed. [s.l.: s.n.].

CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30. ed. [s.l.: s.n.].

COLLINS, J. et al. Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile*. **Nature**, v. 553, n. 7688, p. 291–294, jan. 2018.

CORTEZ, A. O. et al. Tuberculosis in Brazil: one country, multiple realities. **Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia E Tisiologia**, v. 47, n. 2, p. e20200119, 2021.

CROBACH, M. J. T. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Diagnostic Guidance Document for Infection. v. 22, p. S63–S81, 1 ago. 2016.

CURRY, S. R. et al. High Frequency of Rifampin Resistance Identified in an Epidemic *Clostridium difficile* Clone from a Large Teaching Hospital. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 4, p. 425, 15 fev. 2009.

CZEPIEL, J. et al. *Clostridium difficile* infection: review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 1211–1221, jul. 2019.

DE CARVALHO, T. P. et al. Lethal acute diarrhea associated with *Clostridioides difficile* toxin A and B in a buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*). **Journal of Medical Primatology**, v. 51, n. 6, p. 400–403, dez. 2022.

DE OLIVEIRA, C. A. et al. Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. **Anaerobe**, v. 51, p. 61–63, 1 jun. 2018.

DILNESSA, T. et al. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1, p. e0262597, 13 jan. 2022.

DINGLE, K. E. et al. A Role for Tetracycline Selection in Recent Evolution of Agriculture-Associated *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078. **mBio**, v. 10, n. 2, p. e02790-18, 12 mar. 2019.

DINIZ, A. N. et al. The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. **Anaerobe**, v. 49, p. 58–62, 1 fev. 2018.

DINIZ, A. N. et al. Fecal microbiota transplantation via colonoscopy in a dog with *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. **Ciência Rural**, v. 51, 12 fev. 2021a.

DINIZ, A. N. et al. *Clostridioides (Clostridium) difficile*-associated diarrhea in equine in Minas Gerais, Brazil: clinical and microbiological characterization of six cases. **Ciência Rural**, v. 51, 10 maio 2021b.

DINIZ, A. N. et al. Characterization of the virulence of three novel clade 2 *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains and a two-year screening in animals and humans in Brazil. **PLOS ONE**, v. 17, n. 8, p. e0273013, 26 ago. 2022.

DINLEYICI, M.; VANDENPLAS, Y. *Clostridium difficile* Colitis Prevention and Treatment. Em: GUANDALINI, S.; INDRIIO, F. (Eds.). **Probiotics and Child Gastrointestinal Health: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 10**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 139–146.

DÜRRE, P. Physiology and Sporulation in *Clostridium*. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. TBS-0010-2012, ago. 2014.

EDWARDS, A. N.; MCBRIDE, S. M. Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. **FEMS Microbiology Letters**, v. 358, n. 2, p. 110–118, 1 set. 2014.

ERIKSTRUP, L. T. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. E266-272, ago. 2012.

EYRE, D. W. et al. Emergence and spread of predominantly community-onset *Clostridium difficile* PCR ribotype 244 infection in Australia, 2010 to 2012. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 10, p. 21059, 12 mar. 2015.

FINSTERWALDER, S. K. et al. Dogs as carriers of virulent and resistant genotypes of *Clostridioides difficile*. **Zoonoses and Public Health**, v. 69, n. 6, p. 673–681, set. 2022.

FREEMAN, J. et al. Five-year Pan-European, longitudinal surveillance of *Clostridium difficile* ribotype prevalence and antimicrobial resistance: the extended ClosER study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 169–177, jan. 2020.

GAREY, K. W. et al. Rifamycin Antibiotics for Treatment of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, n. 6, p. 827–835, 1 jun. 2008.

GATEAU, C. et al. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 5, p. 463–468, 1 maio 2018.

GONZALEZ RONQUILLO, M.; ANGELES HERNANDEZ, J. C. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. **Food Control**, FAO/IAEA International Symposium on Food Safety and Quality: Applications of Nuclear and Related Techniques, Vienna, Austria, 10-13 November 2014. v. 72, p. 255–267, 1 fev. 2017.

GOORHUIS, A. et al. Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1162–1170, 1 nov. 2008.

GROBBELAAR, M. et al. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 74, p. 103937, out. 2019.

GUERY, B.; GALPERINE, T.; BARBUT, F. Clostridioides difficile: diagnosis and treatments. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 366, p. 14609, 20 ago. 2019.

GUO, C. L. T. et al. Trends in Incidence and Clinical Outcomes of Clostridioides difficile Infection, Hong Kong. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 12, p. 3036–3044, dez. 2021.

HAIN-SAUNDERS, N. M. R. et al. Clostridioides difficile infection and One Health: an equine perspective. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 985–997, mar. 2022.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS: WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, BACILLUS DIFFICILIS. **American Journal of Diseases of Children**, v. 49, n. 2, p. 390–402, 1 fev. 1935.

HARTMANN, G. et al. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 145, n. 3, p. 843–844, 1967.

HASTEY, C. J. et al. Comparison of Clostridium difficile minimum inhibitory concentrations obtained using agar dilution vs broth microdilution methods. **Anaerobe**, v. 44, p. 73–77, abr. 2017.

HOLT, H. M.; DANIELSEN, T. K.; JUSTESEN, U. S. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of Clostridium difficile and association with PCR ribotype 027. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2243–2246, nov. 2015.

HUHULESCU, S. et al. Rifaximin disc diffusion test for in vitro susceptibility testing of Clostridium difficile. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 8, p. 1206–1212, ago. 2011.

IGAWA, G. et al. Comparison of agar dilution and broth microdilution methods for Clostridium difficile antimicrobial susceptibility testing. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 7, p. 43–45, dez. 2016.

IMWATTANA, K. et al. A species-wide genetic atlas of antimicrobial resistance in Clostridioides difficile. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 11, p. 000696, nov. 2021.

JANEZIC, S.; RUPNIK, M. Molecular Typing Methods for Clostridium difficile: Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR Ribotyping. Em: MULLANY, P.; ROBERTS, A. P. (Eds.). **Clostridium difficile: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p. 55–65.

JANEZIC, S.; RUPNIK, M. Genomic diversity of Clostridium difficile strains. **Research in Microbiology**, Special issue on Insights into toxigenic Clostridia through genomics. v. 166, n. 4, p. 353–360, 1 maio 2015.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 1 dez. 2009.

- KAMIYA, S.; NAKAMURA, S. Virulence Factors of *Clostridium difficile* and Its Pathogenesis in Intestinal Infection in Man. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 1993.
- KARASAWA, T. et al. Effect of arginine on toxin production by *Clostridium difficile* in defined medium. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 8, p. 581–585, 1997.
- KARPIŃSKI, P. et al. Motility and the genotype diversity of the flagellin genes *fliC* and *fliD* among *Clostridioides difficile* ribotypes. **Anaerobe**, v. 73, p. 102476, fev. 2022.
- KECHAGIAS, K. S. et al. Tigecycline for the treatment of patients with *Clostridium difficile* infection: an update of the clinical evidence. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1053–1058, jun. 2020.
- KEESSEN, E. C. et al. Evaluation of Four Different Diagnostic Tests To Detect *Clostridium difficile* in Piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1816–1821, maio 2011.
- KELLY, C. R. et al. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1124–1147, 1 jun. 2021.
- KHORUTS, A.; STALEY, C.; SADOWSKY, M. J. Faecal microbiota transplantation for *Clostridioides difficile*: mechanisms and pharmacology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 1, p. 67–80, jan. 2021.
- KHUN, P. A.; RILEY, T. V. Epidemiology of *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* Infection in Southeast Asia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 3, p. 517–526, 8 ago. 2022.
- KIM, D. et al. Molecular epidemiology and clinical risk factors for rifaximin-non-susceptible *Clostridioides difficile* infection in South Korea: a prospective, multicentre, observational study. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 46–50, 1 dez. 2021.
- KNETSCH, C. W. et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. **Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 19, n. 45, p. 20954, 13 nov. 2014.
- KNIGHT, D. R. et al. Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 721–741, jul. 2015.
- KNIPPEL, R. J. et al. *Clostridioides difficile* Senses and Hijacks Host Heme for Incorporation into an Oxidative Stress Defense System. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 3, p. 411–421.e6, 9 set. 2020.
- KOCIOLEK, L. K.; GERDING, D. N. Clinical Utility of Laboratory Detection of *Clostridium difficile* Strain BI/NAP1/027. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 19–24, jan. 2016.
- KRIJGER, I. M. et al. *Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands. **Letters in Applied Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 35–40, jul. 2019.

KUIJPER, E. et al. Nosocomial Outbreak of Clostridium difficile-Associated Diarrhoea due to a Clindamycin-Resistant Enterotoxin A-Negative Strain. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 528–534, 1 ago. 2001.

KUIJPER, E. J. et al. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12 Suppl 6, p. 2–18, out. 2006.

KULLIN, B. et al. Clostridioides difficile infection in Africa: A narrative review. **Anaerobe**, v. 74, p. 102549, abr. 2022.

KURAHARA, Y. et al. The feasibility of rifampicin Re-administration in patients with tuberculosis and Clostridioides difficile infection. **Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 28, n. 4, p. 558–562, abr. 2022.

KUWATA, Y. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile isolated from a university teaching hospital in Japan. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 763–772, 1 abr. 2015.

LARSON, H. E. et al. CLOSTRIDIUM DIFFICILE AND THE ÆTIOLOGY OF PSEUDOMEMBRANOUS COLITIS. **The Lancet**, v. 311, n. 8073, p. 1063–1066, 20 maio 1978.

LAWSON, P. A. et al. Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95–99, 1 ago. 2016.

LAWSON, P. A.; RAINEY, F. A. Proposal to restrict the genus Clostridium Prazmowski to Clostridium butyricum and related species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 1009–1016, 1 fev. 2016.

LEE, Y. M. et al. Incidence and Clinical Outcomes of Clostridium difficile Infection after Treatment with Tuberculosis Medication. **Gut and Liver**, v. 10, n. 2, p. 250–254, mar. 2016.

LEEDS, J. A. et al. In vitro selection, via serial passage, of Clostridium difficile mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 41–44, 1 jan. 2014.

LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. Clostridium difficile Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 3, p. 287–288, 16 jul. 2015.

LEGENZA, L. et al. Clostridium difficile infection perceptions and practices: a multicenter qualitative study in South Africa. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 125, 29 out. 2018.

LEMEE, L. et al. Multiplex PCR Targeting tpi (Triose Phosphate Isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of Clostridium difficile. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5710–5714, dez. 2004.

LEVETT, P. N. Antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile determined by disc diffusion and breakpoint methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 2, p. 167–173, 1 ago. 1988.

- LI, H. et al. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Clostridioides difficile* in China and its association with geographical regions and patient age. **Anaerobe**, v. 60, p. 102094, dez. 2019.
- LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* and One Health. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 7, p. 857–863, jul. 2020.
- LOPES CANÇADO, G. G. et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, MALDI-TOF MS in anaerobe diagnostics. v. 54, p. 65–71, 1 dez. 2018.
- MAL, P. B. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Pakistan by Etest compared to Calibrated Dichotomous Sensitivity and Clinical Laboratory Standards Institute disc diffusion techniques. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 236, 10 out. 2016.
- MARKS, S. L. et al. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1195–1208, 2011.
- MARRIE, T. J. et al. Pseudomembranous colitis: isolation of two species of cytotoxic clostridia and successful treatment with vancomycin. **Canadian Medical Association Journal**, v. 119, n. 9, p. 1058–1060, 4 nov. 1978.
- MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 4, p. 206–216, abr. 2016.
- MCCLUNG, L. S. The Anaerobic Bacteria with Special Reference to the Genus *Clostridium*. **Annual Review of Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 173–192, 1956.
- MCDONALD, L. C. et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 66, n. 7, p. e1–e48, 19 mar. 2018.
- MOURA, I. et al. Analysis of metronidazole susceptibility in different *Clostridium difficile* PCR ribotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 362–365, 1 fev. 2013.
- NAKAMURA, S. et al. Effect of Clindamycin on Cytotoxin Production by *Clostridium difficile*. **Microbiology and Immunology**, v. 26, n. 11, p. 985–992, 1982.
- NARULA, N. et al. Systematic Review and Meta-analysis: Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Active Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1702–1709, out. 2017.
- OBUCH-WOSZCZATYŃSKI, P. et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection in tuberculosis patients due to a highly rifampicin-resistant PCR ribotype 046 clone in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 8, p. 1027–1030, 1 ago. 2013.

O'CONNOR, J. R. et al. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2813–2817, ago. 2008.

OFORI, E. et al. Community-acquired *Clostridium difficile*: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 4, p. 436–442, 1 ago. 2018.

O'GRADY, K.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 2459–2478, dez. 2021a.

O'GRADY, K.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 12, p. 2459–2478, 1 dez. 2021b.

OKSI, J.; ANTTILA, V.-J.; MATTILA, E. Treatment of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. **Annals of Medicine**, v. 52, n. 1–2, p. 12–20, 2020.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. et al. Non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 1–6, abr. 2019.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.** , dez. 2014. Disponível em: <<https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v>>

OREN, A.; RUPNIK, M. *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: Two validly published and correct names. **Anaerobe**, v. 52, p. 125–126, 1 ago. 2018.

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

PD, M. et al. Antimicrobial resistance testing of *Helicobacter pylori*: a comparison of Etest and disk diffusion methods. **Pathology**, v. 29, n. 4, nov. 1997.

PENG, Z. et al. Antibiotic Resistance and Toxin Production of *Clostridium difficile* Isolates from the Hospitalized Patients in a Large Hospital in Florida. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017a.

PENG, Z. et al. Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 1998–2008, jul. 2017b.

PERUMALSAMY, S.; LIM, S. C.; RILEY, T. V. *Clostridioides (Clostridium) difficile* isolated from paediatric patients in Western Australia 2019–2020. **Pathology**, v. 54, n. 4, p. 460–465, jun. 2022.

PIRES, R. N. et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 3, p. 371–373, mar. 2018.

- PIRŠ, T. et al. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1478–1485, [s.d.].
- POILANE, I. et al. Comparison of the E test to the reference agar dilution method for antibiotic susceptibility testing of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 155–156, mar. 2000.
- POILANE, I. et al. [Interest of the disk diffusion method for screening *Clostridium difficile* isolates with decreased susceptibility to antibiotics]. **Pathologie-Biologie**, v. 55, n. 8–9, p. 429–433, nov. 2007.
- PUTSATHIT, P. et al. Antimicrobial resistance surveillance of *Clostridioides difficile* in Australia, 2015–18. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 7, p. 1815–1821, 18 jun. 2021.
- RAHIMI, E.; JALALI, M.; WEESE, J. S. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1, p. 119, 5 fev. 2014.
- RAMOS, C. P. et al. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2019, p. e9530732, 27 maio 2019.
- RAMOS, C. P. et al. Immunochromatographic test and ELISA for the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and A/B toxins as an alternative for the diagnosis of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile*–associated diarrhea in foals and neonatal piglets. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1459–1462, 1 set. 2020.
- RAZAVI, B.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. *Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance. **Infection**, v. 35, n. 5, p. 300–307, out. 2007.
- REIGADAS, E. et al. Rifaximin-resistant *Clostridium difficile* strains isolated from symptomatic patients. **Anaerobe**, v. 48, p. 269–272, dez. 2017.
- REVOLINSKI, S. L.; MUNOZ-PRICE, L. S. *Clostridium difficile* in Immunocompromised Hosts: A Review of Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Prevention. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 68, n. 12, p. 2144–2153, 30 maio 2019.
- RILEY, T. V.; LYRAS, D.; DOUCE, G. R. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. **Vaccine**, v. 37, n. 50, p. 7300–7306, 28 nov. 2019.
- RODRIGUEZ DIAZ, C.; SEYBOLDT, C.; RUPNIK, M. Non-human *C. difficile* Reservoirs and Sources: Animals, Food, Environment. Em: MASTRANTONIO, P.; RUPNIK, M. (Eds.). **Updates on Clostridium difficile in Europe: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 8**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 227–243.
- RODRÍGUEZ-PALLARES, S. et al. Transmission of toxigenic *Clostridioides difficile* between a pet dog with diarrhea and a 10-month-old infant. **Anaerobe**, v. 74, p. 102519, abr. 2022.

- RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 526–536, jul. 2009.
- SAMMONS, J. S.; TOLTZIS, P. Recent trends in the epidemiology and treatment of C. difficile infection in children. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, n. 1, p. 116, fev. 2013.
- SANTANA, J. A. et al. Identification and characterization of pathogenic and multidrug-resistant bacteria in feral pigeons surrounding a veterinary hospital in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, 16 dez. 2022.
- SCHWAN, C. et al. Clostridium difficile toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2313–2318, 11 fev. 2014.
- SEBAIHIA, M. et al. The multidrug-resistant human pathogen Clostridium difficile has a highly mobile, mosaic genome. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 779–786, jul. 2006.
- SHEN, A. Clostridioides difficile Spore Formation and Germination: New Insights and Opportunities for Intervention. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 545–566, 2020.
- SHEN, W.-J. et al. Constitutive expression of the cryptic vanGCd operon promotes vancomycin resistance in Clostridioides difficile clinical isolates. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 4, p. 859–867, 1 abr. 2020.
- SILVA, R. O. S. et al. Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of Clostridium difficile in piglets in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1430–1435, ago. 2011.
- SILVA, R. O. S. et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in an ocelot (Leopardus pardalis). **Anaerobe**, v. 20, p. 82–84, abr. 2013.
- SILVA, R. O. S. et al. Carriage of Clostridium difficile in free-living South American coati (Nasua nasua) in Brazil. **Anaerobe**, v. 30, p. 99–101, 1 dez. 2014.
- SILVA, R. O. S. et al. Clostridium difficile ribotypes in humans and animals in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 1062–1065, dez. 2015.
- SILVA, R. O. S. et al. Isolation of Clostridium perfringens and Clostridioides difficile in diarrheic and nondiarrheic cats. **Anaerobe**, v. 62, p. 102164, 1 abr. 2020.
- SISAKHTPOUR, J. et al. Phenotypical and Genotypical Comparison of Clostridium difficile Isolated from Clinical Samples: Homebrew DNA Fingerprinting versus Antibiotic Susceptibility Testing (AST) and Clostridial Toxin Genes. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2021, p. e7386554, 2 dez. 2021.
- SMITS, W. K. et al. Sequence-Based Identification of Metronidazole-Resistant Clostridioides difficile Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 11, p. 2308–2311, nov. 2022.
- SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. **Anaerobe**, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006.

SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial Enteric Infections in Pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 528–536, 1 nov. 2005.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 387–399, out. 1992.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. Tetracycline Resistance Gene tet(W) in the Pathogenic Bacterium *Clostridium difficile*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 770–773, fev. 2008.

SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P.; BARBANTI, F. Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1050, p. 137–159, 2018.

SRINIVASA, V. R. et al. Hospital-associated *Clostridium difficile* infection and reservoirs within the hospital environment. **American Journal of Infection Control**, v. 47, n. 7, p. 780–785, 1 jul. 2019.

STABLER, R. A. et al. Macro and Micro Diversity of *Clostridium difficile* Isolates from Diverse Sources and Geographical Locations. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31559, 2 mar. 2012.

STEWART, D. B.; BERG, A.; HEGARTY, J. Predicting Recurrence of *C. difficile* Colitis Using Bacterial Virulence Factors: Binary Toxin Is the Key. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 17, n. 1, p. 118–125, 1 jan. 2013.

SURAWICZ, C. M. et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 478–498; quiz 499, abr. 2013.

TANG, X. et al. Re-assessment of the disk diffusion technique for routine antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 25, n. 4, p. e12703, ago. 2020.

TAORI, S. K. et al. A prospective study of community-associated *Clostridium difficile* infections: the role of antibiotics and co-infections. **The Journal of Infection**, v. 69, n. 2, p. 134–144, ago. 2014.

TERHES, G. et al. Community-Acquired *Clostridium difficile* Diarrhea Caused by Binary Toxin, Toxin A, and Toxin B Gene-Positive Isolates in Hungary. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4316–4318, set. 2004.

TERRA, D. A. DE A. et al. Estruturação de centro de transplante de microbiota fecal em hospital universitário no Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 57, p. 434–458, 16 nov. 2020.

THERIOT, C. M. et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3114, 20 jan. 2014.

TIAN, T. et al. Molecular Characterization of *Clostridium difficile* Isolates from Human Subjects and the Environment. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151964, 24 mar. 2016.

- TRAMUTA, C. et al. Comparison of Clostridioides difficile strains from animals and humans: First results after introduction of C. difficile molecular typing and characterization at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale of Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 75, p. 101623, abr. 2021.
- TSAI, C.-S. et al. Clostridioides difficile infection: an emerging zoonosis? **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 19, n. 12, p. 1543–1552, dez. 2021.
- VALIENTE, E.; CAIRNS, M. D.; WREN, B. W. The Clostridium difficile PCR ribotype 027 lineage: a pathogen on the move. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 396–404, maio 2014.
- VALSESIA, G. et al. A Statistical Approach for Determination of Disk Diffusion-Based Cutoff Values for Systematic Characterization of Wild-Type and Non-Wild-Type Bacterial Populations in Antimicrobial Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1812–1822, jun. 2015.
- VILLANO, S. A. et al. Evaluation of an Oral Suspension of VP20621, Spores of Nontoxigenic Clostridium difficile Strain M3, in Healthy Subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5224–5229, out. 2012.
- VONBERG, R.-P. et al. Infection control measures to limit the spread of Clostridium difficile. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 2–20, 1 maio 2008.
- WEESE, J. S. Clostridium (Clostridioides) difficile in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 2, p. 213–221, mar. 2020.
- WEI, Y. et al. Prevalence, genotype and antimicrobial resistance of Clostridium difficile isolates from healthy pets in Eastern China. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 46, 11 jan. 2019.
- WETZEL, D.; MCBRIDE, S. M. The Impact of pH on Clostridioides difficile Sporulation and Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 4, p. e02706-19, 3 fev. 2020.
- WICKRAMAGE, I.; SPIGAGLIA, P.; SUN, X. Mechanisms of antibiotic resistance of Clostridioides difficile. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 12, p. 3077–3090, 12 nov. 2021.
- WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.
- WOLFE, C. et al. Comparison of the in vitro antibacterial activity of Ramizol, fidaxomicin, vancomycin, and metronidazole against 100 clinical isolates of Clostridium difficile by broth microdilution. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 3, p. 250–252, nov. 2018.
- WONG, S. S.-Y. et al. Susceptibility testing of Clostridium difficile against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, n. 1, p. 1–6, 1 maio 1999.

ZHANG, W.-Z. et al. The molecular characters and antibiotic resistance of *Clostridioides difficile* from economic animals in China. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 70, 30 mar. 2020.

ANEXO A



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AEC0B9A

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AEC0B9A**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Clostridium sp.

Título da Atividade: **Isolamento, caracterização e aplicação de estirpes do gênero Clostridium no diagnóstico e na produção de insumos biológicos**

Equipe

Rodrigo Otávio Silveira Silva **Universidade Federal de Minas Gerais**
Francisco Carlos Faria Lobato **UFMG**

Data do Cadastro: **29/10/2018 22:33:38**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:03** de **10/08/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Arquivo Suplementar I

ID	Hospedeiro	Ano	Ribotipo	Clado	Toxina
HC29/18	Humano	2018	NT	NT	0
HC49/15	Humano	2015	46	1	1
HC56/18	Humano	2018	770	NR	1
JC20	Roedor	2018	64	NR	1
P1CD	Pombo	2019	NT	NT	0
HC37/18	Humano	2018	14	1	1
HC40/18	Humano	2018	12	1	1
HC51/19	Humano	2019	258	NR	1
PR54	Réptil	2016	81	1	1
HC36/19 - 2	Humano	2019	654	NR	1
HC3/20 (T)	Humano	2020	988	NR	1
HC3/20 (NT)	Humano	2020	NT	NT	0
C103	Canino	2015	602	3	1
C46	Canino	2014	106	1	1
EQ13	Equino	2013	014/020	1	1
Elliot2	Felino doméstico	2017	106	1	1
EQ5	Equino	2012	78	5	1
H11	Suíno	2016	126	5	1
HC11/18	Humano	2018	014/020	1	1
HC13/18	Humano	2018	106	1	1
HC14/18	Humano	2018	106	1	1
HC16/18	Humano	2018	106	1	1
HC18/15	Humano	2015	216	1	1
HC26/19	Humano	2019	600	1	1
HC29/19	Humano	2019	NT	NT	0
HC31/19	Humano	2019	106	1	1
HC39/19	Humano	2019	NT	NT	0
HC44/15	Humano	2015	106	1	1
HC49/19	Humano	2019	174	1	1
HC52	Humano	2012	014/020	1	1
HC67	Humano		50	1	1
PO43623	Equino	2012	78	5	1
R1/20	Humano	2019	76	1	1
R12/18	Humano	2018	37	NR	1
UN1/17	Canino	2017	106	1	1
Z11	Canino	2012	106	1	1
C100	Canino	2014	NT	NT	0
FF48	Felino doméstico	2017	106	1	1

HC1/18	Humano	2018	106	1	1
HC10/18	Humano	2018	106	1	1
HC24/19	Humano	2019	NT	NT	0
HC17/18	Humano	2018	106	1	1
HC2/18	Humano	2018	106	1	1
HC4/18	Humano	2018	106	1	1
HC58	Humano	2012	884	2	1
HC8/19	Humano	2019	106	1	1
HC9/19	Humano	2019	106	1	1
HC1/17	Humano	2018	106	1	1
PO53033	Equino	2014	78	5	1
R3/19	Humano	2019	14	1	1
S/I	Roedor	2018	NT	NT	0
SS148	Canino	2020	14	1	1
SS149	Canino	2020	14	1	1
Tico	Felino doméstico	2016	106	1	1
UN/20	Equino	2020	660	NR	1
Sagui	Sagui	2021	NR	NR	1
Aquiles	Canino	2017	014/020	1	1
HC42/19	Humano	2019	NR	NR	1
Bella	Canino	2017	014/020	1	1
C52	Canino	2014	014/020	1	1
HC15/18	Humano	2018	106	1	1
HC3/18	Humano	2018	104	1	1
HC3/19	Humano	2019	106	1	1
HC51/18	Humano	2018	770	NR	1
HC36/19	Humano	2019	654	NR	1
HC47/19	Humano	2019	989	NR	1
HC52/19	Humano	2019	54	1	1
HC60/19	Humano	2019	NT	NT	0
HC62/19	Humano	2019	NT	NT	0
Z14	Canino	2011	014/020	1	1
Z30	Canino	2012	NT	NT	0
HC6/19	Humano	2019	106	1	1
HC23/18	Humano	2018	NT	NT	0
HC25/15	Humano	2015	133	1	1
HC62	Humano		001/072	1	1
ICC45	Humano	2013	821	2	1
HC7/18	Humano	2018	106	1	1
C96	Canino	2014	014/020	1	1
FV33	Canino	2018	600	1	1
HC39/18	Humano	2018	014/020	1	1
HCC8	Humano	2013	424	2	1

R6/18	Humano	2018	106	1	1
HC26/15	Humano	2015	NT	NT	0
HC8/18	Humano	2018	52	NR	1
S59	Canino	2016	NT	NT	0
R10/18-3	Humano	2018	106	1	1
LND5	Suíno	2016	680	5	1
HC22/19	Humano	2019	NT	NT	0
Lucy	Felino doméstico	2016	106	1	1
F12	Felino doméstico	2015	NT	NT	0
ZOO5	Leão	2019	NT	NT	0
C53	Canino	2013	NT	NT	0
HC1/19	Humano	2019	39	1	1
C106	Canino	2015	NT	NT	0
HC14	Humano	2012	NT	NT	0
Pb01	Pombo	2019	NT	NT	0
R15/18	Humano	2018	NT	NT	0
H5	Suíno	2019	126	5	1
HC22/15	Humano	2015	126	5	1
HC53/18	Humano	2018	126	5	1
HC41/19	Humano	2019	NT	NT	0
JT1	Equino	2018	126	5	1
154860	Equino	2018	126	5	1
EQN1/2016	Equino	2016	126	5	1
F031	Jaguatirica	2013	46	1	1
PB	Suíno	2014	011/049	1	1
SS154	Canino	2019	14	1	0
R10/18-1	Humano	2018	131	NR	1
1376	Suíno	2014	126	5	1
727/15-1	Suíno	2015	126	5	1
H1	Suíno	2019	126	5	1
JT12	Equino	2019	126	5	1
HC2/20	Humano	2019	126	5	1
HC47/18	Humano	2018	11	1	1
1486/16	Suíno	2016	014/020	1	1
HC15	Humano	2012	NT	NT	0
HC53/19	Humano	2019	9	1	1
HC4/19	Humano	2019	NT	NT	0
HCD3-1/21	Humano	2021	106	1	1
HCD6/21	Humano	2021	106	1	1
HCD9/21	Humano	2021	2	1	1
HCD16/21	Humano	2021	14	1	1
HCD17/21	Humano	2021	105	NR	1
HCD21/21	Humano	2021	87	NR	1

HCD28/21	Humano	2021	186	NR	1
HCD29/21	Humano	2021	106	1	1
HCD33/21	Humano	2021	106	1	1
M103	Suíno	2021	NT	NT	0
HCD43/21	Humano	2021	NR	NR	1
HCD45/21	Humano	2022	23	3	1
HCD49/21	Humano	2021	14	1	1
HCD51/21	Humano	2022	9	1	0
HCD52/21	Humano	2022	NT	NT	0
HCD24/21	Humano	2021	NR	NR	1
ABS44A	Gato-mourisco	2022	NT	NT	0
B33-2	Suíno	2022	NR	NR	1
HCD27/21	Humano	2021	NT	NT	0
HCD44/21	Humano	2021	NT	NT	0
HCD31/21	Humano	2021	NT	NT	0
HCD56/21	Humano	2021	NT	NT	0
AB39	Equino	2021	NT	NT	0
AB21	Equino	2021	NT	NT	0
AB61	Equino	2021	46	1	1
AB63	Equino	2021	46	1	1
AB64	Equino	2021	46	1	1
AB92	Equino	2021	126	5	1
AB160	Equino	2021	126	5	1
AB172	Equino	2021	126	5	1
AB179	Equino	2021	126	5	1
HCD53/21-T	Humano	2022	NR	NR	1
HCD53/21-NT	Humano	2022	NT	NT	0
HCD1/22	Humano	2022	NR	NR	1
HCD15/21-T	Humano	2021	NR	NR	1
ABS72B	Gambá-de-orelha-branca	2022	NT	NT	0
ABS43A	Tamanduá-bandeira	2022	NT	NT	0

Arquivo Suplementar II

ID	Tetra_mm	Tetra_MIC	Ery_mm	Ery_MIC	Rif_mm	Rif_MIC
HC29/18	42	0.016	6	>256	6	>32
HC49/15	39	0.016	33	0.19	42	0.002
HC56/18	54	0.016	34	0.016	52	0.002
JC20	40	0.016	28	1	43	0.002
P1CD	32	0.016	31	0.023	35	0.002
HC37/18	50	0.023	34	0.047	52	0.002
HC40/18	41	0.023	28	0.75	42	0.002
HC51/19	50	0.023	36	0.19	52	0.002
PR54	38	0.023	26	0.25	40	0.002
HC36/19 - 2	51	0.023	37	0.094	51	0.002
HC3/20 (T)	49	0.023	37	0.094	52	0.002
HC3/20 (NT)	50	0.023	37	0.19	52	0.002
C103	40	0.032	33	0.75	40	0.002
C46	43	0.032	6	>256	45	0.002
EQ13	36	0.19	33	0.5	46	0.002
Elliot2	40	0.032	6	>256	41	0.002
EQ5	45	0.032	31	0.5	43	0.002
H11	48	0.032	32	0.38	45	0.002
HC11/18	41	0.032	28	0.75	45	0.002
HC13/18	43	0.032	6	>256	43	0.002
HC14/18	43	0.032	30	0.25	45	0.002
HC16/18	42	0.032	30	0.032	41	0.002
HC18/15	40	0.032	32	0.75	40	0.002
HC26/19	51	0.032	6	>256	46	0.002
HC29/19	37	0.032	38	0.032	47	0.002
HC31/19	46	0.032	6	>256	50	0.002
HC39/19	42	0.032	35	0.25	45	0.002
HC44/15	36	0.032	33	0.25	43	0.002
HC49/19	42	0.032	6	>256	45	0.002
HC52	46	0.032	31	0.5	47	0.002
HC67	38	0.032	31	1	41	0.002
PO43623	41	0.032	32	0.5	40	0.002
R1/20	44	0.032	29	0.75	44	0.002
R12/18	43	0.032	30	0.75	45	0.002
UN1/17	43	0.032	6	>256	41	0.002
Z11	38	0.032	28	0.38	40	0.002
C100	33	0.047	6	>256	47	0.002
FF48	40	0.047	6	>256	40	0.002
HC1/18	40	0.047	6	>256	40	0.002
HC10/18	40	0.047	28	0.5	41	0.002

HC24/19	42	0.19	30	0.75	39	0.002
HC17/18	45	0.047	31	0.19	43	0.002
HC2/18	41	0.047	6	>256	40	0.002
HC4/18	42	0.047	6	>256	42	0.002
HC58	36	0.047	37	0.75	47	0.002
HC8/19	42	0.047	6	>256	40	0.002
HC9/19	39	0.047	6	>256	38	0.002
HC1/17	33	0.047	6	>256	45	0.002
PO53033	43	0.047	32	0.5	43	0.002
R3/19	45	0.047	32	0.5	49	0.002
S/I	41	0.047	27	1	15	3
SS148	52	0.047	6	>256	45	0.002
SS149	43	0.047	6	>256	40	0.002
Tico	39	0.047	6	>256	43	0.002
UN/20	48	0.047	36	0.125	49	0.002
Sagui	31	0.047	21	0.25	45	0.002
Aquiles	40	0.064	28	0.75	42	0.002
HC42/19	41	0.19	23	0.25	42	0.002
Bella	41	0.064	26	0.75	41	0.002
C52	48	0.064	32	0.5	47	0.002
HC15/18	49	0.064	6	>256	40	0.002
HC3/18	38	0.064	26	1.5	41	0.002
HC3/19	39	0.064	25	2	38	0.002
HC51/18	44	0.19	35	0.75	48	0.002
HC36/19	44	0.064	32	0.38	45	0.002
HC47/19	41	0.064	31	1	44	0.002
HC52/19	42	0.19	30	0.5	43	0.002
HC60/19	41	0.064	6	>256	43	0.002
HC62/19	32	0.064	27	1	43	0.002
Z14	43	0.064	27	0.075	6	>32
Z30	42	0.064	27	0.75	40	0.002
HC6/19	45	0.25	6	>256	39	0.002
HC23/18	40	0.094	30	0.19	40	0.002
HC25/15	41	0.094	29	0.5	44	0.002
HC62	38	0.094	32	0.25	40	0.002
ICC45	39	0.094	34	1	42	0.002
HC7/18	45	0.25	6	>256	43	0.002
C96	44	0.125	30	0.75	45	0.002
FV33	39	0.125	30	0.38	44	0.002
HC39/18	50	0.125	6	>256	45	0.002
HCC8	45	0.047	34	0.25	42	0.002
R6/18	38	0.125	29	0.75	43	0.002
HC26/15	41	0.19	30	0.75	44	0.002

HC8/18	39	0.19	27	1	39	0.002
S59	43	0.19	36	0.5	43	0.002
R10/18-3	46	0.25	27	1.5	47	0.002
LND5	23	12	40	0.5	51	0.002
HC22/19	25	2	6	>256	41	0.002
Lucy	36	0.125	6	>256	46	0.002
F12	29	0.75	6	>256	47	0.002
ZOO5	31	0.5	6	>256	6	>32
C53	19	1	30	0.38	44	0.002
HC1/19	28	0.5	6	>256	6	>32
C106	28	1.5	6	>256	46	0.002
HC14	23	1.5	6	>256	41	0.002
Pb01	28	0.5	6	>256	6	>32
R15/18	35	0.5	6	>256	6	>32
H5	19	16	6	>256	50	0.002
HC22/15	25	2	6	>256	45	0.002
HC53/18	12	2	28	0.016	31	0.002
HC41/19	32	1.5	6	>256	45	0.002
JT1	24	3	6	>256	6	>32
154860	24	4	6	>256	6	>32
EQN1/2016	22	4	6	>256	6	>32
F031	22	4	25	1	6	>32
PB	19	4	6	>256	49	0.002
SS154	39	0.125	33	0.5	42	0.002
R10/18-1	19	4	6	>256	44	0.002
1376	17	6	6	>256	42	0.002
727/15-1	23	6	6	>256	38	0.002
H1	22	6	6	>256	46	0.002
JT12	23	6	6	>256	6	>32
HC2/20	20	8	6	>256	44	0.002
HC47/18	20	12	6	>256	43	0.002
1486/16	10	16	31	0.38	42	0.002
HC15	10	24	6	>256	6	>32
HC53/19	18	32	6	>256	6	>32
HC4/19	12	96	6	>256	6	>32
HCD3-1/21	17	3	8	24	32	0.002
HCD6/21	37	0.125	21	1.5	40	0.002
HCD9/21	40	0.125	29	0.19	40	0.002
HCD16/21	37	0.19	6	>256	43	0.002
HCD17/21	29	0.125	25	0.25	40	0.002
HCD21/21	29	0.125	21	1	36	0.002
HCD28/21	32	0.25	24	0.75	37	0.002
HCD29/21	41	0.125	22	1.5	53	0.002

HCD33/21	36	0.125	6	>256	44	0.002
M103	28	0.047	28	0.047	33	0.002
HCD43/21	11	16	30	0.25	32	0.002
HCD45/21	25	0.094	42	0.125	39	0.002
HCD49/21	40	0.19	6	>256	41	0.002
HCD51/21	28	0.19	28	0.38	35	0.002
HCD52/21	48	0.094	22	0.38	35	0.002
HCD24/21	40	0.125	29	0.125	47	0.002
ABS44A	41	0.19	22	1	53	0.002
B33-2	15	32	6	>256	45	0.002
HCD27/21	21	0.75	6	>256	55	0.002
HCD44/21	43	0.125	6	>256	53	0.002
HCD31/21	42	0.064	33	0.25	16	2
HCD56/21	50	0.094	34	0.125	20	1.5
AB39	23	1.5	6	>256	6	>32
AB21	23	1	6	>256	6	>32
AB61	20	4	6	>256	6	>32
AB63	20	3	6	>256	6	>32
AB64	21	2	6	>256	6	>32
AB92	6	32	6	>256	6	>32
AB160	19	16	6	>256	6	2
AB172	6	32	6	>256	19	>32
AB179	11	48	6	>256	26	1.5
HCD53/21-T	43	0.064	26	1	54	0.002
HCD53/21-NT	45	0.047	33	0.125	20	2
HCD1/22	35	0.125	21	0.75	41	0.002
HCD15/21-T	38	0.064	36	0.094	48	0.002
ABS72B	45	0.032	43	0.094	48	0.002
ABS43A	37	0.125	33	0.25	17	6