



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE BIOMEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CECÍLIA LEITE COSTA

***Clostridium difficile*: INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
CEPAS ISOLADAS DE PACIENTES COM DIARREIA INTERNADOS EM UM
HOSPITAL ONCOLÓGICO DE FORTALEZA, CEARÁ**

FORTALEZA

2014

CECÍLIA LEITE COSTA

***Clostridium difficile*: INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
CEPAS ISOLADAS DE PACIENTES COM DIARREIA INTERNADOS EM UM
HOSPITAL ONCOLÓGICO DE FORTALEZA, CEARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Bacteriologia Médica.

Orientador: Prof^ª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C871c Costa, Cecília Leite.
Clostridium difficile: incidência da infecção e caracterização das cepas isoladas de pacientes com diarreia internados em um hospital oncológico de Fortaleza, Ceará./ Cecília Leite Costa. – 2014. 78 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal.
Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.
1. *Clostridium difficile*. 2. Diarreia. 3. Pacientes Internados. 4. Serviço Hospitalar de Oncologia.
I. Título.

CDD 616.3427

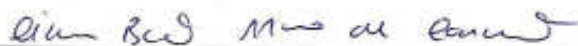
CECÍLIA LEITE COSTA

***Clostridium difficile*: INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
CEPAS ISOLADAS DE PACIENTES COM DIARRÉIA INTERNADOS EM UM
HOSPITAL ONCOLÓGICO DE FORTALEZA, CEARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Bacteriologia Médica.

Aprovada em: 13/11/2014.

BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Dra. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de aprendizado e formação profissional.

Ao Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, que proporcionou a realização desse estudo.

A CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos meus pais pelo carinho, apoio e incentivo em todos os meus projetos.

Ao meu marido, Príncipe (Tarcísio Pimentel), meu companheiro e amigo, por todo o apoio, compreensão e por sempre acreditar na minha capacidade profissional.

Ao meu irmão Diego Costa, a minha cunhada Vanessa Costa e minha sobrinha Bellinha pela amizade e companheirismo de todas as horas.

A Prof^a Cibele Carvalho pela excelente orientação, dedicação e conselhos dados. E como já havia dito é um exemplo de ética e profissionalismo pra mim.

A Prof^a Gerly Anne por ser tão acessível, amável e sempre acreditar e incentivar o meu trabalho com sugestões para a realização e melhoria do estudo.

As professoras participantes da banca examinadora Prof^a Tereza Bandeira e Prof^a Regina Domingues pelo tempo dedicado ao meu estudo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas que somaram conhecimentos na minha vida.

Ao Olavo Moraes pela amizade e pela colaboração para a realização desse estudo.

A Janice Oliveira e Catarina Reis, amigas que ganhei para a vida toda, desde que entrei no laboratório, agradeço por todo apoio e companheirismo.

Aos colegas da turma de mestrado, principalmente Eliclécio Rodrigues e Gláucia Guedes, pela amizade e por todos os momentos compartilhados durante todo o mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização desse estudo.

RESUMO

Clostridium difficile é um bacilo Gram positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos e produtor de toxinas. Atualmente, representa a principal causa de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos. Pacientes oncológicos são um dos principais grupos de risco para infecção por *C. difficile* (CDI), visto que o uso de agentes quimioterápicos pode alterar a mucosa intestinal. Além disso, estes pacientes normalmente são imunodeprimidos e frequentemente utilizam antibióticos de largo espectro. Tendo em vista a patogenicidade do *C. difficile* e a importância da doença induzida por essa bactéria em ambiente hospitalar este estudo visou determinar a incidência e caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes oncológicos internados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará. Durante o período de 12 meses (maio/2013 a maio/2014) foram coletadas 41 amostras de fezes diarreicas. Toxinas A e/ou B foram detectadas a partir das fezes por meio de um kit de detecção comercial ELISA. Em seguida, as amostras foram cultivadas em Agar Cicloserina, Cefoxitina, Frutose (CCFA) e incubadas em anaerobiose. As cepas isoladas foram processadas e realizadas identificação fenotípica e análise de detecção dos genes das toxinas e do fragmento do gene *tpi* (identificação definitiva) por PCR convencional. A sensibilidade das cepas isoladas a 12 antimicrobianos foi determinada por meio de *E-test*. Também foi realizado a genotipagem das cepas por meio da análise molecular PFGE. 46,3% (19/41) das amostras foram positivas para presença das toxinas A/B por ELISA e/ou cultura do *C. difficile*. Dessas amostras, foram isolados *C. difficile* de três amostras (15,8% - 3/19). Em todos os isolados foram detectados os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*. O domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) não foi detectado assim como também não foram observadas deleções no gene *tcdC* nos isolados. Todas as cepas apresentaram o mesmo genótipo, NAP4. Com relação à sensibilidade das cepas aos antimicrobianos foi verificada resistência a dois ou mais antimicrobianos (azitromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, ceftriaxona e cefotaxima). 57,9% (11/19) faziam uso de antibióticos e quimioterápicos. Este trabalho descreveu a incidência de CDI em pacientes oncológicos, e evidenciou pela primeira vez a presença de *C. difficile* em casos associados a comunidade (CA-CDI) nesses pacientes no Brasil, ressaltando a importância do estudo dessa bactéria para a compreensão da situação epidemiológica dessa infecção e de sua dispersão entre unidades hospitalares brasileiras.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*. CDI. Diarreia. Pacientes oncológicos.

ABSTRACT

Clostridium difficile is a strictly anaerobic, spore-forming, toxin-producing Gram positive bacillus. Currently, it is the main cause of nosocomial diarrhea associated with antibiotic use. Cancer patients are a major risk group for *C. difficile* infection (CDI), since the use of chemotherapeutic agents can alter the intestinal mucosa. Furthermore, these patients are often immunosuppressed and often use broad spectrum antibiotics. Considering the pathogenicity of *C. difficile* and the importance of this infection in hospitalized patients, this study aimed to determine the incidence and the phenotypical and genotypical characterization of strains of *C. difficile* isolated from cancer patients at Haroldo Juaçaba Hospital, Fortaleza, Ceará. During the 12 month period (May/2013 to May/2014) 41 diarrheic fecal samples were collected. Toxins A/B were detected from feces through a commercial ELISA detection kit. Then, the samples were cultivated on cefoxitine-cycloserine-fructose agar (CCFA) and incubated anaerobically. Isolates were submitted to several analyses, including phenotypical identification, detection of toxin genes and of a fragment of the *tpi* gene (definitive identification) by conventional PCR. The susceptibility of the strains to 12 antimicrobial agents was determined by E-test. Genotyping of the strains was also performed through molecular PFGE analysis. Out of 41 samples, 46.3% (19/41) were positive for either one or both of the performed tests: detection of toxin A/B and/or culture of *C. difficile*. *C. difficile* was recovered from three samples (15.8% - 3/19). The *tpi*, *tcdA* and *tcdB* genes were detected in all of the isolates. The binding domain of the binary toxin (*cdtB*) was not detected as well as no deletions were observed in the *tcdC* gene of the analysed isolates. All strains belonged to the same genotype, NAP4. Regarding the antimicrobial susceptibility of the strains, resistance to two or more antibiotics (azithromycin, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, ceftriaxone and cefotaxime) was observed. Out of the 19 positive patients, 57.9% (11/19) were using antibiotics and under chemotherapy. This paper describes the incidence of CDI in patients with cancer, and shows for the first time the detection of community-associated *Clostridium difficile* infection (CA-CDI) in those patients in Brazil, highlighting the importance of studying this bacterium for understanding the epidemiological situation of this infection and its spread among Brazilian hospitals.

Keywords: *Clostridium difficile*. CDI. Diarrhea. Cancer patients.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Coloração de Gram de cepa de <i>Clostridium difficile</i> isolada a partir de fezes de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba para a visualização dos esporos subterminais (Aumento 1000x).....	17
Figura 2 –	Colônias de <i>Clostridium difficile</i> isoladas em meio CCFA.....	18
Quadro 1 –	Características chave para identificação de <i>Clostridium difficile</i>	18
Figura 3 –	Lócus de patogenicidade (PaLoc) contém os genes que codificam as toxinas A e B.....	21
Figura 4 –	Lócus CdtLoc contém os genes que codificam a toxina binária (CDT).....	22
Figura 5 –	Patogênese da infecção por <i>Clostridium difficile</i>	23
Quadro 2 –	Recomendações para o tratamento de CDI.....	28
Quadro 3 –	Incidência da infecção por <i>Clostridium difficile</i> em pacientes hospitalizados no Brasil (2000-2014).....	34
Figura 6 –	Pulsotipos de <i>C. difficile</i> isolados de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Faixa etária dos pacientes estudados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).....	44
Tabela 2 – Caracterização das cepas de <i>C. difficile</i> isoladas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).....	45
Tabela 3 – Antibióticos prescritos aos pacientes internados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).....	46
Tabela 4 – Quimioterápicos utilizados pelos pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).....	47
Tabela 5 – Diagnóstico oncológico dos pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).....	48
Tabela 6 – Comorbidades associadas aos pacientes com CDI do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).....	49
Tabela 7 – Causa da internação dos pacientes participantes da pesquisa do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
ATCC	do inglês “American Type Culture Collection”
BAK	Agar Brucella suplementado com sangue e vitamina K
BHI	do inglês “Brain Heart Infusion” (Infusão de cérebro e coração)
BI	Tipo por análise de fragmentos gerados por endonucleases de restrição
CA-CDI	do inglês “Community Acquired – CDI” (CDI associada a comunidade)
CCCNA	do inglês “Cell Culture Cytotoxicity Neutralization Assays” (Ensaio de neutralização de citotoxicidade em cultura celular)
CCFA	do inglês “Cycloserine, Cefoxitin, Fructose Agar” (Agar Cicloserina Cefoxitina Frutose)
CDAD	do inglês “ <i>Clostridium difficile</i> associated diarrhea” (diarreia associada a <i>C. difficile</i>)
CDI	do inglês “ <i>Clostridium difficile</i> infection” (infecção por <i>C. difficile</i>)
CDT	Toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtA</i>	Gene que codifica a subunidade enzimática A da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtA	Proteína correspondente à subunidade enzimática A da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtB</i>	Gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtB	Proteína correspondente à subunidade ligante B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtLoc	Região gênica que codifica a toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtR</i>	Gene que codifica o regulador positivo da expressão das subunidades A e B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Colite pseudomembranosa
EDTA	do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid” (Ácido etilenodiamino tetraacético)
EIA	do inglês “Enzyme immunoassay” (Imunoensaio enzimático)
FAB	do inglês “Fastidious Anaerobe Broth” (Caldo para Anaeróbios Fastidiosos)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa
GDH	Glutamato desidrogenase
GTPases	Guanosinas trifosfatases
HMP	do inglês “Human <i>Microbiome</i> Project” (Projeto Microbioma Humano)
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MetaHIP	do inglês “Metagenomics of the Human Intestinal Tract” (Metagenômica do Trato Intestinal Humano)
NAATs	do inglês “Nucleic Acid Amplification Methods” (Métodos de Amplificação do ácido nucleico)
NAP	do inglês “North American Pulsotype” (Pulsotipo Norte Americano)
NML	National Microbiology Laboratory
ONA	Organização Nacional de Acreditação
PaLoc	do inglês “Pathogenicity locus” (Locus de Patogenicidade)
pb	Pares de bases
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
PFGE	do inglês “Pulsed-field Gel Electrophoresis” (Eletroforese de Campo Pulsado)
SHEA/IDSA	Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) / Infectious Diseases Society of America (IDSA)
SlpA	do inglês “Surface layer protein A” (Proteína de camada superficial A)
<i>SmaI</i>	Enzima de restrição do tipo II
TBE	Tris/Borato/EDTA
<i>tcdA</i>	Gene que codifica a enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
TcdA	Proteína correspondente à enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdB</i>	Gene que codifica a enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
TcdB	Proteína correspondente à enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdC</i>	Gene que codifica o regulador negativo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por <i>C. difficile</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- tcdE* Gene que codifica uma proteína responsável pela liberação extracelular das enterotoxinas A e B produzidas por *C. difficile*
- tcdR* Gene que codifica o regulador positivo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por *C. difficile*
- TE Tris-HCl e EDTA
- TNF- α do inglês “*Tumor necrosis factor alpha*” (Fator de necrose tumoral alfa)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Características gerais de <i>Clostridium difficile</i>	15
2.1.1	<i>Histórico de C. difficile</i>	15
2.1.2	<i>Classificação taxonômica, morfológica e fisiológica de C. difficile</i>	16
2.2	Fatores de virulência de <i>Clostridium difficile</i>	18
2.3	Patogenicidade do <i>Clostridium difficile</i>	23
2.4	Aspectos clínicos da CDI.....	24
2.4.1	<i>Transmissão e Manifestação clínica</i>	24
2.4.2	<i>Diagnóstico</i>	26
2.4.3	<i>Tratamento</i>	28
2.5	Fatores de riscos da CDI.....	29
2.6	Epidemiologia de <i>Clostridium difficile</i> e CDI (<i>Clostridium difficile infection</i>)....	32
3	HIPÓTESES.....	35
4	OBJETIVO GERAL.....	36
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6	MATERIAIS E METODOS.....	37
6.1	Delineamento do estudo.....	37
6.2	Local de realização.....	37
6.3	Critérios de inclusão e coleta dos espécimes clínicos.....	37
6.4	Detecção de toxinas de <i>Clostridium difficile</i> em amostras fecais.....	38
6.5	Exames parasitológico e bacteriológico em amostras fecais.....	38
6.6	Isolamento de <i>Clostridium difficile</i> a partir de amostras fecais.....	39
6.7	Identificação presuntiva dos isolados de <i>C. difficile</i>	39
6.8	Identificação definitiva dos isolados de <i>C. difficile</i>	40
6.9	Extração do DNA genômico bacteriano de <i>C. difficile</i>	40
6.10	Detecção de genes das toxinas (<i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtB</i> e <i>tcdC</i>).....	40
6.11	Tipificação mediante eletroforese de campo pulsado (PFGE - Pulsed-field Gel Electrophoresis).....	41
6.12	Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	42
6.13	Correlação entre os dados clínicos e epidemiológicos com os resultados bacteriológicos.....	42
6.14	Análise estatística dos dados.....	42

7	RESULTADOS	44
8	DISCUSSÃO	50
9	CONCLUSÃO	55
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	56
	APÊNDICE	68
	ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é um bacilo Gram positivo anaeróbico estrito, formador de esporos e produtor de toxinas (KHAN *et al*, 2012). Foi isolado pela primeira vez em 1935 e a partir da década de 1970 foi identificado como o agente etiológico da colite pseudomembranosa. Entretanto, estudos têm relatado que infecções por *C. difficile* podem variar desde a forma assintomática à limitada diarreia leve e aquosa, a colite pseudomembranosa, colite fulminante e morte (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Atualmente, infecções por *C. difficile* (CDI – *Clostridium difficile* infection) representam a causa mais importante de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos, com uma crescente incidência de mais de 250 mil casos/ano e com um gasto anual estimado em 3,5 bilhões de dólares nos EUA (DUBBERKE; WERTHEIMER, 2009; McGLONE *et al*, 2012).

Na Europa a incidência de *C. difficile* em pacientes hospitalizados varia de cerca de 6% em países como França e Bélgica a 20% na Eslovênia e Bulgária (BAUER *et al.*, 2011). Já na América Latina alguns países como Brasil, Argentina, Chile e México apresentam esses percentuais bem elevados comparados aos da Europa, aproximadamente 45% em um estudo no Brasil (MARCON; GAMBA; VIANNA, 2006). Na Costa Rica esses percentuais, segundo alguns estudos, já atingiram cerca de 30% (ZUMBADO-SALAS *et al.*, 2008; BALASSIANO *et al*, 2012).

Alguns fatores predisponentes estão envolvidos no desenvolvimento das CDI como o desequilíbrio da microbiota intestinal normal causado geralmente pelo uso de antibióticos de largo espectro, exposição ao *C. difficile* que ocorre habitualmente no ambiente hospitalar e condições de risco do hospedeiro principalmente, idosos e imunodeprimidos (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; PREDRAG *et al*, 2012).

Diversos fatores de virulência do *C. difficile* contribuem para a colonização e o desenvolvimento de infecção, como flagelos, enzimas proteolíticas, esporos e resistência a antibióticos, mas o principal e mais estudado fator de virulência são as toxinas produzidas por algumas cepas (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; KHANNA; PARDI, 2012).

A maioria das cepas toxigênicas do *C. difficile* produzem ambas as toxinas, toxina A, uma enterotoxina, e a toxina B, uma potente citotoxina (CARROLL; BARTLETT, 2011).

Além da produção de toxinas A e B, algumas cepas de *C. difficile* podem produzir uma terceira toxina chamada toxina binária CDT (ADP-ribosiltransferase específico para actina) (CARROLL; BARTLETT, 2011).

Evidências mostram que o surgimento de uma nova cepa hipervirulenta, caracterizada como pulsotipo NAP1 (*North American Pulsotype I*) ou BI (*Restriction enzyme a analysis type*) ou PCR ribotipo 027 (NAP1/BI/027), está ligado ao aumento da incidência e da gravidade de infecções por *C. difficile* (McDONALD *et al*, 2005; WARNY *et al*, 2005).

Essa cepa tem sido identificada em diversos países, sendo os primeiros os Estados Unidos e Canadá (McDONALD *et al*, 2005; WARNY *et al*, 2005). Várias características encontradas em NAP1/BI/027 podem contribuir para sua hipervirulência, incluindo polimorfismos no gene regulador negativo, *tcdC*, aumentando a produção das toxinas A e B, presença dos genes que codificam a toxina binária (*ctdA* e *ctdb*) e elevado nível de resistência a fluoroquinolonas (McDONALD *et al*, 2005; WARNY *et al*, 2005). Além disso, recentes análises comparativas do genoma inteiro da NAP1/BI/027 têm demonstrado uma série de rearranjos genéticos. Esses múltiplos mecanismos que *C. difficile* tem para modificar o seu conteúdo genético podem oferecer novas pistas sobre por que NAP1/BI/027 surgiu como um esforço global dominante (LESSA; GOULD; MCDONALD, 2012).

Esses múltiplos mecanismos e características das cepas de *C. difficile* fazem com que a incidência e a resistência das CDI em ambientes hospitalares sejam crescentes. Pacientes oncológicos são um dos grupos de risco a este tipo de infecção exigindo bastante atenção, visto que o uso de agentes quimioterápicos pode alterar a mucosa intestinal e provavelmente este é o fator mais importante que predispõe a CDI nesses pacientes. Além disso, esses pacientes são normalmente imunodeprimidos e frequentemente utilizam antibióticos de largo espectro, o que pode agravar o seu estado geral e comprometer a resposta à quimioterapia, constituindo risco de morte (KHAN *et al*, 2012).

Tendo em vista a patogenicidade do *C. difficile* e o papel dessa infecção na morbimortalidade em ambiente hospitalar, especialmente em pacientes imunossuprimidos, é evidenciada a importância de realizar um estudo aprofundado sobre a incidência e caracterização de cepas de *C. difficile* em pacientes com câncer de um hospital terciário de Fortaleza, permitindo um maior conhecimento da situação epidemiológica desta infecção e assim contribuir com a melhoria da qualidade de atenção a saúde no Estado do Ceará.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A microbiota intestinal age em sua maioria em benefício do hospedeiro, extraindo nutrientes e energia das dietas, e contribuindo para a função imune normal. O desequilíbrio entre a microbiota intestinal e o hospedeiro tem sido associado com obesidade, doenças inflamatórias intestinais, distúrbios neurológicos e câncer (DONSKEY, 2004; LOZUPONE *et al*, 2012). Entender como a microbiota intestinal afeta a saúde e doença requer uma mudança de foco de patógenos individuais para uma abordagem ecológica que considera a comunidade como um todo.

Projetos de grande escala, como o Metagenômica do Trato Intestinal Humano (MetaHIT) e o Projeto Microbioma Humano (HMP) têm contribuído para a compreensão da relação simbiótica entre micro-organismos do intestino e seu hospedeiro, caracterizando a microbiota de base saudável e as diferenças que estão associadas com a doença (LOZUPONE *et al*, 2012). No entanto, a complexidade da microbiota, e a variação entre indivíduos dificulta a definição de que este estado ideal pode estar dentro de uma população ou de um indivíduo (LOZUPONE *et al*, 2012).

A microbiota intestinal de adultos contém cerca de 10^{12} bactérias/g e mais de 100 espécies bacterianas pertencentes em sua maioria aos filos Bacteroidetes e Firmicutes. Essa microbiota normal tem um importante papel na defesa do hospedeiro, pois inibe a proliferação de micro-organismos patogênicos, como o *Clostridium difficile*, encontrado em 3% de adultos saudáveis e neonatos e em 15% a 25% dos indivíduos com exposição recente em ambiente hospitalar (DONSKEY, 2004; DUBBERKE; WERTHEIMER, 2009; SEKIROV *et al*, 2010).

2.1 Características gerais de *Clostridium difficile*

2.1.1 Histórico de *C. difficile*

Clostridium difficile foi descrito pela primeira vez por Hall e O'Tolle em 1935 a partir de um isolamento em fezes de recém nascidos. Devido à dificuldade encontrada no isolamento e na conservação desse micro-organismo em cultura pura, os autores o chamaram inicialmente de *Bacillus difficilis* e em seguida de *Clostridium difficile* devido as suas características morfológicas e fisiológicas.

Apenas em 1978 foi identificado como o agente etiológico da colite pseudomembranosa (CPM). Desde então passou a ser associado a quadros de infecções humanas (BARLETT *et al*, 1978; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

CPM tornou-se uma complicação comumente conhecida pelo uso de antibióticos no início de 1950 e o patógeno suspeito foi *Staphylococcus aureus*, já que tinha se tornado o agente infeccioso predominante em pacientes internados que receberam antibióticos (BARLETT, 2008).

Em 1974, em um estudo prospectivo de 200 pacientes tratados com clindamicina, foi detectada diarreia em 21% e colite pseudomembranosa em 10% (TEDESCO; BARTON; ALPERS, 1974). Em 1977, em estudos com modelos em hamsters, a toxina produzida por uma espécie de *Clostridium* foi proposta como a causa da diarreia induzida por clindamicina; mais tarde essa toxina foi isolada a partir de amostras de fezes dos pacientes, e apresentada como organismos causadores *Clostridium sordellii* e *C. difficile*, pois por meio de ensaios de citotoxicidade foi detectada a toxina B produzida por *C. difficile*, confirmando que os antibióticos são indutores do CPM, e confirmando a eficácia da vancomicina oral para o tratamento da infecção (BARTLETT *et al*, 1977; BARTLETT, 2008). Enquanto isso em outro estudo essa potente toxina citopática foi neutralizada com a antitoxina de *C. sordellii*, no entanto, as culturas de amostras de fezes dos hamsters deram negativo para essa bactéria (CHANG *et al*, 1978). E então em 1978, o *C. difficile* foi claramente identificado como o agente causal da colite associada a antibióticos (BARTLETT, 1978; ASLAM; HAMILL; MUSHER, 2005; BARLETT, 2008).

Recentemente as manifestações clínicas de *C. difficile* foram referidas como doença ou diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) e infecção por *C. difficile* (CDI). No entanto, o termo CDI é cada vez mais preferido na literatura científica internacional, principalmente porque CDAD é usado regularmente para diarreia associada ao *C. difficile*, tornando-se um termo que não cobre todo o espectro clínico da doença (SUETENS, 2008; COHEN *et al*, 2010).

2.1.2 Classificação taxonômica, morfológica e fisiológica de *C. difficile*

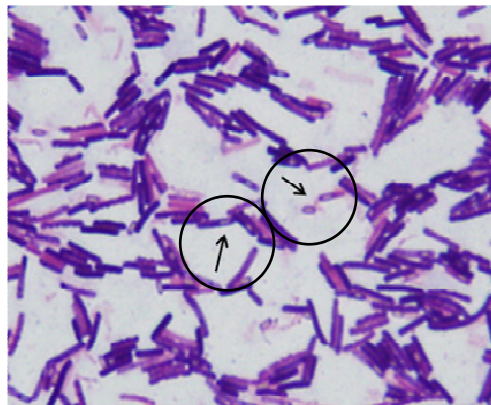
Pertencente à divisão Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales, família Clostridiaceae e gênero *Clostridium*, *C. difficile* é encontrado em diversos ambientes e já foi

isolado do solo, água, do conteúdo intestinal de diversos animais (cavalos, vacas, porcos), da vagina e uretra de seres humanos e das fezes de neonatos saudáveis (KONEMAN *et al*, 2008).

C. difficile é um bacilo relativamente grande (3-5 µm de comprimento), anaeróbio obrigatório, móvel, formador de esporos e em sua maioria produtor de toxinas (KONEMAN *et al*, 2008).

Na coloração de Gram, as bactérias apresentam-se como bastonetes Gram positivos, com esporos ovais subterminais (Figura 1) (JOUSIMIES-SOMER *et al*, 2002). A produção de esporos é uma resposta de defesa ao estresse físico ou químico ao qual o micro-organismo está exposto, e por isso pode ou não estar presente em uma cultura de *C. difficile*.

Figura 1: Coloração de Gram de cepa de *Clostridium difficile* isolada a partir de fezes de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba para a visualização dos esporos subterminais (Aumento 1000x).

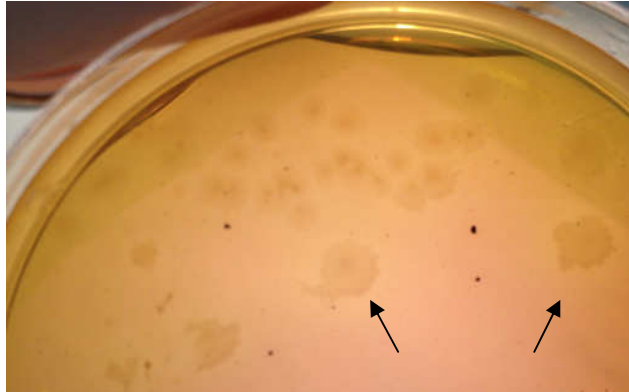


Fonte: Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Medicina, UFC, 2014.

A identificação de cepas de *C. difficile* pode ser obtida por meio de crescimento em ágar seletivo CCFA (Agar Cicloserina, Cefoxitina, Frutose), onde os antibióticos cicloserina (500 µg/mL) e cefoxitina (16 µg/mL) inibem o crescimento da maioria das bactérias, mas não do *C. difficile*. A frutose é metabolizada pelo *C. difficile* mais ativamente que a glicose e o vermelho neutro é usado como um indicador para detectar a proteólise do meio. As colônias de *C. difficile* quebram as proteínas no meio, o que resulta na produção de produtos finais alcalinos que se transformam de vermelho neutro a cor amarelada (JOUSIMIES-SOMER *et al*, 2002).

Então em CCFA, são identificadas colônias características com aproximadamente 2-4 mm de diâmetro, amareladas, aparência de “vidro moído”, circulares com bordas irregulares ligeiramente filamentosas (Figura 2) (JOUSIMIES-SOMER *et al*, 2002).

Figura 2 – Colônias de *Clostridium difficile* isoladas em meio CCFA.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Medicina, UFC, 2014.

A cultura de *C. difficile* apresenta fluorescência verde-amarela quando expostas a luz ultravioleta (JOUSIMIES-SOMER *et al*, 2002).

Algumas características chave para *C. difficile* consistem em ausência de produção de indol e catalase dentre outras como apresentado no Quadro 1 (KONEMAN *et al*, 2008; JOUSIMIES-SOMER *et al*, 2002).

Quadro 1 – Características chave para identificação de *Clostridium difficile*.

Características chave	<i>Clostridium difficile</i>
Anaeróbio estrito	+
Zona dupla de hemólise	-
Esporos subterminais	+
Motilidade	+
Reações em Agar diferencial	Indol, catalase, lipase e lecitinase negativas

(-) Ausência de determinada característica

(+) Presença de determinada característica

Fonte: Adaptado de KONEMAN *et al*, 2008.

2.2 Fatores de virulência de *Clostridium difficile*

Diversos fatores de virulência do *C. difficile* contribuem para a sua ação patogênica no organismo hospedeiro. Alguns fatores contribuem facilitando sua colonização, o que promove o desenvolvimento da infecção, e outros contribuem diretamente com a infecção.

Os principais fatores de virulência do *C. difficile* são:

Flagelos: A etapa de adesão é vista como um dos fatores iniciais para a colonização e desenvolvimento de uma infecção causada por um determinado patógeno.

Dentre os fatores que auxiliam no estabelecimento da infecção, o flagelo é uma importante estrutura multiuso que tem diversificado suas funções biológicas para favorecer a sobrevivência e colonização de bactérias (BABAN *et al*, 2013). Isso se deve ao fato do muco intestinal de diferentes animais e seres humanos servirem como um quimioatrato para *C. difficile* e para que o micro-organismo desenvolva o mecanismo de quimiotaxia é necessário que ele exerça motilidade (BORRIELLO, 1998). Embora nem todas as cepas de *C. difficile* apresentem flagelos em microscopia eletrônica, todas as cepas contêm e podem expressar os genes que codificam a flagelina, *fliC* e a proteína cap flagelar, *fliD*. Foi demonstrado que as cepas com flagelos resultam numa adesão dez vezes superior ao tecido cecal do rato do que as cepas sem flagelos (TASTEYRE *et al*, 2001).

Adesinas: Algumas adesinas são importantes no processo de aderência do *C. difficile*. Elas atuam na aderência a mucosa intestinal do hospedeiro, podendo induzir respostas inflamatórias e produção de anticorpos no hospedeiro. As proteínas de camada superficial (*S-layer proteins*) têm sido relacionadas a adesão e evasão imune, além de proporcionar a integridade estrutural para as células e agir como peneiras moleculares. Entre as proteínas de superfície do *C. difficile*, a mais estudada e importante é a proteína de camada superficial A (SlpA) que é a mais abundante proteína produzida na célula por estar presente em toda a superfície bacteriana. Esta proteína apresenta uma variabilidade considerável entre as cepas, como no caso de cepas de *C. difficile* BI/NAP1/027 em que alterações nessa proteína estão associadas ao aumento da adesão às células epiteliais intestinais humanas (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Cwp66 assim como a SlpA é uma importante adesina do *C. difficile* e juntamente com a SlpA partilham alguns genes que as codificam e apresentam homologia com o domínio de ancoragem de parede de célula de CwlB/LytC de *B. subtilis*, indicando que estes genes codificam proteínas associadas à superfície (KARJALAINEN *et al*, 2001).

Enzimas hidrolíticas: As bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium* produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas a fim de obter os nutrientes a partir de vários biopolímeros e assim promover o estabelecimento do micro-organismo em determinado ambiente, como por exemplo, *C. difficile* no intestino (MATSUSHITA; OKABE, 2001).

No entanto, muitas enzimas hidrolíticas produzidas por *Clostridium* patogênicos funcionam como fatores de virulência, promovendo a sua multiplicação e disseminação de

tecidos infectados ou potencializando a ação de toxinas através da facilitação de sua difusão. Entre as enzimas hidrolíticas do *C. difficile* as principais são a hialuronidase com atividade hidrolítica e a collagenase que facilita a sua translocação entre células (BORRIELLO, 1998; MATSUSHITA; OKABE, 2001).

Esporulação: Um elemento chave para o sucesso de *C. difficile* como patógeno é a sua capacidade para produzir esporos. Como outros esporos bacterianos, eles são metabolicamente dormentes, para sobreviver longos períodos, e são resistentes à tratamentos físicos e químicos (PAREDES-SABJA; SHEN; SORG, 2014). Portanto os esporos são resistentes à maioria dos desinfetantes e antibióticos, tornando-os difíceis de eliminar, tanto de hospedeiros humanos infectados como do ambiente. E como resultado, os esporos de *C. difficile* disseminam facilmente de pessoa para pessoa e causam altos índices de infecções recorrentes, o que pode levar a doenças graves ou mesmo a morte (FIMLAID *et al*, 2013).

Os sinais que estimulam a esporulação não são bem identificados, mas eles poderiam estar relacionados aos estímulos ambientais, como falta de nutrientes e outros fatores de estresse não identificados (PAREDES-SABJA; SHEN; SORG, 2014).

Os genes que codificam as proteínas dos esporos são dispersos ao longo do genoma bacteriano. As proteases e proteínas de resposta ao estresse que supostamente protegem os esporos do estresse oxidativo durante a germinação são abundantes, como também são as proteínas metabólicas. Proteínas de superfície expostas podem interagir com o ambiente extracelular e podem ser importante na adesão celular (por exemplo, proteína S-camada, *SlpA*) e germinação (CARROLL; BARTLETT, 2011). A capacidade de esporulação, que pode diferir entre as linhagens, pode ser um fator de virulência associado à propagação e persistência de cepas específicas (VEDANTAM *et al*, 2012).

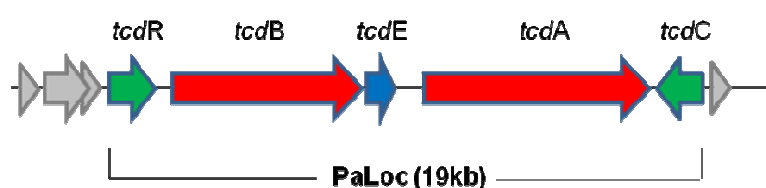
Toxinas: O principal e mais estudado fator de virulência de *C. difficile* é a produção de toxinas.

C. difficile produz dois tipos de toxinas: a toxina A (TcdA), a qual possui um efeito enterotóxico e citotóxico, e a toxina B (TcdB), a qual tem uma forte atividade citotóxica e estão entre as mais potentes toxinas bacterianas descritas como, por exemplo, as toxinas letal (TcsL) e hemorrágica (TcsH) do *Clostridium sordellii*, toxina alfa (TcnA) do *Clostridium novyi* e TpeL do *Clostridium perfringens* (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; CARTER; ROOD; LYRAS, 2010).

TcdA (308 kDa) e TcdB (270 kDa) são codificados em um locus de patogenicidade do cromossomo, o PaLoc que mede 19,6 kb (Figura 3). Este locus está

formado por cinco genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* e *tcdR*). Os genes *tcdA* e *tcdB* codificam as toxinas TcdA e TcdB, respectivamente. O gene *tcdR* atua como regulador positivo da expressão de *tcdA* e *tcdB*, enquanto que *tcdC* atua como regulador negativo, evitando a expressão de todo PaLoc. Finalmente, *tcdE* codifica uma holina que permite a liberação das toxinas por meio da permeabilização da parede celular (VOTH; BALLARD, 2005; JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

Figura 3: Lócus de patogenicidade (PaLoc) contém os genes que codificam as toxinas A e B.



Fonte: Adaptado de RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009.

Tanto TcdA como TcdB são citotoxinas com atividade glicosiltransferase, causando a ruptura das fibras do citoesqueleto de actina da célula alvo, que resulta em uma diminuição da resistência transepitelial, acumulação de líquido e destruição do epitélio intestinal (CARROLL; BARTLETT, 2011).

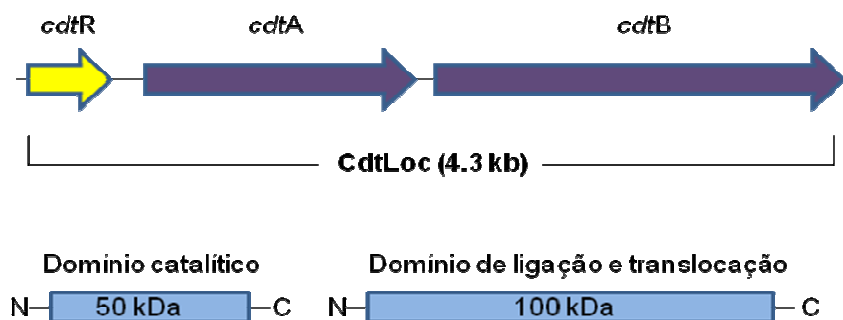
Após a ligação aos seus receptores as toxinas, são introduzidas nas células alvo por endocitose. Dentro destes endossomas, em um meio ácido, ocorre a digestão autoproteolítica pela região N-terminal (com o domínio catalítico) que se separa do resto da toxina. Aparentemente, apenas a região catalítica é liberada para o citosol e exerce sua função incorporando glicose a determinadas guanosinas trifosfatases (GTPases) como Rho, Rac e CDC42 (VOTH; BALLARD, 2005; JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007). Estas GTPases são responsáveis, dentre outras atividades, pela regulação de determinados processos de sinalização que estão envolvidos em funções relacionadas com a manutenção da barreira epitelial. As toxinas interferem diretamente no citoesqueleto celular, resultando da ruptura das junções oclusivas, além de induzir apoptose de células epiteliais (VOTH; BALLARD, 2005; JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

A apoptose de células epiteliais intestinais humanas (T84), ocorre por ativação da via extrínseca com ativação de caspase 8 e intrínseca com mudança do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de caspase 9, juntamente com

ativação de BID e de caspase 3 e 6. Tudo isso, ocorre secundariamente a inativação de Rho-GTPases (BRITO et al., 2002a). O resultado deste processo é a desestruturação da barreira epitelial, que por conseguinte, induz uma intensa reação inflamatória com produção de citocinas como TNF- α e interleucinas (IL-1 e IL-6), com consequente migração de neutrófilos, contribuindo para a resposta inflamatória típica de colite. Nesse sentido, a TcdA induz inativação de Rho e mudança da morfologia de neutrófilos humanos, com alteração de expressão de moléculas de adesão, favorecendo a adesão ao tecido o que possivelmente está envolvida na formação de pseudomembranas (BRITO et al., 2002b).

Além das toxinas A e B, algumas cepas são portadoras de uma transferase, denominada de toxina binária (CDT), formada por duas subunidades CDTa e CDTb, as quais são codificadas pelos genes *cdtA* e *cdtB*, respectivamente. Estes genes encontram-se em um locus específico do cromossomo, denominado CdtLoc, que também contém um gene regulador *cdtR*. A toxina binária é composta de duas proteínas desvinculadas, CdtA e CdtB. CdtB tem função de ligação e CdtA é um componente enzimático, conforme é apresentado na Figura 4 (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

Figura 4: Locus CdtLoc contém os genes que codificam a toxina binária (CDT).



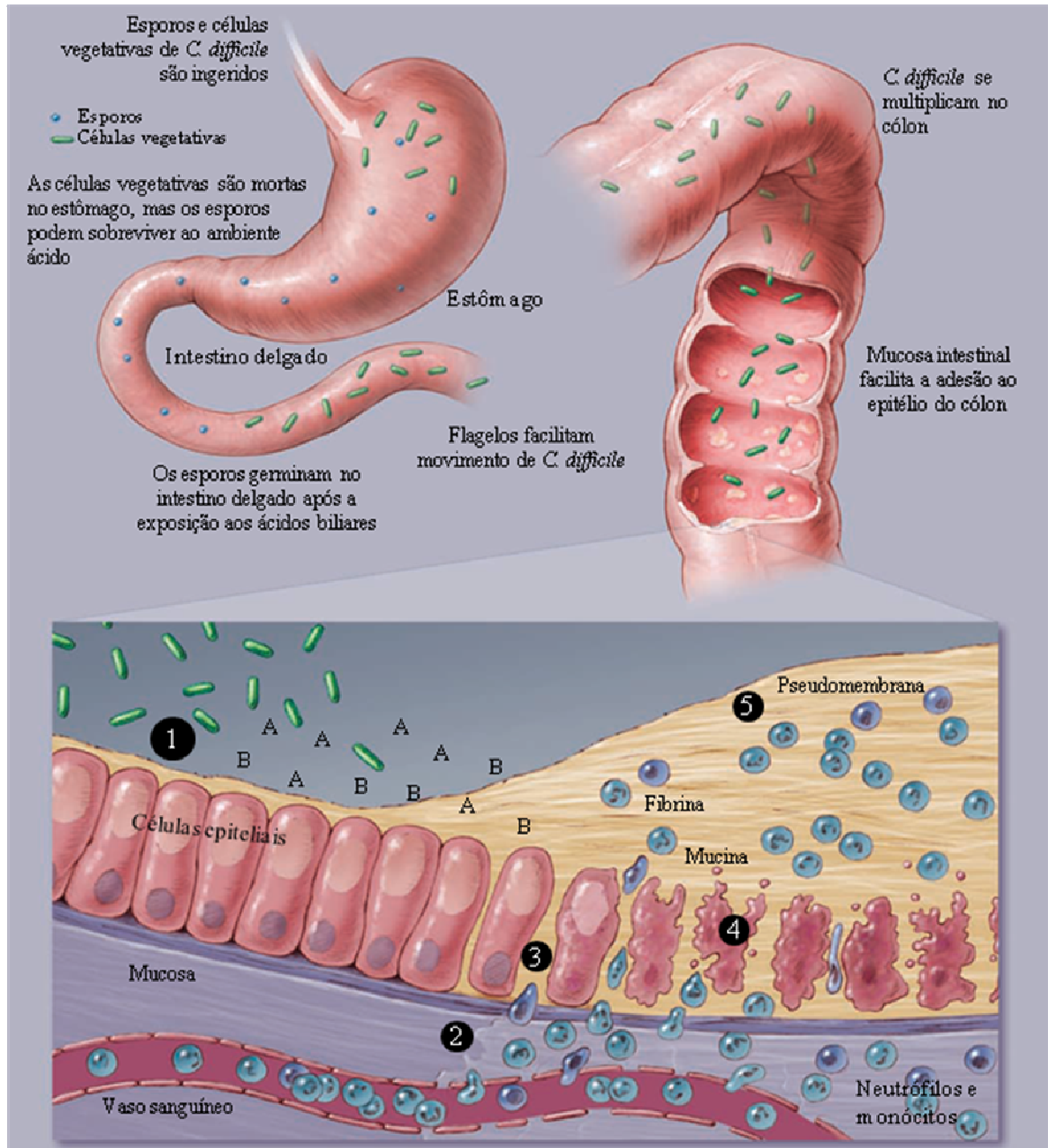
Fonte: Adaptado de RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009.

A toxina binária está associada a uma maior toxicidade da cepa, porque aumenta a adesividade e atua ao nível do citoesqueleto das células, induz a formação de novos microtúbulos finos, na superfície das células epiteliais, o que leva a um aumento da adesão do clostrídio cinco vezes *in vitro* e quatro vezes *in vivo*. Desta forma, as cepas portadoras de toxina binária estão associadas a uma maior virulência (CARROLL; BARTLETT, 2011; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

2.3 Patogenicidade do *Clostridium difficile*

A patogênese da infecção por *C. difficile* inicia com a ingestão de organismos vegetativos ou com esporos, como demonstrado na Figura 5.

Figura 5: Patogênese da infecção por *Clostridium difficile*.



Fonte: Adaptada de POUTANSEN; SIMOR, 2004.

O processo de patogênese inicia com a ingestão de *C. difficile*, tanto na sua forma vegetativa como em esporos. As células vegetativas são mortas no estômago devido a acidez,

mas os esporos podem sobreviver, e germinar no intestino delgado por meio da ação dos ácidos biliares. Em seguida, locomovem-se com auxílio de flagelos, multiplicam-se e aderem ao epitélio do cólon. Quando aderidas, as células vegetativas de *C. difficile* produzem toxinas A e B e enzimas hidrolíticas (1). As toxinas A e B agem quando são liberadas no lúmen intestinal e são internalizadas por endocitose, pelas células intestinais por meio de ligação aos receptores na lâmina basal. Dentro das vesículas endossômicas, cujo pH torna-se ácido por causa da fusão com lisossomos presentes no citoplasma, as toxinas sofrem clivagem autocatalítica, e os fragmentos contendo os sítios ativos migram para o citoplasma, onde exercem suas funções causando a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucinas pró-inflamatórias, aumentando a permeabilidade vascular, o recrutamento de monócitos e neutrófilos (2), abertura das junções de células epiteliais (3) e a apoptose de células epiteliais (4). A produção local de enzimas hidrolíticas leva a degradação do tecido conjuntivo, levando à formação de colite pseudomembrana (5) e diarreia aquosa. Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, agindo também em outros órgãos. (POUTANSEN; SIMOR, 2004; HOOKMAN; BARKIN, 2009).

2.4 Aspectos clínicos de CDI

2.4.1 Transmissão e Manifestação clínica

O principal modo de transmissão de *C. difficile*, resultando em doença, ocorre através da via fecal-oral, principalmente dentro de instalações hospitalares (COHEN *et al*, 2010).

Durante a colonização por cepas toxigênicas de *C.difficile*, os indivíduos podem se tornar portadores ou desenvolver doença com vários graus de gravidade, desde uma diarreia leve até à colite pseudomembranosa, sendo os portadores assintomáticos, assim como em todos os estágios da doença, um importante reservatório para a transmissão nosocomial de *C.difficile* (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Os pacientes com sintomas clínicos podem ser estratificados em doença leve a moderada, doença grave e doença fulminante. Esta estratificação é importante para determinar a necessidade de tratamento, o tipo de agente antimicrobiano que pode ser necessária para o tratamento, se a cirurgia é necessária para controlar a doença, e a necessidade de cuidados de suporte, como internação em unidade de terapia intensiva (BURNHAM; CARROLL, 2013).

A apresentação clínica mais comum da CDI é a diarreia associada a um histórico de uso de antibióticos. O início da diarreia é geralmente durante ou logo após o recebimento de antibioticoterapia, mas pode ocorrer a partir de alguns dias após o início ou até 8 semanas após o término da terapia. As fezes são geralmente aquosas, com um odor fétido característico, embora também possam ocorrer fezes pastosas, e a presença de sangue é rara (BARLETT; GERDING, 2008).

Em pacientes com doença leve a moderada, a diarreia é geralmente o único sintoma, com os pacientes apresentando até 10 evacuações por dia. Pacientes com doença moderada tem diarreia com evidência de colite e caracteriza-se por febre e cólicas abdominais. Alterações laboratoriais na doença leve e moderada incluem um nível leucocitose de 15.000 cel/ μ L ou inferior e um nível de creatinina sérica inferior a 1,5 vezes do nível pré-mórbido (BURNHAM; CARROLL, 2013).

Em geral, a febre ocorre em aproximadamente 28% dos casos, leucocitose em 50%, e dor abdominal em 22%. Febre alta com temperaturas por vezes chegando a 40 °C e a contagem de glóbulos brancos, aproximando-se 50.000 cel/ mm^3 podem estar presentes. Dor abdominal, quando ocorre, é normalmente localizada nos quadrantes inferiores. Hipoalbuminemia é o resultado das grandes perdas de proteína atribuídas ao vazamento de albumina e pode ocorrer precocemente no curso da doença (BARTLETT; GERDING, 2008; BURNHAM; CARROLL, 2013; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

Complicações graves de colite por *C. difficile* incluem desidratação, distúrbios eletrolíticos, hipoalbuminemia, megacólon tóxico, perfuração intestinal, hipotensão, insuficiência renal, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse e morte (COHEN *et al*, 2010).

Doença fulminante por *C. difficile* ocorre em < 5% dos pacientes, e é caracterizada por dor abdominal grave, diarreia profusa, ou por vezes sem diarreia, na qual o doente progride rapidamente para o desenvolvimento de um íleo ou megacólon tóxico, uma condição em que o cólon tenha uma distensão maior que 6 cm e corre o risco de perfuração. Este é um desenvolvimento sinistro e pode indicar a necessidade de cirurgia emergente. A contagem de leucócitos pode ser tão alta quanto 50.000 cel/ μ L ou superior (BURNHAM; CARROLL, 2013).

2.4.2 Diagnóstico

O diagnóstico da CDI baseia-se numa combinação dos critérios clínicos apoiado por exames laboratoriais: diarreia (três ou mais evacuações diariamente por mais de 24 horas) com nenhuma outra causa identificável e detecção da presença de toxinas A e/ou B nas fezes, ou a identificação de pseudomembrana no cólon por colonoscopia (RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

Vários exames de fezes estão disponíveis para diagnosticar uma CDI, incluindo cultura, ensaio de citotoxicidade celular, imunoenaios enzimáticos (EIAs), ensaio da glutamato desidrogenase e reação em cadeia da polimerase (PCR) (KHANNA; PARDI, 2012).

Cultura de *C. difficile* toxigênico baseia-se em isolar o organismo a partir de amostras fecais e determinar se o isolado recuperado é uma cepa produtora de toxina. O meio de cultura mais utilizado é Agar Cicloserina, Cefoxitina, Frutose (CCFA).

A cultura é hoje considerada por muitos como o padrão ouro para detecção de *C. difficile* em amostras fecais. As diretrizes SHEA/IDSA apoiam o uso da cultura toxigênica como padrão-ouro em estudos de comparação de métodos. No entanto, o tempo de resposta longo e um elevado custo limitam o seu uso na prática do dia a dia (COHEN *et al*, 2010; BURNHAM; CARROLL, 2013).

Ensaio de neutralização de citotoxicidade em cultura celular (CCCNA) é realizado por preparação de um filtrado de fezes, o qual é, então, aplicado sobre uma monocamada de uma linha celular apropriada e observado o efeito citopático depois de 24-48 horas. Em seguida, é realizada a neutralização com um antissoro, ou com antitoxina de *C. sordellii* ou com antitoxina de *C. difficile*. Diferentes linhagens de células foram utilizadas para este fim, tais como os fibroblastos diplóides humanos, as células Vero, células de McCoy e células Hep2 (BURNHAM; CARROLL, 2013).

CCCNA historicamente era considerada o padrão ouro. No entanto, atualmente a maioria dos especialistas considera que este método não tem a sensibilidade desejada para ser o padrão ouro em estudos de comparação de ensaios. As sensibilidades reportadas para CCCNAs são bastante variáveis (65 a 90%) e quando comparado ao cultivo de *C. difficile* toxigênico, CCCNA tem uma sensibilidade de aproximadamente 75 a 85% (BURNHAM; CARROLL, 2013).

Imunoensaios enzimáticos (EIAs) utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos contra antígenos das toxinas de *C. difficile*. Até muito recentemente, os EIAs para detecção de toxinas têm sido os ensaios mais utilizados em laboratórios clínicos devido a sua facilidade de uso e custos trabalhistas mais baixos para a detecção de *C. difficile*. Deve notar-se que, apesar de alguns dos primeiros ensaios detectarem exclusivamente a toxina A, atualmente recomenda-se que os ensaios detectem tanto a toxina A como a toxina B, por causa da presença de cepas toxigênicas que são negativas para toxina A (BURNHAM; CARROLL, 2013).

A sensibilidade destes testes é de 63% a 94%, com uma especificidade de 75% a 100%. Devido a essa baixa sensibilidade este método não é considerado a melhor maneira de fazer um diagnóstico de CDI (COHEN *et al*, 2010; BURNHAM; CARROLL, 2013).

Glutamato desidrogenase (GDH) é uma enzima produzida em elevados níveis em todos os isolados de *C. difficile*, incluindo cepas toxigênicas e não toxigênicas. Além disso, o GDH de *C. difficile* é conhecido por reagir de forma cruzada com a da *C. sordellii*. Portanto, GDH representa um teste de triagem para CDI e os ensaios positivos devem ser seguidos por um teste confirmatório, como um EIA ou um teste molecular para a detecção de genes de toxinas (BURNHAM; CARROLL, 2013).

A sensibilidade deste teste é de apenas 58%-68%. Além da baixa sensibilidade a utilização deste método não fornece nenhuma informação sobre a toxicidade da cepa de *C. difficile* nem realiza o isolamento do mesmo, o que seria útil para investigações epidemiológicas (COHEN *et al*, 2010).

Amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) para a detecção de *C. difficile* em amostras fecais começaram a aparecer na literatura no início de 1990. Estes ensaios iniciais utilizaram métodos de PCR convencionais e uma variedade de genes, incluindo *tcdA*, *tcdB*, e genes rRNA 16S e apresentaram uma sensibilidade significativamente melhor do que os métodos de cultura anaeróbica e CCCNAs (CARROLL; BARTLETT, 2011; BURNHAM; CARROLL, 2013).

Apesar dos benefícios e do aprimoramento dos ensaios moleculares na detecção de *C. difficile* em amostras fecais, por se tratar de uma técnica rápida, sensível e específica, inúmeras questões são levantadas em relação à sua utilidade clínica. Algumas destas preocupações são relacionadas com a biologia de *C. difficile* e como a detecção dos genes que codificam para as toxinas A e B se correlaciona com a expressão da toxina. Questões essas que podem ser esclarecidas realizando o cultivo de *C. difficile*. Portanto, mais dados sobre a

utilidade desta metodologia são necessários antes de ser recomendada como teste de rotina (COHEN *et al*, 2010; BURNHAM; CARROLL, 2013).

2.4.3 Tratamento

O portador assintomático, não necessita de tratamento e de diagnóstico exceto se houver evidência epidemiológica. Entre as principais medidas de tratamento de CDI que se deve realizar é sempre que possível, eliminar o antibiótico desencadeante. Outras medidas básicas incluem hidratação e evitar o uso de opiáceos e drogas que inibem o peristaltismo intestinal, pois escondem os sintomas e podem piorar a doença (RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

Os dois principais antibióticos utilizados para o tratamento de CDI são o metronidazol e vancomicina. Metronidazol tem sido geralmente recomendado para o tratamento de primeira linha de CDI, com vancomicina oral, sendo utilizada principalmente se o metronidazol for ineficaz ou se for contraindicado ou não bem tolerado pelo paciente (COHEN *et al*, 2010).

As recomendações de tratamento são baseadas em uma estratificação inicial da gravidade da doença com base em critérios clínicos e analíticos, como descrito no Quadro 2.

Quadro 2: Recomendações para o tratamento de CDI.

Definição clínica	Dados clínicos	Tratamento recomendado
Primeiro episódio leve ou moderado	Leucocitose de 15.000 cel/ μ L ou mais baixas e um nível de creatinina sérica inferior a 1,5 vezes o nível pré-mórbido	Metronidazol, 500 mg, 3 vezes ao dia por via oral durante 10-14 dias
Primeiro episódio grave	Leucocitose de 15.000 cel/ μ L ou superior ou um nível de creatinina sérica maior ou igual a 1,5 vezes o nível pré-mórbido	Vancomicina, 125 mg, 4 vezes ao dia por via oral durante 10-14 dias
Primeiro episódio grave e complicado	Hipotensão ou choque e megacólon	Vancomicina, 500 mg, 4 vezes ao dia por via oral ou por sonda nasogástrica, além de metronidazol, 500 mg a cada 8 horas por via intravenosa
Primeira recorrência	-----	Mesmo para o primeiro episódio
Segunda recorrência	-----	

Fonte: Adaptado de COHEN *et al*, 2010.

Os mais difíceis desafios para o tratamento de uma CDI são a recorrência múltipla e a presença de casos complicados de doença fulminante ou grave. Pacientes com múltiplas recorrências de CDI normalmente respondem ao tratamento com vancomicina ou metronidazol, mas, em seguida, os sintomas de diarreia podem retomar dentro de dias ou semanas após o tratamento ser interrompido. Entre 20% e 50% destas recorrências são causadas por novas cepas de *C. difficile*, indicando reinfecção em vez de uma recaída da infecção original. No caso complicado de CDI grave, se o tratamento médico com fluidos intravenosos, vancomicina por via oral e intravenosa não é eficaz, a remoção cirúrgica do cólon pode ser a única solução (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Portanto novos agentes para o tratamento de recaída múltipla e fulminante CDI são necessários, e várias abordagens estão sob investigação, incluindo vacinas, agentes de ligação da toxina e anticorpos passivos, incluindo anticorpos monoclonais (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

O transplante da microbiota fecal (FMT) tem sido estudado como uma alternativa à terapia com antibióticos para tratar CDI recorrentes, sendo um tratamento capaz de reconstituir a homeostase microbiana normal e quebrar o ciclo de antibióticos que podem perturbar ainda mais o microbioma (KHANNA; PARDI, 2012; YOUNGSTER *et al*, 2014).

A restauração da microbiota do cólon ocorre com o uso de micro-organismos intestinais a partir de um doador saudável, via infusão de uma suspensão líquida ou inóculo congelado de fezes por sonda nasogástrica ou colonoscopia, em pacientes com CDI recorrentes (COHEN *et al*, 2010; YOUNGSTER *et al*, 2014).

2.5 Fatores de riscos de CDI

Diversos fatores de risco estão associados a CDI. Entre os principais envolvidos estão alteração da microbiota intestinal, exposição ao *C. difficile* e imunidade debilitada do hospedeiro.

Antibióticos: O principal fator de risco para a CDI é a exposição a antibióticos. Houve alguns relatos recentes de pacientes com CDI adquirida na comunidade, que não haviam sido expostos a antibióticos nos últimos três meses. No entanto, estes casos, não são frequentes em comparação com o número de pacientes internados com CDI em hospitais, ou que tenham sido expostos a um antibiótico dois ou três meses antes da infecção (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

A microbiota intestinal quando íntegra, impede eficazmente a colonização pelo *C. difficile*. Contudo, os antibióticos agem desestabilizando a microbiota normal do cólon, permitindo ao *C. difficile*, de origem exógena, se estabelecer, proliferar nesta região e provocar diarreia ou até caso grave de colite pseudomembranosa. E isso é possível devido ao fato de que o *C. difficile* é resistente a um grande número de antibióticos (PREDRAG *et al*, 2012).

Vários antibióticos têm sido associados com a subsequente CDI, mas alguns carregam um maior risco do que outros, incluindo beta lactâmicos (ampicilina e cefalosporinas), lincosamidas (clindamicina) e, mais recentemente, fluoroquinolonas (BLONDEAU, 2009).

Todas as fluoroquinolonas têm sido relacionadas, incluindo a levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina e ciprofloxacina. O aumento do risco associado a fluoroquinolona foi concomitante com o aumento da incidência da cepa hipervirulenta de *C. difficile* (BI/NAP1/027) e de outras cepas que carregam alto nível de resistência à esse antimicrobiano (OWENS *et al*, 2008; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Hospitalização: O ambiente hospitalar é considerado um dos mais importantes reservatórios e área de transmissão de esporos do *C. difficile*, isso se deve ao fato que nos hospitais, os pacientes estão expostos a um ambiente contaminado por esporos encontrados nas superfícies hospitalares e nas mãos dos profissionais de saúde facilitando a infecção por esse e outros micro-organismos (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Idosos e Co-morbidades: Idade é um fator de risco específico para a CDI. Um relatório apontou que 80% dos resultados positivos em estudos de detecção de *C. difficile* ocorreram em pacientes com mais de 65 anos. A resistência à colonização pode diminuir com o processo de envelhecimento, tais que a menor exposição a antibióticos resulta num microambiente propício no cólon a enterocolite (TASLIM, 2009).

O número desproporcional de idosos que têm doenças graves na unidade de cuidados intensivos, frequentes tratamentos prolongados de antibióticos, doenças subjacentes mais comuns e imunossupressão oferecem mais oportunidades para a colonização com *C. difficile* entre os idosos (TASLIM, 2009; DePESTEL; ARONOFF, 2013).

O aparente aumento de CDI em idosos pode ser visto de forma mais adequada como consequência da doença de base e não com relação apenas na idade. Doenças subjacentes que comprometem o sistema imunológico do hospedeiro devem ser vistas como

uma situação clínica que favorece a infecção por *C. difficile*, independentemente da idade do paciente (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Demais fatores: Além dos principais fatores de riscos (uso de antibióticos, hospitalização prolongada e idosos), outros fatores podem contribuir para adquirir CDI como inibidores de bomba de prótons ou antagonistas de receptores H2 da histamina como protetor gástrico, quimioterápicos, insuficiência renal, cirurgia gastrointestinal, doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa) e intubação nasogástrica (BLONDEAU, 2009).

O uso de inibidores de bomba de prótons e os antagonistas de receptores H2 da histamina aumentam o pH gástrico, favorecendo a colonização e a proliferação bacteriana no lúmen intestinal. Assim, o uso desses agentes associado ao uso de antibióticos potencializa o risco de desenvolvimento de *C. difficile* (LINSKY *et al*, 2010).

Pacientes cirúrgicos gastrointestinais normalmente têm preparo intestinal pré-operatório recebem antibióticos orais que são não absorvíveis, tem motilidade intestinal prejudicada, e nenhuma ingestão calórica por via oral durante o período pré-operatório. O uso imprudente continuado de antibióticos pós-operatório para fins preventivos presumidos, principalmente entre os idosos e os doentes que têm sonda nasogástrica ou outros tubos entéricos, parece ser uma receita para infecções evitáveis com *C. difficile* (TASLIM, 2009).

Pacientes oncológicos: Quimioterapia é outro fator de risco para a CDI que é, pelo menos em parte, mediada pela atividade antimicrobiana de vários agentes quimioterápicos, mas pode também estar relacionada com os efeitos imunossupressores de neutropenia (COHEN *et al*, 2010).

A incidência de CDI em pacientes com câncer que recebem quimioterapia foi relatado entre 2,3 a 7%, com 8,2 % dos casos desenvolvendo enterocolite grave. O primeiro caso de CDI associada à quimioterapia foi relatado em 1981, em um paciente com câncer de células embrionárias tratado com ciclos de cisplatina, bleomicina e vimblastina (KHAN *et al*, 2012).

Os mecanismos pelos quais a quimioterapia aumenta o risco de CDI estão relacionados com a alteração da flora intestinal e é provavelmente o fator predisponente mais importante da CDI. Outros fatores em pacientes com câncer incluem hospitalização prolongada, idade avançada, uso prolongado de antibióticos, principalmente cefepime e levofloxacina, os quais são epidemiologicamente associados a CDI. É desconhecido casos de câncer sozinho, sem quimioterapia, causar CDI (KHAN *et al*, 2012; HAN *et al*, 2013).

Os agentes quimioterápicos, tais como 5-FU e o metotrexato, podem induzir mucosite com necrose e descamação da mucosa, o que pode criar um ambiente adequado para a proliferação de *C. difficile* (KHAN *et al*, 2012).

Entre os pacientes com câncer a diarreia é comum e pode ser causada tanto pela quimioterapia como por CDI. O aparecimento de sintomas de CDI pode ocorrer imediatamente após o início de agentes quimioterápicos, ou pode demorar até 20 dias em média. Além disso, diarreia, febre, dor abdominal e desidratação comumente são vistos em pacientes pós-quimioterapia, mas também podem ser manifestações clínicas de CDI (KHAN *et al*, 2012; KRISHNA *et al*, 2013).

Nestes pacientes, as complicações relacionadas com a diarreia incluem graves desequilíbrios eletrolíticos, insuficiência renal, hipotensão grave, e até mesmo colapso circulatório e morte. Além disso, os distúrbios induzidos por diarreia (hipocalemia, hipomagnesemia) podem causar disfunção intestinal, o que tem sido implicado na patogênese de megacólon tóxico. Devido ao potencial para estas complicações com risco de morte, os padrões de atendimento para a diarreia grave incluem início imediato de antiperistálticos (com terapia anti-secretora, se necessário), e terapia de CDI de preferência, até que a resposta clínica seja adequada e haja a exclusão de CDI (KRISHNA *et al*, 2013).

2.6 Epidemiologia de *Clostridium difficile* e CDI (*Clostridium difficile* infection)

Clostridium difficile é a causa mais comum de diarreia infecciosa associada às unidades de saúde de cuidados agudos e crônicos (DUBBERKE; WERTHEIMER, 2009).

Atualmente, a infecção por *Clostridium difficile* é uma das principais causas de morbidade e aumento de custos de cuidados de saúde (BRITTON; YOUNG, 2014).

Em 2002, o custo anual associado com CDI nos EUA foi cerca de 1,3 bilhões de dólares. Em 2009, esse custo foi estimado em 3,4 bilhões de dólares. Embora haja variação sobre a carga econômica global atribuível à CDI, um dado consistente é que o custo estimado de saúde associados a um paciente internado que desenvolve CDI é de 33 a 54% maior do que de um paciente semelhante que não desenvolve essa infecção (ANANTHAKRISHNAN, 2011).

CDI tem sido tradicionalmente considerada como uma infecção adquirida em hospitais ou associada à assistência médica. Os pacientes da comunidade também estão em risco para CDI, embora a uma taxa consideravelmente mais baixa daqueles que estão

hospitalizados. No entanto, recentemente, relatórios sugerem que casos de CDI associada à comunidade (CA-CDI) (ou seja, casos em que o paciente não esteve internado em unidades de saúde nas últimas 12 semanas) são cada vez mais frequentes (KHANNA *et al*, 2012; DESHPANDE *et al*, 2013). Alguns estudos mostram que a incidência de CA-CDI é de um quarto dos pacientes internados diagnosticados com CDI (HENSGENS *et al*, 2012; KHANNA *et al*, 2012).

CA-CDI tem sido relatada em populações previamente descritas de baixo risco, como indivíduos jovens e mulheres grávidas (HENSGENS *et al*, 2012; KHANNA *et al*, 2012; DESHPANDE *et al*, 2013). Entre as fontes de contaminação possíveis para CA-CDI incluem solo, água, carnes, legumes e animais de estimação (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

A partir do ano 2000 houve um aumento de relatos de casos graves de CDI, apresentando mudanças tanto nas manifestações clínicas como na epidemiologia, além de descrições de novos fatores de riscos. Essa alta incidência de casos de CDI no mundo foi ocasionada devido ao surgimento de uma nova cepa hipervirulenta caracterizada como pulstotipo NAP1 ou BI ou ribotipo 027 (NAP1/BI/027) (FREEMAN *et al*, 2010).

A cepa hipervirulenta foi descrita pela primeira vez em 2005 por investigadores norte-americanos e canadenses (McDONALD *et al*, 2005; WARNY *et al*, 2005). Na Europa, foi relatada pela primeira vez na Inglaterra e logo depois na Holanda (BAUER *et al*, 2011). Já na América Latina, o primeiro isolamento da NAP1/BI/027 foi reportado na Costa Rica em 2009 (QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

Embora a cepa NAP1/BI/027 tenha sido associada com a atual epidemia de CDI, alguns países da Europa estão começando a verificar diminuições da prevalência desta cepa. No entanto, é provável que no futuro ocorra o surgimento de outras cepas de *C. difficile* capazes de causar epidemias (BAUER *et al*, 2011; LESSA; GOULD; MCDONALD, 2012).

O aumento da incidência e a gravidade de CDIs têm sido bem documentadas na última década em toda América do Norte e Europa (FREEMAN *et al*, 2010; BAUER *et al*, 2011; DePESTEL, ARONOFF, 2013). Enquanto isso, a conscientização e vigilância de CDI na América Latina permaneceram escassas. Pouco se sabe sobre os casos de CDI que ocorrem em países latino-americanos, apesar da diarreia ser uma das principais causas de morbidade nos países em desenvolvimento (BALASSIANO *et al*, 2012).

No Brasil há pouca informação sobre a incidência de CDI e a disseminação de *C. difficile*. Isso se deve em parte ao fato de que a detecção de bactérias anaeróbias não é um procedimento de rotina nos laboratórios clínicos em nosso país, principalmente devido à falta

de tecnologias e instalações para o seu cultivo e, portanto, contribuindo para a sub-notificação de CDI (BALASSIANO *et al*, 2009).

Além disso, existem poucos grupos de pesquisas em micro-organismos anaeróbios no país. A maioria dos estudos é realizada no Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre (BALASSIANO *et al*, 2012). Dentre esses estudos os percentuais de incidência de CDI variam de cerca de 10% a 40%, como apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 – Incidência da infecção por *Clostridium difficile* em pacientes hospitalizados no Brasil (2000-2014).

Localidade	Incidência de CDI	Nº de isolados de <i>C. difficile</i>	Ano	Referência
São Paulo	5,5% (10/181)*	5,5% (10/181)	2000-2001	Ferreira <i>et al</i> 2003
Rio de Janeiro	6,7% (14/210)*	6,7% (14/210)	----	Pinto <i>et al</i> 2003
São Paulo	44,7% (22/49)	-----	2002	Marcon <i>et al</i> 2006
Rio de Janeiro	28,5% (6/21)	4/6	2006-07	Balassiano <i>et al</i> 2009
Rio de Janeiro	19,7% (43/218)	4/43	2006-09	Balassiano <i>et al</i> 2010
Fortaleza	18,75% (3/16)	-----	1991-1993	Mesquita <i>et al</i> 2011
Rio de Janeiro	27.1% (19/70)	8/19	2008-2009	Balassiano <i>et al</i> 2011
Rio de Janeiro	6,8% (5/74)	4/5	2009-10	Secco <i>et al</i> 2014
Porto Alegre	8,3% (8/96)		2011-12	Pires <i>et al</i> 2014

* Incidência de CDI em crianças.

Tendo em vista a patogenicidade do *C. difficile* e a importância dessa bactéria no ambiente hospitalar é importante realizar um estudo sobre CDI em pacientes de risco, principalmente pacientes oncológicos, que recebem quimioterapia. Nestes pacientes há uma urgente necessidade do reconhecimento precoce e diagnóstico de CDI para a implementação de tratamento de CDI associada à quimioterapia. Além disso, este estudo poderá levar a um maior conhecimento da situação epidemiológica desta infecção em uma unidade de saúde de pacientes de risco em Fortaleza.

3 HIPÓTESES

1. Existe uma alta incidência de *Clostridium difficile* em pacientes oncológicos, apresentando diarreia e internados em um hospital de Fortaleza.
2. As cepas de *C. difficile* isoladas são toxigênicas produtoras das toxinas A e B.
3. As cepas toxigênicas de *C. difficile* pertencem aos genótipos NAP1, NAP4 e NAP11, comumente encontrados em ambientes hospitalares.
4. As cepas de *C. difficile* identificadas apresentam uma resistência aos antimicrobianos associados a CDI.

4 OBJETIVO GERAL

Determinar a incidência da infecção induzida por *Clostridium difficile* e caracterização fenotípica e genotípica das cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes oncológicos internados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar cepas toxigênicas de *Clostridium difficile* pela presença das toxinas A e B nas amostras de fezes diarreicas dos pacientes;
2. Isolar e identificar fenotipicamente cepas de *C. difficile*;
3. Detectar um fragmento do gene *tpi* de *C. difficile*;
4. Detectar os genes *tcdA* (toxina A), *tcdB* (toxina B), *cdtB* (toxina binária) e *tcdC* (regulador negativo do *PaLoc*) do *C. difficile*;
5. Tipificar as cepas isoladas por meio de genotipagem;
6. Traçar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos;
7. Correlacionar os dados clínicos com os resultados bacteriológicos.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Delineamento do estudo

Este é um estudo prospectivo, analítico e transversal, que foi realizado em um hospital de atendimento de pacientes com fator de risco para a doença associada ao *Clostridium difficile*. Os pacientes foram identificados clinicamente pela equipe médica do hospital e foram aplicados Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e Questionário (Apêndice B) para o paciente participar do estudo. Esse estudo faz parte do projeto intitulado “Isolamento, genotipagem e estudo comparativo da virulência de cepas de *Clostridium difficile* em pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará” submetido e aprovado pelo comitê de ética do Instituto do Câncer do Ceará (Anexo A) e financiado pela FUNCAP, nº de processo 12535679-0, referente a Chamada 03/2012 Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde PPSUS-REDE-MS/CNPq/FUNCAP/SESA.

6.2 Local de realização

O Hospital Haroldo Juaçaba é a primeira instituição filantrópica do Estado a receber Certificação Nível 1 de Acreditação Hospitalar emitido pela Organização Nacional de Acreditação – ONA. Esse hospital realiza por mês cerca de 20.000 atendimentos, dos quais aproximadamente 70% são prestados a pacientes provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS). Possui em sua estrutura 115 leitos e recebe aproximadamente 6.000 internações clínicas e cirúrgicas (INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ, 2014).

O processamento das amostras, com posterior isolamento e identificação bacteriana, foi realizado no Laboratório de Bacteriologia, Centro de Biomedicina da Faculdade de Medicina (UFC). As detecções dos genes do *C. difficile* e das toxinas foram executadas no Centro de Investigação em Enfermidades Tropicais e no Laboratório de Investigación en Bacteriología Anaerobia da Faculdade de Microbiologia na Universidad da Costa Rica.

6.3 Critérios de inclusão e coleta dos espécimes clínicos

A coleta dos espécimes clínicos foi realizada no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, durante o período de 12 meses (maio de 2013 a maio de 2014).

As amostras fecais diarreicas foram coletadas de pacientes hospitalizados, acima de 18 anos de idade, com câncer, que fizeram uso de quimioterápicos ou antibióticos nas últimas oito semanas antes do início do quadro diarreico. Pacientes com enteropatia causadora de diarreia crônica, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino curto foram excluídos da pesquisa assim como qualquer condição médica que pudesse comprometer a capacidade do paciente de participar do estudo.

Como critério para paciente com diarreia foi definido como três ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 horas ou em menos horas consecutivas (COHEN *et al*, 2010).

A coleta foi realizada a partir da evacuação espontânea de qualquer horário do dia, dentro de um frasco de coleta estéril com boca larga e uma tampa bem ajustada. A amostra foi transportada em um recipiente com gelo. O tempo decorrido entre a coleta e a semeadura não excedeu a seis horas ou então a amostra foi congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e analisada dentro de um prazo máximo de dois meses.

6.4 Detecção de toxinas de *Clostridium difficile* em amostras fecais

Toxinas A/B foram detectadas em amostras de fezes diarreicas através do kit de detecção comercial ProSpecT™ *Clostridium difficile* Toxin A/B Microplate (Remel®, Lenexa, KS, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

6.5 Exames parasitológico e bacteriológico em amostras fecais

Os exames parasitológico e bacteriológico foram realizados nas amostras de fezes positivas para *C. difficile*.

No exame parasitológico foram utilizados os métodos direto e Lutz para pesquisa de protozoários e helmintos (KONEMAN *et al*, 2008). O exame foi realizado no Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC.

No exame bacteriológico, a amostra foi inoculada diretamente em placas de ágar MacConkey para isolamento de bactérias entéricas. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. As colônias suspeitas foram identificadas por meio de coloração de Gram e provas bioquímicas (KONEMAN *et al*, 2008).

6.6 Isolamento de *Clostridium difficile* a partir de amostras fecais

Antes do cultivo das amostras fecais, as amostras passaram por um tratamento de choque com álcool. O tratamento de choque foi executado da seguinte maneira: 1 mL de fezes líquidas foi misturado em 1 mL de álcool à 96%, no caso de amostras semi sólidas, 1 g da amostra foi dissolvida em 1 mL de extrato de levedura estéril à 0,05% e em seguida adicionado, a solução, 1 mL de álcool à 96%. O experimento foi realizado em tubos de polipropileno de 15 mL estéreis.

Em seguida as fezes foram deixadas em repouso por 35 minutos à temperatura ambiente e então foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (álcool) foi descartado e o *pellet* semeado em placa de Petri contendo o meio CCFA (OXOID®) por meio de um *swab*. Em seguida as placas foram incubadas em anaerobiose por 72 horas a 37 °C. Para obtenção de anaerobiose foi utilizada jarra de anaerobiose (DIFCO®/OXOID®) e envelope gerador de anaerobiose (PROBAC®/OXOID®). Após a incubação as colônias características crescidas no CCFA foram examinadas.

O mesmo *swab* utilizado para semeio no meio de cultura CCFA foi inoculado em um tubo contendo 5 mL de caldo para anaeróbios fastidiosos (FAB). O tubo foi incubado por 7 dias, a 37° C em anaerobiose. O crescimento bacteriano em FAB foi utilizado com o objetivo de se obter um caldo de reserva para caso por algum motivo o semeio em CCFA desse negativo (ALFA *et al*, 2000; MILLER *et al*, 2010; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010). Se não houvesse crescimento no CCFA realizava-se outro semeio em meio CCFA a partir do caldo FAB.

Todas as amostras fezes foram congeladas a -20 °C.

6.7 Identificação presuntiva dos isolados de *C. difficile*

Colônias suspeitas foram cultivadas no meio de cultura agar Brucella suplementado com vitamina K (1 µg/mL) e 5% de sangue lisado de carneiro (BAK) e em 5 mL de caldo BHI suplementado com a mesma quantidade de vitamina K e hemina (5 µg/mL, Sigma®), ambos foram incubados em anaerobiose por 72 horas a 37 °C. As colônias crescidas em agar BAK foram submetidas à prova de tolerância ao oxigênio, coloração de Gram e detecção de fluorescência em luz UV (MILLER *et al*, 2010).

O teste de aerotolerância foi realizado para confirmar que o micro-organismo isolado era uma bactéria anaeróbia estrita. Esse teste consiste em repicar cada colônia isolada na cultura em anaerobiose em uma placa de agar sangue e incubar em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. Se o micro-organismo crescer apenas na atmosfera anaeróbia, confirma a presença de uma bactéria anaeróbia (KONEMAN *et al*, 2008).

Também foi realizado o teste rápido de aglutinação em látex, que detecta especificamente a proteína glutamato-desidrogenase de *C. difficile* (*C. difficile* Test Kit® da Oxoid®), seguindo as recomendações do fabricante.

6.8 Identificação definitiva dos isolados de *C. difficile*

As cepas isoladas a partir do meio BAK foram identificadas mediante provas bioquímicas comerciais (RapID™ ANA II System, Remel®). Além disso, a sua identificação foi confirmada pela detecção de um fragmento do gene *tpi* exclusivo de *C. difficile* (triose fosfato isomerase) por PCR, com os iniciadores e as condições descritas (KATO *et al*, 1991; STUBBS *et al*, 2000; SPIGAGLIA *et al*, 2004; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

6.9 Extração do DNA genômico bacteriano de *C. difficile*

O DNA genômico foi extraído de cada cepa previamente cultivadas em caldo BHI suplementado com vitamina K (1 µg/mL, Sigma®) e hemina (5 µg/mL, Sigma®). As cepas foram incubadas por 12 a 18 horas, a 37 °C e sob condições anaeróbias. A extração foi realizada por meio do kit InstaGene Matrix® (BioRad®) seguindo as recomendações do fabricante e segundo descrito em Miller *et al* (2010) e Quesada-Gómez *et al* (2010).

6.10 Detecção de genes das toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *cdtB* e *tcdC*)

A determinação da presença de fragmentos dos genes das toxinas A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*), domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) e o potencial regulador negativo do PaLoc (*tcdC*) foi realizada por meio de PCR Multiplex. O protocolo, iniciadores e as condições utilizadas foram as descritas na literatura (KATO *et al*, 1991; STUBBS *et al*, 2000; SPIGAGLIA *et al*, 2004; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

Os produtos amplificados foram visualizados mediante a inoculação de 10 µL da amplificação em gel de agarose a 1,5% e corridos em eletroforese em tampão TBE 0.5X, a 100V por 90 minutos (COHEN; TANG; SILVA, 2000; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

As deleções parciais no gene *tcdC* foram interpretadas de acordo com o tamanho do fragmento amplificado nas imagens do eletroforese (COHEN; TANG; SILVA, 2000; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

Os controles positivos de amplificação foram as seguintes cepas: uma cepa hipervirulenta NAP1 (*tcdA+*, *tcdB+*, deleção 18 pb em *tcdC*, *cdtB+*), NAP7 (*tcdA-*, *tcdB+*, deleção > 18 pb em *tcdC*, *cdtB+*) e uma cepa que apresentasse somente a toxina B (*tcdA-*, *tcdB+*, sem deleção no *tcdC*, *cdtB-*).

6.11 Tipificação mediante eletroforese de campo pulsado (PFGE - Pulsed-field Gel Electrophoresis)

O padrão de macrorestrição foi determinado por meio da digestão do genoma com a enzima de restrição *SmaI*, obtido pelo equipamento PFGE, para cada um dos isolados de *C. difficile* de acordo com o método descrito (ALFA *et al*, 2000; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI por 6 a 8 horas. Em seguida, estas bactérias foram ressuspensas em tampão de lise celular (6 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM de EDTA pH 9,0, NaCl 1 M para desoxicolato a 0,2%, sarcosil a 0,5%, Brij 58 a 0.5%) e os plugs de agarose foram feitos por uma mistura de volumes iguais das soluções bacterianas e da agarose SeaKream Gold[®] (Lonza[®]) à 1% fundida, contendo dodecilsulfato de sódio à 1% em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 1 mM). As bactérias foram lisadas durante a noite por incubação dos plugs em tampão de lise celular e enzimas (2 mg/mL de lisozima, 20 mg/mL de RNase e 12,5 unidades de mutanolisina), a uma temperatura de 37 °C. Em seguida, os plugs foram incubados a 55 °C durante 12 – 18 horas em uma suspensão de 500 mM de EDTA pH 9,0, sarcosil a 1% e 50 mg/mL de proteinase K.

Depois destas lises, os plugs de agarose com o DNA genômico foram lavados, de 7 a 8 vezes, com tampão TE 1X e água ultrapura (bidestilada, deionizada e estéril). A digestão com a enzima de restrição *SmaI* (Roche[®]) foi realizada durante overnight a 25 °C.

O DNA dos plugs foi separado em géis de agarose a 1% (BioRad[®] grau campo pulsado) em tampão TBE 0,5X (tris-borato-EDTA) contendo 50 mM de tiourea em 6 V/cm

com 1 a 40 segundos, tempo de comutação durante 22 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio, descorados com água ultrapura, e fotografados digitalmente.

As imagens dos géis foram analisadas com software BioNumerics® (Applied Maths®) e com o banco de dados do National Microbiology Laboratory (NML), Winnipeg, Manitoba, Canadá. Com isso, o genótipo foi determinado e dado uma designação "NAP" para cada cepa em estudo.

Como um controle do tamanho dos fragmentos de DNA foi utilizado a cepa *Salmonella* serovar Braenderup H9812, estabelecida para esta metodologia, com uma digestão enzimática com *Xba*I (Roche®) durante 18-24 horas a 37 °C (Roche®) (ALFA *et al*, 2000; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

6.12 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) de clindamicina, levofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, rifampicina, cefotaxima, metronidazol, cloranfenicol, ceftriaxona, tetraciclina, vancomicina e azitromicina para *C. difficile* foi determinada por meio de *E-test* (bioMérieux®) em agar Brucella suplementado com 5% sangue de carneiro, hemina (5 µg/mL), e vitamina K (1 µg/mL). Os pontos de corte utilizados foram os descritos no CLSI (2012).

O controle utilizado foi a cepa *C. difficile* ATCC® 700057.

6.13 Correlação entre os dados clínicos e os resultados bacteriológicos

Os dados clínicos, obtidos por meio do questionário (Anexo II), foram correlacionados com os resultados bacteriológicos. Os dados utilizados foram: sexo, idade, febre, leucócitos, creatinina, quimioterápicos e antibióticos utilizados (tipos e quantidade).

6.14 Análise estatística dos dados

A análise descritiva das características dos pacientes foi realizada utilizando para as variáveis contínuas, médias, e para as variáveis categóricas, frequências e teste do Qui-quadrado.

Análises uni e multivariadas foram utilizadas para corrigir eventuais desvios causados pela interdependência das variáveis e para eliminar potenciais fatores de confundimento. O nível de significância adotado na comparação das variáveis nas análises uni e multivariadas foi o valor de erro de primeira ordem inferior a 5% ($p < 0,05$).

Todas as análises estatísticas do estudo foram realizadas utilizando o software IBM® SPSS® Statistics 20.

7 RESULTADOS

Durante o período de estudo (2013-2014), foram coletadas um total de 41 amostras de fezes diarreicas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba.

46,3% (19/41) das amostras foram positivas para presença das toxinas A/B por ELISA e/ou cultura do *C. difficile*. Foram obtidos três isolamentos de *C. difficile* (15,8% - 3/19), sendo um isolado das amostras positivas para detecção de toxinas e dois isolados de amostras que tiveram resultados negativos quanto à presença de toxinas (Apêndice C).

Todas as 19 amostras de fezes positivas para presença de *C. difficile* foram submetidas aos exames parasitológico e bacteriológico. No entanto, em nenhuma amostra foi detectado outro patógeno.

Dos 41 pacientes do estudo, 23 (56,1%) eram mulheres, com média de idade de 58 anos.

Os pacientes com CDI também apresentaram uma maior predominância do sexo feminino (63,2%) e com idade média de 56 anos. As idades dos pacientes variaram de 28 a 84 anos, com predominância de idosos, conforme detalha a Tabela 1.

Tabela 1 – Faixa etária dos pacientes estudados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).

Faixa etária	Amostragem Total		Amostragem Positiva	
	Frequência	Porcentagem (%)	Frequência	Porcentagem (%)
18-38 anos	6	14,6	3	15,8
39-59 anos	12	29,3	7	36,8
60-80 anos	21	51,2	8	42,1
81-101 anos	2	4,9	1	5,3
Total	41	100,0	19	100,0

Não foram observadas diferenças significativas entre a faixa etária e sexo da amostragem total e positiva quando comparadas por meio da análise do teste do Qui-quadrado ($p > 0.05$).

As cepas isoladas foram processadas e realizadas análises de detecção dos genes das toxinas e do fragmento do gene *tpi* (identificação definitiva), e em todos os isolados foram detectados os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*. O domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) não foi detectado assim como também não foram observadas deleções no gene *tcdC* nos isolados. A caracterização desses isolados foi detalhada na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização das cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).

Identificação dos isolados	Perfil toxigênico	Pulsotipo	CIM*					Período de isolamento
			AZI	CIP	CTX	LEV	TET	
ICC-01 feminino, 68, CA de reto	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB</i> -, sem deleções <i>tcdC</i>	NAP4	>256	25	1.5	4	128	Mai 2013
ICC-05 masculino, 63, CA de bexiga	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB</i> -, sem deleções <i>tcdC</i>	NAP4	0.75	>32	>32	4	0.125	Junho 2013
ICC-14 feminino, 37, Linfoma de Burkitt	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB</i> -, sem deleções <i>tcdC</i>	NAP4	0.25	2	>32	3	8	Agosto 2013

CA – câncer

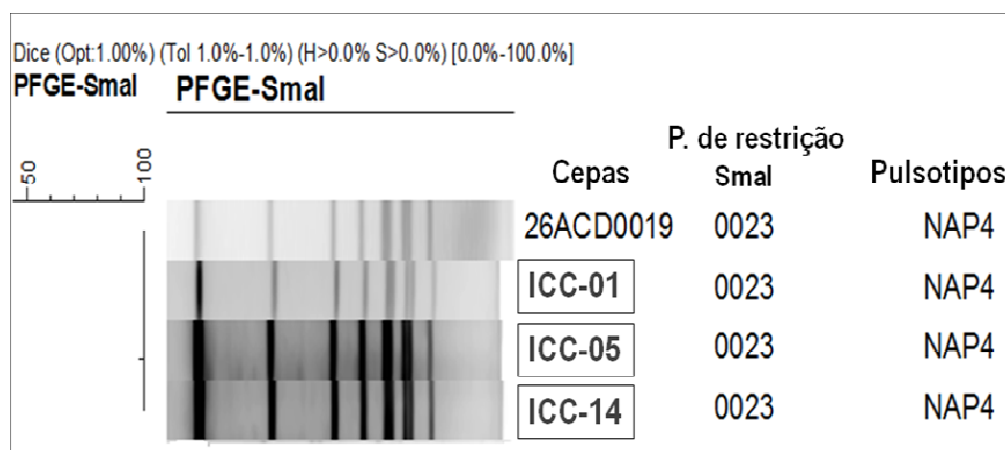
Perfil toxigênico – *tcdA* (enteroxina TcdA), *tcdB* (enterotoxina TcdB), *cdtB* (domínio de ligação da toxina binária) e *tcdC* (gene regulador negativo que controla a produção de TcdA e TcdB).

Breakpoints de acordo com CLSI (2012): AZI=azitromicina (16 µg/mL), CIP=ciprofloxacina (≥8 µg/mL), CTX=ceftriaxona (≥64 µg/mL), LEV=levofloxacina (≥4 µg/mL), TET=tetraciclina (≥16 µg/mL).

*Todas as cepas apresentaram CIM >32 µg/mL para cefotaxima.

A análise molecular PFGE revelou que os três isolados apresentam o mesmo genótipo, NAP4 (Tabela 2 e Figura 6).

Figura 6 – Pulsotipos de *C. difficile* isolados de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará.



A análise dos perfis de PFGE por meio da digestão com *SmaI* são idênticos, ou seja, todas as bandas apresentam o mesmo tamanho de fragmento, sugerindo pertencer ao mesmo genótipo. Quando analisados no banco de dados do NML, Canadá, foi verificado que os perfis eram iguais a de uma cepa (26acd0019) já tipada com o genótipo NAP4.

Com relação à sensibilidade aos antimicrobianos, foi verificado que as cepas foram sensíveis a cloranfenicol, clindamicina, moxifloxacina, rifampicina, vancomicina, metronidazol. A cepa ICC-01 apresentou multirresistência a cinco antimicrobianos (azitromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina e cefotaxima), a ICC-05 a quatro antibióticos (ciprofloxacina, levofloxacina, ceftriaxona e cefotaxima) e a ICC-14 a dois (ceftriaxona e cefotaxima) (Tabela 2).

Dos pacientes estudados, 73,1% (30/41), faziam uso de um ou mais antibióticos. Os antibióticos mais utilizados nos pacientes com diarreia e CDI eram Tazocin (Piperacilina + Tazobactam), Metronidazol, Bactrim F (Sulfametaxol + Trimetoprima) e Ciprofloxacina, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Antibióticos prescritos aos pacientes estudados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).

Antibióticos	Amostragem Total		Amostragem Positiva		
	Frequência	Porcentagem (%)	Frequência	Porcentagem (%)	
β-lactâmicos	Cefepima	4	7,0	3	10,0
	Ceftriaxona	2	3,5	0	0
	Meropenem	2	3,5	1	3,3
	Piperacilina + Tazobactam	13	22,8	6	20,0
	Oxacilina	1	1,8	0	0
Glicopeptídeos	Vancomicina	2	3,5	2	6,7
Lincosamidas	Clindamicina	1	1,8	1	3,3
Macrolídeos	Claritromicina	1	1,8	1	3,3
Nitroimidazólicos	Metronidazol	9	15,8	5	16,7
Polimixina	Polimixina	1	1,8	1	3,3
Quinolonas	Ciprofloxacina	5	8,8	3	10,0
Sulfonamidas/ Trimetoprima	Sulfametaxol + Trimetoprima	5	8,8	3	10,0
	Nenhum	11	19,3	4	13,3
	Total	57	100,0	30	100,0

Oitenta e três por cento (34/41) dos pacientes estavam recebendo quimioterapia e 39% (16/41) faziam uso de radioterapia.

Os pacientes diagnosticados com CDI que faziam uso de antibióticos e quimioterápicos representavam 57,9% (11/19). Apenas 15,8% (3/19) não estavam recebendo quimioterapia. Os quimioterápicos mais utilizados foram ciclofosfamida, xeloda (capecitabina), 5-FU (5-fluorouracil) e taxol (paclitaxel), detalhados na Tabela 4.

Tabela 4 – Quimioterápicos utilizados nos pacientes estudados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).

Quimioterápicos	Amostragem Total		Amostragem Positiva	
	Frequência	Porcentagem (%)	Frequência	Porcentagem (%)
5-FU	5	8,3	3	10,0
Avastin	2	3,3	1	3,3
Carboplatina	2	3,3	2	6,7
CDDP	4	6,7	1	3,3
Ciclofosfamida	6	10,0	1	3,3
Citarabina	2	3,3	0	0
Codox-M	2	3,3	2	6,7
Dacarbazina	1	1,7	1	3,3
Dexametazona	1	1,7	0	0
Docetaxel	2	3,3	0	0
Erbitux	1	1,7	1	3,3
Evoxali	1	1,7	0	0
FLOX	1	1,7	1	3,3
Floxatin	2	3,3	1	3,3
Folfox	1	1,7	1	3,3
Leucovorin	2	3,3	1	3,3
Merceptin	3	5,0	3	10,0
Mitomicina	3	5,0	1	3,3
Nexavar	1	1,7	1	3,3
Oncovin	1	1,7	0	0
Taxol	4	6,7	3	10,0
Xeloda	6	10,0	3	10,0
Nenhum	7	11,7	3	10,0
Total	60	100,0	30	100,0

Os diagnósticos mais frequentes dos pacientes foram 22% (9/41) câncer de mama e 12,2% (5/41) câncer de cólon, conforme detalhado na Tabela 5.

Tabela 5 – Diagnóstico oncológico dos pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).

Diagnóstico	Amostragem Total		Amostragem Positiva	
	Frequência	Porcentagem (%)	Frequência	Porcentagem (%)
CA de Bexiga	2	4,9	2	10,5
CA de Boca	1	2,4	1	5,3
CA de Canal anal	2	4,9	1	5,3
CA de Colo uterino	1	2,4	1	5,3
CA de Cólon	5	12,2	2	10,5
CA de Mama	9	22,0	4	21,1
CA de Orofaringe	1	2,4	1	5,3
CA de Pâncreas	1	2,4	1	5,3
CA de Próstata	1	2,4	0	0
CA de Reto	1	2,4	1	5,3
CA de Tireóide	1	2,4	0	0
CA Gástrico	4	9,8	0	0
CA Hepático	2	4,9	1	5,3
Glioma de alto grau na região frontal	1	2,4	0	0
Leucemia mielóide aguda	1	2,4	0	0
Linfoma Burkitt	1	2,4	1	5,3
Linfoma folicular	1	2,4	0	0
Linfoma não Hodgkin	3	7,3	2	10,5
Melanoma	1	2,4	1	5,3
Mieloma Múltiplo	2	4,9	0	0
Total	41	100,0	19	100,0

Todos os pacientes com CDI (19/19) apresentaram um quadro de anemia. 26% dos pacientes estavam com leucopenia e neutropenia e 37% de leucocitose e neutrofilia. 53% dos pacientes apresentaram linfopenia. Todos os pacientes apresentaram ureia dentro dos parâmetros e apenas um paciente apresentou a creatinina elevada. 32% dos pacientes apresentaram além da diarreia, febre.

O paciente que apresentou creatinina elevada tinha insuficiência renal aguda. Outras comorbidades foram relatadas entre os pacientes com CDI, sendo as mais prevalentes hipertensão (41,4%) e diabetes (13,8%). 17,2% (5/19) dos pacientes não apresentaram nenhuma comorbidade além de CDI e câncer, como é detalhado na Tabela 6.

Tabela 6 – Comorbidades associadas aos pacientes com CDI do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).

Comorbidades	Frequência	Porcentagem (%)
AVC prévio	2	6,9
Diabetes	4	13,8
Gastrite	1	3,4
Hipertensão	12	41,4
HIV	1	3,4
Insuficiência coronariana	1	3,4
Insuficiência renal aguda	1	3,4
Osteopenia	1	3,4
Tuberculose	1	3,4
Nenhuma	5	17,2
Total	29	100,0

Os pacientes do estudo assim como os positivos para CDI em sua maioria foram internados por apresentarem quadros de diarreia intensa. Outros motivos frequentes foram quimioterapia e cirurgia como estão detalhados na Tabela 7.

Tabela 7 – Causa da internação dos pacientes participantes da pesquisa do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, (2013-2014).

Causa da internação	Amostragem Total		Amostragem Positiva	
	Frequência	Porcentagem (%)	Frequência	Porcentagem (%)
Cirurgia	8	19,5	3	15,8
Convulsão	1	2,4	1	5,3
Diarreia	11	26,8	7	36,8
Dispneia	1	2,4	1	5,3
Dor oncológica	1	2,4	0	0
Exames	1	2,4	0	0
Hiperemia facial	1	2,4	0	0
Infecção urinária	1	2,4	0	0
Neutropenia febril	2	4,9	1	5,3
Quimioterapia	9	22,0	3	15,8
Sangramento retal	1	2,4	1	5,3
Tuberculose	1	2,4	1	5,3
Outros	3	7,3	1	5,3
Total	41	100,0	19	100,0

8 DISCUSSÃO

Clostridium difficile é responsável por 20% a 30% dos casos de diarreia associada ao uso de antibióticos e é a principal causa de diarreia infecciosa nos serviços de saúde (COHEN *et al*, 2010). Durante a última década, um aumento na frequência de casos e nas manifestações graves da infecção por *C. difficile* têm sido descritos. Em algumas unidades de saúde, as taxas de infecção hospitalar por *C. difficile* têm sido superiores às causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (FREEMAN *et al*, 2010; MILLER *et al*, 2011).

Dentre os pacientes considerados como pertencentes ao grupo de risco destacam-se pacientes oncológicos. Esses pacientes merecem bastante atenção por apresentarem diversos fatores que favorecem essa infecção (COHEN *et al*, 2010; KHAN *et al*, 2012).

Nesse estudo, apesar do pequeno número de amostras, CDI foi identificada em 46,3% (19/41) dos pacientes oncológicos estudados e a bactéria patogênica isolada em 15,8% (3/19) das amostras de fezes diarreicas.

No total de 19 amostras positivas para *C. difficile* não foi possível isolar a bactéria em quatro delas, provavelmente devido ao fato destes pacientes já estarem sendo tratados antecipadamente com metronidazol. Outro fator que pode também ter contribuído foram as condições de cultivo, que não favoreceram o difícil isolamento desse micro-organismo anaeróbio obrigatório, visto que o mesmo foi realizado utilizando jarras de anaerobiose e não câmaras de anaerobiose.

Han e colaboradores (2013) durante o período de oito meses (abril a dezembro de 2011) realizaram um estudo de incidência de *C. difficile* em um hospital de câncer em Pequim, China. Analisaram 277 amostras de fezes diarreicas de pacientes internados, das quais 41 (15%) foram positivas para CDI.

Fang e colaboradores (2014) também realizaram um estudo de incidência de CDI em três hospitais oncológicos no leste da China. Durante um período de seis meses (abril a outubro de 2013) foram coletadas 400 amostras de fezes de pacientes com câncer que receberam quimioterapia e 82 (20,5%) amostras foram positivas para *C. difficile*.

Estudo realizado na Coréia do Sul, por Hwang e colaboradores (2013), também apresentou percentual menor de CDI. No período de dois anos (janeiro de 2008 a dezembro de 2009), foram analisadas amostras de fezes diarreicas de 188 pacientes com câncer de pulmão, dessas 44 (23,4%) foram positivas para CDI.

No presente estudo foi encontrada uma incidência de CDI maior do que as relatadas nos estudos citados anteriores (46,3%). No Brasil, os trabalhos de Balassiano e colaboradores (2012), Secco e colaboradores (2014), Pires e colaboradores (2014) detectaram uma incidência de CDI variando de 6,8% a 44,7%, percentuais menores que o obtido nesse estudo. Esse achado pode ser explicado pelo fato dos pacientes desse estudo apresentarem diversos fatores de risco para CDI, como o uso de quimioterápicos e antibióticos, hospitalização prolongada e serem imunossuprimidos (COHEN *et al*, 2010; FREEMAN *et al*, 2010).

Os pacientes identificados com CDI nessa pesquisa foram predominantemente idosos e mulheres. O fato de o gênero feminino predominar também pode estar relacionado à elevada incidência de câncer de mama. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada tardiamente (INCA, 2014). A idade avançada é um importante fator de risco para CDI. As possíveis razões para a associação entre idade e CDI provavelmente são a diminuição da resposta imunológica, aumento de comorbidades, aumento da exposição a agentes antibacterianos e ao ambiente hospitalar (COHEN *et al*, 2010; DePESTEL; ARONOFF, 2013; KRISHNA *et al*, 2013).

Características epidemiológicas e clínicas de casos de CDI são fundamentais para investigações em surtos hospitalares. E a tipagem molecular é uma ferramenta importante para a compreensão de uma variedade de aspectos da epidemiologia de CDI, sendo a caracterização molecular de isolados essencial para a compreensão dos modos e locais de transmissão (COHEN *et al*, 2010; TENOVER *et al*, 2011).

A identificação molecular de todas as cepas isoladas nesse estudo foi a mesma, ou seja, pertenciam ao mesmo genótipo toxigênico NAP4 (*tcdA+* e *tcdB+*).

NAP4 tem sido um genótipo comum para a CDI associada a ambientes hospitalares, embora tenha se tornado menos comum nos últimos anos, visto que na maioria dos estudos a cepa hipervirulenta, NAP1, tem sido a mais identificada (LIMBAGO *et al*, 2009; FREEMAN *et al*, 2010; WALKTY *et al*, 2010; SEE *et al*, 2014).

A NAP4 já foi identificada nos EUA e Canadá (LIMBAGO *et al*, 2009; WALKTY *et al*, 2010; SEE *et al*, 2014) e provavelmente em todo o Mundo. Mas não foi possível comparar o nosso genótipo com os das cepas encontradas no Brasil, devido ao fato

de que em outros estudos brasileiros assim como nos europeus, por exemplo, utilizarem outra técnica de identificação molecular, principalmente, a PCR ribotipagem.

A exposição a antimicrobianos é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de CDI (DePESTEL; ARONOFF, 2013). As cepas isoladas nesse estudo apresentaram sensibilidade aos antibióticos de escolha para o tratamento dessa infecção, metronidazol e vancomicina, e resultados semelhantes foram relatados em outros estudos (BALASSIANO *et al*, 2010; RODRÍGUEZ-PARDO *et al*, 2013).

Várias classes de antimicrobianos aumentam o risco para o desenvolvimento de CDI comparativamente em relação a outras, como lincosaminas (clindamicina), cefalosporinas e fluoroquinolonas (BLONDEAU, 2009; CARROLL; BARTLETT, 2011; DESHPANDE *et al*, 2013).

Todas as cepas isoladas nesse estudo foram sensíveis a clindamicina, apesar de que alguns trabalhos relatam resistência a esse antibiótico (OWENS *et al*, 2008; SECCO *et al*, 2014).

A utilização de cefalosporinas de terceira geração, tais como a ceftazidima, a cefotaxima e ceftriaxona estão associadas a um elevado risco para o desenvolvimento de uma CDI (OWENS *et al*, 2008; BLONDEAU, 2009). Geralmente, os isolados de *C. difficile* são resistentes à maioria dos cefalosporinas e por isso estão em quase todos os estudos realizados para determinar os fatores de risco para CDI (OWENS *et al*, 2008; CARROLL; BARTLETT, 2011). Nesse estudo as cepas isoladas apresentaram resistência a cefotaxima e ceftriaxona.

Similar às cefalosporinas, as fluoroquinolonas tornaram antimicrobianos populares para o tratamento de pacientes internados e ambulatoriais, por causa de seus bons espectros de atividade e biodisponibilidade oral. Desde a introdução da ciprofloxacina, o uso de fluoroquinolonas tem aumentado e se tornado comum e vários novos agentes foram introduzidos, incluindo levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina. Como esperado para uma classe de agentes, frequentemente usada com baixa atividade *in vitro* contra *C. difficile*, o uso das fluoroquinolonas foi recentemente associado a surtos de CDI (OWENS *et al*, 2008; BLONDEAU, 2009). As cepas isoladas nesse estudo foram resistentes a ciprofloxacina e levofloxacina e foram sensíveis a moxifloxacina, o que explica o fato desse antibiótico apresentar melhor atividade *in vitro* contra organismos anaeróbios do que outras fluoroquinolonas (BLONDEAU, 2009; BALASSIANO *et al*, 2010).

O uso de quimioterápicos tem sido descrito como um fator de risco para o desenvolvimento de CDI, com ou sem o uso de antibióticos (KHAN *et al*, 2012). Esse fato

pode justificar a presença, nesse estudo, de CDI em 21% (4/19) dos pacientes que não usavam antibiótico, mas estavam fazendo quimioterapia.

Os agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento de pacientes com CDI nessa pesquisa foram 5-FU, taxol e xeloda. Esses quimioterápicos podem induzir mucosite intestinal associadas a alterações inflamatórias graves na mucosa do cólon. Essa inflamação no cólon pode causar necrose intestinal, o que promove um ambiente anaeróbio propício para a proliferação de *C. difficile* (COHEN *et al*, 2010; KHAN *et al*, 2012).

Os pacientes oncológicos são normalmente imunodeprimidos e vários agentes quimioterápicos podem estar relacionados com os efeitos imunossupressores, como neutropenia (BLONDEAU, 2009). A contagem de leucócitos no sangue é significativamente associada com casos graves de CDI, o que provavelmente reflete a gravidade da inflamação do cólon e, portanto, deve ser acompanhada durante a infecção por essa bactéria (RODRÍGUEZ-PARDO *et al*, 2013). Dentre os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados com CDI, anemia, leucocitose e ureia elevada no sangue estão entre os principais (BLONDEAU, 2009). Todos os pacientes com CDI desse estudo apresentavam anemia, 37% apresentavam leucocitose e nenhum apresentou ureia elevada.

Algumas comorbidades predis põe o desenvolvimento de casos graves de CDI (BLONDEAU, 2009). Câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão, doenças respiratórias e renais e diabetes são as comorbidades mais relacionadas com o aumento de mortalidade em pacientes com CDI (WELFARE *et al*, 2011). E nesse estudo, 41,4% dos pacientes estudados com CDI eram hipertensos e 13,8% tinham diabetes.

A maioria dos casos de CDI é adquirida em hospitais ou instalações de cuidados de longo prazo, mas recentemente, casos de CDI associados à comunidade (CA-CDI) estão cada vez mais frequentes (DESHPANDE *et al*, 2013). Dados recentes sugerem que CA-CDI representam um terço de todos os casos de *C. difficile* (CHITNIS *et al*, 2013)

Entretanto, algumas vias de transmissão dessa infecção têm sido consideradas a fim de explicar o aumento no aparecimento de casos de CA-CDI, como contato com superfícies com esporos, contato com pacientes infectados ou colonizados, contato com animais infectados ou colonizados e origem alimentar (HENSGENS *et al*, 2012).

36,8% (7/19) dos pacientes deste estudo com CDI foram internados por sintomas de diarreia, indicando casos de CA-CDI e não de infecção hospitalar. A cepa isolada ICC-01, genótipo NAP4, é o primeiro caso de infecção adquirida na comunidade em pacientes oncológicos na América Latina. Em um estudo de casos de CA-CDI de Limbago e

colaboradores (2009) nos EUA, os isolados identificados pertenciam aos genótipos NAP1 (21%), NAP4 (10%), NAP7 (8%), NAP11 (6%), NAP2 (5%) enquanto em um estudo de casos de CA-CDI realizado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA, o genótipo mais comum foi NAP1 (23,5%), seguido por NAP11 (11,4%) e NAP4 (10,7%) (LESSA, 2013).

Os casos de CA-CDI geralmente são menos graves do que os adquiridos em ambientes hospitalares, sendo frequentemente, limitados a uma diarreia leve e, assim apenas uma minoria dos pacientes procura assistência médica (HENSGENS, *et al*, 2012; CHITNIS *et al*, 2013; LEE; COHEN, 2013).

No Brasil a infecção promovida pelo *C. difficile* é subnotificada, especialmente quanto à incidência de CDI, a disseminação do patógeno em hospitais e sua resistência a vários antibióticos (SECCO *et al*, 2014). Estudos e pesquisas sobre a epidemiologia dessa infecção tanto no ambiente hospitalar como na comunidade são necessários. A caracterização molecular das cepas de *C. difficile* circulantes é uma das principais medidas de vigilância necessária, a fim de informar estratégias de prevenção adicionais às autoridades de saúde pública para evitar surtos de CDI no Brasil, principalmente em pacientes de risco como os pacientes com câncer.

9 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem tecer conclusões sobre a ocorrência de diarreia associada a *C. difficile*, em um hospital de oncologia.

- Uma elevada incidência de CDI (46,3%) em pacientes oncológicos foi observada, comparada a outros estudos descritos. Este resultado mostra a necessidade do reconhecimento precoce e diagnóstico clínico e laboratorial de CDI nesses pacientes em Fortaleza assim como no Brasil.
- A cepa circulante detectada nesta unidade hospitalar, pertence ao genótipo toxigênico, NAP4 (*tcdA+* e *tcdB+*), comumente encontrado em outros países, como EUA e Canadá. Esse genótipo também tem sido isolado tanto em casos de infecção hospitalar como em casos de CDI associados à comunidade.
- Todas as cepas isoladas de *C. difficile* apresentaram sensibilidade aos antibióticos de escolha para o tratamento de CDI, metronidazol e vancomicina, e apresentaram resistência à ciprofloxacina e levofloxacina, alertando para a relação de resistência às fluoroquinolonas e surtos de CDI;
- A prevalência de CDI foi predominante em pacientes idosos e do sexo feminino. A idade avançada é um importante fator de risco para essa infecção e o aumento de casos em mulheres pode ser devido à elevada incidência de câncer de mama no Ceará assim como no Brasil.
- Pela primeira vez no Brasil foram detectados, em pacientes oncológicos, casos de infecção por *C. difficile* associados à comunidade (CA-CDI). Este resultado demonstra que são necessários métodos de vigilância reforçada para monitorar a incidência de CDI e identificar populações em risco, ressaltando a importância de um maior conhecimento da situação epidemiológica desta infecção em unidades hospitalares brasileiras.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFA, M. J., KABANI, A., LYERLY, D., MONCRIEF, S., NEVILLE, L.M., AL-BARRAK, A., HARDING, G.K., DYCK, B., OLEKSON, K., EMBIL, J.M. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**. 38, p. 2706-2714, 2000.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. 8:17-26, 2011.

ASLAM, S.; HAMILL, R.J.; MUSER, D.M. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. **Lancet Infectious Diseases**. Sep;5(9), p. 549-57, 2005.

BABAN, S. T.; KUEHNE, S. A.; BARKETI-KLAI, A.; CARTMAN, S. T.; KELLY, M. L.; HARDIE, K. R.; KANSAU, I.; COLLIGNON, A.; MINTON, N. P. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. **PLoS One**. 8(9):e73026. 2013.

BALASSIANO, I. T.; MIRANDA, K. R.; BOENTE, R. F.; PAUER, H.; OLIVEIRA, I. C.; SANTOS-FILHO, J.; AMORIM, E. L.; CANINÉ, G. A.; SOUZA, C. F.; GOMES, M. Z.; FERREIRA, E. O.; BRAZIER, J. S.; DOMINGUES, R. M. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**. 15:61-4, 2009.

BALASSIANO, I. T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; DE OLIVEIRA, M. P.; RAMOS, M. C.; JAPIASSU, A. M.; DOS REIS, A. M.; BRAZIER, J. S.; FERREIRA, E. O.; DOMINGUES, R. M. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 68(4):449-55, 2010.

BALASSIANO, I. T.; YATES, E. A.; DOMINGUES, R. M.; FERREIRA, E. O. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **Journal of Medical Microbiology**. Feb;61(Pt 2):169-79, 2012.

BARTLETT, J.G.; ONDERDONK, A.B.; CISNEROS, R.L.; KASPER, D. L. Clindamycin associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. **Journal of Infectious Diseases**. 136:701–5, 1977.

BARTLETT, J. G.; CHANG, T-W.; GURWITH, M.; GORBACH, S.L.; ONDERDONK, A. B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. **New England Journal of Medicine**. 298:531–4, 1978.

BARTLETT, J. G. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. Jan 15;46; Suppl 1:S4-11, 2008.

BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. 46 Suppl 1:S12-8, 2008.

BAUER, M. P.; NOTERMANS, D. W.; VAN BENTHEM, B. H.; BRAZIER, J. S.; WILCOX, M. H.; RUPNIK, M.; MONNET, D. L.; VAN DISSEL, J. T.; KUIJPER, E. J.; ECDIS STUDY GROUP. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. **Lancet**. 377, p.63-73, 2011.

BLONDEAU, J. M. What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 63:238-42, 2009.

BORRIELLO, S. P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 41 Suppl C:13-9, 1998.

BRITO, G.A.; FUJII, J.; CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, A.A.M.; OBRIG R.; GUERRANT R.L. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **Journal of Infectious Diseases**. 186, 1438-1447, 2002a.

BRITO, G.A.; SULLIVAN, G.W.; CIESLA, W.P.; CARPER H.T.; MANDELL, G.L.; GUERRANT R.L. *Clostridium difficile* toxin A alters in vitro-adherent neutrophil morphology and function. **Journal of Infectious Diseases**. 185, 1297-1306, 2002b.

BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. **Gastroenterology**. 146:1547-53, 2014.

BURNHAM, C. A.; CARROLL, K. C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. **Clinical Microbiology Reviews**. 26:604-30, 2013.

CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. **Annual Review of Microbiology**. 65:501-21, 2011.

CARTER, G. P.; ROOD, J. I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. **Gut Microbes**. 1:58-64, 2010.

CHANG, T-W.; BARTLETT, J.G.; GORBACH, S. L.; ONDERDONK, A. B. Clindamycin induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. **Infection and Immunity**. p. 526-9, 1978.

CHITNIS, A. S.; HOLZBAUER, S. M.; BELFLOWER, R. M.; WINSTON, L. G.; BAMBERG, W. M.; LYONS, C.; FARLEY, M. M.; DUMYATI, G. K.; WILSON, L. E.; BELDAVS, Z. G.; DUNN, J. R.; GOULD, L. H.; MACCANNELL, D. R.; GERDING, D. N.; MCDONALD, L. C.; LESSA, F. C. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. **JAMA Internal Medicine**. 173(14):1359-67, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard, 8th ed.** CLSI M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COHEN, S.; TANG, Y.J.; SILVA, J. JR. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. **Journal of Infectious Diseases**. 181, p. 659-663, 2000.

COHEN, S. H.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; KELLY, C. P.; LOO, V. G.; MCDONALD, L. C.; PEPIN, J.; WILCOX, M. H.; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Infection Control and Hospital Epidemiology**. 31:431–55, 2010.

DePESTEL, D. D.; ARONOFF, D. M. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Pharmacy Practice**. 26:464-75, 2013.

DESHPANDE, A.; PASUPULETI, V.; THOTA, P.; PANT, C.; ROLSTON, D. D.; SFERRA, T. J.; HERNANDEZ, A. V.; DONSKEY, C. J. Community-associated *Clostridium difficile* infection and antibiotics: a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 68:1951-61, 2013.

DONSKEY, C.J. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. **Clinical Infectious Diseases**. p. 219–26, 2004.

DUBBERKE, E.R.; WERTHEIMER, A.I. Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. Jan;30(1), p.57-66, 2009.

FANG, W. J.; JING, D. Z.; LUO, Y.; FU, C. Y.; ZHAO, P.; QIAN, J.; TIAN, B. R.; CHEN, X. G.; ZHENG, Y. L.; ZHENG, Y.; DENG, J.; ZOU, W. H.; FENG, X. R.; LIU, F. L.; MOU, X. Z.; ZHENG, S. S. *Clostridium difficile* carriage in hospitalized cancer patients: a prospective investigation in eastern China. **BMC Infectious Diseases**. 29;14(1):523, 2014.

FERREIRA, C. E.; NAKANO, V.; DURIGON, E. L.; AVILA-CAMPOS, M. J. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in São Paulo city, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 98(4):451-4, 2003.

FIMLAID, K. A.; BOND, J. P.; SCHUTZ, K. C.; PUTNAM, E. E.; LEUNG, J. M.; LAWLEY, T.D.; SHEN, A. Global analysis of the sporulation pathway of *Clostridium difficile*. **PLoS Genetics**. 9(8):e1003660, 2013.

FREEMAN, J.; BAUER, M. P.; BAINES, S. D.; CORVER, J.; FAWLEY, W. N.; GOORHUIS, B.; KUIJPER, E. J.; WILCOX, M. H. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. **Clinical Microbiology Reviews**. 23:529-49, 2010.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants. **American Journal of Diseases of Children**. 49:390-402, 1935.

HAN, X. H.; DU, C. X.; ZHANG, C. L.; ZHENG, C. L.; WANG, L.; LI, D.; FENG, Y.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; SHI, Y. K. *Clostridium difficile* infection in hospitalized cancer patients in Beijing, China is facilitated by receipt of cancer chemotherapy. **Anaerobe**. 24:82-4, 2013.

HENSGENS, M. P.; KEESSEN, E. C.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V.; KOENE, M. G.; DE BOER, E.; LIPMAN, L. J.; KUIJPER, E. J.; European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases study group for *Clostridium difficile* (ESGCD). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? **Clinical Microbiology and Infection**. 18:635-45, 2012.

HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. **World Journal of Gastroenterology**. v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.

HWANG, K. E.; HWANG, Y. R.; SEOL, C. H.; -PARK, C.; PARK, S. H.; YOON, K. H.; PARK, D. S.; LEE, M. K.; JEONG, E. T.; KIM, H. R. *Clostridium difficile* infection in lung cancer patients. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 66(5):379-82, 2013.

INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ (Fortaleza). **História do Hospital Haroldo Juaçaba**. Disponível em: <<http://www.hospcancer-icc.org.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

JANK, T.; GIESEMANN, T.; AKTORIES, K. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. **Glycobiology**. 17:15R-22R, 2007.

JOUSIMIES-SOMER, H. R.; SUMMANEN, P.; CITRON, D. M.; BARON, E. J.; WEXLER, H. M.; FINEGOLD, S. M. **Anaerobic bacteriology manual**. 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing Company; 2002.

KATO, N.; OU, C-Y.; KATO, H.; BARTLEY, S.L.; BROWN, V.K.; DOWELL, V.R.; UENO, L. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. 29, p. 33–37, 1991.

KARJALAINEN, T.; WALIGORA-DUPRIET, A. J.; CERQUETTI, M.; SPIGAGLIA, P.; MAGGIONI, A.; MAURI, P.; MASTRANTONIO, P. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. **Infection and Immunity**. 69:3442-6, 2001.

KHAN, A.; RAZA, S.; BATUL, S.A.; KHAN, M.; AKSOY, T.; BAIG, M.A.; BERGER, B.J. The evolution of *Clostridium difficile* infection in cancer patients: epidemiology, pathophysiology, and guidelines for prevention and management. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**. Aug 1;7(2), p. 157-70, 2012.

KHANNA, S.; PARDI, D. S. *Clostridium difficile* infection: new insights into management. **Mayo Clinic Proceedings**. 87:1106-17, 2012.

KHANNA, S.; PARDI, D. S.; ARONSON, S. L.; KAMMER, P. P.; ORENSTEIN, R.; ST SAUVER, J. L.; HARMSSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. **American Journal of Gastroenterology**. 107:89-95, 2012.

KONEMAN, E.W.; WINN JR, W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

KRISHNA, S. G.; ZHAO, W.; APEWOKIN, S. K.; KRISHNA, K.; CHEPYALA, P.; ANAISSIE, E. J. Risk factors, preemptive therapy, and antiperistaltic agents for *Clostridium difficile* infection in cancer patients. **Transplant Infectious Disease**. 15:493-501, 2013.

LEE, L.; COHEN, S. H. Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an emerging problem. **Current Emergency and Hospital Medicine Reports**. 1:149–153, 2013.

LESSA, F. C. Community-associated *Clostridium difficile* infection: how real is it? **Anaerobe**. 24:121-3, 2013.

LESSA, F. C.; GOULD, C. V.; MCDONALD, L. C. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**. 55 Suppl 2:S65-70, 2012.

LIMBAGO, B. M.; LONG, C. M.; THOMPSON, A. D.; KILLGORE, G. E.; HANNETT, G. E.; HAVILL, N. L.; MICKELSON, S.; LATHROP, S.; JONES, T. F.; PARK, M. M.; HARRIMAN, K. H.; GOULD, L. H.; MCDONALD, L. C.; ANGULO, F. J. *Clostridium difficile* strains from community-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**. 47(9):3004-7, 2009.

LINSKY, A.; GUPTA, K.; LAWLER, E. V.; FONDA, J. R.; HERMOS, J. A. Proton pump inhibitors and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Archives of Internal Medicine**. 170:772-8, 2010.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. 489(7415), 220–23, 2012.

MARCON, A. P.; GAMBA, M. A.; VIANNA, L. A. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 10(6):384-9, 2006.

MATSUSHITA, O.; OKABE, A. Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. **Toxicon**. 39:1769-80. 2001.

MCDONALD, L.C.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A.; OWENS R.C.; KAZAKOVA, S.V.; SAMBOL, S.P.; JOHNSON, S.; GERDING, N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**. 8, p. 2433-2441, 2005.

MCGLONE, S.M.; BAILEY, R.R.; ZIMMER, S.M.; POPOVICH, M.J.; TIAN, Y.; UFBERG, P.; MUDER, R.R.; LEE, B.Y. The economic burden of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**. 18, p.282-9, 2012.

MESQUITA, A. M. R. C.; RODRIGUES, J. L. N.; MESQUITA, V. P.; LIMA, N. L.; LIMA, A. A. M. Diarréia nosocomial e outras infecções adquiridas em hospital universitário. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.**, v. 10, n. 1, p. 54-61, 2011.

MILLER, M.; GRAVEL, D.; MULVEY, M.; TAYLOR, G.; BOYD, D.; SIMOR, A.; GARDAM, M.; MCGEER, A.; HUTCHINSON, J.; MOORE, D. Y.; KELLY, S. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. **Clinical Infectious Diseases**. 50, p. 194–201, 2010.

MILLER, B. A.; CHEN, L. F.; SEXTON, D. J.; ANDERSON, D. J. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* Infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community hospitals. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. 232(4):387-90, 2011.

OWENS, R. C. JR.; DONSKEY, C. J.; GAYNES, R. P.; LOO, V. G.; MUTO, C. A. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. 15;46 Suppl 1:S19-31, 2008.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. **Trends in Microbiology**. 22:406-16, 2014.

PINTO, L. J.; ALCIDES, A. P.; FERREIRA, E. O.; AVELAR, K. E.; SABRÁ, A.; DOMINGUES, R. M.; FERREIRA, M. C. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. 52(Pt 12):1095-9, 2003.

PIRES, R.N.; MONTEIRO, A. A.; CARNEIRO, L. C.; BAETHGEN, L. F.; TAVARES, R.; LINCHO, C. S.; PARK, S.; PERLIN, D.; RODRIGUES FILHO, E. M.; PASQUALOTTO, A. C. *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? **American Journal of Infection Control**. 42(4):459-60, 2014.

POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal**. 171:51-8, 2004.

PREDRAG, S.; BRANISLAVA, K.; MIODRAG, S.; BILJANA, M. S.; SUZANA, T.; NATASA, M. T.; TATJANA, B. Clinical importance and representation of toxigenic and non-toxigenic *Clostridium difficile* cultivated from stool samples of hospitalized patients. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 215 – 223, 2012.

QUESADA-GÓMEZ, C.; RODRÍGUEZ, C.; GAMBOA-CORONADO, M. M.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E.; MULVEY, M.; VILLALOBOS-ZÚÑIGA, M.; BOZA-CORDERO, R. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**. 48, p. 669-670, 2010.

RODRÍGUEZ-PARDO, D.; ALMIRANTE, B.; BARTOLOMÉ, R. M.; POMAR, V.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F.; SORIANO, A.; SORLÍ, L.; MARTÍNEZ-MONTAUTI, J.; MOLINS, M. T.; LUNG, M.; VILA, J.; PAHISSA, A.; BARCELONA CLOSTRIDIUM DIFFICILE STUDY GROUP. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**. 51:1465-73, 2013.

RODRÍGUEZ-PARDO, D.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 31(4):254–263, 2013.

RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; GERDING, D.N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. Jul;7(7), p. 526-36, 2009.

SECCO, D. A.; BALASSIANO, I. T.; BOENTE, R. F.; MIRANDA, K. R.; BRAZIER, J.; HALL, V.; DOS SANTOS-FILHO, J.; LOBO, L. A.; NOUÉR, S. A.; DOMINGUES, R. M. *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. **Anaerobe**. Aug;28:85-9, 2014.

SEE, I.; MU, Y.; COHEN, J.; BELDAVS, Z. G.; WINSTON, L. G.; DUMYATI, G.; HOLZBAUER, S.; DUNN, J.; FARLEY, M. M.; LYONS, C.; JOHNSTON, H.; PHIPPS, E.; PERLMUTTER, R.; ANDERSON, L.; GERDING, D. N.; LESSA, F. C. NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. 58(10):1394-400, 2014.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. 90(3):859-904, 2010.

SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. **Journal of Medical Microbiology**. 53, p. 1129–1136, 2004.

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B.; POPOFF, M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. **FEMS Microbiology Letters**. 186, p. 307–312, 2000.

SUETENS, C. *Clostridium difficile*: summary of actions in the European Union. **Eurosurveillance**. v. 13, p. 7-9, 2008.

TASLIM, H. *Clostridium difficile* infection in the elderly. **Acta medica Indonesiana**. 41:148-51, 2009.

TASTEYRE, A.; BARC, M. C.; COLLIGNON, A.; BOUREAU, H.; KARJALAINEN, T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. **Infection and Immunity**. 69:7937-40, 2001.

TEDESCO, F. J.; BARTON, R.W.; ALPERS, D. H. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. **Annals of Internal Medicine**. 81:429–33, 1974.

TENOVER, F. C.; AKERLUND, T.; GERDING, D. N.; GOERING, R. V.; BOSTRÖM, T.; JONSSON, A. M.; WONG, E.; WORTMAN, A. T.; PERSING, D. H. Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America. **Journal of Clinical Microbiology**. 49(5):1831-7, 2011.

VEDANTAM, G.; CLARK, A.; CHU, M.; MCQUADE, R.; MALLOZZI, M.; VISWANATHAN, V. K. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. **Gut Microbes**. 3:121-34, 2012.

VOTH D.E.; BALLARD J.D. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v.18, n.2, p.247-263, 2005.

WALKTY, A.; BOYD, D. A.; GRAVEL, D.; HUTCHINSON, J.; MCGEER, A.; MOORE, D.; SIMOR, A.; SUH, K.; TAYLOR, G.; MILLER, M.; MULVEY, M. R.; CANADIAN NOSOCOMIAL INFECTION SURVEILLANCE PROGRAM. Molecular characterization of moxifloxacin resistance from Canadian *Clostridium difficile* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 66(4):419-24, 2010.

WARNY, M.; PEPIN, J.; FANG, A.; KILLGORE, G.; THOMPSON, A.; BRAZIER, J.; FROST, E.; MCDONALD, C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet**. 366: 1079-1084, 2005.

WELFARE, M. R.; LALAYIANNIS, L. C.; MARTIN, K. E.; CORBETT, S.; MARSHALL, B.; SARMA, J. B. Co-morbidities as predictors of mortality in *Clostridium difficile* infection and derivation of the ARC predictive score. **Journal of Hospital Infection.** 79(4):359-63, 2011.

YOUNGSTER, I.; SAUK, J.; PINDAR, C.; WILSON, R. G.; KAPLAN, J. L.; SMITH, M. B.; ALM, E. J.; GEVERS, D.; RUSSELL, G. H.; HOHMANN, E. L. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. **Clinical Infectious Diseases.** 58(11):1515–22, 2014.

ZUMBADO-SALAS, R.; GAMBOA-CORONADO, M. DEL M.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E.; CHAVES-OLARTE, E. *Clostridium difficile* in adult patients with nosocomial diarrhea in a Costa Rica hospital. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 79, p. 164–165, 2008.

APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CORRELAÇÃO ENTRE SINTOMAS GASTRINTESTINAIS, QUALIDADE DE VIDA E PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM PACIENTES DO HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA

Neste momento, você recebe um tratamento com remédios importantes para combater as células do tumor que precisa ser combatido. Entretanto, estas medicações costumam produzir lesões na mucosa oral e intestinal, provocando sinais e sintomas como aftas, úlceras, alteração do gosto dos alimentos, dor ao engolir, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, além de diminuir o número das células responsáveis pela defesa do seu organismo, muitas vezes prejudicando o andamento do tratamento e a sua eficácia e favorecendo infecções por bactérias que podem se aproveitar da queda da imunidade.

O Hospital Haroldo Juaçaba e a Universidade Federal do Ceará (UFC) promovem uma pesquisa que pretende estudar e dimensionar a presença de uma bactéria chamada *Clostridium difficile* em pacientes tratados na instituição. Este microrganismo está associado à presença de diarreia em pacientes com redução da capacidade imunológica e pode causar graves consequências aos pacientes infectados.

Para tanto, você deverá realizar coleta de fezes para que a pesquisa e a tipagem da bactéria seja efetuada. Além disso, você responderá a perguntas relacionadas aos sintomas que você está sentindo e ao tratamento oncológico ao qual você está sendo submetido. É importante, para esta pesquisa, garantir que você receberá prontamente o tratamento para a infecção caso a presença da bactéria se confirme.

Sua identidade será mantida em sigilo, sendo a divulgação dos resultados dos exames totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão em ambiente acadêmico com propósito científico, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes por outros componentes da equipe de saúde, exceto pelos responsáveis diretos por seu tratamento.

A sua participação deverá ser voluntária e consciente. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação neste estudo. Em qualquer momento, você terá o direito de desistir da pesquisa sem necessidade de dar explicações. A eventual desistência não acarretará prejuízo ou discriminação quanto à manutenção do seu tratamento

EU CONCORDO LIVREMENTE EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO

(NOME DO SUJEITO DA PESQUISA
LETRA DE FORMA)

DATA

ASSINATURA

INVESTIGADOR

DATA

ASSINATURA

NOME DA TESTEMUNHA

DATA

ASSINATURA

APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Questionário

Paciente nº: _____

Data: ____ / ____ / ____

1. Epidemiologia e tratamento oncológico

Paciente _____

Idade: ____ Sexo M F Prontuário _____ Nascimento ____ / ____ / ____

Procedência: _____ Estado: _____

Diagnóstico: _____ Estado ao Dx: _____

Data do diagnóstico: ____ / ____ / ____

Cirurgia: Sim Não Qual? _____ Data ____ / ____ / ____

Radioterapia Sim Não Região: _____ Dose: _____

Data ____ / ____ / ____

Recebeu Quimioterapia? Sim Não

Recebe quimioterapia atualmente? Sim Não

Adjuvante Neoadjuvante Radiossensibilizante Paliativa Curativa

Regimes:

Adjuvante: _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

1ª linha: _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

2ª linha: _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

3ª linha: _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

Hormonioterapia: Sim Não

1ª linha _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

2ª linha _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

3ª linha _____ Início: ____ / ____ / ____ Fim ____ / ____ / ____

Internado ? Sim Não Quantos dias? _____

Antibióticos? Sim Não Regime? _____ Quantos dias? _____

2- Sintomas atuais

1. Diarréia (grau):

 1 2 3 4

2. Dor Abdominal (grau):

 1 2 3 4

3. Náusea (grau):

 1 2 3 4

4. Vômito (grau):

 1 2 3 4

5. Mucosite oral (grau):

 1 2 3 4

6. Febre:

 Sim Não

7. Muco nas fezes

 Sim Não

8. Sangue nas fezes:

 Sim Não

9. Performance status

 0 1 2 3 4**3- Exames (se disponíveis):**

Data: ____ / ____ / ____

Hemoglobina: _____

Leucócitos: _____

Linfócitos: _____

Neutrófilos: _____

Plaquetas: _____

Uréia: _____

Creatinina: _____

4- Outras informações

Comorbidades:

Diabetes: Sim NãoHipertensão: Sim NãoInsuficiência Renal Crônica: Sim NãoInsuficiência Coronariana: Sim NãoDPOC: Sim NãoAVC prévio: Sim NãoIAM prévio: Sim NãoInternação nos últimos 30 dias: Sim Não


APÊNDICE C - RESULTADOS

Deteção das toxinas e isolamento de cepas de *C. difficile* de amostras de pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará.

AMOSTRAS	DETECÇÃO DAS TOXINAS	ISOLAMENTO DE <i>C. difficile</i>
ICC-01	POSITIVA	POSITIVO
ICC-02	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-03	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-04	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-05	NEGATIVA	POSITIVO
ICC-06	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-07	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-08	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-09	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-10	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-11	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-12	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-13	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-14	NEGATIVA	POSITIVO
ICC-15	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-16	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-17	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-18	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-19	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-20	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-21	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-22	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-23	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-24	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-25	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-26	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-27	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-28	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-29	NEGATIVA	NEGATIVO

AMOSTRAS	DETECÇÃO DAS TOXINAS	ISOLAMENTO DE <i>C. difficile</i>
ICC-30	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-31	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-32	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-33	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-34	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-35	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-36	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-37	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-38	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-39	NEGATIVA	NEGATIVO
ICC-40	POSITIVA	NEGATIVO
ICC-41	POSITIVA	NEGATIVO

 Positivo → Detecção das toxinas

 Positivo → Identificação e isolamento de *C. difficile*

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento, genotipagem e estudo comparativo da virulência de cepas de *Clostridium difficile* em pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará

Pesquisador: Markus Andret Cavalcante Gifoni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 05843813.0.0000.5528

Instituição Proponente: Instituto do Cancer do Ceara

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 208.362

Data da Relatoria: 28/02/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de estudo multicêntrico, prospectivo, transversal e analítico acerca da incidência, patogenia e virulência de cepas de *Clostridium difficile* isoladas de pacientes com diarreia atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba, em Fortaleza-Ceará

Objetivo da Pesquisa:

Tipar e traçar um perfil da toxicidade, virulência e sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas de pacientes em ambiente hospitalar.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não oferece riscos ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa acrescentará dados importantes acerca do perfil epidemiológico de pacientes com diarreia em ambiente hospitalar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem considerações.

Recomendações:

Sem recomendações.

Endereço: PAPI JUNIOR

Bairro: BELA VISTA

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: 3288-4653

CEP: 60.441-700

E-mail: cep_icc@yahoo.com.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendencias.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado.

FORTALEZA, 28 de Fevereiro de 2013

Assinador por:

**Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)**

Endereço: PAPI JUNIOR

Bairro: BELA VISTA

UF: CE

Telefone: 3288-4653

Município: FORTALEZA

CEP: 60.441-700

E-mail: cep_icc@yahoo.com.br

ANEXO B – PULICAÇÃO ORIGINADA A PARTIR DO TRABALHO

International Journal of Infectious Diseases 26 (2014) 138–139



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid

Case Report

Community-acquired diarrhea associated with *Clostridium difficile* in an HIV-positive cancer patient: first case report in Latin America

Cecília L. Costa^{a,*}, Carlos Quesada-Gómez^b, Cibele B. Mano de Carvalho^a,
Rafael H. González^c, Markus A. Gifoni^c, Ronaldo A. Ribeiro^d, Gerly Anne de Castro Brito^e

^aLaboratory of Bacteriology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1315, Rodolfo Teófilo, CEP 60430-275, Fortaleza, Brazil

^bLaboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología and Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

^cHaroldo Juacaba Hospital, Cancer Institute of Ceará, Fortaleza, Brazil

^dLaboratory of Pharmacology of Inflammation and Cancer (IAPICA), Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^eNúcleo de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI), Department of Morphology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2014

Received in revised form 9 June 2014

Accepted 11 June 2014

Corresponding Editor: Eskild Petersen,
Aarhus, Denmark

Keywords:

Clostridium difficile

Cancer patients

HIV-positive patients

Community-acquired *C. difficile* infection (CA-CDI)

SUMMARY

Clostridium difficile is the most important cause of nosocomial diarrhea, mainly associated with antibiotic use and immunodeficiency. Although, an increased incidence of community-acquired *C. difficile* infection (CA-CDI) has been reported worldwide, this infection has been under-diagnosed in Latin America. This is the first report of a CA-CDI case in Latin America, in an HIV-positive patient with cancer.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Clostridium difficile is recognized as the main cause of diarrhea and pseudomembranous colitis in hospitalized patients. Risk factors for the development of *C. difficile* infection (CDI) include advanced age, hospitalization, and severe illness. Cancer patients and HIV-infected patients have immunological failures that predispose them to CDI. These patients are at risk of CDI, independent of antibiotic or healthcare facility exposure, because of their clinical condition and the use of chemotherapeutic agents, which usually affect the immune system.¹

In Brazil, research into the incidence of *C. difficile* is still scarce, although studies carried out in hospitals in Rio de Janeiro, São Paulo, and Porto Alegre (southern and southeastern regions) have reported high and increasing incidences compared to European

and Costa Rican hospitals, with the occurrence of complicated cases of CDI and deaths resulting from severe infection.² However, community-acquired CDI (CA-CDI) infection has been under-diagnosed. This is the first report of a CA-CDI case in an HIV-positive patient with cancer in Latin America, pointing to the importance of investigating this pathogen in community-acquired diarrhea in developing countries, especially among patients with an immunodeficiency.

2. Case report

A 68-year-old woman who was HIV-positive was admitted to a cancer reference hospital in northeastern Brazil in May 2013. She presented with clinical symptoms of diarrhea, which had lasted for 6 days. She had been diagnosed with rectal cancer in early 2012. In December 2012, she underwent rectosigmoidectomy and abdominal lymphadenectomy. She was on adjuvant chemotherapy (regimen of folinic acid, 5-fluorouracil, and oxaliplatin), having received the first cycle in March 2013. She had not used antibiotics

* Corresponding author.

E-mail address: cecilia costa@hotmail.com (C.L. Costa).

ANEXO C – CARTILHA INFORMATIVA ORIGINADA A PARTIR DO TRABALHO

