



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

HILDENIA BALTASAR RIBEIRO NOGUEIRA

***Clostridioides difficile* EM CRIANÇAS COM DIARREIA ATENDIDAS EM
HOSPITAL PEDIÁTRICO EM FORTALEZA, CEARÁ**

FORTALEZA

2019

HILDENIA BALTASAR RIBEIRO NOGUEIRA

Clostridioides difficile EM CRIANÇAS COM DIARREIA ATENDIDAS EM HOSPITAL
PEDIÁTRICO EM FORTALEZA, CEARÁ

Defesa de Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gerly Anne de Castro Brito.

FORTALEZA

2019

HILDENIA BALTASAR RIBEIRO NOGUEIRA

***Clostridioides difficile* EM CRIANÇAS COM DIARREIA ATENDIDAS EM
HOSPITAL PEDIÁTRICO EM FORTALEZA, CEARÁ**

Defesa de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Biologia celular e tecidual.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Dionne Bezerra Rolim

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profª. Virna Costa e Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Renata Ferreira de Carvalho Leitão

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Virginia Claudia Carneiro Girão

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N712c Nogueira, Hildenia Baltasar Ribeiro.

Clostridioides difficile em crianças com diarreia atendidas em hospital pediátrico em Fortaleza, Ceará / Hildenia Baltasar Ribeiro Nogueira. – 2019.

94 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019. Orientação: Prof. Dr. Gerly Anne de Castro Brito.

1. C. difficile. 2. crianças. 3. infecção. 4. hospital pediátrico. I. Título.

CDD 611

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus, por me iluminar e me guiar nos grandes mistérios da vida.

Aos meus pais Francisco Furtado e Hilda, por todas as lições de amor, força e determinação e principalmente por colocar a educação acima de tudo, me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado.

A meu marido, Francisco José, sem dúvidas o maior incentivador de todos os meus projetos, pessoa que eu amo e escolhi para envelhecer junto, sempre me incentiva para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Minhas filhas Sarah e Deborah são o meu bem mais precioso, amor incondicional, o maior sonho que já realizei foi tê-las.

Meus irmãos, cunhado(a), sobrinhos e afilhada, na torcida sempre, pela compreensão dos momentos de afastamento e reclusão.

A Universidade Federal do Ceará, da qual retornei depois de tantos anos, por mais uma oportunidade de aprendizado e formação profissional.

A Universidade da Costa Rica e Universidade do Rio de Janeiro, representados por Carlos Quesada-Gómez e Prof^a Eliane Ferreira e Laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Ceará em especial à Cecília Costa, que proporcionaram a realização de algumas análises fundamentais para esse estudo.

Ao Hospital Infantil Albert Sabin, minha segunda casa, que me possibilita o cuidar dos meus pequenos pacientes e realizar minha escolha de ser pesquisadora.

Meus pacientes e meus alunos que são essenciais para a realização da minha missão.

A Prof^a Gerly Anne, grande mentora desse projeto, que com seu contagiante entusiasmo por pesquisas me orientou com maestria, meu aprendizado foi algo além do que ela mesma possa imaginar.

À 3 grandes amigas: Amália, Aline e Eliane Mara, que me apoiaram durante toda essa trajetória e possibilitaram que eu conseguisse chegar até essa etapa.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais pelos ensinamentos que me fizeram refletir sobre a verdadeira arte de ensinar e a todos os funcionários, em especial a Laisa que correspondeu prontamente as demandas de todas as etapas do programa. A professora Virginia, alguém que lembrarei por toda a vida, agradeço por todo apoio e incentivo.

Aos colegas do doutorado, e não foram poucos, em especial ao grupo "os difficiles" que comigo compartilharam momentos fantásticos da vida acadêmica.

E a todos que contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi caracterizar a infecção por *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) em crianças com diarreia atendidos em Hospital Pediátrico Terciário em Fortaleza, Ceará. Realizou-se um estudo observacional, transversal, de janeiro/2015 a dezembro/2017 em crianças e adolescentes com diarreia, para pesquisar infecção por *C. difficile* (CDI), através da detecção de toxina A e/ou B por ELISA, do cultivo em agar Cicloserina, Cefoxitina, Frutose (CCFA) e incubação em anaerobiose, identificação das cepas com análise fenotípica e detecção dos genes das toxinas e do fragmento do gene *tpi* por PCR convencional e análises de identificação molecular por meio de PFGE, e PCR ribotipagem. A sensibilidade à antimicrobianos foi verificada por meio de E-test. Foram incluídas 56 amostras. Identificou-se toxinas (ELISA positivo) e/ou isolou-se *C. difficile* por cultura em 17/56 amostras (30,4%). O percentual de isolamento por cultura foi de 35% (6/17) sendo obtidos 4 isolados: 046 (HIAS 01), 106 (HIAS 15), 002 (HIAS 54), 012 (HIAS 58), com perfil toxigênico (PFGE): *tpi+*, *tcdA+*, *tcdB+*, *cdtB-*, sem deleções *tcdC*, um pulsotipo NAP11 e 3 pulsotipos novos: HIAS 01(1174), HIAS 54(NML-1234) e HIAS 58(NML-1235). Todas as cepas foram sensíveis ao metronidazol e vancomicina. A média de idade foi 10,5 ($\pm 5,14$). A idade variou entre 15 meses e 18 anos. A diarreia teve duração média de 11 dias, variando de 3 a 50 dias, com presença de muco e sangue em 41,1% (7/17). Os outros sintomas mais frequentes foram: náusea e vômito 52,9% (9/17), febre 41,1% (7/17) e dor abdominal 82,3% (14/17). Os fatores de risco encontrados nos casos de CDI foram: hospitalização 41,1% (7/17), uso de antibióticos prévios e de inibidores da bomba de prótons 47% (8/17). As seis crianças nas quais foram realizados isolamentos de *C. difficile* tinham doença crônica prévia. Diretrizes apropriadas de tratamento e higiene ambiental foram estabelecidas. Conclui-se que CDI apresenta prevalência de 30,4% em crianças com diarreia em Hospital Pediátrico no Ceará. As 4 cepas toxigênicas eram dos ribotipos 044, 106, 002 e 012 e sensíveis ao metronidazol e vancomicina. Este trabalho destaca a importância do conhecimento das cepas de *C. difficile* e ribotipagem para traçar um perfil epidemiológico local que possa contribuir para uma melhor intervenção clínica e profilaxia ambiental.

Palavras-chaves: *C. difficile*, crianças, infecção, hospital pediátrico.

ABSTRACT

. This study aimed to characterize *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) infection in children with diarrhea seen at a Tertiary Pediatric Hospital in Fortaleza, Ceará. An observational cross-sectional study was conducted from January 2015 to December 2017 in children and adolescents with diarrhea to investigate *C. difficile* infection (CDI) by detecting ELISA positivity for toxin A and/or B, culture on Cycloserine, Cefoxitin, Fructose (CCFA) agar and anaerobic incubation, identification of strains with phenotypic analysis and detection of toxin and *tpi* genes fragment by conventional PCR and molecular identification analysis by PFGE, and PCR ribotyping. Antimicrobial susceptibility was verified by E-test. Fifty-six samples were included. Toxin positivity (ELISA) and/or isolation of *C. difficile* by culture were found in 17/56 samples (30.4%). *C. difficile* isolation percentage by culture was 35% (6/17) and 4 isolates were obtained: 046 (HIAS 01), 106 (HIAS 15), 002 (HIAS 54), 012 (HIAS 58), with toxigenic profile (PFGE): *tpi* +, *tcdA* +, *tcdB* +, *cdtB*-, no *tcdC*, deletions, one NAP11 and 3 new pulsotypes: HIAS 01 (1174), HIAS 54 (NML-1234) and HIAS 58 (NML-1235) were found. All strains were sensitive to metronidazole and vancomycin. The average age was 10.5 (\pm 5.14). Age ranged from 15 months to 18 years. Diarrhea had an average duration of 11 days, ranging from 3 to 50 days, with mucus and blood in 41.1% (7/17). Other symptoms found were: nausea and vomiting 52.9% (9/17), fever 41.1% (7/17), abdominal pain 82.3% (14/7). The percentage of risk factors for CDI were: hospitalization 41.1% (7/17), previous use of antibiotics and proton pump inhibitors 47% (8/17). The six children in whom *C. difficile* isolation was performed had prior chronic disease. Appropriate guidelines for treatment and environmental hygiene have been established. In conclusion, CDI has a prevalence of 30.4% in children with diarrhea in a pediatric hospital in Ceará. The 4 toxigenic strains were from ribotypes 044, 106, 002 and 012 and sensitive to metronidazole and vancomycin. This paper highlights the importance of knowledge of *C. difficile* strains and ribotyping to draw a local epidemiological profile that can contribute to better clinical intervention and environmental prophylaxis

Keywords: *C. difficile*. children. infection. pediatric hospital.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas chave da infecção por <i>C. difficile</i>	18
Figura 2: Recomendações para o tratamento de infecção por <i>C. difficile</i> em crianças	33
Figura 3: Fluxograma do recrutamento de crianças com diarreia para investigação de <i>C. difficile</i> em hospital terciário, Fortaleza, Ceará (2015-2017).	46
Figura 4: Fluxograma dos dados clínicos de crianças com diarreia atendidas em Hospital Terciário Fortaleza, Ceará, 2015 – 2017	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela 1: Caracterização das cepas de <i>C. difficile</i> isoladas de pacientes internados em Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, CE (2015 – 2017).	49
Tabela 2: Tabela 2: Faixa etária dos pacientes estudados no Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, Ceará (2015-2017).	50
Tabela 3: Dados clínicos de crianças com diarreia atendidas em Hospital Terciário Fortaleza, Ceará, 2015 – 2017.	52
Tabela 4: Fatores de risco de crianças com diarreia atendidas em Hospital Terciário Fortaleza, Ceará, 2015 – 2017.	53
Tabela 5: Comorbidades associadas as crianças com diarreia atendidas em Hospital Terciário Fortaleza-Ce, 2015 – 2017.	54
Tabela 6: Antibióticos utilizados, antes da seleção, nos pacientes estudados em Hospital Terciário Fortaleza-Ce, 2015 – 2017.	56
Tabela 7: Correlações clínicas dos pacientes com isolamento de <i>C. difficile</i> em Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, Ce (2015 – 2017).	58
Tabela 8: Correlações dos fatores de risco dos pacientes com isolamento de <i>C. difficile</i> em Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, Ce (2015 – 2017).	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVB	Atresia de vias biliares
CCFA	Agar de cefoxitina frutose de cicloserina
CCEY	Agar de cera de cefoxitina de clara de cicloser
CDI	Infecção por <i>C. difficile</i>
CDT	<i>C. difficile</i> transferase
CDIr	Recorrência da infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
<i>cdtB</i>	Domínio de ligação da toxina binária
CMI	Concentração inibitória mínima
DII	Doença inflamatória intestinal
EIAs	Imunoensaios enzimáticos (EIAs)
GDH	Glutamato desidrogenase
IBP	Inibidores da bomba de prótons
IL-1	Interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
MLST	Ribotipagem e tipificação sequência multilocus
MC	Megacolon Congênito
MICs	Metro- metronidazol
NAATs	amplificação de ácido nucleico
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PCR	Cadeia da polimerase
SHU	Síndrome Hemolítica
TMF	Transplante de microbiota fecal
TcdA	Proteína correspondente à enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdA</i>	Gene que codifica a enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
TcdB	Proteína correspondente à enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdB</i>	Gene que codifica a enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdC</i>	Gene regulador negativo que controla a produção de TcdA e TcdB
TNF- α .	do inglês "Tumor necrosis factor alpha" (Fator de necrose tumoral alfa)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Microbiota intestinal e <i>Clostridioides difficile</i>	11
1.2 <i>Clostridioides difficile</i>: características gerais	15
1.2.1 Caracterização	15
1.2.2 Colonização e Patogenicidade	17
1.3 Infecção por <i>Clostridioides difficile</i> em criança	23
1.3.1 Epidemiologia	23
1.3.2 Quadro clínico	26
1.3.3 Fatores de risco para CDI	28
1.3.4 Tratamento de CDI em criança.....	31
2 JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1. Delineamento do estudo	37
4.2. Critérios de inclusão e exclusão	37
4.3. Local de realização	38
4.4. Coleta de dados clínicos e epidemiológicos	39
4.5. Coleta dos espécimes clínicos	39
4.6. Detecção de toxinas de <i>C. difficile</i> em amostras fecais	40
4.7. Isolamento de <i>C. difficile</i> a partir de amostras fecais	40
4.8. Identificação presuntiva dos isolados de <i>C. difficile</i>	41
4.9. Identificação definitiva dos isolados de <i>C. difficile</i>	41
4.10. Extração do DNA genômico bacteriano de <i>C. difficile</i>	41
4.11. Detecção de genes das toxinas (<i>tcdA</i>, <i>tcdB</i>, <i>tcdC</i> e <i>ctdB</i>)	42
4.12. Tipificação mediante eletroforese de campo pulsante (PFGE)	42
4.13. Ribotipagem e PCR de cepas do <i>C difficile</i>	43
4.14. Teste de sensibilidade a antimicrobianos	43
4.15. Correlação entre os dados clínicos e epidemiológicos com os resultados bacteriológicos	44
4.16. Investigação da contaminação da mobília	44
4.17. Análise Estatística	45
4.18.Aspectos éticos	45

5	RESULTADOS	46
5.1	Ribotipagem, genotipagem e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	48
5.2	Dados epidemiológicos e clínicos	50
5.3	Fatores de risco	53
5.3	Isolamento de <i>C. difficile</i> e correlações clínicas	56
5.4	Investigação da contaminação da mobília e orientação de medidas de prevenção ambiental e pessoal	59
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	71
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A	87
	APÊNDICE B	90
	ANEXO I	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota intestinal e *Clostridioides difficile*

Na última década vem ocorrendo uma explosão de estudos sobre microbioma e microbiota. Entre os anos de 1965 e 2016 observa-se um aumento exponencial de publicações relacionadas ao tema, sendo este interesse gerado por uma busca de conhecimento de como as comunidades bacterianas podem influenciar na patogênese de várias doenças e acarretar implicações na abordagem para prevenção, diagnóstico e tratamento de patologias (YOUNG, 2017).

O termo microbioma refere-se não só aos microrganismos, mas também o ambiente que eles habitam, ou seja, inclui os elementos do hospedeiro, tais como o epitélio, componentes do sistema imunológico e produtos (metabólitos) de ambos: micróbios e hospedeiros. A coleção de bactérias que colonizam o trato gastrointestinal é denominada "microbiota intestinal" que coevoluiu com o hospedeiro ao longo de milhares de anos para formar uma relação intrincada e mutuamente benéfica (MARCHESI; RAVEL, 2015; NEISH, 2009).

Na microbiota de intestino humano, até poucos anos atrás, tinham sido identificadas pelo menos 1000 a 1200 espécies bacterianas simbioticamente sobrevivendo com o hospedeiro (GILL et al., 2006; QIN et al., 2010). Estes agentes desempenham um papel importante na saúde humana, contribuindo desde o processamento de nutrientes e obtenção de energia, à proteção contra agentes patogênicos e manutenção da homeostase intestinal (MAYNARD et al., 2012; YOUNG, 2012).

O surgimento de métodos moleculares, que permitiu a identificação de espécies independentes do cultivo de comunidades microbianas intestinais, ampliou a capacidade de caracterização de componentes da microbiota. O avanço desta abordagem permitiu gerar um sequenciamento de genes, tornando então possível expandir o conhecimento de comunidades microbianas e proporcionar uma maior compreensão da população de bactérias, até mesmo independente da cultura, influenciando num conhecimento mais amplo da microbiota intestinal (SCHLOSS et al., 2016; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

O manejo de métodos para caracterização da população microbiana possibilitou o conhecimento de novos agentes. Registros atuais revelam que dados

compilados dos estudos Metagenômica do Trato Humano (MetaHit) e do Projeto Microbioma Humano, identificaram 2172 espécies isoladas de seres humanos, classificadas em 12 filos diferentes, das quais 93,5% pertenciam a Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Nos seres humanos, 386 das espécies identificadas são estritamente anaeróbicas e, portanto, geralmente serão encontradas nas regiões da mucosa, como a cavidade oral e o trato gastrointestinal (HUGON et al., 2015; LI et al., 2014).

Na diversidade da composição da microbiota humana saudável observa-se uma prevalência de bifidobactérias e lactobacilos que são considerados as mais importantes bactérias benéficas para a saúde dos hospedeiros humanos, enquanto que as bactérias, estafilococos e Clostridia, consideradas potencialmente patogênicas, coabitam em menor quantidade (RASTALL, 2004).

Ao nascer, os intestinos são estéreis, a colonização intestinal por bactérias na criança, durante os primeiros dias de vida, se origina principalmente da mãe e do meio ambiente. Gradualmente, o consumo de oxigênio por estas bactérias acarreta uma mudança no ambiente intestinal, permitindo o crescimento subsequente de anaeróbios estritos. Este processo que se inicia depois da ruptura da membrana fetal pode ser influenciado por vários fatores, levando a um significativo impacto no desenvolvimento da microbiota intestinal (PENDERS et al., 2006).

O local (hospital ou domicílio) e o modo (vaginal ou cesariano) de nascimento, o uso de antibióticos no período perinatal além da dieta infantil (leite materno ou fórmula para lactentes) pode definir o povoamento de cada indivíduo com consequências tanto no desenvolvimento de funções intestinais, como funções sistêmicas. Pode-se especular que precauções para minimizar as alterações negativas na microbiota intestinal podem propiciar repercussões toda a vida, embasado em razões óbvias, tendo em vista que muitas doenças estão associadas à disbiose (BIEDERMANN; ROGLER, 2015; DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010; FALLANI et al., 2011).

A hospitalização infantil durante o nascimento foi associada com maior prevalência do aumento da contagem de *C. difficile* e número reduzido de Bacteroides e Bifidobacteria em estudo de fezes de crianças. Essa taxa de colonização aumentada de *C. difficile* em bebês assintomáticos no ambiente hospitalar ocorre devido à presença de esporos formados por essa bactéria que persiste por meses nesse ambiente (AL-JUMAILI et al., 1984; AZAD et al., 2013; PENDERS et al., 2006).

Atrelado ao local de nascimento, recém-nascidos de parto cesariano apresentaram maior taxa de colonização por *C. difficile* e menos Bifidobacteria e Bacteroides na sua composição intestinal quando comparados ao parto vaginal (AL-JUMAILI et al., 1984; PENDERS et al., 2006). No parto vaginal, o contato com a vagina da mãe e flora intestinal é uma importante fonte de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Ao contrário, em cesariana, o contato direto da boca do recém-nascido com a microbiota vaginal e intestinal é substituído por bactérias exógenas não-maternas que colonizam o intestino dos bebês, produzindo uma flora menos diversificada e uma comunidade bacteriana semelhante ao encontrado na superfície da pele, prejudicando a colonização intestinal por *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e Bacteroides (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010; TORRAZZA; NEU, 2011)

Outro fator que impulsiona as mudanças no dinâmico ecossistema intestinal da criança é o tipo de dieta oferecida. Azad e colaboradores (2013) em avaliação de presença de patógenos nas fezes de bebês com idade entre 3 e 4 meses verificou que a prevalência de *C. difficile* foi significativamente menor entre as crianças amamentadas exclusivamente do que entre as crianças que receberam fórmula (20% v. 71%, $p = 0,01$) e a prevalência não diferiu por via de parto. Este resultado é consistente com os estudos anteriores que relatam menor prevalência e menor contagem de *C. difficile* na flora intestinal de lactentes amamentados comparado aos que foram alimentados com fórmulas (PENDERS et al., 2005, 2006; STARK; LEE, 1982). Esta diversidade encontrada na microbiota intestinal de lactentes amamentados pode ser atribuída à presença de oligossacarídeos únicos presentes no leite materno, servindo como substratos metabólicos seletivos para um número limitado de microorganismos no trato gastrointestinal (MARCOBAL et al., 2010).

Mudanças na composição da microbiota intestinal de crianças antes e após o desmame tem sido discutidas por muitos autores. Fallani e colaboradores (2010) analisando fezes de crianças saudáveis, durante as primeiras 6 semanas de vida, notou que achados importantes ocorreram após o desmame, como diminuição de Bifidobacteria, Bacteroides, Enterobacteriaceae e espécies de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, sugerindo que a forma de alimento influencia diretamente sobre a composição da microbiota intestinal de recém-nascidos, dessa forma exercendo também influência na composição da microbiota individual (BENNO; SAWADA; MPTSUOKA1, 1984; FALLANI et al., 2006, 2010).

C. difficile pode ser identificado em microbiota intestinal infantil na faixa etária até dois anos de idade, por vários meses consecutivos. A colonização por essa bactéria foi estável, e isso mostra que *C. difficile* pode ser considerado um componente normal da microbiota intestinal em crianças nesse grupo etário, (ROUSSEAU et al., 2011a). Curiosamente, os bebês podem, portanto, constituir um reservatório de cepas infecciosas para adultos e atuar como um vetor eficiente de esporos de *C. difficile* (ROUSSEAU et al., 2011b).

GONZÁLEZ-DEL VECCHIO et al., 2016 em um estudo caso-controle, confirmaram que, independentemente da presença de *C. difficile*, em crianças menores de 2 anos, as infecções gastrointestinais apresentavam resolução dos sintomas clínicos sem qualquer tratamento e sem complicações. No entanto, ainda há controvérsias quanto ao mecanismo de colonização assintomática em crianças, causando dúvidas nas recomendações terapêuticas no caso de *C. difficile* associado à diarreia nesse grupo etário (MCFARLAND; BRANDMARKER; GUANDALINI, 2000).

Por meio de uma profunda e coordenada relação entre hospedeiro e bactéria, o *C. difficile* pode fazer parte da microbiota intestinal de crianças saudáveis tanto no período neonatal como no lactente, entretanto a modulação de um comportamento patogênico pode ser esperada na vigência de uma disbiose da microbiota intestinal (BIEDERMANN; ROGLER, 2015; HEAVEY; ROWLAND, 1999; MADAN et al., 2012; YOUNG, 2012). O equilíbrio global da comunidade microbiana intestinal é tão importante que, quando ocorre uma disbiose da microbiota, pode resultar em doença inflamatória do intestino (MAYNARD et al., 2012).

Esse desequilíbrio da microbiota intestinal faz com que *C. difficile* seja patogênico, causando crescimento excessivo e levando a uma condição clínica de diarreia grave, caracterizada por infecção por *C. difficile* (CDI) com riscos de recorrência (CHANG et al., 2008; DENÈVE et al., 2009). Tem sido observado nos últimos anos, um aumento significativo na incidência de CDI pediátrico, devendo-se considerar o tratamento pelo critério individualizado (GIACOMO; BORALI, 2016).

Abordagens metabolômicas tem avançado muito a nossa compreensão dos mecanismos que ligam a composição da microbiota intestinal e sua interação no binômio saúde - doença. Alteração na microbiota tanto pode ser uma causa ou uma consequência da doença. Novas estratégias terapêuticas podem ser necessárias para restaurar o microbioma e restabelecer uma comunicação efetiva entre o hospedeiro e

o alvo na microbiota. O sucesso terapêutico depende da compreensão de como a microbiota afeta e é afetada pelo hospedeiro (THURSBY; JUGE, 2017).

1.2 *Clostridioides difficile*: características gerais

1.2.1 Caracterização

O gênero *Clostridium* pertence à família Clostridiaceae, ordem Clostridiales, classe Clostridia e divisão Firmicutes. Contém 238 espécies (e subespécies) reconhecidas, sendo que apenas algumas espécies são patogênicas para humanos. *Clostridium difficile* é a espécie toxínica mais comum do Gênero *Clostridium*. Curiosamente, *C. difficile* descrito pela primeira vez em 1935 por Hall e O'Tolle teve sua raiz na criança, pois fazia parte da microflora intestinal de neonatos e pela dificuldade de cultivar este organismo no laboratório inicialmente foi chamado *Bacillus difficile* (HATHEWAY, 1990; KONEMAN et al., 2008).

Em 1994, a heterogeneidade dessa espécie foi confirmada pelo sequenciamento do gene do rRNA 16S e sequências de proteínas ribossômicas. Com a crescente disponibilidade de dados genômicos este gênero, como vários outros, passou por uma série de revisões. Dentre os achados propostos foi sugerido que *Clostridium difficile* estaria dentro da família Peptostreptococcaceae. Sob esta proposta, as espécies *Clostridium difficile* tornar-se-iam *Peptoclostridium difficile*. Em 2015 com a proposta de Lawson e Rainey de reconhecimento do gênero no rRNA cluster I foi designado *Clostridium butyricum* e passando a ser reconhecido como *Clostridium* stricto sensu (COLLINS et al., 1994; FINEGOLD; SONG; LIU, 2002; LAWSON; RAINEY, 2016; YUTIN; GALPERIN, 2013).

Em 2016, uma reclassificação foi sugerida, baseado na constatação de que, o *Clostridium difficile* filogeneticamente estaria localizado no cluster XI, pertencente à família Peptostreptococcaceae, conforme definido anteriormente por Collins. Com a nova classificação foi necessário um nome que se adequasse tanto ao código bacteriológico quanto à comunidade científica e indústria farmacêutica. Assim surgiu a mudança recente da designação do gênero *Clostridioides difficile*. Embora essa denominação estabelecida, ainda que não tenha sido sedimentada, possibilitou a manutenção da abreviatura "*C. difficile*", assim como os termos "*C. diff*" e CDI,

continuasse sendo utilizados (LAWSON et al., 2016).

Clostridioides difficile, tem descrição idêntica à *Clostridium difficile*, um bacilo gram-positivo, anaeróbio estrito e apresentam-se como bastonetes móveis, com dimensões de 0,5 -1,9 por 3,0 - 16,9 µm, que formam esporos subterminais ovais e mostram o melhor crescimento no agar de sangue nas temperaturas do corpo humano na ausência de oxigênio. Produzem duas exotoxinas potentes, nomeadamente: toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB). O *C. difficile* tem sido reconhecido como agente etiológico da colite pseudomembranosa em humanos desde 1978 (BRETTLER; WALLACE, 1984; KONEMAN et al., 2008; LAWSON et al., 2016; LIMA et al., 1988; PRICE; DAVIES, 1977).

Historicamente, alguns testes vêm surgindo, desde a primeira descrição do *C. difficile*, buscando uma maior acurácia em exames complementares, para melhor sensibilidade e especificidade na identificação laboratorial desse patógeno. Isto demanda da necessidade de um diagnóstico mais preciso e coeso que possibilite uma conduta apropriada e correlacionada com a clínica (ANTONARA; LEBER, 2016).

C. difficile pode ser isolados a partir de espécimes fecais em cultura usando agar de cefoxitina frutose de cicloserina (CCFA) ou agar de cera de cefoxitina de clara de cicloser (CCEY). Na identificação por meio de crescimento em agar seletivo (CCFA) pode ser observado algumas características que sinalizam para a presença da espécie no cultivo. As colônias de *C. difficile* são de 4 a 6 mm de diâmetro, irregulares, levantadas, opacas e cinza-branco após 48 horas de incubação. Apresenta também fluorescência verde-amarela sob luz ultra violeta de onda longa. Geralmente não são hemolíticos, com um cheiro de fazenda característico. As colônias típicas podem ser vistas após a subcultura de colônias suspeitas a partir de meios seletivos sobre agar anaerobios fastidiosos (JOUSIMIES-SOMER et al., 2002).

Teste de amplificação de ácido nucleico (NAATs) que utilizam método de PCR e uma variedade de genes do rRNA 16S, é geralmente considerado um bom método para a detecção bacteriana, pois é simples, rápida, sensível e específica. A dificuldade do método é reportada quando as sequências dos genes homólogos possuem alta similaridade. Há recomendações para utilização com sucesso na identificação de espécies de *Clostridium*, por exemplo *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. baratii* e *C. butyricum*, *C. novyi*, *C. difficile* (BÉLANGER et al., 2003; GRANT et al., 2008;

SATTERFIELD et al., 2010).

Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) detecta a variação genética entre cepas, seguido da separação dos fragmentos genômicos em um gel de agarose. PFGE é conhecido por ser altamente discriminatório e uma técnica frequentemente utilizada para investigações de surtos. Realiza o isolamento de *C. difficile*, embora uma proporção considerável de cepas não sejam identificadas por esta técnica devido à degradação do DNA durante o procedimento (ALONSO et al., 2005).

Análise de sequenciamento de genes do rDNA 16S é um método de identificação genotípica, é utilizado para estudos filogenéticos e, subsequentemente, pode ser capaz de reclassificar as bactérias em espécies completamente novas, ou mesmo gêneros. Também pode ser usado para descrever novas espécies que nunca foram cultivadas com sucesso (BRAZIER et al., 2002; JANVILISRI et al., 2010).

Sequenciamento de Genoma Inteiro (WGS) conhecido como sequenciamento do genoma completo é um processo de laboratório que determina a sequência de DNA completa do genoma de um organismo. Este método de sequenciamento é uma ótima promessa para uma identificação rápida, precisa e abrangente de caminhos de transmissão bacteriana em ambiente hospitalar e comunitário, com reduções concomitantes de infecções, morbidade e custos (PARKHILL; WREN, 2011).

Análise proteômica é uma tecnologia que vem surgindo como uma promessa que também irá apoiar no fornecimento de informações detalhadas sobre a fisiologia básica deste patógeno humano anaeróbico. O conhecimento profundo da fisiologia do *Clostridioides difficile* surge como uma esperança para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e de medidas profiláticas (OTTO et al., 2016).

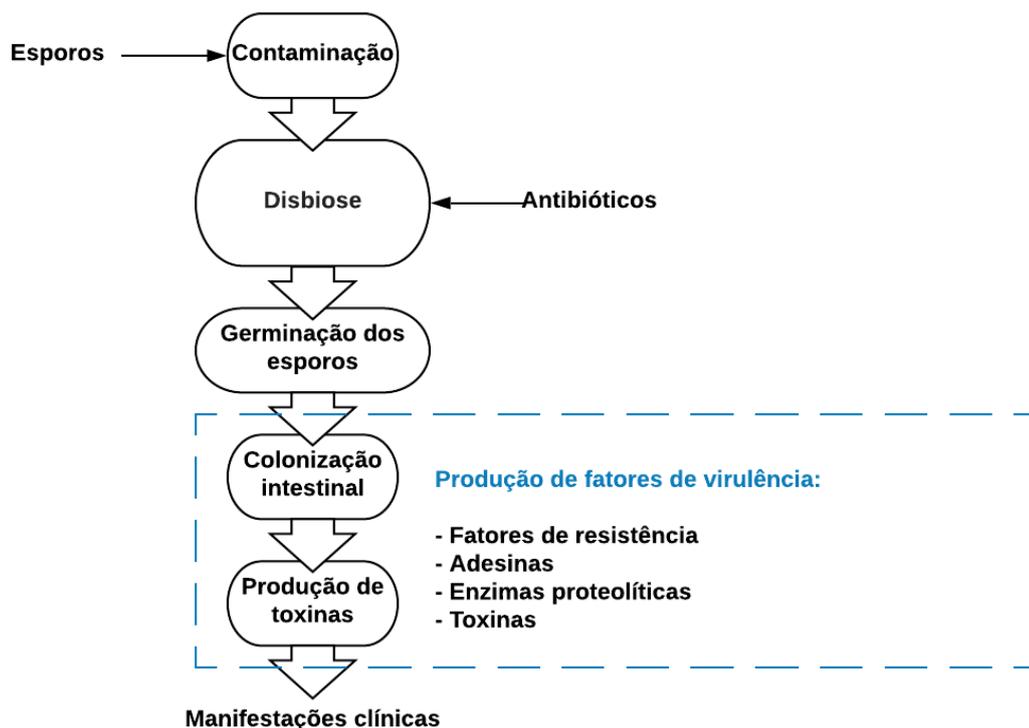
1.2.2 Colonização e Patogenicidade

C. difficile está amplamente presente na natureza, podendo ser encontrado na água, no solo, em alimentos, podendo sobreviver no ambiente por meses. Uma combinação de fatores que permitam alteração na microbiota colônica normal e na colonização do organismo, pode ser crucial para acarretar infecção, a depender de

interações entre o agente microbiano e o celular neste complexo ecossistema intestinal (BRITTON; YOUNG, 2012). (Figura 1).

O limiar entre doença e colonização de *C. difficile* não está completamente esclarecido. Nas hipóteses sugeridas, alguns pontos podem ser considerados: o impacto da microbiota intestinal na transformação do ácido biliar que afeta a germinação de esporos do *C. difficile*; antagonismo direto pela microbiota normal através da produção de bacteriocinas, antimicrobianos produzidos por esses organismos que inibem diretamente o crescimento de *C. difficile*; estimulação de respostas imunes inatas; e competição entre a microbiota e *C. difficile* para limitação de recursos nutricionais (BRITTON; YOUNG, 2012).

Figura 1: Etapas chave da infecção por *C. difficile*



Fonte: Adaptado de JANOIR, 2015

Para garantir a sobrevivência no trato gastrointestinal, alguns fatores inerentes ao genoma do *C. difficile* são fundamentais para a produção de enzimas que ajudam no transporte e metabolismo dos carboidratos, incluindo p-hidroxifenilacetato descarboxilase, que permite ao organismo produzir composto bacteriostático que pode ser inibitório para micróbios intestinais, responsável pelo odor característico do *C. difficile*. Outros compostos também são produzidos permitindo que seja utilizado

nitrogênio e fosfolípidos oriundos da dieta do hospedeiro para sobrevivência na presença de ácidos biliares (CARROLL; BARTLETT, 2011; SEBAIHIA et al., 2006).

Fatores de virulência são também importantes no processo de adesão celular contribuindo para a patogênese de *C. difficile*, dentre esses fatores de virulência incluem-se adesinas, flagelos, endoesporos, biofilmes e a produção das toxinas que são os principais fatores responsáveis pela patogenicidade dessa bactéria (VEDATAM et al., 2012).

Esse bacilo, produz duas exotoxinas envolvidas na patogênese desta doença, a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB), que são codificados pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente, localizados dentro de uma região conhecida como locus de patogenicidade ou PaLoc, juntamente com três outros genes regulatórios (*tcdC*, *tcdR* e *tcdE*) formam o locus de patogenicidade no cromossomo do *C. difficile*. O gene *tcdR* codifica um fator sigma RNA polimerase essencial para ativar diretamente a expressão do gene das toxinas; o *tcdE* codifica uma proteína tipo "holin", que é necessária para a liberação extracelular das toxinas TcdA e TcdB. O papel do *tcdC* é ainda controverso porém atribui-se uma possível ação antagonista do *tcdR* (CARROLL; BARTLETT, 2011); JANOIR et al., 2016).

Além das toxinas A e B, uma terceira toxina, chamada toxina binária, também é produzido por alguns, mas não por todas, cepas toxigênicas do *C. difficile*. Os genes que codificam a toxina binária não são encontrados no PaLoc (CARROLL; BARTLETT, 2011).

TcdA e TcdB são grandes toxinas clostridiais (308 kDa e 270 kDa, respectivamente), pertencem à grande família de toxinas clostridiais (LCTs) e ambas compartilham uma estrutura de domínio ABCD. O domínio A (para "Activity") é o domínio da N-terminal de glicosiltransferase, domínio B (para "Binding") está localizado na parte C-terminal da proteína e exibe oligopeptídeos repetitivos combinados, domínio C (para "Cuty") consiste em um domínio de cisteína protease envolvido no auto processamento de toxinas e o domínio D (para "Delivery") corresponde à região hidrofóbica interna. Desta forma, a ação da toxina engloba quatro etapas principais: 1 - endocitose mediada pela ligação do receptor ao domínio B; 2- translocação de um domínio catalítico através da membrana que envolve o domínio D; 3- libertação da fração enzimática uma vez que a toxina é internalizada em

células hospedeiras por processamento auto proteolítico (domínio C) promovido pelo hexa-fosfato de inositol celular; 4- inativação por glicosilação de GTPases da família de proteínas Rho (domínio A) (AWAD et al., 2014; JANOIR., 2016).

De fato, os alvos da atividade enzimática de TcdA e TcdB são as GTPases da família Rho e Ras dentro das células hospedeiras, que afeta os processos celulares vitais, conseqüentemente a inativação das GTPases Rho, Rac e Cdc42 da família Rho, ocorre a alteração do citoesqueleto de actina, o arredondamento das células, ruptura de junções firmes e comprometimento da barreira intestinal, bem como a morte celular por apoptose ou necrose (BRITO et al., 2002a, 2002b; CARROLL; BARTLETT, 2011; DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009; PRUITT; LACY, 2012; VOTH; BALLARD, 2005).

Essas toxinas também atuam como mediadores de inflamação na infecção por *C. difficile* (CDI) estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1B, TNF- α , IL-8 a partir de células epiteliais e da mucosa, o que provoca o influxo de neutrófilos e desencadeiam uma complexa cascata de respostas celulares do hospedeiro levando a uma maior destruição do revestimento intestinal podendo causar diarreia, inflamação e necrose tecidual alterações muito bem representadas em modelo animal (CARROLL; BARTLETT, 2011; DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009; LIMA et al., 1988; PRUITT; LACY, 2012; SEBAIHIA et al., 2006).

Originalmente, acreditava-se que a TcdA era o maior responsável em acarretar infecção por *C. difficile*. Este pensamento estava embasado em resultados em uma variedade de estudos em modelos animais. Em hamsters e camundongos, administração intragástrica de TcdA, mas não de TcdB, induz o acúmulo de líquido ileal, resultando em diarreia, hemorragia e morte, sendo a TcdA referida como uma enterotoxina (PRUITT; LACY, 2012; VOTH; BALLARD, 2005) e TcdB referida como a citotoxina porque é 100 a 1000 vezes mais potente *in vitro* em células cultivadas do que TcdA (VOTH; BALLARD, 2005).

Posteriormente, foi caracterizado que mutantes isogênicos para *tcdA* e *tcdB* de uma cepa virulenta de *C. difficile*, usada em um modelo de doença em hamsters demonstrou que a toxina B, e não apenas a toxina A, é essencial para a virulência desse patógeno emergente. Isso gera uma mudança no conceito anterior que mostrava que a toxina purificada A sozinha era capaz de induzir a patologia da doença por *C. difficile* e que a toxina B purificada não era eficaz a menos que fosse

coadministrada com a toxina A. Isto cria um paradoxo sobre a importância individual de TcdA e TcdB, onde nesses achados é reforçada a patogenicidade das TcdA e TcdB e destaca-se a necessidade de continuar a considerar a pesquisa das duas toxinas nos testes diagnósticos (KUEHNE et al., 2010).

A patogenicidade da CDI inicia-se após a ingestão de esporos ou células vegetativas que ocorre principalmente por via fecal-oral e na presença de uma disbiose, que pode ser precipitada por terapia antimicrobiana (ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016; DENÈVE et al., 2009). No estômago as células vegetativas são mortas devido à acidez, mas os esporos podem sobreviver, e germinar no intestino delgado por meio da ação dos ácidos biliares (POUTANEN; SIMOR, 2004). No lúmen intestinal as toxinas são liberadas e internalizadas pelas células intestinais por meio da ligação aos receptores (processo dependente de clatrina) dentro das vesículas endossômicas, as toxinas sofrem clivagem auto catalítica, e os fragmentos contendo os sítios ativos migram para o citosol, onde exercem suas funções. Ocorrendo a inativação de proteínas da família Rho, resultando no desarranjo do citoesqueleto, arredondamento celular, marginalização do núcleo, perda da integridade estrutural e, por fim, morte celular. Além disso, a inativação das Rho GTPases induz a perda das zônulas de oclusão na barreira epitelial intestinal, resultando no aumento da permeabilidade do epitélio. A alteração da integridade celular e o aumento da permeabilidade epitelial contribuem para a migração neutrofílica e deflagração dos eventos inflamatórios observados na doença. (CHAVES-OLARTE et al., 1997).

Além dos efeitos mencionados anteriormente, as toxinas também induzem morte celular por apoptose que contribui mais ainda para o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal. Brito e colaboradores (2002b) também demonstraram que a TcdA induz mudança na forma, rearranjo de actina do citoesqueleto e aumento de aderência secundária ao aumento de expressão de Mac-1 em neutrófilos humanos, o que pode estar relacionado com a formação de pseudomembranas futuras (BRITO et al., 2002b).

Ambas toxinas estimulam ainda a liberação de citocinas pró inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-8. Isto leva posteriormente ao recrutamento e adesão de neutrófilos no tecido, resultante da alteração de expressão de moléculas de adesão, fenômeno que certamente é

responsável pela formação de pseudomembranas que podem ser visto na colite severa resultante da resposta inflamatória (SHEN, 2012).

A toxina binária denominada como *C. difficile* transferase (CDT), é um determinante associado à virulência, cujo papel exato na patogênese da doença permanece obscuro, sendo assim o efeito da toxina binária na virulência ainda é uma questão em debate (AWAD et al., 2014; JANOIR, 2016). Estudos recentes demonstram que em doses baixas, a toxina binária induz a formação de protruções na superfície das células epiteliais que aumentam a adesão ao *C. difficile*, essas protruções induzidas por CDT, ocasionam o reencaminhamento de vesículas contendo a fibronectina da superfície basolateral para a superfície apical das células epiteliais intestinais, onde a fibronectina é liberada e aumenta a adesão de bactéria (JANOIR, 2016).

Algumas peculiaridades da presença do *C. difficile* na criança abaixo de 2 anos, sem causar doenças, são enigmas ainda não totalmente esclarecidos, algumas teorias são discutidas: a falta de receptores de toxinas na superfície de células intestinais, a ação protetora do leite materno e a defesa proporcionada por outras bactérias intestinais neonatais. Em modelo de íleo de coelho foi constatado que não havia sítios de ligação para a TcdA na superfície das células, além disso, em células de íleo de coelhos recém-nascidos e jovens, tratadas com toxina A os efeitos foram mínimos comparados aos danos severos à mucosa causados em coelhos adultos (EGLOW et al., 1992).

O leite materno sabidamente tem um fator protetor, porém o mecanismo exato ainda não está completamente elucidado. Componentes do leite humano (colostró e galactose) parecem inibir a ligação de *C. difficile* em células colônicas, além disso, podem realizar uma ligação com a TcdA, tornando-a inativa. Outros autores relatam ainda que a composição da microbiota de bebês em aleitamento materno, favorece ao crescimento de bifidobactérias dificultando o crescimento e ligação de *C. difficile* ao enterócito (NAABER et al., 1996; ROLFE; SONG, 1995; TREJO et al., 2006).

Na literatura tem sido relatado casos de infecção por *C. difficile* mesmo em faixa etária abaixo de 2 anos, é necessário portanto, o conhecimento da microbiota local, assim como o entendimento do real papel dos fatores de risco. Esses pontos podem facilitar o discernimento da tênue linha entre colonização e patogenicidade

representadas no binômio saúde – doença, em pacientes na faixa etária pediátrica e possibilitar uma conduta mais assertiva (KIM et al., 2008).

1.3 Infecção por *Clostridioides difficile* em criança

1.3.1 Epidemiologia

A infecção por *C. difficile* ganhou importância nos últimos anos como resultado da rápida disseminação de cepas epidêmicas, incluindo cepas hipervirulentas, inclusive na América Latina. Estudo realizado no Chile constatou setecentos e dezenove isolados de *C. difficile* toxigênicos de 45 hospitais de todo o país, caracterizados através do perfil de toxinas, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e sequenciamento do gene *tcdC*, além de, reação em cadeia da polimerase (PCR) ribotipagem e tipificação sequência multilocus (MLST). Preocupante ainda foi que este relatório mostra a ampla disseminação da cepa hipervirulenta NAP1 / 027 / ST1 no Chile, com 79% dos isolados relacionados à cepa hipervirulenta NAP1 (AGUAYO et al., 2015).

No Brasil a detecção de bactérias anaeróbias não é indicação de rotina nos protocolos clínicos, o que prejudica o conhecimento da real incidência de CDI no nosso país. Publicações que envolvem a identificação de *C. difficile* no adulto são provenientes dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Porto Alegre e Fortaleza (BALASSIANO et al., 2009, 2012; COSTA et al., 2014; COSTA et al., 2016; COSTA et al., 2017; OTÁVIO et al., 2015)

Nosso grupo, em investigação de *C. difficile* em pacientes oncológicos, constatou CDI em 46,3% (19/41) das amostras de fezes de pacientes com diarreia no Hospital Haroldo Juaçaba, realizando 3 isolamentos que pertenciam ao mesmo genótipo NAP4 (COSTA, 2017). O mesmo autor constatou um pulsotipo até então desconhecido que foi classificado como ST41 do MLST Clado 2 e toxinotipo IXb. Essa cepa exibiu uma expressão aumentada dos genes em comparação as outras cepas isoladas, resultado esse que pode ter contribuído para a gravidade da doença da paciente e para a lesão tecidual (COSTA et al., 2017). Costa e colaboradores (2014) também relataram o isolamento de cepa toxigênica, NAP4 em paciente com HIV e

câncer, internado para investigação de diarreia, sendo o primeiro caso da América Latina descrito de infecção de CDI adquirido na comunidade.

Mundialmente, na população pediátrica, observa-se um aumento na incidência da infecção por *C. difficile*. Entender esta mudança epidemiológica tem a singularidade de formar a base para otimizar o controle da infecção e desenvolver estratégias para a prevenção (COHEN et al., 2010a; MCDONALD et al., 2007; ZILBERBERG; SHORR; KOLLEF, 2008).

Desde a década passada a percepção do surgimento de formas mais graves, gerando um impacto econômico, devido ao maior número de internações e a possibilidade de culminar com mortalidade, vem tornando a CDI um significativo risco para a saúde pública além de despertar em muitos países a atenção de pesquisas com foco na evolução da incidência (SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013; VAN BEURDEN et al., 2017).

Nos Estados Unidos, estudo populacional em residentes pediátricos (de 0 a 18 anos) de 1991 a 2009, identificou que a incidência geral de CDI ajustada por idade e sexo foi de 13,8 por 100 000 pessoas, observando ainda um aumento de 12,5 vezes, de 2,6 (1991-1997) para 32,6 por 100 000 (2004-2009), ao longo do período do estudo ($p < ,0001$) (KHANNA et al., 2013).

Observando o número de admissões hospitalares em crianças com CDI, também nos Estados Unidos no período entre 2001 e 2006 mostrou um aumento de 2,4 para 4,4 por 1000 e ainda nos casos de infecção hospitalar o aumento foi de 4,4 para 6,5 por 10000 em 22 hospitais pediátricos (KIM et al., 2008). Dados mais recentes registraram uma tendência crescente na incidência de CDI entre crianças hospitalizadas neste país entre 2003 e 2012 resultando em um aumento de 24 para 58 por 10000 internamentos por ano ($p < 0,001$) em toda a faixa etária pediátrica, especialmente na idade de 15 anos (PANT et al., 2016).

Na pediatria especialmente na última década tem sido relatado um perfil epidemiológico de infecção por *C. difficile* distinto de anos anteriores, onde observa-se um cenário não apenas com aumento no número de casos hospitalares, mas também um surgimento de CDI na comunidade. No Canadá um estudo retrospectivo, com 299 crianças foi constatado infecção pelo *C. difficile*, onde setenta e quatro por cento dos casos foi nosocomial (SCHWARTZ et al., 2014).

Da mesma forma em estudo de coorte epidemiológico nos Estados Unidos demonstrou-se que a maioria dos casos de CDI (75%) foi adquirida na comunidade (KHANNA et al., 2013). Similarmente entre os anos de 2010 e 2011 em estudo de vigilância em 10 áreas geográficas dos Estados Unidos demonstrou que 71% de 944 crianças com CDI foram adquiridas na comunidade (WENDT et al., 2014).

No Brasil, há registro da participação de *C. difficile* em criança com diarreia aguda em pesquisa realizada em 3 hospitais de São Paulo com amostras de fezes diarreicas e fezes normais. No estudo paulistano, *C. difficile* foi detectado em 5,5% dos espécimes diarreicas e em crianças com fezes normais a pesquisa de *C. difficile* foi negativa (FERREIRA et al., 2003). Outro estudo publicado no mesmo ano, realizado no Rio de Janeiro, revelou espécies de *C. difficile* detectadas em 6,7% de amostras de fezes diarreicas de crianças hospitalizadas ou não, sugerindo que investigação para *C. difficile* deveria ser considerada na diarreia pediátrica em pacientes hospitalizados ou não nos países em desenvolvimento (PINTO et al., 2003).

Evidências mostram que o surgimento de uma nova cepa hipervirulenta está ligado ao aumento da incidência e da gravidade da doença induzida pelo *C. difficile* (LOO et al., 2005; MCDONALD et al., 2005) NAP1/BI/027 possui uma mutação no gene *tcdC*, um regulador negativo da produção de TcdA e TcdB (MACCANNELL et al., 2006). O surgimento dessa nova cepa tem coincidido com o uso aumentado de fluoroquinolonas (GAYNES et al., 2004; MUTO et al., 2005). Portanto, o estudo da patogênese da lesão induzida por estas toxinas se reveste de importância fundamental, no qual se observa aumento da incidência e da gravidade da doença induzida pelo *C. difficile* e aparecimento de casos adquiridos na comunidade sem história de uso prévio de antibióticos (DIAL et al., 2005).

Em criança, NAP 1 tem sido demonstrada em percentuais mais baixos do que no adulto em torno de 10 a 19,4% dos isolamentos de *C. difficile* (TOLTZIS et al., 2009). Percebe-se que melhorias nos métodos de detecção deste agente, aliado ao surgimento de formas graves na faixa etária pediátrica tem contribuído para uma nova consciência no diagnóstico de CDI na criança (BAUER et al., 2011; SPIGAGLIA et al., 2015; WILCOX et al., 2012).

1.3.2 Quadro clínico

Infecção por *C. difficile* ocorre na presença de condições inicialmente inerentes a alterações da microbiota colônica do hospedeiro associado a diversos fatores de virulência do agente, esses aspectos podem definir entre a colonização e ação patogênica. A importância do sistema imunológico do hospedeiro, neste processo é bem pontuada, pois evidências mostram que as taxas de infecção e agravamento da doença ocorre em pessoas com imunodeficiência (KELLY; KYNE, 2011; LOO et al., 2011). Além disso, a constatação da presença de anticorpos antitoxina pode explicar variações nas apresentações de doenças entre hospedeiros imunocompetentes (KELLY, 2012; KELLY; KYNE, 2011).

Na definição do diagnóstico de infecção por *C. difficile* de acordo com as diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) é necessário uma combinação de sintomas sugestivos de CDI e a presença de uma cepa toxigênica / toxina livre nas fezes ou evidência histopatológica de colite pseudomembranosa. Já a Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID), requerem também a exclusão adicional de etiologias alternativas para diarreia (COHEN et al., 2010b; CROBACH et al., 2016; GALDYS; CURRY; HARRISON, 2014).

O quadro clínico da infecção por *C. difficile* pode variar desde um curso assintomático ou diarreia leve até um quadro grave com complicações como colite pseudomembranosa, megacolon tóxico, perfuração intestinal e morte (ZILBERBERG; TILLOTSON; MCDONALD, 2010).

Na infância a diarreia na CDI manifesta-se habitualmente com fezes de caráter aquoso, odor fétido e a presença de sangue. Numa investigação entre 200 crianças canadenses infectadas por *C. difficile*, 79% apresentaram diarreia aquosa e 12,5% com diarreia sangrenta (MCDONALD et al., 2005). Achado mais expressivo de evacuações com sangue (24%) foi verificado entre 45 crianças indianas com diagnóstico de CDI (GOGATE et al., 2005).

Quanto a gravidade da diarreia a maioria surge de forma leve a moderada. Além disso, esse sintoma não é nem mais freqüente, nem específico para crianças com infecção por *C. difficile* hospitalar ou adquirido na comunidade em comparação com outras causas de diarreia (BORALI et al., 2015).

Além da diarreia, a maioria das crianças sintomáticas, semelhante aos adultos, apresentam outras manifestações como febre, dor abdominal, distensão abdominal, vômito e perda de peso (BORALI et al., 2015; KHALAF et al., 2012).

Apresentação clínica mais severa está relacionada à identificação de uma cepa hipervirulenta, o que acarretaria um aumento da mortalidade, além de ser um fator de risco para recorrência (GAREY et al., 2008; MCDONALD et al., 2005; WARNY et al., 2005). Desde 2003, a cepa hipervirulenta (NAP1/027) tem sido isolado em surtos em vários países europeus, apenas em 2009 o primeiro isolamento na América Latina foi reportado em um paciente com diarreia na Costa Rica. (QUESADA-GÓMEZ et al., 2010)

Controvérsias no impacto da gravidade em pacientes com infecção por *C. difficile* relacionado por cepa hipervirulenta vem sendo discutido recentemente. Tamez-Torres e colaboradores (2017), compararam pacientes com presença de NAP1/RT027 e outras cepas de *C. difficile* não classificadas como hipervirulentas, concluíram que os tipos de apresentação clínica mais graves não eram de pacientes onde foi detectado NAP1/RT027. Outros autores já tinham sugerido que cepa emergente tem sido identificada e não necessariamente estaria relacionada com quadro grave da doença (KIM; KIM; PAI, 2016; NICOLAU; THABIT, 2016).

Uma evolução desfavorável para formas graves de infecção por *C. difficile* que resultam em megacolon tóxico, colite pseudomembranosa e morte raramente ocorrem em crianças. Uma recente série pediátrica dos Estados Unidos encontrou doença grave apenas em 8% dos casos em uma faixa de grupos etários ($P = 0,08$) (WENDT et al., 2014). No geral, parece que as mudanças epidemiológicas no *C. difficile* não resultaram nos mesmos resultados severos em crianças que na população adulta (SCHWARTZ et al., 2014).

Casos de recorrência da infecção por *Clostridioides difficile* (CDI) é habitualmente definida com o reaparecimento dos sintomas dentro de 8 semanas depois de quadro infeccioso precedente resolvido e seguido por período assintomático (DEBAST; BAUER; KUIJPER, 2014; DUROVIC et al., 2017). Esse quadro recorrente ocorre em 20- 30 % dos pacientes com CDI, gerando um impacto na qualidade de vida dos pacientes, com aumento nos dias de internamento e podendo ser responsável pelo aumento na taxa de mortalidade (JOHNSON, 2009; KELLY, 2012).

1.3.3 Fatores de risco para CDI

O conhecimento de fatores de risco para CDI, bem delineados a partir de estudos realizados em adultos, vem instigando investigações na faixa etária pediátrica, em virtude de potenciais influências desses fatores na evolução da doença. Estudos revelam que a infecção por *C. difficile* pode estar atrelada à fatores de risco como hospitalização, uso de antibiótico e inibidor de bomba de prótons (IBP) e presença de comorbidade, sendo a falha no desenvolvimento de uma resposta sistêmica de anticorpos antitoxina o que diferencia os pacientes com CDI e CDI recorrente de portadores assintomáticos de *C. difficile*. Assim uma imunidade inadequada poderá explicar a associação de casos de recorrência atrelados aos fatores de risco (KELLY, 2012).

A hospitalização foi considerada, por muito tempo, um fator fundamental para CDI, porém evidências reportam que outras condições que podem favorecer ao surgimento de casos relacionados como uso de antibiótico e inibidor de bomba de prótons, à idade, à presença de comorbidade, inclusive ampliando a possibilidade de surgimento de casos na comunidade (ANANTHAKRISHNAN, 2011).

O uso de antibióticos pode ser considerado uma impactante condição para o desenvolvimento de CDI tanto em adulto como na criança, sendo o principal aspecto diretamente relacionado à alteração da microbiota intestinal (SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013), da mesma forma o uso de terapia de supressão de ácido gástrico (inibidores da bomba de prótons e / ou antagonistas dos receptores de histamina) também parece atuar de maneira significativa na infecção por *C. difficile* tanto de origem hospitalar como nos casos adquiridos na comunidade (JIMENEZ et al., 2015).

Em investigação de infecção por *C. difficile* em dois hospitais pediátricos na Nova Zelândia, numa amostra de 46/320 crianças que apresentavam CDI, observou-se uma significativa relação com os fatores de risco como: tratamento com inibidor de bomba de próton, risco relativo (RR) 1,74 com 95 % intervalo de confiança (CI) 1,09–5,59; $p=0.002$) e ainda com uso prévio de antibiótico (RR 1,17 com 95 % CI 0,99–1,17; $p=0.03$) (SATHYENDRAN et al., 2014).

Estudo de um grupo de crianças chilenas internadas, também verificou que em CDI dentre os fatores de risco mais frequentemente encontrados, estava o uso de

antimicrobianos dentro das seis semanas antes da infecção, 21 casos (80,7%), presença de sonda 20 (76,9%) e uso de IBP 19 (73, 1%) (MACCIONI et al., 2015). Outras publicações prévias, também afirmam que a terapia com antibióticos é o principal fator de risco do CDI em crianças (DULĘBA; PAWŁOWSKA; WIETLICKA-PISZCZ, 2014; LOO et al., 2011).

Um estudo de coorte retrospectivo, unicêntrico, comparou as taxas e a gravidade do CDI adquirido em hospital entre pacientes em uso inibidores da bomba de prótons (IBP) versus pacientes sem exposição à IBP. Um total de 41.663 pacientes com CDI que foram hospitalizados entre janeiro de 2013 e maio de 2014; Destes, 17.471 pacientes (41,9%) receberam pelo menos uma dose de IBP (grupo IBP) e 24.192 pacientes (58,1%) não tinham exposição a IBP (grupo controle). Foi constatado que um total de 348 pacientes tiveram CDI durante o período do estudo, sendo que o uso de IBP representa um risco relativo não ajustado (RR) de 6,46 (intervalo de confiança de 95% [IC] 3,63-11,51, $p < 0,0001$) vezes maior de desenvolver CDI e RR não ajustado de 6,27 (IC95% 2,91-13,48, $p < 0,0001$) vezes maior de desenvolver CDI grave, no grupo IBP. Os autores concluíram que o uso de IBP foi associado a um aumento tanto na taxa quanto na gravidade de CDI e sugerem que o uso de IBP deve ser avaliado criticamente para limitar os danos potenciais associados ao desenvolvimento de CDI (LEWIS et al., 2016).

Fatores de risco adicionais para CDI são indivíduos com comorbidades dentre elas as mais aluzentes a esta associação: doença renal crônica, fibrose cística, doenças inflamatórias intestinais, neoplasia principalmente com uso de quimioterapia. Outros grupos que são mais vulneráveis à CDI são pacientes com imunodeficiência, tais como aqueles com imunodeficiências genéticas, infecção por HIV e aqueles com história de transplante de órgãos. Pacientes após cirurgia gastrointestinal ou procedimentos endoscópicos, e aqueles com gastrostomia ou sondas de jejunostomia também estão em maior risco de CDI (DEPESTEL; ARONOFF, 2013; KHANNA; PARDI, 2012; WIJARNPREECHA et al., 2016).

Outra associação com doença crônica foi reportada em adultos com fibrose cística, onde *C. difficile* foi detectado, através de cultivo, em 50% (30/60). As toxinas do *C. difficile* foram detectadas em 63% (19/30) de amostras de fezes positivas para *C. difficile*. Todas as amostras de fezes positivas para toxinas continham cepas toxigênicas de *C. difficile* que continham genes de toxina, *tcdA* e *tcdB*. Apesar da

presença de *C. difficile* e suas toxinas em fezes do paciente, não foram relatados sintomas gastrointestinais agudos. A ribotipagem das cepas de *C. difficile* revelou 16 ribotipos (RT), 11 dos quais são conhecidos como causadores de doenças, incluindo o RT078 hipervirulento. Demonstrando uma alta prevalência de cepas hipervirulentas e toxigênicas de *C. difficile* em pacientes assintomáticos com FC. Isso destaca o papel potencial de pacientes assintomáticos com FC na transmissão nosocomial de *C. difficile* (BURKE et al., 2017).

Em relação à criança com doença neoplásica, DE BLANK e colaboradores (2015) analisando o histórico de crianças hospitalizadas no período entre 1999 e 2006 identificou um aumento na incidência de CDI em crianças com diagnóstico de câncer ($p=0,01$). O mesmo estudo pode concluir ainda que o risco de CDI estava diretamente associado ao uso prévio de aminoglicosídeo, cefepime, e inibidor de bomba de próton.

Recentemente um estudo de coorte realizado na Suécia, revelou que pacientes com doença celíaca apresentaram significativamente maior incidência de CDI do que controles. O risco de CDI foi maior nos primeiros 12 meses após o diagnóstico de doença celíaca ($P < 0,0001$), mas manteve-se alto, em comparação com os controles, 1-5 anos após o diagnóstico ($P = 0,004$). Não houve diferenças significativas quanto à exposição prévia a antibióticos entre pacientes com doença celíaca e controles. Portanto, na avaliação de pacientes com doença celíaca com diarreia persistente ou recorrente deve ser considerada a investigação de infecção por *C. difficile* (LEBWOHL et al., 2017).

É crescente o interesse de investigação de *C. difficile* em criança com doença inflamatória intestinal, porém vem surgindo vários questionamentos na conduta devido a possibilidade entre colonização assintomática e CDI. Esta dúvida vem gerando um impacto na tomada de decisão tornando atualmente o tratamento um dilema desafiador (HOURIGAN; SEARS; OLIVA-HEMKER, 2016).

A presença de *C. difficile* em pacientes com colite ulcerativa pode corresponder a desfechos indesejados, proporcionando um maior risco de colectomia e complicação após a cirurgia além de estar intrinsecamente relacionado com mortalidade (NEGRÓN et al., 2016).

Definitivamente a relação entre *C. difficile* e Doença inflamatória intestinal (é complexa. Lamentavelmente existe uma lacuna para o diagnóstico de CDI em pacientes com IBD conseqüente à uma apresentação clínica indistinguível, já que as pseudomembranas vistas pelo exame colonoscópio estão frequentemente ausentes.

(COJOCARIU et al., 2014; NAVANEETHAN; VENKATESH; SHEN, 2010) É importante pontuar que apesar de registros de colonização assintomática por *C. difficile*, infecção por este agente pode negativamente gerar um impacto no curso natural da doença inflamatória intestinal, aumentando a morbidade, hospitalizações prolongadas e recorrências (ONG et al., 2017).

O entendimento do papel dos fatores de risco na CDI, continua sendo um intrigante motivo de continuo estudo, avanços na compreensão e no manuseio da microbiota intestinal talvez seja a chave para escolha de novas terapias e que possivelmente propiciará no futuro um maior controle tanto da infecção como na recorrência de *C. difficile* (CHILTON; PICKERING; FREEMAN, 2018).

1.3.4 Tratamento de CDI em criança

A conduta terapêutica sugerida para infecção por *C. difficile* em criança, segue por três patamares: tratamento de suporte; descontinuidade do antibiótico identificado como fator de risco (sempre que possível) e início do tratamento efetivo e específico para CDI (PAI et al., 2012; SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013).

Diante do diagnóstico de CDI, o tratamento de suporte com hidratação vigorosa e reposição de eletrólitos, caso seja detectado distúrbio hidroeletrólítico, deve ser a primeira medida a ser instituída. Além dessa conduta inicial, a maioria dos estudos sugerem a suspensão da antibioticoterapia vigente, sempre que possível ou o mais precocemente. Esse procedimento pode influenciar na resposta terapêutica e na evolução do quadro clínico, propiciando uma maior taxa de cura e menor recidiva (MULLANE et al., 2011).

Uma vez definido o diagnóstico de CDI, o tratamento específico deve ser instituído. A gravidade da doença e presença de sintomas sistêmicos devem ser considerados na escolha do regime terapêutico: medicamentoso ou cirúrgico. Apesar do alvo principal do tratamento da CDI seja resolver a infecção, outros pontos como prevenção de recorrência e transmissão entre indivíduos, melhora na qualidade de vida e redução das despesas do sistema de saúde também que podem ser considerados (DANIELS; KUFEL, 2018).

A escolha ideal do antibiótico específico para infecção por *C. difficile* na criança vem sendo baseada em estudos prévios de CDI realizado em adultos. Na criança,

motivado pela carência de dados para a faixa etária, os dois principais antibióticos utilizados para tratamento de CDI são os mesmos utilizados no adulto: o metronidazol e a vancomicina, cada uma das drogas exibe vantagens e desvantagens, podendo ocorrer uma variação na recomendação da escolha baseada na gravidade da infecção, episódio inicial ou recidiva (MCDONALD et al., 2018).

Na terapêutica da CDI na criança tanto o metronidazol quanto a vancomicina podem ser considerados no caso de primoinfecção mesmo na forma leve, porém o tratamento com metronidazol vem sendo indicado como droga de escolha em casos leves e moderados, baseado na eficácia e no menor custo. Assim, a terapia com vancomicina segue como indicação de primeira escolha nos casos graves, na não resposta ao metronidazol ou nas recidivas recorrentes (MCDONALD et al., 2018).

A conduta em casos de recorrência de CDI na faixa etária pediátrica, vem sendo tema de discussão devido a limitação das opções terapêuticas permitidas para esta idade. As opções atuais para recorrência incluem metronidazol e vancomicina, que estão associadas a uma taxa de recorrência semelhante (27,1% e 24,0%, respectivamente (VARDAKAS et al., 2012).

Outro antibiótico promissor para uso em CDI recorrente na criança, ainda em estudo para a população pediátrica é a fidaxomicina. Esse antibiótico aprovado nos Estados Unidos em 2011 para uso em adultos, vem demonstrando um potencial agente contra *C. difficile*, com excelente perfil de segurança, além de pouca agressão a microbiota intestinal. Na pediatria há registro de sucesso terapêutico em criança de 10 anos com CDI recorrente (SMELTZER; HASSOUN, 2013; VAISHNAVI, 2015).

Figura 2: Recomendações para o tratamento de infecção por *C. difficile* em crianças

Definição clínica	Tratamento recomendado	Dose pediátrica	Dose máxima/vez
Episódio inicial, não severo	<ul style="list-style-type: none"> • Metronidazol x 10 dias (VO ou VR) • Vancomicina, 10 dias (VO) 	<ul style="list-style-type: none"> • 7,5 mg/kg/dose 3-4x por dia • 10 mg/kg/dose 4x por dia 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 mg • 125 mg
Episódio inicial, severo/fulminante	<ul style="list-style-type: none"> • Vancomicina x 10 dias (VO ou VR) com ou sem metronidazol x 10 dias (EV)^a 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/kg/dose 4x por dia 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 mg • 500 mg
Primeira recorrência, não severa	<ul style="list-style-type: none"> • Metronidazol x 10 dias (VO ou VR) • Vancomicina x 10 dias (VO) 	<ul style="list-style-type: none"> • 7,5 mg/kg/dose 3-4x por dia • 10 mg/kg/dose 4x por dia 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 mg • 125 mg
Segunda ou subsequente recorrência	<ul style="list-style-type: none"> • Vancomicina – pulso-terapia^b (VR) • Vancomicina x 10 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/kg/dose 4x por dia • Vancomicina: 10 mg/kg/dose 4x por dia 	<ul style="list-style-type: none"> • 125 mg • Vancomicina: 500 mg

Legenda: VO – via oral, VR – via retal, EV – endovenosa. ^aEm casos de infecção por *C. difficile* grave ou fulminante associada a doença crítica, considere a adição de metronidazol à vancomicina oral. ^bVancomicina 10 mg/kg com máximo de 125 mg 4x/dia por 10-14 dias, depois 10 mg/kg com máximo de 125 mg 2x/dia durante uma semana, depois 10 mg/kg com máximo de 125 mg uma vez ao dia durante uma semana, depois 10 mg/kg com máximo de 125 mg a cada 2 ou 3 dias durante 2-8 semanas.

Fonte: Adaptada de MCDONALD et al, 2017

Além do tratamento conservador a intervenção cirúrgica vem sendo indicada em apresentações na forma grave, onde na maioria das vezes há evolução para colite pseudomembranosa e que não respondem ao tratamento convencional com metronidazol ou vancomicina (PAI et al., 2012). Colectomia total está indicada em casos raros, sendo geralmente realizada quando há colite grave com presença de quadro toxêmico importante. Estudo que observou evolução de 75 crianças com CDI verificou que apenas em uma criança foi necessária intervenção cirúrgica, sendo realizada colectomia subtotal (PAI et al., 2012).

No manejo da CDI na população infantil, há de se considerar que a restauração da microbiota intestinal pode refletir no sucesso terapêutico. Terapia com impacto na restauração do microbioma tem sido exercida através do uso de prebióticos e probióticos, mais recentemente o transplante de microbiota fecal, vem tornando-se uma possibilidade cada vez mais próxima da realidade pediátrica. (NOOR; KRILOV, 2018)

O uso de probióticos: *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e *Saccaromyces boulardii*

vem sendo empregado como terapia alternativa para CDI. *Saccharomyces boulardii* foi usado com sucesso em criança com infecção recorrente de *C. difficile*, a mesma era portadora de doença Hirschsprung conduzida cirurgicamente, o autor obteve redução da recorrência da infecção e resolução de sintomas. No entanto, pesquisas ainda são necessárias para avaliar e comparar a eficácia de vários agentes probióticos inclusive a combinação de cepas ou com substâncias prebióticas no tratamento e prevenção da infecção por *C. difficile* (OOI; DILLEY; DAY, 2009).

Protocolos com transplante de microbiota fecal (TMF) tem sido proposto no tratamento da CDI em população infantil, alguns relatos reportam a utilização de TMF pela técnica de administração através de tubo nasogástrico temporário ou via colonoscópica, demonstrando o benefício desse tratamento na CDI. A magnitude da restauração do microbioma poderá ser no futuro uma peça fundamental no desfecho dessa doença (KAHN; YOUNG; RUBIN, 2012; KRONMAN et al., 2015; PIEROG; MENCIN; REILLY, 2014; RUSSELL et al., 2010, 2014).

A taxa crescente de infecção e a mortalidade por CDI alertam para a importância da prevenção de CDI. Isso deve ser focado em duas direções: reduzir a exposição dos pacientes ao patógeno, intensificando as medidas de higiene e reduzindo o impacto dos fatores de risco. Uma das medidas mais importantes para reduzir o número de infecções e propagação de *C. difficile* é sem dúvida a lavagem frequente das mãos freqüente. A desinfecção adequada do meio ambiente do paciente (pisos, armários, cama, roupa de cama) e de equipamentos médicos também é importante. Implementação de outras medidas profiláticas em caso de CDI diagnosticado como isolamento do paciente com banheiro separado deve ser considerada (HENRICH et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Entender as particularidades do *Clostridioides difficile* na criança tem sido um desafio para pesquisadores e pediatras. Profissionais são constantemente confrontados com o desafio de diferenciar entre infecção e colonização. Além disso, a presença de comorbidades pode dificultar o diagnóstico apropriado.

Particularidades dos pacientes pediátricos sugerem que em crianças, testes para pesquisa de *C. difficile* devem ser criteriosamente indicados e reservados para casos de diarreia a depender da idade e na suspeita de CDI. Assim, resultados positivos em exames complementares devem ser correlacionados com o perfil clínico. Por outro lado, os profissionais se deparam com a dificuldade de realização de testes específicos para a identificação dessa bactéria que poderiam refletir no curso da doença.

Certamente, diante de um alto índice de suspeita de CDI, ao avaliar um paciente, um melhor conhecimento dos fatores de risco (hospitalização, comorbidade e uso de antibiótico e terapia de supressão de ácido gástrico) associados a CDI, aliados a detecção rápida e o tratamento imediato da infecção, permitirão uma maior articulação de medidas que devem ser tomadas para evitar a propagação da infecção por *C. difficile* e provavelmente proporcionar um melhor desfecho para o paciente.

A relevância de traçar um perfil epidemiológico, com a investigação dos ribotipos de *Clostridioides difficile*, em pacientes pediátricos com diarreia, de certa forma, poderá suprir a carência de estudos, no nosso estado. Essa identificação de *C. difficile* pode ser o ponto de partida para uma maior compreensão das características únicas desse agente na faixa etária infantil, inclusive permitir a orientação de melhores condutas, evitar piores desfechos clínicos e maior tempo de internação, com complicações e mortalidade, que certamente impacta na qualidade de vida e repercute nos fatores sócio econômicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a infecção por *C. difficile* em pacientes com diarreia atendidos em um Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, Ceará.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar as cepas de *C. difficile* através de provas bacteriológicas e bioquímicas convencionais em espécimes de pacientes de Hospital Pediátrico Terciário;
- Tipificar as cepas de *C. difficile* isoladas através da detecção dos genes das toxinas e da genotipagem;
- Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas de *C. difficile* isoladas;
- Conhecer as manifestações clínicas presentes em pacientes com infecção por *C. difficile* em Hospital Pediátrico;
- Correlacionar a presença dos fatores de risco e comorbidades ao tipo de cepa de *C. difficile* isolada;
- Correlacionar o tipo de cepa de *C. difficile* com as manifestações clínicas.
- Investigar a contaminação da mobília hospitalar de pacientes com infecção por *C. difficile* em Hospital Infantil Pediátrico Terciário.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento do estudo

Este é um estudo prospectivo, transversal, descritivo e analítico. Realizado no período de janeiro de 2015 à dezembro de 2017, em serviço público de Hospital terciário referência em atendimento pediátrico. Inicialmente o projeto foi apresentado para o corpo clínico do Hospital para sinalizar à equipe médica, que caso identificassem pacientes com diarreia, o pesquisador deveria ser comunicado. Além disso, 3 vezes na semana era feita uma busca ativa de pacientes em cada bloco desta instituição. Recrutamento de pacientes também foi realizado no ambulatório de especialidade de gastroenterologia pediátrica que funciona nessa mesma instituição. Após a seleção foram aplicados Termo de Consentimento Livre Esclarecido (apêndice A), questionário de coleta de dados clínicos e epidemiológicos (apêndice B) e amostra de fezes foram coletadas.

Essa pesquisa em questão faz parte do projeto do “Núcleo de Excelência em Pesquisa do *C. difficile* no Estado do Ceará (NEPEC-CE)” financiado por PRONEX/FUNCAP/CNPq por meio da concessão no PR2-0101-00060.01.00/15, referente ao edital 02/2015 do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência PRONEX/FUNCAP/CNPq.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão:

1. Idade: crianças maiores de 18 meses e menores de 18 anos atendidos em enfermaria ou ambulatório especializado.
2. Qualquer condição médica que, na opinião do investigador mesmo que a idade seja inferior à 18 meses.
3. Presença de diarreia Hospitalar ou adquirida na comunidade, classificada de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS): presença de fezes líquidas ou 3 ou mais evacuações diárias.
4. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável legal.

Critérios de exclusão:

1. Presença de ileostomia, colostomia ou ressecção colônica maior do que a hemicolectomia, síndrome do intestino curto, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
2. Obstrução ou suboclusão intestinal.
3. Sangramento ou hemorragia intestinal de grau superior a 3 pelos critérios comuns de toxicidade (CTC versão 4.0) do Instituto Nacional do Câncer Norteamericano.
4. Qualquer condição médica que, na opinião do investigador, possa comprometer a capacidade do paciente de participar do estudo ou interferir na interpretação dos resultados

4.3. Local de realização

As coletas dos espécimes e dos dados clínicos foram realizadas no Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, Ceará (HIAS). É um hospital de atenção terciária dentro da rede pública de saúde do Ceará, sendo a referência na assistência infantil do Estado do Ceará, atendendo exclusivamente a clientela do Sistema Único de Saúde (SUS). Oferece à população, 267 leitos hospital, distribuídos nas enfermarias das especialidades pediátricas, tais como gastroenterologia, nefrologia, pneumologia, cardiologia, oncologia, pediatria geral, enfermaria cirúrgica, berçário de médio risco, UTI pediátrica e UTI neonatal. Desenvolvem ainda programas de assistência ambulatorial e domiciliar, como também cuidados especiais e personalizados, com equipes multidisciplinares.

O processamento da amostra, com posterior isolamento, identificação bacteriana e antibiograma foi realizado no Laboratório de Bacteriologia, Centro de Biomedicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). As análises moleculares foram realizadas no Centro de Investigação em Enfermidades Tropicais e no Laboratório de Investigação em Bacteriologia Anaeróbia da Faculdade de Microbiologia na Universidade da Costa Rica (URC) e Laboratório de Biologia de Anaeróbios da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.4. Coleta de dados clínicos e epidemiológicos

Após a seleção foram aplicados Termo de Consentimento Livre Esclarecido (apêndice A), questionário de coleta de dados clínicos e epidemiológicos (apêndice B).

A coleta de dados clínicos foi realizada através de entrevista com responsáveis ou acompanhantes das crianças, onde foi feito o preenchimento de questionário escrito como instrumento de coleta contendo dados da doença diarreica atual, sintomas associados, fatores de risco: internamento prévio, uso de antibiótico, inibidores de bomba de prótons, presença de doença crônica. Além disso pesquisa de exames laboratoriais no prontuário hospitalar onde ficam registrados as informações dos pacientes. Os resultados dos exames (hemograma completo, ureia e creatinina) também foram anotados no questionário da pesquisa. Essa etapa foi realizada no Hospital Infantil Albert Sabin.

4.5. Coleta dos espécimes clínicos

Foram analisadas 56 amostras fecais de 48 pacientes, apresentando diarreia hospitalar ou comunitária. As amostras de fezes diarreicas foram coletadas, no Hospital Infantil Albert Sabin, durante 22 meses dentro do período entre janeiro de 2015 e dezembro de 2017.

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável legal do paciente, foram coletadas amostras de fezes e preenchido questionário com os dados clínicos. Os espécimes foram coletados a partir de evacuação espontânea em qualquer horário do dia, armazenado dentro de um frasco de coleta estéril com boca larga e com tampa bem ajustada. Imediatamente após a coleta a amostra foi armazenada em congelador (-20°C) até ser transportada, em um recipiente com gelo, para o laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Ceará. A amostra foi analisada dentro de um período máximo de dois meses.

4.6. Detecção de toxinas de *C. difficile* em amostras fecais

Toxinas A/B foram pesquisadas em amostras de fezes diarreicas através do kit de detecção comercial ProSPECT™ *Clostridium difficile* Toxin A/B Microplate (Remel® KS, USA) seguindo das recomendações dos fabricantes. Essa etapa foi realizada na Universidade federal do Ceará.

4.7. Isolamento de *C. difficile* a partir de amostras fecais

As amostras de fezes passaram por um tratamento de choque com álcool que foi realizado da seguinte forma: 1ml de fezes líquidas foi misturado em 1ml de álcool à 96%. O experimento foi realizado em tubos estéreis de polietileno de 15ml. As fezes foram mantidas em repouso por 35 minutos à temperatura ambiente e a seguir centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet semeado em placa de Petri contendo o meio Cefoxitina-Cicloserina-Frutose-Agar (CCFA) através de um swab.

As placas foram incubadas em anaerobiose por 72h a 37° C. As colônias características crescidas no CCFA foram examinadas. Para a obtenção da anaerobiose foi utilizada jarra de anaerobiose (DIFCO®/OXOID®) acrescido envelope gerador de anaerobiose (PROBAC®/OXOID®). Após incubação as colônias características crescidas no CCFA foram examinadas.

O swab utilizado no semeio no meio de cultura CCFA também foi incubado em tubo contendo 5ml 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 obtenção de um caldo reserva, sendo utilizado nos casos em que o semeio em CCFA desse negativo, sendo possível a realização de outro semeio em meio CCFA a partir do caldo FAB (Alfa *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2010; Quesada-Gómez *et al.*, 2010). Essa etapa foi realizada na Universidade federal do Ceará.

4.8. Identificação presuntiva dos isolados de *C. difficile*

Colônias suspeitas foram cultivadas no meio de cultura agar Brucella suplementado com vitamina K (1µg/ml) e 5% de sangue lisado de carneiro (BAK) e em 5ml de caldo BHI suplementado com a mesma quantidade de vitamina K e hemina (51µg/ml, Sigma®), e a seguir incubados em anaerobiose por 72h a 37°C.

Posteriormente as colônias crescidas, passaram pela prova de tolerância ao oxigênio (anaeróbio estrito), coloração de Gram e detecção de fluorescência em luz UV (Miller et al, 2010). Este teste consiste em repicar cada colônia isolada na cultura em anaerobiose em uma placa de agar sangue e incubar em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. Assim pode ser confirmado se o isolado era uma bactéria anaeróbia estrita. (KONEMAN et al, 2008). Essa etapa foi realizada na Universidade federal do Ceará.

4.9. 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* (triosefosfato isomerase) por PCR, com os iniciadores e as condições descritas (KATO et al, 1991; STUBBS et al, 2000; SPIGAGLIA et al, 2004; QUESADA-GOMEZ et al, 2010). Essa etapa foi realizada na Universidade da Costa Rica.

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

O DNA genômico foi extraído de cada cepa previamente cultivada em Caldo BHI (Brain Heart Infusion broth) 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 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). Essa etapa foi realizada na Universidade da Costa Rica.

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

Foi determinada a presença de fragmentos dos genes da toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*), o domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) e o potencial regulador negativo do PaLoc (*tcdC*) através do multiplex PCR. Foi utilizado o protocolo, iniciadores e as condições descritas na literatura (QUESADA-GÓMEZ *et al.*, 2010).

Os produtos amplificados foram visualizados mediante a inoculação de 10µL 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 da eletroforese (COHEN; TANG; SILVA,2000; QUESADA-GÓMEZ *et al.*, 2010).

Foi utilizado como controle positivo de amplificação 4 cepas: uma cepa hipervirulenta NAP1 (*tcdA+*, *tcdB+*, deleção 18 bp em *tcdC*, *cdtB+*), uma cepa NAP7 (*tcdA+*, *tcdB+*, deleção >18 bp em *tcdC*, *cdtB+*), uma cepa *tcdA-*, *tcdB+*, sem deleção *tcdC*, *cdtB-* e uma cepa não toxigênica (*C. difficile* ATCC® 700057). Essa etapa foi realizada na Universidade da Costa Rica.

4.12. Tipificação mediante eletroforese de campo pulsante (PFGE)

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

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI por 6 a 8 horas. Em seguida, e sofreram lise celular (6 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM de EDTA pH 9,0, NaCl 1 M para desoxilato a 0,2%, sarcosil a 0,5%, Brij 58 a 0.5%), 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 doddecilsulfato de sódio à 1% em tampão TE (10mM Tris-HCl, 8,0 EDTA 1mM). As bactérias foram lisadas durante a noite por incubação dos plugs em tampão de lise celular e enzimas (2mg/mL de lisozima, 20mg/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 nM de EDTA pH 9,0, sarcosil a 1% e 50mg/mL de proteinase K.

Após esse processo de lise, os plugs de agarose com o DNA genômico foram lavados 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 "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 50nM de tioreia em 6 V/cm com 1 q 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 BioNumerics® software (Applied Maths®) e com as bases de dados da Universidade da Costa Rica. Um isolamento reprodutível de *C. difficile* genótipo NAP1 foi incluído em cada corrida de eletroforese. Comparado ainda o crescimento e virulência pelas cepas denominadas "NAP-CR" (Costa Rica), NAP1/027 (Hipervirulenta). Essa etapa foi realizada na Universidade da Costa Rica.

4.13. Ribotipagem e PCR de cepas do *C difficile*.

Para o PCR ribotipagem, as regiões espaçadoras intergênicas foram amplificadas usando Primers Bidet conforme descrito anteriormente (BIDET et al, 1999). A análise de PCR Ribotipagem foi realizada no Laboratório de Biologia Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e também os ribotipos foram determinados pela apresentação dos dados ao banco de dados do Laboratório de Biologia Anaeróbios (UFRJ).

4.14. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) de clindamicina, levofloxacina, moxifloxacina, rifampicina, metronidazol e vancomicina 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 da resistência foram estabelecidos de acordo com as diretrizes do CLSI (M11-A8) da seguinte forma: moxifloxacina ≥ 4 µg/ml; clindamicina ≥ 8 µg/ml; metronidazol ≥ 32 µg/ml; rifampina ≥ 32 µg/ml e vancomicina > 2 µg/ml. Para as fluoroquinolonas, utilizamos o ponto de corte da moxifloxacina (levofloxacina), para a vancomicina foram utilizadas as diretrizes da EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) e para a rifampicina, o ponto de corte usado por O'Conner e colaboradores (2008). Foi utilizado como controle a cepa *C. difficile* ATCC® 700057. Essa etapa foi realizada na Universidade da Costa Rica.

4.15. Correlação entre os dados clínicos e epidemiológicos com os resultados bacteriológicos

Os dados clínicos e epidemiológicos, obtidos por meio do questionário (Anexo II), foram correlacionados com os resultados bacteriológicos. Os dados utilizados foram: idade, sintomas apresentados, história de patologias crônicas ou internamento até o mês anterior do evento, medicamentos em uso previamente tais como: inibidor de bomba de próton, antibióticos (tipos e quantidade) e tratamento realizado.

4.16. Investigação da contaminação da mobília

Na mobília utilizada pelos pacientes com infecção por *C. difficile*, foi realizada a coleta de material através de *swab*. O material foi adquirido de berços e colchões das crianças, que estavam internados na mesma enfermaria e apresentaram diarreia no mesmo período. A coleta foi realizada 1 semana depois do início dos sintomas e confirmação da presença de toxina nas fezes. O armazenamento e o processamento do material foram feitos da mesma forma indicada para os espécimes clínicos.

Após o teste positivo para toxinas do *C. difficile* e/ou isolamento de cepas do *C. difficile*, o profissional e o cuidador da criança foram informados que medidas de prevenção e tratamento fossem instituídas, tais como: direcionamento da conduta

terapêutica, medidas de isolamento de contato, desinfecção com hipoclorito de sódio para minimizar a contaminação ambiental e método de barreira eficazes.

4.17. Análise Estatística

As informações obtidas foram digitadas em um computador IBM-PC compatível pelo processo de dupla entrada para resolução de discrepâncias e consistência dos dados. A entrada do sistema foi realizada por meio de senha individualizada.

Os principais testes estatísticos utilizados foram os testes de qui-quadrado e o exato de Fisher quando pertinente. Na comparação entre médias foi utilizado o teste t de Student. Análises uni e multivariadas foram utilizadas para corrigir eventuais desvios causados pela interdependência das variáveis e para eliminar potenciais fatores de confundimento. Em todos os casos foram consideradas significantes as diferenças com erro de primeira ordem inferior a 5% ($p < 0,05$).

4.18. Aspectos éticos

A pesquisa obedeceu à Resolução nº 466 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos e assegura os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado.

Através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), cujo objetivo é demonstrar a importância da pesquisa e a ausência de malefícios, foi solicitado, aos pais/responsáveis de cada participante, anuência à pesquisa, fim de obter autorização espontânea dos responsáveis legais para a participação dos menores de idade. Concedendo permissão para que a pesquisa fosse realizada. O projeto foi submetido à Plataforma Brasil, para o Comitê de Ética e Pesquisa- CEP do Hospital Infantil Albert Sabin, com aprovação pelo Parecer nº 861363 (ANEXO 1).

5 RESULTADOS

O estudo foi realizado no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2017 com pacientes acompanhados no Hospital Infantil Albert Sabin. Nesse período foram abordadas 97 crianças com diarreia das quais foram convidados para participação na pesquisa através da coleta de fezes para investigação da presença de *C. difficile*.

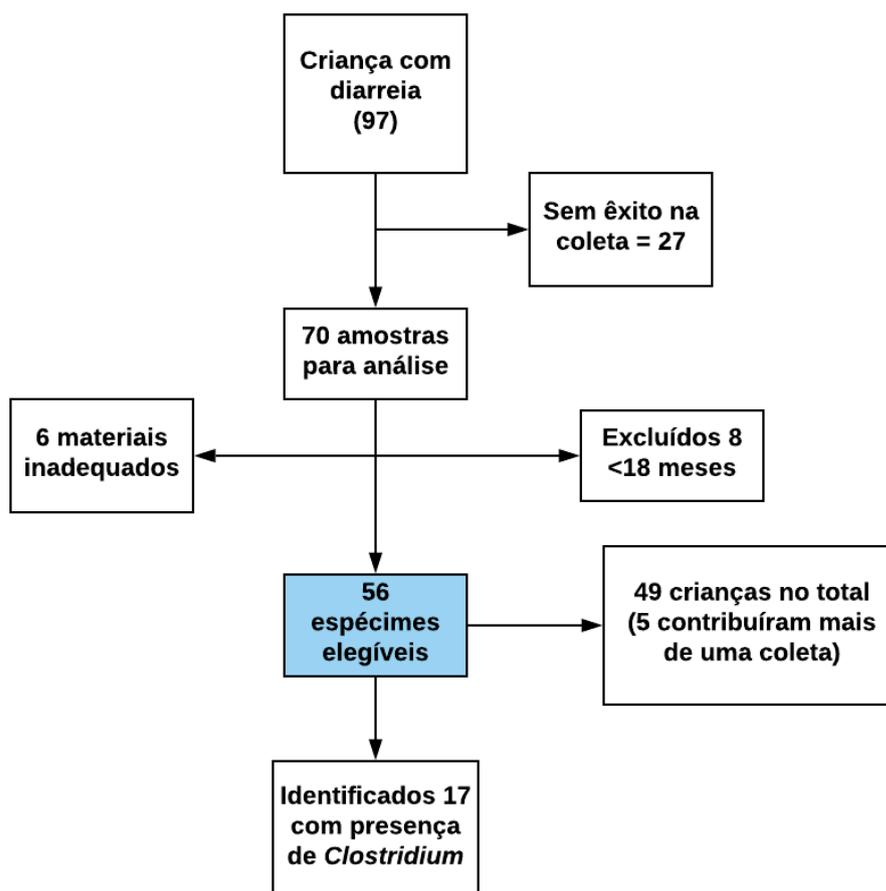
Dos 97 pacientes abordados, 27 não tiveram êxito na coleta do material fecal, sendo assim restaram uma seleção de 70 amostras de fezes diarreicas, dentre as quais foram excluídas: 8 amostras pertencentes das crianças com faixa etária inferior à permitida para inclusão nesse estudo e 6 amostras cujo material não foi aproveitado devido condições inadequadas de armazenamento ou por quantidade insuficiente.

Duas situações foram ponderadas o que definiu a inclusão de crianças menores de 18 meses: uma delas para investigação de surto de diarreia na enfermaria e a outra devido necessidade de investigação de CDI por apresentar recorrência do quadro diarreico.

A seleção final foi de 56 espécimes elegíveis para investigação de *C. difficile*, sendo incluído nesses 56, as duas crianças com idade menor que 18 meses. A coleta foi adquirida de espécimes de 49 crianças, já que cinco participantes contribuíram com mais de uma amostra, as quais foram adquiridas em períodos diferentes de atendimento no hospital (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma do recrutamento de crianças com diarreia para investigação de

C. difficile em hospital terciário, Fortaleza, Ceará (2015-2017).



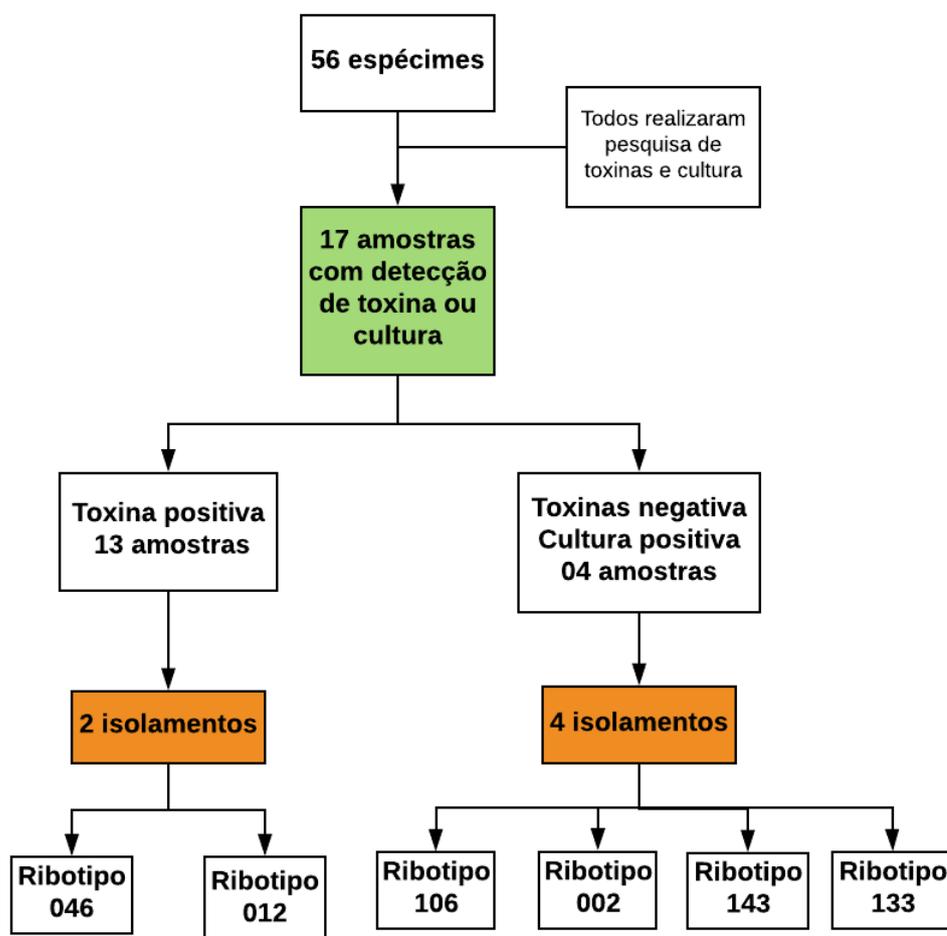
Fonte: Elaborado pela própria autora

Trinta por cento (30,4%; 17/56) das amostras foram positivas para *C. difficile* conforme detecção de toxinas A/B por ELISA e/ou cultura.

Nesses 17 pacientes com infecção por *C. difficile* a positividade para presença de toxina foi verificada em 76,4% (13/17). Foi obtido dois isolados dessas amostras positivas e das amostras que tiveram resultados negativos quanto à presença de toxinas, 04 isolados foram obtidos. Portanto o percentual de isolamento por cultura de *C. difficile* foi de 35% (6/17). Nenhuma criança apresentou mais de uma amostra positiva (Figura 4).

Figura 4: Fluxograma dos dados clínicos de crianças com diarreia atendidas em

Hospital Terciário Fortaleza, Ceará, 2015 – 2017



Fonte: Elaborada pela própria autora

5.1 Ribotipagem, genotipagem e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Por meio da análise de isolamento em meio seletivo CCFA, foram isoladas e identificadas seis cepas de *C. difficile* nas amostras. Foi constatado que os isolados pertencem a seis ribotipos diferentes: 046, 106, 002, 143, 133, 012, sendo este resultado baseado nos registros dos bancos de dados da Universidade do Rio de Janeiro (Figura 4).

Em todas as cepas isoladas foi realizada análise de detecção dos genes da toxina e do fragmento do gene *tpi* (identificação definitiva). Nos pacientes HIAS 54 e HIAS 58 foram detectados genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB* e deleções no gene *tcdC* não foi observado nessas amostras. Nas amostras HIAS 55 e HIAS 56 apresentaram

características não toxigênicas, não sendo realizado genotipagem. O gene de ligação da toxina binária (*cdtB*) não foi detectado em nenhuma das amostras. A caracterização desses isolados está detalhado na tabela 8.

A análise dos perfis de PFGE por meio da digestão com *Sma*I identificou pulsotipos novos em 3 dos isolados (HIAS 01, HIAS 54 e HIAS 58). A análise do número identificado foi o padronizado de acordo com banco de dados do National Microbiology Laboratory do Canadá. Tabela 1.

Tabela 1: Tabela 1: Caracterização das cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes internados em Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, CE (2015 – 2017).

Cepas	RIBOTIPO	PCR	PULSOTIPO	MICs (ug/ml)					
				Metro	Vanco	Clinda	Levo	Moxi	Rifa
HIAS-01	046	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , sem deleções <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Novo pulsotipo 1174	0,38	1,5	1	4	1	<0,002
HIAS-15	106	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , sem deleções <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	NAP11 0499	0,5	2	3	4	1.5	0,002
HIAS-54	002	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , sem deleções <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Novo pulsotipo NML-1234	0,125	0,5	4	1	0,75	<0,002
HIAS-55	143	<i>tpi+</i> , <i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i> , sem deleções <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Cepa Não-Tox						
HIAS-56	133	<i>tpi+</i> , <i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i> , sem deleções <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Cepa Não-Tox						
HIAS-58	012	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , sem deleções <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Novo pulsotipo NML-1235	0,125	0,75	2	1	0,5	<0,002

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). MICs - Metro- metronidazol; vanco- vancomicina; clinda- clindamicina; levo- levofloxacina; moxi- moxifloxacina; rifa- rifampicina.

Com relação à sensibilidade aos antimicrobianos, foi expresso que as cepas foram sensíveis as drogas de escolha para o tratamento de CDI, metronidazol e vancomicina. As crianças com CDI inclusive os seis pacientes em que foi isolado *C. difficile*, foram tratadas com metronidazol e as mesmas evoluíram com remissão da diarreia, durante o acompanhamento.

Duas cepas apresentaram resistência a levofloxacina (HIAS-01 e HIAS-15). Todas as cepas foram sensíveis aos demais antimicrobianos testados.

5.2 Dados epidemiológicos e clínicos

Foi verificado que 57,1% (32/56) era de indivíduos procedentes da capital, sendo ainda observado o mesmo percentual (50%) para o sexo feminino e masculino.

A média de idade dos pacientes do estudo foi de 10,5 ($\pm 5,14$) anos. As idades variaram entre 15 meses e 18 anos. A tabela 2 detalha a distribuição das crianças por idade.

Tabela 2: Faixa etária dos pacientes estudados no Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, Ceará (2015-2017).

Variáveis	Amostragem Total N (%)	<i>Clostridioides difficile</i>		P
		Sim N (%)	Não N (%)	
Idade				
≤ 18 meses	2 (3,6)	2 (11,8)	0 (0,0)	0,0083
19 meses a 10 anos	26 (46,4)	8 (47,0)	18 (46,2)	
≥10 anos	28 (50,0)	7 (41,2)	21 (53,8)	
Total	56 (100)	17 (100)	39 (100)	

Fonte: Dados da pesquisa. Teste de Qui-quadrado (χ^2)

Não houve diferença significativa entre a faixa etária ($p=0,086$), sexo ($p=0,771$) e procedência ($p=0,772$) entre amostragem positiva e negativa, quando comparados por meio da análise do teste do Qui- quadrado.

Em relação as características da diarreia entre as crianças com CDI foi constatada a presença de muco e sangue em 41,1% (7/17). A duração da diarreia teve média de 11 dias, variando entre 3 e 50 dias, sendo a maioria diarreia aguda (até 14 dias), porém foi identificado diarreia persistente (> 14 dias até 30 dias) em 3 pacientes e a diarreia crônica (> 30 dias) ocorreu em 2 crianças.

Associada à diarreia foi detectado ainda a presença de sintomas como vômito 52,9% (9/17), febre 41,1% (7/17), dor 82,3% (14/17) e distensão abdominal 17,6% (3/17). Nos pacientes com infecção, o sintoma de náusea, mostrou uma relação significativa ($p=0,035$) quando comparados com pacientes de amostra negativa. A tabela 3 detalha os dados demográficos e a apresentação clínica dos pacientes inseridos no estudo.

Exames complementares evidenciaram, nos 17 pacientes com CDI, presença de anemia em 70,5% (12/17), além disso foi constatado no leucograma que 29,4% (5 /17) apresentavam leucocitose, 76,4%(13/17) neutrofilia, 11,7% (2/17) linfopenia, estes pacientes mostraram na sua maioria 82,3%(14/17) contagem de plaquetas normais sendo o restante exibiam plaquetopenia. Insuficiência renal avaliada através de dosagem laboratorial de ureia e creatinina foi percebida em 17,6%(3/17), sendo que estes pacientes tinham diagnóstico prévio de doença renal crônica.

Tabela 3: Dados clínicos de crianças com diarreia atendidas em Hospital Terciário Fortaleza, Ceará, 2015 – 2017.

Características Clínicas	Amostragem Total	<i>Clostridioides difficile</i>			Regressão Logística Multinomial				
		Sim N (%)	Não N (%)	P	P	Wald	OR	IC	
Nº dias/Diarreia^a									
Média (DP min - máx)	19 (±35) (3 - 240)	11 (±12) (3 - 50)	23 (±41) (3 -240)	0,234					
Com Muco^b									
Sim	26 (46,4)	7 (41,2)	19 (48,7)	0,772					
Não	30 (53,6)	10 (58,8)	20 (51,3)						
Com Sangue^b									
Sim	22 (39,3)	7 (41,2)	15 (38,5)	0,848					
Não	34 (60,7)	10 (58,8)	24 (61,5)						
Náusea^b									
Sim	18 (32,1)	9 (52,9)	9 (23,1)	0,035	0,032	4,591	1,119	12,564	
Não	38 (67,9)	8 (47,1)	30 (76,9)			0,032	0,267	0,080	0,893
Vômito^b									
Sim	20 (35,7)	9 (52,9)	11 (35,9)	0,128					
Não	36 (64,3)	8 (47,1)	28 (71,8)						
Febre^b									
Sim	28 (50,0)	7 (41,2)	21 (53,8)	0,562					
Não	28 (50,0)	10 (58,8)	18 (46,2)						
Dor Abdominal^b									
Sim	41 (73,2)	14 (82,4)	27 (69,2)	0,351					
Não	15 (26,8)	3 (17,6)	12 (30,8)						
Distensão Abdominal^b									
Sim	14 (25,0)	3 (17,6)	11 (28,2)	0,513					
Não	42 (75,0)	14 (82,4)	28 (71,8)						

Fonte: Dados da pesquisa. ^a Teste Mann-Whitney. ^b Teste de Qui-quadrado (χ^2). Valor significante em negrito quando $p < 0.05$. Comparando amostra positiva com negativa

5.3 Fatores de risco

Fatores de risco (internamento nos últimos 30 dias previamente ao internamento atual), uso de antibiótico ou inibidor de bomba de próton, além de presença de comorbidade / doença crônica) investigados na amostra positiva revelou a presença de 88,2 % (15/17) de condições subjacentes que podem aumentar o risco de CDI, portanto, apenas duas crianças 11,7% (2/17) com CDI não apresentavam nenhum desses fatores na sua totalidade. Avaliando as crianças em que foi feito isolamento de *C. difficile* na amostra de fezes, foi percebido que cada uma tinha um ou mais fatores de risco estava presente.

Comparando amostra positiva e negativa para *C. difficile* para a presença de fatores de risco, apesar de não terem sido obtido valores estatisticamente significantes, percebe-se que crianças com CDI tiveram um percentual maior da presença de todos esses fatores em relação as crianças que não tiveram diagnóstico confirmado. Conforme exposto na tabela 4.

A presença de comorbidades foi o mais prevalente fator de risco para CDI verificado em 76,5% (13/17). O uso prévio de antibiótico juntamente com o uso de IBP, mostrou-se presente em 47% (8/17) das crianças com CDI, além disso internamento nos últimos 30 dias foi visto em 41,1% (7/17). A tabela 4 reporta a distribuição dos fatores de risco das crianças estudadas.

Tabela 4: Fatores de risco de crianças com diarreia atendidas em Hospital Terciário

Fortaleza, Ceará, 2015 – 2017.

Variáveis	Amostragem Total	<i>Clostridioides difficile</i>		p- valor*
		Sim N (%)	Não N (%)	
Internamento				
Sim	16 (28,6)	7 (41,2)	9 (23,1)	0,206
Não	40 (71,4)	10 (58,8)	30 (76,9)	
Uso prévio de Antibióticos				
Sim	21 (37,5)	8 (47,1)	13 (33,3)	0,378
Não	35 (62,5)	9 (52,9)	26 (66,7)	
Uso prévio de IBP				
Sim	26 (46,4)	8 (47,1)	18 (46,2)	0,950
Não	30 (53,6)	9 (52,9)	21 (53,8)	
Comorbidades				
Sim	41 (73,2)	13 (76,5)	28 (71,8)	0,758
Não	15 (26,8)	4 (23,5)	11 (28,2)	

Fonte: Dados da pesquisa *Teste de Qui-quadrado (χ^2). Valor significativo em negrito quando $p < 0,05$. Comparando amostra positiva com negativa

Dentre as principais comorbidades das crianças com amostra positiva para *C. difficile*, destacam-se os diagnósticos de doença inflamatória intestinal em 6/17 (35,3%), doença renal crônica em 4/17 (23,5%), doença neurológica em 2/17 (11,8%), hepatopatia em 1/17 (11,8%). Não houve diferença significativa de comorbidade entre a presença ou não de infecção por *C. difficile* ($p = 0,758$). Observamos ainda que todos os 6 pacientes em que foi obtido o isolamento tinham algum diagnóstico de doença crônica. A Tabela 5 resume o percentual das comorbidades nos grupos estudados.

Tabela 5: Comorbidades associadas as crianças com diarreia atendidas em Hospital

Terciário Fortaleza-Ce, 2015 – 2017.

Variáveis	Amostragem Total (%)	<i>Clostridioides difficile</i>		p- valor*
		Sim N (%)	Não N (%)	
Comorbidades				
Sim	41 (73,2)	13 (76,5)	28 (71,8)	0,758
Não	15 (26,8)	4 (23,5)	11 (28,2)	
Doença inflamatória intestinal				
Sim	21 (37,5)	6 (35,3)	15 (38,5)	0,822
Não	35 (62,5)	11 (64,7)	24 (61,5)	
Doença Renal				
Sim	11 (19,6)	4 (23,5)	7 (17,9)	0,719
Não	45 (80,4)	13 (76,5)	32 (82,1)	
Doença Neuronal				
Sim	5 (8,9)	2 (11,8)	3 (7,7)	0,623
Não	51 (91,1)	15 (88,2)	36 (92,3)	
Doença Hepática				
Sim	5 (8,9)	2 (11,8)	3 (7,7)	0,623
Não	51 (91,1)	15 (88,2)	36 (92,3)	
Outros				
Sim	1 (1,8)	1 (5,9)	0 (0,0)	0,304
Não	55 (98,2)	16 (94,1)	39 (100,0)	

Fonte: Dados da pesquisa *Teste de Qui-quadrado (χ^2). Valor significativo em negrito quando $p < 0.05$.

Dentre os pacientes estudados, 37,5% (21/56), fizeram uso de um ou mais antibióticos, nos últimos 30 dias antes de serem selecionados para o estudo. Ceftriaxona foi o antibiótico mais utilizado nos pacientes com diarreia. E sulfametoxazol /trimetropina foi o antibiótico mais utilizado nas amostras positivas, sendo observado significância estatística, $p = 0,0079$ ao comparar com os pacientes que não fizeram uso de antibióticos. Os antibióticos utilizados estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6:Antibióticos utilizados, antes da seleção, nos pacientes estudados em Hospital Terciário Fortaleza-Ce, 2015 – 2017.

Antibióticos	Na amostragem total	<i>Clostridioides difficile</i>			P
		Sim N (%)	Não N (%)		
<i>b-lactâmicos</i>	Amoxiciclina	2 (3,3)	1 (5,8)	1 (2,3)	0,4519
	Amplicina + Sulbactam	1 (1,6)	1 (5,8)	0	0,1020
	Cefalexina	1 (1,6)	0	1 (2,3)	0,5582
	Cefepima	2 (3,3)	0	2 (4,7)	0,497
	Ceftazidima	1 (1,6)	1 (5,8)	0	0,1020
	Ceftriaxona	5 (8,3)	1 (5,8)	4 (9,5)	0,7825
	Oxacilina	3 (5)	0	3 (7,1)	0,3147
	Penicilina	1 (1,6)	0	1 (2,3)	0,5582
	Piperaciclina + Tazobactam	3 (5)	1 (5,8)	3 (7,1)	0,9753
<i>Nitroimidazólicos</i>	Metronidazol	2 (3,3)	1 (5,8)	1 (2,3)	0,4519
<i>Sulfonamidas/ Trimetroprima</i>	Sulfametaxol + Trimetroprima	3 (6,6)	3 (17,6)	0	0,0079
	Nenhum	35 (58,3)	9 (52,9)	26 (56,5)	
	Total	60 (100)	17 (10)	42 (100)	

Fonte: Dados da pesquisa *Teste de Qui-quadrado (χ^2). Valor significativo em negrito quando $p < 0,05$. Comparando amostra positiva com negativa

5.3 Isolamento de *C. difficile* e correlações clínicas

O *C. difficile* ribotipo 046 foi obtido de material fecal (HIAS 01), pertencente à criança com idade de 2 anos e 6 meses, atendida no ambulatório. Na história patológica pregressa, o paciente, aos 7 meses de idade, realizou transplante hepático por hepatopatia crônica devido atresia de vias biliares, sendo indicado o uso contínuo de imunossupressor. Na história atual, a criança ao ser selecionada para o estudo, vinha apresentando diarreia com muco e episódios de raios de sangue durante 3 dias, porém foi relatado episódios de diarreia recorrente que alternavam com fezes normais no ano anterior à inclusão neste estudo. Nesse período, fez uso de antibiótico sulfametoxazol+trimetropima em 3 episódios diarreicos, além de antiparasitário (albendazol). Tem história de internamento com 1 ano e 11 meses por pneumonia e diarreia que foi tratada com ceftriaxona e com 2 anos e 3 meses por pneumonia sendo usado piperacilina + tazobactan, além de vancomicina, ou seja, dois meses antes da admissão no estudo. Não fazia uso de inibidor de bomba de prótons. Após tratamento com metronidazol evoluiu com melhora do quadro clínico.

O *C. difficile* ribotipo 106 referente a espécimes (HIAS 15), refere-se a uma criança de 1 ano e 6 meses, com história prévia de megacolon congênito, tendo realizado correção cirúrgica, 2 meses anteriores ao isolamento. No momento da seleção, estava internado há 1 mês e 16 dias, reportava quadro de diarreia crônica (40 dias), evacuações com muco e sem sangue e uso prévio de ampicilina + sulbactan sódico e no momento da coleta estava com piperacilina + tazobactan, além de probiótico e IBP. Realizou tratamento com metronidazol e evoluiu com melhora do quadro diarreico.

O *C. difficile* ribotipo 002 pertencente de paciente (HIAS 54) com 1 ano e 3 meses, que evoluiu com insuficiência renal dialítica decorrente de síndrome hemolítica urêmica atípica, sendo internado por diarreia sem sangue ou muco, evoluiu com melhora do quadro infeccioso com ceftriaxona. Após 20 dias de internamento, apresentou recidiva do quadro diarreico, estava no terceiro dia de diarreia quando foi realizado coleta de fezes para pesquisa de *C. difficile*. Desde o internamento, o mesmo fazia uso de IBP e hemodiálise. Foi indicado tratamento com metronidazol com evolução favorável.

O *C. difficile* ribotipo 143 (pulso tipo não toxigênico) isolado de adolescente (HIAS 55) de 13 anos e 11 meses, atendido em ambulatório por doença inflamatória intestinal, em tratamento com imunobiológico, 6-mercaptopurina e IBP. Apresentava diarreia sem muco ou sangue há 7 dias. Apesar de não ter registro de internamento,

comparecia ao “hospital dia” a cada 8 semanas para infusão de medicação. Hábito intestinal recuperado após uso de metronidazol.

O *C. difficile* ribotipo 133 (pulsotipo não toxigênico) proveniente de criança (HIAS 56) de 5 anos, internada há quase 5 meses na enfermaria de nefrologia por síndrome nefrótica corticoide dependente, em esquema de diálise peritoneal. A diarreia iniciou 3 dias antes da coleta dos espécimes, sendo a apresentação com muco e sangue. Registro de uso de antibiótico (cefepime e teicoplanina), além de antifúngico (caspofungina) foi verificado no prontuário. Associação de metronidazol foi indicada e criança evoluiu com melhora.

O *C. difficile* ribotipo 012 detectado de criança (HIAS 58) que tinha 2 anos e 6 meses e portadora de doença renal crônica estava internada há 20 dias na enfermaria de nefrologia. Diarreia sem muco e sem sangue, iniciada há 3 dias da inclusão no nosso estudo, em uso contínuo de antibiótico (cefalexina, dose profilática), não fazendo outros medicamentos. Melhora clínica foi observada após conduta terapêutica com metronidazol.

A tabela 7 e 8 sintetizam as correlações clínicas e fatores de risco de cada paciente em que foi obtido o isolamento da cepa.

Tabela 7: Correlações clínicas dos pacientes com isolamento de *C. difficile* em Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, Ce (2015 – 2017).

Caso	Idade (Anos)	Sexo	Ribotipo	Diagnóstico	Quadro clínico			
					Sangue nas fezes	Febre	Náusea/Vômito	Dor abdominal
HIAS01	2,5	F	046	AVB (Tx)	Sim	Não	Não	Sim
HIAS15	1,5	M	106	MC	Não	Sim	Sim	Sim
HIAS54	1,16	M	002	SHU	Não	Sim	Sim	Sim
HIAS55	13	M	143	DII	Não	Não	Sim	Sim
HIAS56	4	F	133	DRC	Sim	Não	Sim	Sim
HIAS58	2,5	M	012	DRC	Não	Não	Sim	Sim

Fonte: Dados da pesquisa. Sexo - F (feminino), M (masculino) Diagnóstico – AVB (Atresia de Vias Biliares), Tx (transplante), MC (Megacolon Congênito), SHU (Síndrome Hemolítica Urêmica), DII (Doença Inflamatória Intestinal), DRC (Doença Renal Crônica).

Tabela 8: Correlações dos fatores de risco dos pacientes com isolamento de *C. difficile*

em Hospital Pediátrico Terciário, Fortaleza, Ce (2015 – 2017).

Caso	Idade (Anos)	Sexo	Ribotipo	Diagnóstico	Fatores de risco			
					Comorbidade	Antibiótico	IBP	Internamento
HIAS01	2,5	F	046	AVB (Tx)	Sim	Não	Não	Não
HIAS15	1,5	M	106	MC	Sim	Sim	Sim	Sim
HIAS54	1,16	M	002	SHU	Sim	Sim	Sim	Não
HIAS55	13	M	143	DII	Sim	Não	Não	Não
HIAS56	4	F	133	DRC	Sim	Não	Sim	Sim
HIAS58	2,5	M	012	DRC	Sim	Sim	Não	Sim

Fonte: Dados da pesquisa. Sexo - F (feminino), M (masculino) Diagnóstico – AVB (Atresia de Vias Biliares), Tx (transplante), MC (Megacolon Congênito), SHU (Síndrome Hemolítica Urêmica), DII (Doença Inflamatória Intestinal), DRC (Doença Renal Crônica). Fatores de risco – IBP inibidor de bomba de próton.

5.4- Investigação da contaminação da mobília e orientação de medidas de prevenção ambiental e pessoal

Além do estudo das amostras fecais, pesquisa de *Clostridium difficile* foi realizada em equipamento de mobília hospitalar. Não houve crescimento bacteriano no *swab* coletado de berço e colchão dos pacientes com diarreia das quais foi feito isolamento de *C. difficile*.

O resultado da identificação de *C. difficile*, realizada nos 17 pacientes do estudo, foi reportado para o médico assistente e comunicado para a comissão de infecção hospitalar. Além disso, foi realizada orientação de limpeza da mobília com hipoclorito de sódio e cuidados com a lavagem de mãos foram também reforçados.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho detectou 30,4% de positividade para toxinas e/ou isolamento por cultura para *C. difficile* (17/56 amostras) em fezes de crianças com diarreia internadas ou em atendimento ambulatorial em Hospital Público Pediátrico de atendimento terciário de referência do Estado do Ceará. Esse dado sugere a importância do *C. difficile* como causa de diarreia em crianças no nosso meio.

No Brasil, apenas dois artigos relatam a presença de infecção por *C. difficile* em crianças. Estudo realizado no Rio de Janeiro identificou que cepas de *C. difficile* foram detectadas em 14 de 210 (6,7%) amostras fecais de crianças com diarreia internadas ou não e residentes na cidade do Rio de Janeiro (PINTO ET AL., 2003). Investigação realizada durante o período de junho de 2000 à junho de 2001 para identificar presença de infecção por *C. difficile*, em crianças com diarreia internadas em 3 hospitais em São Paulo, verificou que 5,5% (5/90) das amostras eram positivas (FERREIRA et al., 2003). Diante desses resultados, vemos que a positividade encontrada no nosso estudo foi maior que a encontrada no Sudeste do país.

Da mesma forma, o percentual de amostras positivas encontradas nesse estudo foi superior a relatada para os Estados Unidos, onde um estudo populacional na faixa etária pediátrica (de 0 a 18 anos) de 1991 a 2009, identificou que a incidência geral de CDI ajustada por idade e sexo foi de 13,8 por 100 000 pessoas, observando ainda um aumento de 12,5 vezes, de 2,6 (1991-1997) para 32,6 por 100 000 (2004-2009), ao longo do período do estudo (KHANNA et al., 2013). Vale a pena comentar, que no nosso estudo não temos uma avaliação da incidência, uma vez que não incluímos todos os casos de diarreia atendidos no Hospital no período do levantamento, mas apenas uma amostragem considerada significativa.

Mundialmente, a avaliação de CDI foi representada em um estudo de meta-análise, que selecionou estudos recentes que forneciam a prevalência de infecção por *C. difficile* em pacientes adultos ou crianças com diarreia. Essa análise estimou que a prevalência de infecção por *C. difficile* está em torno de 15%. No entanto, o autor sugere que esse resultado pode estar subestimado devido baixa conscientização e os protocolos de diagnóstico e vigilância inconsistentes (CURSIO et al., 2019).

No presente estudo, foi obtido uma positividade através da detecção de toxinas por ELISA em 13/17 amostras (76,4%), desse material, isolou-se o *C. difficile* na cultura em duas amostras. Além disso, intrigantemente 4 isolamentos foram realizados

a partir de amostras negativas para pesquisa de toxinas. Esse resultado nos indicou que o isolamento de *C. difficile* em cultura das amostras positivas de crianças hospitalizadas ou não foi 35,3% (6/17 amostras). Devemos atentar que a positividade teria sido menor (23,2%; 13/56 amostras), caso tivesse sido considerada apenas a presença de toxinas nas fezes como método diagnóstico para processamento do isolamento. Isso demonstra a importância do cultivo das fezes para o diagnóstico.

Outro aspecto percebido foi que ocorreu inicialmente uma dificuldade tanto na coleta como no acondicionamento das fezes de forma adequada, conforme descrito nos resultados, onde 27 não tiveram êxito na coleta por quantidade insuficiente e em seis o material não foi aproveitado por condições inadequadas de armazenamento, totalizando 33 perdas de espécimes que ocorreram no início do estudo. Ações realizadas no sentido de orientar as coletas e o acondicionamento do material favoreceram a uma diminuição das perdas no decorrer do estudo. Assim, a elaboração de protocolos para a equipe de saúde, pode ser fundamental para um diagnóstico preciso de CDI e pode gerar um impacto no tratamento e no controle da doença.

A infecção por *C. difficile* é um diagnóstico clínico apoiado por achados laboratoriais. Embora não exista um padrão ouro para o diagnóstico de CDI, em termos de exames complementares, a pesquisa de toxinas pelo método ELISA (EIAs) é o teste mais disponível para investigação de CDI (O'Connor et al 2001). Os imunoenaios enzimáticos (EIAs) foram amplamente adotados por muitos laboratórios até hoje, por causa da velocidade, conveniência e economia de usar esses métodos mesmo com relatos prévios de que não são tão sensíveis como a cultura de fezes (George et al 1979).

O aumento da incidência da doença induzida pelo *C. difficile*, identificada através de outros métodos diagnósticos, evidenciou a falta de sensibilidade dos EIAs para o diagnóstico de *C. difficile*. Isso resultou no início de uma nova era de testes para diagnóstico tais como: cultura toxigênica, glutamato desidrogenase (GDH), amplificação de ácido nucleico (NAATs), eletroforese de campo pulsátil (PFGE), sequenciamento de genes análise proteômica e outros. Porém, ainda há incerteza diagnóstica em torno de *C. difficile*, pois a detecção em uma amostra fecal não implica em doença. Este diagnóstico continua a ser um desafio para médicos e laboratórios (CAREY-ANN et al 2013).

Ao investigar a CDI na criança foi percebido o desafio de correlacionar o diagnóstico clínico com a confirmação diagnóstica. Em quatro pacientes que tinham

pesquisa negativa para toxina, ficou decidido realizar o tratamento com metronidazol, pois o quadro clínico aliado aos fatores de risco eram sugestivos de CDI, posteriormente identificamos o isolamento de 2 cepas toxigênicas nesse grupo. Mudanças na rotina para métodos diagnósticos mais específicos, devem ser considerados para maior sensibilidade e especificidade, que pode resultar em benefícios para o paciente e para a saúde pública.

A frequência da infecção pelo *C. difficile* é dependente da idade. Os neonatos (menores de 1 mês) geralmente são portadores assintomáticos do *C. difficile*. Essa condição está fundamentada em algumas hipóteses: falta de receptores de toxinas na superfície de células intestinais por imaturidade intestinal dos neonatos, além da ação protetora do leite materno nos bebês amamentados e a defesa proporcionada por outras bactérias intestinais neonatais (EGLOW et al., 1992).

Delmée et al 1988 observando crianças prospectivamente admitidas em um hospital belga durante 6 meses descobriu que 76 (67%) de 114 amostras de fezes dos neonatos adquiriram *C. difficile*. Porém não foi detectado associação entre a aquisição de *C. difficile* e o desenvolvimento de sintomas intestinais nessa faixa etária. Conforme o autor devido à alta evidência de colonização assintomática, a política da Academia Americana de Pediatria recomenda que a realização de testes diagnósticos para CDI em lactentes seja limitado àqueles com fatores de risco, além de casos diagnosticados com doença de Hirschsprung, distúrbios de motilidade graves ou em situação de surto.

Ao longo do tempo tem sido reforçada a ideia que as infecções sintomáticas não ocorrem em recém-nascidos e lactentes jovens, embora a taxa de colonização com *C. difficile* seja muito alta neste grupo etário específico (AL-JUMAILI et al 1984; PENDERS et al 2006; ROUSSEAU et al 2011a; AZAD et al 2013).

Fundamentados em estudos previamente publicados, inicialmente optamos por incluir apenas crianças acima de 18 meses. Dessa forma, cinquenta e seis amostras fecais coletadas pertenciam a crianças com média de idade de 10,5 anos. No entanto, decidimos incluir duas crianças menores de 18 meses, já que ambos os casos estavam dentro dos critérios definidos como pacientes de risco para esta faixa etária. Uma delas estava internada numa enfermaria onde outras 3 crianças iniciaram quadro diarreico e a outra foi incluída por ser portadora de doença de Hirschsprung.

Ao contrário das recomendações da maioria dos autores, KUIPER e colaboradores (2017), com base em uma pesquisa bibliográfica e ilustrada por dois

relatos de casos, recomendam que seja incluído a investigação de *C. difficile* em recém-nascidos e lactentes com sintomas de diarreia sanguinolenta, especialmente com história de uso prolongado de antibióticos. Estudo de coorte retrospectiva observacional, publicado 10 anos antes, também identifica infecção por *C. difficile* em 22 crianças, com idade entre 15 dias e 6 meses, internadas na unidade de terapia intensiva neonatal, que não seria considerada de alto risco para esta doença, sugerindo que mais investigações são necessárias para explorar particularidades da doença e fatores de risco do paciente (BENSON, 2007).

Um outro estudo analisando 944 casos de CDI pediátricos em áreas geográficas dos EUA durante 2010-2011, observou que a incidência de CDI em crianças foi maior entre os casos de até um ano de idade (66,3). A proporção de casos com diarreia documentada (72%) ou doença grave (8%) foi semelhante entre todos os grupos etários sendo assim a infecção por *C. difficile* no grupo etário mais jovem provavelmente representou doença verdadeira e não colonização assintomática (WENDT ET AL 2014).

Ainda há contradições no real papel do *C. difficile* no intestino pediátrico, na presença de doença diarreica, portanto pode-se atribuir a este patógeno, ser o causador de sintomas sub clínicos, até sintomas graves ou considerar ser um espectador inocente, aceitando a possibilidade da enfermidade ser causada por outros organismos (LEES, 2016). Nossa casuística incluiu apenas 2 crianças abaixo de 18 meses, nos quais, o *C. difficile* foi identificado, no entanto, estudos adicionais locais, merecem ser considerados para uma melhor compreensão dos fatores inerentes aos riscos de CDI na nossa população infantil nessa faixa etária.

Em relação a forma de apresentação da diarreia observamos que a presença de muco e sangue ocorreu em percentual semelhante, 41,1% (7/17) nas amostras positivas e negativas. A qualidade das evacuações diarreicas verificada em crianças hospitalizadas no Canadá com CDI mostrou que a diarreia aquosa foi uma manifestação comum em 79% dos casos e com presença de sangue em 12,5% dos casos (MORINVILLE E MCDONALD, 2005). Observação de quadro clínico em crianças internadas em hospital na Polônia mostrou que o sintoma de diarreia ocorreu em 37,5% na presença de infecção (DULĘBA 2014). Na nossa investigação todas as crianças, tinham diarreia conforme definido pelos critérios de inclusão.

Além de diarreia aguda (menos de 14 dias), diarreia persistente (entre 14 e 30 dias) e crônica (mais de 30 dias) foi verificado em 29,4% (5/17). A classificação da

diarreia quanto ao tempo de doença, verificada no nosso estudo, encontrou um percentual bem menor que o relato de uma série de 19 crianças estudadas por Buts e colaboradores (1993), onde foi verificado que 15 crianças com CDI (78,9%) tinham diarreia persistente e crônica. Esse dado nos fez refletir se a sensibilização da equipe de saúde do Hospital pediátrico do Ceará, para a pesquisa atual, com a investigação de *C. difficile* nas crianças com diarreia, poderia ter reduzido o tempo de diarreia desses pacientes, proporcionando um diagnóstico etiológico e tratamento específico em tempo hábil.

No presente estudo observamos que além da diarreia, dor abdominal ocorreu na maioria (82,4%) das crianças, seguido de náuseas e vômitos 52,9% e febre 41,2%. Esses sintomas são tipicamente encontrados em infecção sintomática nas apresentações de formas leve a moderada (NOOR et al 2018). Apesar da presença de náuseas ($p < 0,032$) mostrar-se significativamente mais frequente nas crianças que tinham diagnóstico de CDI, não há relato na literatura que corrobore esse resultado.

Ao analisar os fatores de risco, nos deparamos com o resultado em que, nas crianças com CDI, houve um percentual total desses fatores em 88,2 % (15/17). Esse achado inerente ao referido hospital do estudo, pode alertar para que uma atenção adicional deve ser dada para que na presença de fatores de risco em pacientes hospitalizados por diarreia, seja incluído a solicitação de exames para a investigação de CDI de forma rotineira.

Na nossa casuística, a história de doença crônica foi o fator de risco mais prevalente com 76,5% (13/17), seguido do uso de antibióticos e IBP com 47% (8/17) em cada um deles. Os mesmos fatores também são destacados como prevalentes em outros estudos, embora com maior destaque para a associação com o uso de antibióticos. Um estudo retrospectivo que foi realizado para investigar CDI na Itália, identificou que a maioria das crianças (82,5%) tinham condições subjacentes que podem aumentar o risco de CDI, dentre elas o uso prévio de antibióticos, relatado em 53,4% dos casos, doenças intestinais crônicas (33,7%) e doenças hematológicas e oncológicas (18,2%), sendo essas comorbidades as condições crônicas subjacentes mais comumente relatadas (VECCHIO et al 2017).

Assim como no estudo de VECCHIO e colaboradores (2017), foi identificado na nossa investigação que a doença intestinal crônica teve presença marcante, sendo a doença inflamatória intestinal (DII) a enfermidade mais prevalente tanto no grupo com presença de *C. difficile* (6/17, 35,3%), quanto no grupo em que a pesquisa da cepa foi

negativa (38,5%, 15/39). Destaca-se também que de uma maneira geral a participação foi evidenciada em mais de um terço (37,5%, 21/56) dos presentes na amostragem total. Esse evento pode ser explicado pelo fato de que a diarreia é a principal forma de apresentação em pacientes com doença inflamatória intestinal e o Hospital do estudo é referência para doença inflamatória intestinal tanto no atendimento ambulatorial quanto internamento.

Uma investigação realizada no Hospital Universitário de Bundang entre março de 2011 e maio de 2017 verificou a prevalência de colonização e infecção de *C. difficile* através da pesquisa de toxinas e cultura em 59 crianças com doença inflamatória intestinal. A pesquisa de *C. difficile* foi feita no momento do diagnóstico de DII e durante o acompanhamento da doença. As culturas iniciais para *C. difficile* foram positivas em 13 (22,0%) dos 59 pacientes com DII, enquanto os testes iniciais para toxinas foram positivos em 3 pacientes (5,1%). Durante o tratamento, as culturas de *C. difficile* converteram-se em positivas em 28 (47,5%) comparados com 13 (22,0%) inicialmente positivos, e os testes para toxinas de *C. difficile* ficaram positivos em 13 (22,0%) comparados com 3 pacientes originalmente positivos para toxina. Esse estudo mostra a complexidade do diagnóstico assertivo de CDI em crianças com DII (KIM ET AL., 2018).

Tem sido reportado que pacientes com DII, têm risco significativamente aumentado para CDI, além disso, essa associação repercute no seu quadro clínico podendo levar a atividade da doença. O aumento da atividade da DII, leva a maior morbidade e mortalidade. Pela dificuldade diagnóstica são sugeridos algumas medidas dentre elas a investigação mais ágil de *C. difficile*, podendo, em alguns casos, ser iniciado tratamento empírico para CDI mesmo antes da confirmação através de exames complementares. O tratamento pode ser descontinuado caso seja descartado o diagnóstico de infecção por *C. difficile* (STALLMACH et al 2018).

Outros fatores e comorbidades foram retratados em estudo de caso controle, que investigou fatores de risco para CDI, e concluiu, após análises multivariadas, que os preditores de CDI incluíram, transplante de órgão sólido (odds ratio [OR], 8,09; intervalo de confiança de 95% [IC], 2,10-31,12) e presença de gastrostomia ou jejunostomia (OR, 3,32; IC95% 1,71-6,42) (SANDORA et al, 2011). Uma das cepas isoladas no presente estudo (ribotipo 046 e com novo pulsotipo 1174) pertencia a uma criança com história prévia de transplante hepático. Nosso achado, sensibilizou a

equipe médica envolvida com transplante de órgãos para que na investigação da diarreia em pacientes com transplante de órgãos, fosse incluído a pesquisa de *C. difficile*.

Além da presença de doença crônica o estudo de SANDORA e colaboradores (2011) também identificou que o uso de fluoroquinolonas ou outros antibióticos, até 4 semanas anteriores à diarreia, poderia estar implicado na infecção por *C. difficile*. Estudo polonês também especificando os antibióticos mais frequentemente administrados previamente ao diagnóstico de CDI, verificou que as cefalosporinas de segunda e terceira geração (41/60, 68%) e amoxicilina/ácido clavulânico (25/60, 42%), administrados por via intravenosa, oral e /ou IM foram os mais utilizados.

Nos nossos achados foi identificado que a classe dos betalactâmicos continha os antibióticos mais utilizados previamente ao diagnóstico, sendo a ceftriaxona o antibiótico mais prescrito para o tratamento da diarreia na amostragem total, já que faz parte do tratamento de rotina de criança internada por diarreia infecciosa na maioria dos hospitais da região. Fortuitamente, Sulfametoxazol/trimetropina foi o antibiótico mais utilizado pelos pacientes antes do internamento, tendo sido usado apenas nos pacientes em que foi identificado *C. difficile*, gerando uma significância estatística para CDI. Mesmo com esse resultado não podemos afirmar que esse medicamento estaria implicado como risco para a doença, já que os pacientes que fizeram uso dessa classe de sulfonamidas também utilizaram outros antimicrobianos.

Ainda em relação à exposição à antibióticos uma outra produção, reportou a associação entre várias classes de fármacos e a gravidade da CDI, demonstrando que a exposição a 3 classes diferentes, comparados ao uso de 1 e 2 classes de antibióticos, foi significativamente associada à gravidade da doença (ajustado OR 3,95, intervalo de confiança 1,19-13,11, $P < 0,05$) (KIM et al 2012). Nos pacientes do nosso estudo, 37,5% (21/56), fizeram uso de um ou mais antibióticos.

Em nível global, todos esses fatores e algumas outras motivações tem despertado grande interesse na tipagem de cepas de isolados de *C. difficile*, obviamente a principal é para finalidades epidemiológicas, que além de avaliar as cepas circulantes em diferentes partes do mundo permitem acompanhar a evolução clínica de cada tipo encontrado (KNETSCH et al 2013).

O presente estudo realizou a identificação de seis ribotipos de *C. difficile* (046, 106, 002, 143, 133, 012) onde foram verificados três novos pulsotipos (1174, NML-1234, NML-1235), além de NAP 11 – 0499. A ribotipagem por PCR das cepas de *C.*

difficile demonstrou a presença de uma relativa heterogeneidade tendo em vista que foram encontrados 6 diferentes ribotipos. As implicações desse achado indicam que a população de cepas examinadas não retratam a presença de um surto. Agrega-se ainda a essa heterogeneidade das cepas, algumas particularidades das seis crianças, que de fato demonstraram diversidades e aqui pode-se destacar principalmente a faixa etária e sobretudo a presença de diferentes comorbidades.

O *C. difficile* ribotipo 046 (HIAS 01), pertencente à criança com diarreia recorrente, com transplante hepático por atresia de vias biliares (AVB), portanto imunossuprimida, tinha como característica *tpi+*, *tcdA+*, *tcdB+*, sem deleções *tcdC*, *cdtB-*, sendo identificado um novo pulsotipo 1174. Além disso, essa cepa tinha resistência a levofloxacina. Nesse estudo reportamos a presença desse ribotipo (046) em criança com quadro de diarreia recorrente, hepatopatia e imunossupressão.

O mesmo ribotipo (046) foi caracterizado em investigação de pacientes adultos com CDI internados na Polônia, onde a ribotipagem por PCR classificou dez isolados de acordo com seus ribotipos: 046 ($n = 7$), 001 ($n = 1$), 002 ($n = 1$) e 017 ($n = 1$). Os pacientes ribotipo 046, todos estavam internados com quadro respiratório sendo que cinco tinham tuberculose, e ainda dois apresentavam cirrose hepática. Todas as cepas do ribotipo 046 por PCR foi altamente resistente a moxifloxacina, clindamicina, eritromicina e rifampicina, sendo que a resistência a moxifloxacina foi encontrada em todas as cepas pertencentes a esse ribotipo (OBUCH-WOSZCZATYŃSKI, 2013). Portanto, ribotipo 046 detectado em adultos com hepatopatia e imunossupressão é visto em perfil similar da criança (HIAS-01) de hospital pediátrico do Ceará.

O ribotipo 106 (NAP 11 – 0499) foi caracterizado com genes *tpi+*, *tcdA+*, *tcdB+*, sem deleções *tcdC*, *cdtB-* e foi isolado da criança identificada como HIAS-15 com idade de 1 ano e 5 meses, com diarreia crônica e diagnóstico de megacolon congênito corrigido cirurgicamente, tendo como fatores de risco para CDI, o uso de antibióticos, IBP, internamento prévio e doença crônica.

Esse ribotipo foi reportado em investigação na Inglaterra, no qual avaliou-se 97 casos de diarreia em adultos hospitalizados e a prevalência do ribotipo 106 foi de 38% (37/97), alarmantemente com mortalidade de 11% em 28 dias e 3% nas primeiras 72 horas. Foi também identificado o uso de ciprofloxacina por mais de 7 dias como um fator de risco (odds ratio ajustados de 3,72; IC 95%: 1,38 e 10,02; $p=0,019$). Nesse mesmo estudo o ribotipo 027 representou 45% dos isolados e demonstrou mortalidade quatro vezes maior que o ribotipo 106 (SUDRAM et al, 2009). Outra publicação de um

estudo escocês, mostrou que ribotipo 106 possui como características a produção aumentada de toxinas e esporos, característico de cepas epidêmicas, fato que corresponde diretamente à gravidade da doença e extensão da disseminação (VOHRA E POXTON, 2011).

Na faixa etária pediátrica a identificação desse ribotipo 106, por PCR ribotipagem, foi realizada em estudo de caso controle em crianças espanholas, sendo detectado em 18% das crianças. Além disso, numa mesma criança 2 ribotipos diferentes estavam presentes dentre eles o 106. No referido estudo, é reforçado ainda que não há repercussão clínica com a presença de *C. difficile* em menores de 2 anos (GONZÁLEZ-DEL VECCHIO, 2016).

Apesar das características endêmicas dessa cepa conforme relatado, não foi registrado, no hospital do nosso estudo, outros casos semelhantes nem mesmo na enfermaria em que a criança (HIAS 15) ribotipo 106, estava internada. O quadro crônico da diarreia foi solucionado após o uso de metronidazol. A eficácia da conduta adequada, aliado ao quadro clínico, reforça o diagnóstico de CDI sugerido no isolamento de *C. difficile*, mesmo sendo a criança classificada como lactente, pois a idade da mesma era 1 ano e 6 meses.

Após 20 dias de internamento foi realizado isolamento do ribotipo 002, *tpi+*, *tcdA+*, *tcdB+*, sem deleções *tcdC*, *cdtB-*, e novo pulsotipo (NML-1234) na criança HIAS-54. A criança tinha sido internada com quadro diarreico importante, sendo diagnosticada com síndrome hemolítica urêmica grave, com repercussões na função renal sendo indicado tratamento com hemodiálise. Infelizmente a investigação para *C. difficile* só foi realizada 20 dias após o internamento já com diarreia, não sendo possível afirmar que esse patógeno foi adquirido na comunidade, pois fatores de risco, como uso de antibiótico e IBP, além da permanência em unidade de terapia intensiva poderiam ter participação no desenvolvimento da doença.

Dauby e colaboradores (2017), relataram um caso de ribotipo fatal adquirido na comunidade 002, em paciente sem presença de fatores de risco. Esse dado sugere que mais estudos são necessários para melhor definir a patogenicidade desse ribotipo. O autor sinaliza ainda que o perfil do ribotipo 002 vem aparecendo como ribotipo emergente. Estudo prévio reportou que a frequência média de esporulação de 35 cepas de *C. difficile* com ribotipo 002 foi de 20,2%, significativamente maior que de outros 56 ribotipos (3,7%, $p < 0,001$). (CHENG et al 2011)

Percebemos que a presença do *C. difficile*, ribotipo 002, pode ter representado um grande desafio para o controle de infecção, pois o paciente HIAS-15 transitou por 3 unidades: leito da observação da emergência, UTI e por fim na enfermaria de nefrologia. Um diagnóstico laboratorial oportuno para reconhecer esta cepa de alto risco, facilitaria intervenções estratégicas de controle de infecção, que devem incluir a identificação precoce de casos sintomáticos para precauções com isolamento de contato e completa limpeza ambiental com germicidas à base de cloro para inativar os esporos de *C. difficile*. Essa criança de apenas 1 ano e 3 meses, apesar da gravidade que o quadro diarreico se apresentou, poderia ter evoluído com desfecho indesejado, culminando com o óbito, caso não tivesse sido instituída terapêutica adequada de forma enérgica.

Nosso estudo também isolou os ribotipos 143 (HIAS 55) e 133 (HIAS 56), os mesmos foram registrados por Alcides e colaboradores (2007), a partir de 39 isolados obtidos de fezes de crianças hospitalizadas e da comunidade, treze ribotipos (001, 015, 031, 043, 046, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 142 e 143), através da ribotipagem por PCR, identificados em estudo brasileiro do Rio de Janeiro. Sete (132, 133, 134, 135, 136, 142 e 143) foram considerados novos tipos e contabilizados 78,5% de todas as amostras avaliadas (incluindo ambientes). Os sete novos ribotipos encontrados nesta investigação poderiam representar cepas características do sudeste do Brasil, mas agora encontrado na região nordeste. O ribotipo 133, considerado não toxigênico, foi o mais comum detectado em todos os grupos de crianças (pacientes internados e ambulatoriais)

Alcides e colaboradores (2007), no mesmo estudo, reportaram que todas as cepas eram sensíveis ao metronidazol e vancomicina e relataram que as cepas não toxigênicas do ribotipo 133, o mais prevalente entre os isolados, podem representar um reservatório de resistência à clindamicina, a partir do achado em que eles apresentaram predominantemente as maiores MICs para este antibiótico. No nosso estudo, pelo fato da cepa ser não toxigênica, não realizamos o antibiograma.

O ribotipo 012 foi obtido a partir de espécimes de criança (HIAS 58) e apresentou as mesmas características genéticas dos outros ribotipos, *tpi+*, *tcdA+*, *tcdB+*, sem deleções *tcdC*, *cdtB-*. Essa criança é portadora de doença renal crônica, em uso contínuo de cefalexina com dose profilática, além de história de internamento prévio que pode ter contribuído também como fator de risco para CDI. No momento

da abordagem apresentava quadro diarreico agudo, juntamente com mais 3 crianças das quais dividiam a mesma enfermaria.

O ribotipo 012 vem sendo classificado como uma cepa emergente e de acordo com estudo no Chile, onde num total de 27 ribotipos de PCR identificados, foi reportado como o ribotipo mais prevalente (14,8%), seguido do 027 (12,3%), 046 (12,3%), 014/020 (9,9%), 001 (4,9%), e 023 (4,9%) (PLAZA-GARRIDO et al 2016). Em estudo realizado na Argélia, onde foi feita caracterização molecular e ribotipagem por PCR, esse ribotipo foi o terceiro mais prevalente (27%) (DJEJBAR et al, 2018). Embora os sintomas tivessem surgido apenas há apenas 3 dias da inclusão no estudo, chamou a atenção a forma intensa de apresentação da diarreia e da presença importante de náusea e vômito. A recuperação ocorreu após a terapia antimicrobiana com metronidazol. Observando a forma prevalente que esse ribotipo vem sendo reportado em regiões diferentes, o nosso isolamento poderá permitir que comparações entre regiões possam ser confrontadas e maiores esclarecimentos da repercussão clínica que este ribotipo pode proporcionar seja compreendida.

C. difficile também foi pesquisado em mobília hospitalar não sendo obtido isolamento dessa cepa em material coletado de berço ou colchão. Concluímos que esse achado ocorreu devido ser conduta de rotina nesse hospital o uso de hipoclorito de sódio para limpeza e além da orientação de lavagem de mãos para a equipe de saúde ocorrer frequentemente pela Comissão de Infecção Hospitalar.

A variabilidade genética das cepas de *C. difficile*, reportada no grupo de crianças em que nos propomos a realizar a caracterização de *C. difficile*, possibilitou pela primeira vez o conhecimento da condição epidemiológica local da CDI na faixa etária infantil em hospital pediátrico do Ceará. O entendimento das relações das cepas com os fatores de risco, a forma de apresentação clínica, assim como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, alertou para a vigilância de medidas de prevenção. Essas práticas sem dúvidas impediram a recorrência da CDI e quem sabe preveniram eventos fatais.

Embora a caracterização de cepas de *C. difficile* não seja atualmente indicada como rotina no presente hospital, é esperado que esse trabalho permita uma reflexão sobre o impacto da CDI na criança do nosso Estado. A expectativa é que, através dos dados desse estudo, possa ser projetada a implantação de novas medidas para pesquisa de *C. difficile* na elucidação diagnóstica da síndrome diarreica, sobretudo em pacientes com maior risco.

C. difficile continua a multar e as particularidades das mudanças são listadas na dependência de cada local, o que culmina com um impacto epidemiológico crescente. Esse estudo pode ser o ponto de partida para que novas perspectivas de investigações locais de CDI na faixa etária pediátrica sejam projetadas, com possibilidade de novas relações genéticas e conexões com as práticas clínicas.

7 CONCLUSÕES

Esse trabalho nos permitiu elaborar as seguintes conclusões:

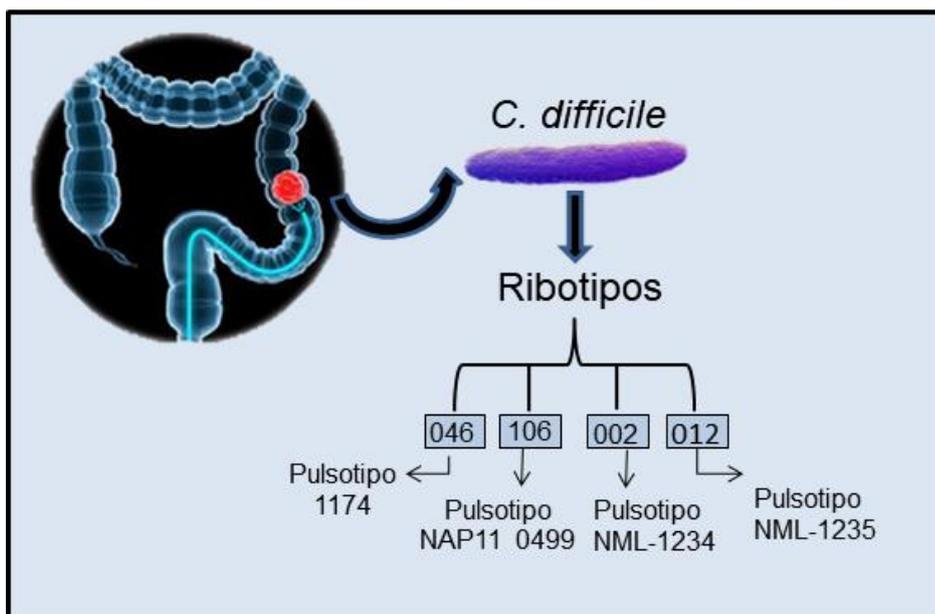
1. O *C. difficile* tem positividade para toxinas e/ou isolamento por cultura de 30,4% em crianças com diarreia internadas ou em atendimento ambulatorial em Hospital Público Pediátrico de atendimento terciário de referência do Estado do Ceará.
2. Pela primeira vez foi realizado isolamento e ribotipagem de *C. difficile* em Hospital público terciário de Fortaleza Ceará, sendo obtido: ribotipo 046 com novo pulsotipo 1174, ribotipo 106 com NAP11 0499, ribotipo 002 com novo pulsotipo NML-1234, ribotipo143, ribotipo 133, ribotipo 012 com novo pulsotipo - 1235.
3. Todas as cepas de *C. difficile* isoladas a partir de amostras de fezes diarreicas foram sensíveis à metronidazol e vancomicina, antibióticos recomendados para o tratamento. Portanto, todas as crianças responderam efetivamente ao tratamento com metronidazol.
4. Apesar da resistência conhecida mundialmente a fluoroquinolonas, somente duas cepas (046 e 106) foram resistentes à levofloxacina.
5. Crianças com CDI no Hospital Público Pediátrico em Fortaleza, Ceará apresentam com mais frequência náuseas e vômitos em relação ao grupo com diarreia sem CDI.
6. Pelo menos um fator de risco (internamento nos últimos 30 dias, uso prévio de antibiótico e inibidores de bomba de prótons, além de comorbidades) foi encontrado em criança em que foi realizado isolamento de *C. difficile*.
7. Pesquisa de contaminação por *C. difficile*, realizado na mobília hospitalar (berço e colchão) não resultou em isolamento dessa bactéria.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo forneceu importantes informações epidemiológicas para a comunidade científica, com a identificação dos ribotipos dessa bactéria em crianças atendidas em um Hospital Terciário pediátrico, realizado de forma inédita no Estado do Ceará. Contribuiu ainda para o conhecimento das particularidades da infecção de *C. difficile* com correlações clínicas e associação com os fatores de risco com cada cepa isolada.

É importante considerar que a atual forma de diagnóstico de CDI, através da detecção de toxinas deve ser repensada. Ficou claramente explicitado no nosso estudo que os exames de rotina utilizados atualmente, parecem não ser tão eficientes. Essa diferenças na sensibilidade dos métodos diagnósticos devem ser ponderadas para que mudanças significativas possam ocorrer.

Nosso grupo almeja, que o conhecimento desse resultado, sensibilize os órgãos governamentais do Estado e permita que um centro diagnóstico de referência para investigação de *C. difficile* seja projetado com a participação do poder público.



REFERÊNCIAS

- ABT, M. C.; MCKENNEY, P. T.; PAMER, E. G. Clostridium difficile colitis: Pathogenesis and host defence. **Nature Reviews Microbiology**. v.14, n.10, p. 609–620, Oct. 2016.
- AGUAYO, C. et al. Rapid spread of Clostridium difficile NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 14, p. 3069–3073, out. 2015.
- AL-JUMAILI, I. J. et al. Incidence and Origin Of Clostridium difficile in Neonates. **Journal of clinical microbiology**. v.19, n.1, p.77-78, jan.1984.
- ALCIDES, Ana PP et al. New PCR ribotypes of Clostridium difficile detected in children in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n.1, p. 53-59, 2007.
- ALONSO, R. et al. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of Clostridium difficile. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 155–157, fev. 2005.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 17–26, jan. 2011.
- ANTONARA, S.; LEBER, A. L. Diagnosis of Clostridium difficile Infections in Children. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.n], [s.i]. 2016.
- AWAD, M. M. et al. Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. **Gut Microbes**, v. 5, [s.i], p. 579–593, 2014.
- AZAD, M. et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. **Canadian Medical Association Journal**, v. 185, n.5, p. 385–394, fev. 2013.
- BALASSIANO, I. T. et al. Characterization of Clostridium difficile strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, v. 15, n. 3, p. 61–64, jun. 2009.
- BALASSIANO, I. T. et al. Clostridium difficile: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 169–179, fev. 2012.
- BAUER, M. P. et al. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 63–73, jan. 2011.
- BÉLANGER, S. D. et al. Rapid Detection of Clostridium difficile in Feces by Real-Time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 2, p. 730–734, fev. 2003.
- BENNO, Y.; SAWADA, K.; MPTSUOKA1, T. The Intestinal Microflora of Infants: Composition of Fecal Flora in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants. **Microbiology and immunology**. v.28, n.9, p.975-86, 1984.

BENSON, Lacey et al. Changing epidemiology of Clostridium difficile-associated disease in children. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 11, p. 1233-1235, nov. 2007.

BIEDERMANN, L.; ROGLER, G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. **European Journal of Pediatrics**, v. 174, n. 2, p. 151–167, fev. 2015.

BORALI, E. et al. Community-acquired Clostridium difficile infection in children: A retrospective study. **Digestive and Liver Disease**, v.28, n.11, p1233-5, nov.2015.

BRAZIER, J. S. et al. Isolation and identification of Clostridium spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 985–989, nov. 2002.

BRETTLE, R. P.; WALLACE, E. Clostridium difficile-associated diarrhoea. **Journal of Infection**, v. 8, n. 2, p. 123–128, mar. 1984.

BRITO, G. A. C. et al. Clostridium difficile Toxin A Alters In Vitro–Adherent Neutrophil Morphology and Function. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1297–1306, maio. 2002a.

BRITO, G. A. C. et al. Mechanism of Clostridium difficile toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 10, p. 1438–1447, nov. 2002b.

BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Interaction between the intestinal microbiota and host in Clostridium difficile colonization resistance. **Trends Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 313–319, jul. 2012.

BURKE, D. G. et al. Clostridium difficile carriage in adult cystic fibrosis (CF); implications for patients with CF and the potential for transmission of nosocomial infection. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, n. 2, p. 291–298, mar. 2017.

CAREY-ANN, Burnham D.; CARROLL, Karen C. Diagnosis of Clostridium difficile infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 604-630, jul. 2013.

CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. Biology of Clostridium difficile: Implications for Epidemiology and Diagnosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 501–521, 2011.

CHANG, J. Y. et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 3, p. 435–438, fev. 2008.

CHENG, V. C. C. et al. Clostridium difficile isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 11, p. 1371, nov. 2011.

CHAVES-OLARTE, E. et al. Toxins A and B from Clostridium difficile Differ with Respect to Enzymatic Potencies, Cellular Substrate Specificities, and Surface Binding to Cultured Cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 7, p.

1734–1741, 1997.

CHILTON, C. H.; PICKERING, D. S.; FREEMAN, J. Microbiologic factors affecting Clostridium difficile recurrence. **Clinical Microbiology and Infection**, **Clinical Microbiology and Infection**.v.24, n.5,p.476–482, mai. 2018.

COHEN, S. H. et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 05, p. 431–455, maio. 2010a.

COHEN, S. H. et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 05, p. 431–455, maio. 2010b.

COJOCARIU, C. et al. Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease. **Turkish Society of Gastroenterology**, v. 25, n.6, p.603-10, Dec. 2014.

COLLINS, M. D. et al. The Phylogeny of the Genus Clostridium: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations International. **Journal of Systematic Bacteriology**. v.44, n.4, p.812-26, out.1994.

COSTA, C. L. et al. Community-acquired diarrhea associated with Clostridium difficile in an HIV-positive cancer patient: first case report in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 138–139, set. 2014.

COSTA, C.L.; LÓPEZ-UREÑA, D.; DE OLIVEIRA ASSIS, T.; RIBEIRO, R.A.; SILVA, R.O.; RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; DE CARVALHO, A.F.; DO CARMO, A.O.; DIAS, A.A.; DE CARVALHO, C.B.; CHAVES-OLARTE, E.; RODRÍGUEZ, C.; QUESADAGÓMEZ, C.; DE CASTRO BRITO, G.A. A MLST. Clade 2 Clostridium difficile strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe**. 40:76-84 2016.

COSTA, C. L. et al. Molecular epidemiology of Clostridium difficile infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, v. 48, p. 232–236, dez. 2017.

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

CURCIO, Daniel et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in developing countries: a systematic Review and meta-analysis. **Infectious diseases and therapy**, v. 8, n. 1, p. 87-103, 2019.

DANIELS, L. M.; KUFEL, W. D. Clinical review of Clostridium difficile infection: an update on treatment and prevention. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 16, p. 1759–1769, nov. 2018.

DAUBY,N. et al. Fatal community-acquired ribotype 002 Clostridium difficile bacteremia. **Anaerobe**, v. 44, p. 1-2, abril. 2017.

- DAWSON, L. F.; VALIENTE, E.; WREN, B. W. Clostridium difficile—A continually evolving and problematic pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1410–1417, dez. 2009.
- DE BLANK, P. et al. Trends in clostridium difficile infection and risk factors for hospital acquisition of clostridium difficile among children with cancer. **Journal of Pediatrics**, v. 163, n. 3, p. 699-705. set. 2015.
- DEBAST, S. B.; BAUER, M. P.; KUIJPER, E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium difficile Infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 1–26, mar. 2014.
- DELMÉE, Michel et al. Clostridium difficile in neonates: serogrouping and epidemiology. **European journal of pediatrics**, v. 147, n. 1, p. 36-40, jan. 1988.
- DENÈVE, C. et al. New trends in Clostridium difficile virulence and pathogenesis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n.1, mar.2009.
- DEPESTEL, D. D.; ARONOFF, D. M. Epidemiology of Clostridium difficile Infection. **Journal of pharmacy practice**, v.26, n.5, p. 464-475, out. 2013.
- DIAL, S. et al. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired Clostridium difficile-associated disease. **JAMA**, v. 294, n. 23, p. 2989, 21 dez. 2005.
- DJEBBAR, Abla et al. First molecular characterisation and PCR ribotyping of Clostridium difficile strains isolated in two Algerian Hospitals. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 12, n. 01, p. 015-021, jan. 2018.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 1971– 11975, jun. 2010.
- DULĘBA, K.; PAWŁOWSKA, M.; WIETLICKA-PISZCZ, M. Clostridium difficile infection in children hospitalized due to diarrhea. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.33, n.2, fev. 2014.
- DUROVIC, A. et al. Distinguishing Clostridium difficile Recurrence From Reinfection: Independent Validation of Current Recommendations. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 08, p. 891–896, ago. 2017.
- EGLOW, R. et al. Diminished Clostridium difficile toxin a sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin a receptor. **Journal of Clinical Investigation**, v.90, n.3, p.822, set. 1992.
- FALLANI, M. et al. Clostridium difficile and Clostridium perfringens species detected in infant faecal microbiota using 16S rRNA targeted probes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 1, p. 150–161, out. 2006.

FALLANI, M. et al. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 77–84, jul. 2010.

FALLANI, M. et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1385–1392, maio 2011.

FERREIRA, C. et al. Prevalence of Clostridium spp. and Clostridium difficile in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. v. 98, n.4, jun. 2003.

FINEGOLD, S. M.; SONG, Y.; LIU, C. General Comments and Update on Taxonomy of Clostridia and Anaerobic cocci. **Anaerobe**, v. 8, n. 5, p. 283–285, out. 2002.

GALDYS, A. L.; CURRY, S. R.; HARRISON, L. H. Asymptomatic Clostridium difficile colonization as a reservoir for Clostridium difficile infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 8, p. 967–980, ago. 2014.

GAREY, K. W. et al. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent Clostridium difficile infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 4, p. 298–304, dez. 2008.

GAYNES, R. et al. Outbreak of Clostridium difficile Infection in a Long - Term Care Facility: Association with Gatifloxacin Use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 5, p. 640–645, mar. 2004.

GEORGE, W. L. et al. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. **Journal of clinical microbiology**, v. 9, n. 2, p. 214-219, 1979.

GIACOMO, C. DE; BORALI, E. Clostridium Difficile in Children- A Multifaceted Infection. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 1, n.2, ago.2016.

GILL, S. R. et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, jun. 2006.

GOGATE, A. et al. Diagnostic role of stool culture & toxin detection in antibiotic associated diarrhoea due to Clostridium difficile in children. **Indian J Med Res**, v. 122, p. 518–524, dec. 2005.

GONZÁLEZ-DEL VECCHIO, M. et al. Clinical significance of Clostridium difficile in children less than 2 years old: A case-control study. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.35, n.3. p.281-5. mar. 2016.

GRANT, K. A. et al. The identification and characterization of Clostridium perfringens by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 5, p. 629–639, out. 2008.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic Clostridia. **Clinical microbiology reviews**.v.3, n.1, p.66-98, jan. 1990.

HEAVEY, P. M.; ROWLAND, I. R. The Gut Microflora of the Developing Infant: Microbiology and Metabolism. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 11, n. 2,

p. 75–83, jan. 1999.

HENRICH, T. J. et al. Clinical Risk Factors for Severe Clostridium difficile–associated Disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n.3, p. 415–22. mar. 2009.

HOURIGAN, S. K.; SEARS, C. L.; OLIVA-HEMKER, M. Clostridium difficile Infection in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 22, n.4, p.1020–1025. abr. 2016.

HUGON, P. et al. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 1211–1219, out. 2015.

JANOIR, C. Virulence factors of Clostridium difficile and their role during infection. **Anaerobe**, v. 37, n.[s.i], p. 13–24, fev. 2016.

JANVILISRI, T. et al. Development of a microarray for identification of pathogenic Clostridium species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 66, p. 140–147, fev. 2010.

JIMENEZ, J. et al. Exposure to Gastric Acid–Suppression Therapy Is Associated With Health Care– and Community-Associated Clostridium difficile Infection in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 208–211, ago. 2015.

JOHNSON, S. Recurrent Clostridium difficile infection: A review of risk factors, treatments, and outcomes. **Journal of Infection**, v. 58, n. 6, p. 403–410, jun. 2009.

JOUSIMIES-SOMER, H. R. et al. **Anaerobic Bacteriology Manual**. 6ª edição ed. Belmont: CA: Star Publishing Company, 2002.

KAHN, S. A.; YOUNG, S.; RUBIN, D. T. Colonoscopic Fecal Microbiota Transplant for Recurrent Clostridium difficile Infection in a Child. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 12, p. 1930–1931, dez. 2012.

KELLY, C. P. Can we identify patients at high risk of recurrent Clostridium difficile infection? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 21–27, 2012.

KELLY, C. P.; KYNE, L. The host immune response to Clostridium difficile. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1070–1079, ago. 2011.

KHALAF, N. et al. Clostridium difficile: An Emerging Pathogen in Children. **Discovery medicine**, v. 14, 2012.

KHANNA, S. et al. The epidemiology of clostridium difficile infection in children: A population-based study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n.10, mai. 2013.

KHANNA, S.; PARDI, D. S. Clostridium difficile Infection: New Insights Into Management. **Mayo Clinics Proceedings**, v. 87, n.11, p. 1106–1117, nov. 2012.

KIM, J. et al. Epidemiological Features of Clostridium difficile-Associated Disease Among Inpatients at Children’s Hospitals in the United States, 2001–2006. **PEDIATRICS**, v. 122, n. 6, p. 1266–1270, dez. 2008.

- KIM, Do Hyun; CHO, Jin Min; YANG, Hye Ran. Clostridium difficile Infection at Diagnosis and during the Disease Course of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 21, n. 1, p. 43-50, 2018.
- KIM, J.; KIM, Y.; PAI, H. Clinical characteristics and treatment outcomes of Clostridium difficile infections by PCR ribotype 017 and 018 strains. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, dez. 2016.
- KIM, Jason et al. Risk factors and outcomes associated with severe Clostridium difficile infection in children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 31, n. 2, p. 134-138, 2012.
- KNETSCH, C. W. et al. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study Clostridium difficile infections. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 4, p. 20381, jan. 2013.
- KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido**. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KRONMAN, M. P. et al. Fecal Microbiota Transplantation Via Nasogastric Tube for Recurrent Clostridium difficile Infection in Pediatric Patients. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 23–26, jan. 2015.
- KUEHNE, S. A. et al. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 711–713, 15 out. 2010.
- KUIPER, Gé-Ann et al. Clostridium difficile infections in young infants: case presentations and literature review. **IDCases**, v. 10, p. 7-11, jul. 2017.
- LAWSON, P. A. et al. Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, v. 40, p. 95–99, ago. 2016.
- LAWSON, P. A.; RAINEY, F. A. Proposal to restrict the genus Clostridium Prazmowski to Clostridium butyricum and related species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n.2. p. 1009–1016, fev. 2016.
- LEBWOHL, B. et al. Risk of Clostridium difficile Infection in Patients With Celiac Disease: A Population-Based Study. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, .n.12, p. 1878–1884, dec. 2017.
- LEES, E. A. et al. The role of Clostridium difficile in the paediatric and neonatal gut—a narrative review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, p. 1047-1057, jul. 2016.
- LEWIS, P. O. et al. Risk and Severity of Hospital-Acquired Clostridium difficile Infection in Patients Taking Proton Pump Inhibitors. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 36, n. 9, p. 986–993, set. 2016.
- LI, J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 834–841, ago. 2014.
- LIMA, A. A. M. et al. Effects of Clostridium difficile Toxins A and B in Rabbit Small and

Large Intestine In Vivo and on Cultured Cells In Vitro. **Infection and immunity**. v. 56, n.3, p. 582-588, mar.1988.

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

LOO, V. G. et al. Host and Pathogen Factors for Clostridium difficile Infection and Colonization. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 18, p. 1693–1703, nov. 2011.

MACCANNELL, D. R. et al. Molecular analysis of Clostridium difficile PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.6, p. 2147-52, jun. 2006.

MACCIONI, A. et al. Descripción clínica y epidemiológica de la infección por Clostridium difficile en población pediátrica. **Revista chilena de infectología**, v. 32, n. 5, p. 523–529, out. 2015.

MADAN, J. C. et al. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. **Current opinion in pediatrics**, v. 24, n.6, p. 753–759, jun. 2012.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v.3, n.31, jul. 2015.

MARCOBAL, A. et al. Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-related Microbes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5334–5340, 2010.

MAYNARD, C. L. et al. Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System. **Nature**, v. 489, p. 231–241, set. 2012.

MCDONALD, L. C. et al. An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of Clostridium difficile. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 23, p. 2433–2441, dez. 2005.

MCDONALD, L. C. et al. Recommendations for Surveillance of Clostridium difficile–Associated Disease. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 02, p. 140–145, fev. 2007.

MCDONALD, L. C. et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n.7. p. 48, mar. 2018.

MCFARLAND, L. V.; BRANDMARKER, S. A.; GUANDALINI, S. Pediatric Clostridium difficile: A Phantom Menace or Clinical Reality? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 220–231, set. 2000.

MORINVILLE, V.; MCDONALD, J. Clostridium difficile-associated diarrhea in 200 Canadian children. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 8, p. 497-501, ago. 2005.

- MULLANE, K. M. et al. Efficacy of Fidaxomicin Versus Vancomycin as Therapy for Clostridium difficile Infection in Individuals Taking Concomitant Antibiotics for Other Concurrent Infections. **Clinical infectious diseases**, v. 53,n.5, p.440-7, sep. 2011.
- MUTO, C. A. et al. A Large Outbreak of Clostridium difficile–Associated Disease with an Unexpected Proportion of Deaths and Colectomies at a Teaching Hospital Following Increased Fluoroquinolone Use. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 03, p. 273–280, mar. 2005.
- NAABER, P. et al. Inhibition of adhesion of Clostridium difficile to Caco-2 cells. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 205–209, jul. 1996.
- NAVANEETHAN, U.; VENKATESH, P. G. K.; SHEN, B. Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease: Understanding the evolving relationship. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 39, p. 4892–4904, out. 2010.
- NEGRÓN, M. E. et al. Ulcerative Colitis Patients With Clostridium difficile are at Increased Risk of Death, Colectomy and Postoperative Complications: A Population-Based Inception Cohort Study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 5, p. 691–704, maio 2016.
- NEISH, A. S. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 65–80, 2009.
- NICOLAU, D.; THABIT, A. An exploratory study to evaluate Clostridium difficile polymerase chain reaction ribotypes and infection outcomes. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 9, p. 143–148, jun. 2016.
- NOOR, A.; KRILOV, L. R. Clostridium difficile infection in children. **JAMA Pediatrics**, v.1, n.47, set. 2018.
- OBUCH-WOSZCZATYŃSKI, P. et al. Emergence of Clostridium difficile infection in tuberculosis patients due to a highly rifampicin-resistant PCR ribotype 046 clone in Poland. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 32, n. 8, p. 1027-1030, jan. 2013.
- O'CONNOR, Don et al. Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of Clostridium difficile-associated diarrhea. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2846-2849, ago. 2001.
- ONG, G. K. B. et al. Clostridium difficile colitis: A clinical review. **American Journal of Surgery**, v. 213, n. 3, p. 565–571, 1 mar. 2017.
- OOI, C. Y.; DILLEY, A. V.; DAY, A. S. Saccharomyces boulardii in a child with recurrent Clostridium difficile. **Pediatrics International**, v. 51, n. 1, p. 156–158, fev. 2009.
- OTÁVIO, R. et al. Clostridium difficile ribotypes in humans and animals in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1062–1065, dec. 2015.
- OTTO, A. et al. The protein inventory of Clostridium difficile grown in complex and minimal medium. **Proteomics - Clinical Applications**, v.10, n.9. p.1068-1072. out. 2016.

- PAI, S. et al. Five Years Experience of Clostridium difficile Infection in Children at a UK Tertiary Hospital: Proposed Criteria for Diagnosis and Management. **PLoS ONE**, v. 7, dec. 2012.
- PANT, C. et al. Rising Incidence of Clostridium difficile Related Discharges among Hospitalized Children in the United States. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 01, p. 104–106, jan. 2016.
- PARKHILL, J.; WREN, B. W. Whole-genome sequencing—a transformation in bacterial epidemiology. **Genome Biology**, v. 12, n.10, p. 230. 2011.
- PENDERS, J. et al. Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 141–147, 2005.
- PENDERS, J. et al. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. **PEDIATRICS**, v. 118, n. 2, p. 511–521, 1 ago. 2006.
- PIEROG, A.; MENCIN, A.; REILLY, N. R. Fecal Microbiota Transplantation in Children With Recurrent Clostridium difficile Infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 11, p. 1198–1200, nov. 2014.
- PINTO, L. J. F. et al. Incidence and importance of Clostridium difficile in paediatric diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 1095–1099, 2003.
- PLAZA-GARRIDO, A. et al. Predominance of Clostridium difficile ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, 2012. **Epidemiology & Infection**, v. 144, n. 5, p. 976-979, 2016.
- POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal**, v. 171, n.1, p.51-8, jul. 2004.
- PRICE, A. B.; DAVIES, D. R. Pseudomembranous colitis. **Journal of Clinical Pathology**. v. 30, n. 6. p. 21. 1977
- PRUITT, R. N.; LACY, D. B. Toward a structural understanding of Clostridium difficile toxins A and B. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n.28, mar. 2012.
- QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464,[s.i], p.59-65, mar. 2010.
- QUESADA-GÓMEZ, C. et al. Emergence of Clostridium difficile NAP1 in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 669-70, fev. 2010.
- RASTALL, R. A. Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 8, p. 2022–2026, ago. 2004.
- ROLFE, R. D.; SONG, W. Immunoglobulin and non-immunoglobulin components of human milk inhibit Clostridium difficile toxin A-receptor binding. **Journal of Medical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 10–19, 1 jan. 1995.
- ROUSSEAU, C. et al. Prevalence and diversity of Clostridium difficile strains in infants. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1112–1118, 2011a.

- ROUSSEAU, C. et al. Clostridium difficile Colonization in Early Infancy Is Accompanied by Changes in Intestinal Microbiota Composition. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 858–865, 2011b.
- RUSSELL, G. et al. Fecal Bacteriotherapy for Relapsing Clostridium difficile Infection in a Child: A Proposed Treatment Protocol. **PEDIATRICS**, v. 126, n. 1, p. e239–e242, 1 jul. 2010.
- RUSSELL, G. H. et al. Fecal Transplant for Recurrent Clostridium difficile Infection in Children With and Without Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 588–592, maio 2014.
- SANDORA, Thomas J. et al. Epidemiology and risk factors for Clostridium difficile infection in children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 30, n. 7, p. 580–584, 2011.
- SATHYENDRAN, V. et al. Clostridium difficile as a cause of healthcare-associated diarrhoea among children in Auckland, New Zealand: clinical and molecular epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 10, p. 1741–1747, out. 2014.
- SATTERFIELD, B. A. et al. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the Clostridium botulinum toxin genes A, B, E and F. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 55–64, jan. 2010.
- SCHLOSS, P. D. et al. Status of the archaeal and bacterial census: An update. **American Society for Microbiology**, v. 7, [s.n], mai. 2016.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Status of the Microbial Census. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n.4, p. 686–91, dec. 2004.
- SCHUTZE, G. E.; WILLOUGHBY, R. E. Clostridium difficile Infection in Infants and Children. **American Academy of Pediatrics**, v.131, n.1, p. 196–200, Jan. 2013.
- SCHWARTZ, K. L. et al. Severe clinical outcome is uncommon in Clostridium difficile infection in children: a retrospective cohort study. **BMC Pediatrics**, v.31, [s.n], p. 14–19, jan. 2014.
- SEBAIHIA, M. et al. The multidrug-resistant human pathogen Clostridium difficile has a highly mobile, mosaic genome. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 779–786, jul. 2006.
- SHEN, A. Clostridium difficile Toxins: Mediators of Inflammation. **Journal of Innate Immunity**, v. 4, n.[s.n], p. 149–158, 2012.
- SMELTZER, S.; HASSOUN, A. Successful use of fidaxomicin in recurrent Clostridium difficile infection in a child. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1688–1689, jul. 2013.
- SPIGAGLIA, P. et al. Clostridium difficile infection (CDI) in children due to hypervirulent strains PCR-ribotype 027: An emblematic report of two cases. **Anaerobe**, v. 36, p. 91–93, dez. 2015.

STALLMACH, Andreas; REUKEN, Philipp A.; TEICH, Niels. Advances in the diagnosis and treatment of Clostridioides [Clostridium] difficile infections in inflammatory bowel disease. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 56, n. 11, p. 1369-1377, 2018.

STARK, P. L.; LEE, A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. **Journal of medical microbiology**, v.15, n.2, p.189-203, mai. 1982.

SUNDRAM, F. et al. Clostridium difficile ribotypes 027 and 106: clinical outcomes and risk factors. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, n. 2, p. 111-118, jun. 2009.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n.11, p. 1823– 1836, jun. 2017.

TOLTZIS, P. et al. Presence of the Epidemic North American Pulsed Field Type 1 Clostridium Difficile Strain in Hospitalized Children. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 4, p. 607–608, abr. 2009.

TORRAZZA, R. M.; NEU, J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. **Journal of Perinatology**, v. 31, n.1, p. 529–534, abr. 2011.

TREJO, F. M. et al. Inhibition of Clostridium difficile growth and adhesion to enterocytes by Bifidobacterium supernatants. **Anaerobe**, v. 12, n. 4, p. 186–193, ago. 2006.

VAISHNAVI, C. Fidaxomicin—the new drug for Clostridium difficile infection. **Indian J Med Res**, v. 141, n. [s.n], p. 398–407, 2015.

VAN BEURDEN, Y. H. et al. Cost analysis of an outbreak of Clostridium difficile infection ribotype 027 in a Dutch tertiary care centre. **Journal of Hospital Infection**, v. 95, n. 4, p. 421–425, abr. 2017.

VARDAKAS, K. Z. et al. Treatment failure and recurrence of Clostridium difficile infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 1–8, jul. 2012.

VECCHIO, A. Lo et al. Clostridium difficile infection in children: epidemiology and risk of recurrence in a low-prevalence country. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 177-185, 2017.

VOHRA, Prerna; POXTON, Ian R. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of Clostridium difficile. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1343-1353, maio. 2011.

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.

WARNY, M. et al. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **The Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1079–1084, set. 2005.

WENDT, J. M. et al. Clostridium difficile Infection Among Children Across Diverse US Geographic Locations. **Pediatrics**, v. 133, n. 4, p. 651–658, abr. 2014.

WIJARNPREECHA, K. et al. The risk of Clostridium difficile associated diarrhea in nasogastric tube insertion: A systematic review and meta-analysis. **Digestive and liver disease**, v. 48, [s.n], 2016.

WILCOX, M. H. et al. Changing Epidemiology of Clostridium difficile Infection Following the Introduction of a National Ribotyping-Based Surveillance Scheme in England. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 8, p. 1056–1063, out. 2012.

YOUNG, V. B. The Intestinal Microbiota in Health and Disease. **Current opinion in gastroenterology**, v. 28, n.1, p. 63–69, jan.2012.

YOUNG, V. B. The role of the microbiome in human health and disease: An introduction for clinicians. **BMJ** , v. 15, n.[s.n], p. 356-831, mar. 2017.

YUTIN, N.; GALPERIN, M. Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. **Environmental Microbiology**, v. 15, n.10, p. 2631–2641, out. 2013.

ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A. F.; KOLLEF, M. H. Increase in Adult Clostridium difficile-related Hospitalizations and Case-Fatality Rate, United States, 2000-2005. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n.6. p. 929-931, jun. 2008.

ZILBERBERG, M. D.; TILLOTSON, G. S.; MCDONALD, L. C. Clostridium difficile infections among hospitalized children, United States, 1997-2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.4, p. 604-9, abr. 2010.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

1) Qual o objetivo desta pesquisa?

A pesquisa “Estudo de incidência de infecção e genotipagem de cepas de *Clostridium difficile* na diarreia em pacientes internados no Hospital Albert Sabin” será realizada para estudar e dimensionar a presença de uma bactéria chamada *Clostridium difficile* em crianças internados neste Hospital. Este microrganismo está associado à presença de diarreia e pode causar graves consequências aos pacientes infectados.

Este estudo é importante para conhecermos a realidade desta doença na criança e identificarmos onde podemos atuar para prevenir a contaminação com essa bactéria e tratar a infecção adequadamente.

2) Como será a participação de meu filho(a)?

O seu filho(a) foi escolhido para participar deste estudo, para tanto, 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 seu filho(a), está sentindo e ao tratamento ao qual está sendo submetido. É importante, para essa pesquisa, garantir que seu filho(a), receberá prontamente o tratamento para a infecção caso a presença da bactéria se confirme.

3) Meu filho sofre algum risco em participar deste estudo?

O seu filho(a) NÃO corre nenhum risco participando da pesquisa, pois a participação dele(a) consiste apenas na avaliação de seus dados, dos tratamentos realizados e de sua evolução e da coleta de exames de fezes.

4) O meu filho(a) será exposto de alguma forma?

Não. A sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o (a) identificar, será mantido em sigilo.

5) Posso recusar a participação de meu filho(a) na pesquisa?

Sim. A participação é de livre e espontânea vontade. Assim, você pode retirar o consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, apenas avisando o pesquisador responsável.

6) Meu filho(a) pode ser penalizado caso ele não participe do estudo?

Não. Caso não queira a participação do seu filho(a), não haverá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

7) Existe algum custo para participar da pesquisa?

Não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

8) Como posso entrar em contato com o pesquisador, caso tenha alguma dúvida?

Você poderá entrar em contato pelos telefones que constam ao fim deste, e se necessário, ao Comitê de Ética em Pesquisa (Hospital Infantil Albert Sabin – (85) 31014212):

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,
responsável pelo(a) menor _____, declaro ter lido
ou escutado as informações contidas neste documento e autorizo a participação dele(a) neste
estudo que me foi apresentado.

(Cidade) _____, (dia) _____ de(mês) _____ de(ano) _____.

Representante legal: _____

RG: _____

Grau de parentesco: _____

Assinatura: _____

Pesquisador responsável:

Assinatura: _____

Telefone do pesquisador: (85) 31014219

E-mail do pesquisador:

APÊNDICE B

Paciente nº : _____ Data: ____ / ____ / ____

1. Epidemiologia

Paciente _____

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

Procedência: _____ Estado: _____

Diagnóstico _____

Data do diagnóstico: ____ / ____ / ____

2- Sintomas atuais

1. Diarreia: Número de dias _____
2. Muco nas fezes Sim Não
3. Sangue nas fezes: Sim Não
4. Náusea: Sim Não
5. Vômito: Sim Não
6. Febre: Sim Não
7. Dor Abdominal Sim Não
8. Distensão abdominal Sim Não

3- Exames (se disponíveis):

Data:

____ / ____ / ____

Hemoglobina: _____

Leucócitos _____

Linfócitos _____

Neutrófilos _____

Plaquetas _____

Ureia _____

Creatinina _____

4- Outras informações

Comorbidades: Sim Não

Doença inflamatória intestinal: Sim Não

Fibrose cística: Sim Não

Neoplasia: Sim Não

Doença cardíaca: Sim Não

DPOC: Sim Não

Doença renal: Sim Não

Doença neurológica: Sim Não

Internação nos últimos 30 dias: Sim Não

Uso prévio de antibiótico Sim Não Cite _____

Uso prévio de IBP Sim Não Cite _____

5-Tratamento:

Antibióticos? Sim Não

Cite _____ Quantos dias? _____

6-Complicações: Sim Não

Cite _____

ANEXO I

HOSPITAL INFANTIL ALBERT
SABIN - CE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da prevalência, perfil de sensibilidade a antimicrobianos e genotipagem de cepas de *Clostridium difficile* isoladas de pacientes com diarreia atendidos em ambulatório de especialidade ou internados em Hospital pediátrico

Pesquisador: HILDENIA BALTASAR RIBEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37340414.7.0000.5042

Instituição Proponente: Hospital Infantil Albert Sabin - CE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 861.363

Data da Relatoria: 15/10/2014

Apresentação do Projeto:

Incidência e a gravidade da doença induzida pelo *Clostridium difficile* tem aumentado mundialmente desde o ano 2000. No Brasil, trabalho realizado na cidade do Rio de Janeiro revelou que espécies de *C. difficile* foram detectadas em 6,7% de amostras de fezes de crianças hospitalizadas ou não (Pinto et al., 2003). O *Clostridium difficile* é um bacilo gram positivo anaeróbico, formador de esporos produz duas exotoxinas envolvidas na

patogênese desta doença, a toxina A e a toxina B entretanto uma nova cepa hipervirulenta está ligado ao aumento da incidência e da gravidade da doença induzida pelo *C. difficile* (Loe et al., 2005; McDonald et al., 2005). A literatura disponível não descreve a incidência da doença induzida pelo *C. difficile* na faixa etária pediátrica no Nordeste do Brasil. A necessidade de um estudo sobre *Clostridium difficile* na população pediátrica se dá pela importância dessa doença na morbi-mortalidade em ambiente hospitalar.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Conhecer a prevalência, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, genotipagem de cepas de

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544
Bairro: Vila União **CEP:** 60.410-750
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3101-4212 **Fax:** (85)3101-4212 **E-mail:** cep@hias.ce.gov.br

HOSPITAL INFANTIL ALBERT
SABIN - CE



Continuação do Parecer: 061.360

C. difficile isoladas de pacientes com diarreia atendidos em ambulatório de especialidade ou internados em Hospital pediátrico

Objetivos Secundários:

Identificar as cepas isoladas através de provas bacteriológicas e bioquímicas convencionais.

Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos através da técnica de diluição em ágar.

Tipificar as cepas isoladas através da detecção dos genes das toxinas e de genotipagem por eletroforese de campo pulsante.

Correlacionar o tipo de cepa de *C. difficile* com a forma de apresentação clínica em crianças.

Avaliar a influência dos fatores de risco e comorbidades no tipo de cepa de *C. difficile* em criança.

Identificar a presença de cepas nas superfícies próximas aos pacientes infectados por *C. difficile*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS : a presente pesquisa apresenta riscos mínimos uma vez que não contará com procedimentos invasivos.

BENEFÍCIOS :- Possibilitará à instituição um maior conhecimento acerca da população atendida bem como conhecimento dos agentes prevalentes em pacientes acometidos com diarreia :- Viabilizará aos profissionais maiores informações acerca da infecção por *Clostridium Difficile* bem como dos principais sinais e sintomas apresentados pelo paciente, formas e prevenções;- Possibilitará à comunidade, através dos seus resultados, beneficiar-se de maior informação, melhores seguimentos com o aprimoramento das condutas clínicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudos na população pediátrica são necessários para a melhor compreensão de fatores de risco, abordagem clínica e orientação de tratamento ideal para que possam ser evitados desfechos graves. A necessidade de um estudo sobre *Clostridium difficile* na população pediátrica se dá pela importância dessa doença na morbimortalidade em ambiente hospitalar. Embora um aumento da incidência nosocomial tenha sido sugerida, aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos têm sido pouco caracterizados na faixa etária pediátrica. A pesquisa de materiais clínicos nas unidades hospitalares, a utilização de técnicas laboratoriais mais modernas e sensíveis para identificação desta bactéria permitirá um

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544
 Bairro: Vila União CEP: 80.610-790
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3101-4212 Fax: (85)3101-4212 E-mail: cep@hias.ce.gov.br

HOSPITAL INFANTIL ALBERT
SABIN - CE



Continuação do Parecer: 861.363

conhecimento da situação epidemiológica desta doença na criança e no adolescente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este projeto de pesquisa apresenta uma introdução que fundamenta claramente o tema a ser estudado com objetivos compatíveis com o que se propõe estudar. A metodologia esta adequadamente delineada. Apresenta ainda TCLE, cronograma e orçamento compatíveis com o estudo.

Recomendações:

Vide conclusão.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa considerado aprovado de acordo com reunião realizada por este colegiado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa cumpre os preceitos que regula a resolução 466/2012 da CNS. Portanto aprovado por este colegiado.

FORTALEZA, 06 de Novembro de 2014

Assinado por:
Regina Lúcia Ribeiro Moreno
(Coordenador)