



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANA MARIA RIBEIRO CARDOSO MESQUITA

DIARREIA NOSOCOMIAL E DOENÇA ASSOCIADA AO *CLOSTRIDIUM*
***DIFFICILE* EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, DE HOSPITAL**
UNIVERSITÁRIO, EM FORTALEZA-CE

FORTALEZA

2014

ANA MARIA RIBEIRO CARDOSO MESQUITA

**DIARREIA NOSOCOMIAL E DOENÇA ASSOCIADA AO *CLOSTRIDIUM*
DIFFICILE EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, DE HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO, EM FORTALEZA-CE**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2014

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

-
- M543d Mesquita, Ana Maria Ribeiro Cardoso.
Diarreia nosocomial e doença associada ao *Clostridium difficile* em pacientes imunossuprimidos, de hospital universitário, em Fortaleza-CE/ Ana Maria Ribeiro Cardoso Mesquita. – 2014.
78 f. : il.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2014.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Anti-Infeciosos. 2. *Clostridium difficile*. 3. Diarreia. 4. Infecção Hospitalar. I. Título.
CDD 616.3427
-

ANA MARIA RIBEIRO CARDOSO MESQUITA

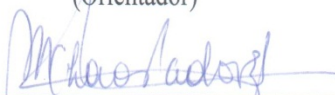
**DIARREIA NOSOCOMIAL E DOENÇA ASSOCIADA AO *Clostridium difficile*
EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
EM FORTALEZA-CE**

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 30 de maio de 2014



Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará-UFC
(Orientador)



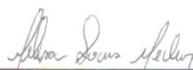
Profa. Dra. Maria Clara Padoveze
Universidade de São Paulo-USP



Profa. Dra. Terezinha do Menino Jesus Silva Leitão
Universidade Federal do Ceará-UFC



Profa. Dra. Mônica Cardoso Façanha
Universidade Federal do Ceará-UFC



Profa. Dra. Melissa Soares Medeiros
Unichristus

Aos meus amores totais: Vicente, meu marido, pelo companheirismo, ao longo de 28 anos, há pouco completados, e ajuda inestimável na análise estatística; Vicente Ayrton, Daniel, Débora e Ana Cecília, nossos filhos.

DEDICO.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Deus, “a quem nenhuma coisa é impossível”. Ele me conduz desde sempre e para sempre e, me deu força, coragem e fé para perseverar até o fim dessa jornada.

Aos meus pais José Ayrton (*in memoriam*) e Miriam, dos quais recebi valores insuperáveis de luta e incansável busca por uma vida melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), por todo o suporte técnico oferecido, e, principalmente, por ser um ambiente de orgulho e satisfação laboral.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pela oportunidade de mais uma vez contar com esta instituição para a minha formação acadêmica.

Ao professor orientador desta pesquisa, Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pela oportunidade concedida desde o mestrado, contribuindo de maneira fundamental para minha formação acadêmica. A ele meu imenso respeito e admiração.

À Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC/UFC), pelo suporte técnico e financeiro, bem como a toda a equipe que a compõe, em especial ao Prof. Dr. Alberto Melo Soares pelo apoio técnico na orientação e conferência do banco de dados, Charles Melo pela redigitação dos dados e Kátia Lima Nogueira sempre disponível a colaborar.

Ao Laboratório de Microbiologia da UPC/UFC pelo suporte técnico, em especial a Dr.^a Josiane da Silva Quetz e Dr.^a Verônica Maria de Oliveira.

A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HUWC, em especial à Dr.^a Marta Maria Costa Freitas e Prof. Dr. Jorge Luiz Nobre Rodrigues, pelo apoio e colaboração.

Ao professor Carlos Robson Bezerra de Medeiros, do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada da UFC, pela contribuição fundamental na análise estatística.

Aos professores participantes da banca do exame de qualificação Marcos Fábio Gadelha Rocha (UECE), Jorge Luiz Nobre Rodriguez (UFC) e Jeová Keny Baima Colares (UNIFOR), por aceitarem cordialmente o convite, pelo tempo, e valiosas colaborações e sugestões.

Às professoras participantes da banca de defesa da tese Prof. Dr.^a Maria Clara Padoveze (USP), Prof.^a Dr.^a Terezinha do Menino Jesus Silva Leitão (UFC), Prof.^a Dr.^a Mônica Cardoso Façanha (UFC), Prof.^a Dr.^a Melissa Soares Medeiros (UNICHRISTUS) e, na suplência Prof.^a Dr.^a Maira Di Ciero Miranda Vieira (UFC), pela presteza e cordialidade na aceitação do convite, esforço despendido e imprescindíveis sugestões.

Às bibliotecárias Norma de Carvalho Linhares, Rosane Maria Costa e Eliene Gomes Vieira Nascimento, pela eficiente colaboração na aquisição de literatura científica e correções bibliotécnicas.

Aos colegas do HUWC, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Aos anônimos pacientes que fizeram parte deste estudo, pelo tempo concedido nas visitas.

AOS PESQUISADORES CIENTÍFICOS

Sejam benditos os pesquisadores
Com seus rigores a buscar verdades;
Capacidades de interlocutores
E de ouvidores de obscuridades.

Ao perquirir tão insondáveis fatos,
Cujos relatos pedem teorias,
Por estas vias, os feitos transatos
Têm, mais que atos, metodologias.

Neste exercício de sabedoria,
Ao revelar seus faustos de vivência,
Tranquilidade e douta teimosia,

É demonstrado em toda a percuciência,
Extasiando o mundo, que aprecia
Um vivaz operário da ciência.

Vianney Mesquita.

(U.F.C.)

“[...] Aprendei de mim, porque sou manso e humilde de coração [...]”.

Jesus Cristo (Mateus 11:29).

RESUMO

Diarreia nosocomial (DN) é uma infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) com incidência e severidade crescentes. Propõe-se determinar a incidência da DN, os fatores de risco e a incidência da doença associada a *Clostridium difficile* (*C. difficile*). Para isso, um estudo caso – controle, pareando pacientes por idade, sexo, período de admissão, clínica e diagnóstico, foi conduzido, de 06/ fev/12 a 05/fev/13, no Hospital Universitário da UFC. Casos –pacientes com DN e Controles – pacientes sem DN. Definiu-se DN como fezes líquidas, três ou mais vezes em 24 horas, com duração superior a 12 horas, sem outras causas inflamatórias ou procedimentos diagnósticos. DN foi detectada mediante busca ativa, visitando-se os pacientes das Unidades de Hematologia, Transplante Hepático e Renal. O teste ELISA TOX A/B II foi utilizado para detectar as toxinas A e/ou B e diagnosticar doença associada ao *C. difficile*. Demais IRAS foram investigadas por intermédio de fichas de notificação de infecção hospitalar (IH). O índice geral de IH foi de 7,17%. A incidência da DN nas enfermarias de Hematologia, Transplante Hepático e Renal foi 4,80% (44/925) e da DN associada ao *C. difficile* 0,12% (01/925). Detectaram-se toxinas A/B de *C. difficile* em caso [1/43 (2,32%)] e controles [3/72 (4,17%)]. DN foi significativamente associada ao uso prévio > 6 antimicrobianos por paciente, além do uso prévio de ciprofloxacina, metronidazol, polimixina B e dieta enteral ($p \leq 0,05$). Pacientes com DN permaneceram mais tempo internados, tiveram mais vômitos, cólicas e febre, verificando-se alta significância estatística ($p \leq 0,05$). Outras IRAS identificadas, nos casos e controles, foi infecção do trato urinário 54% (15/28), seguida da corrente sanguínea 32% (8/28), do sítio cirúrgico 11% (3/28) e de infecção de partes moles 4% (1/28). DN impõe riscos aos pacientes já debilitados. Os dados demonstram a presença endêmica do *C. difficile*. A atualização da epidemiologia local orienta medidas de controle da IH, como uso judicioso de antibióticos, cautelas com a dieta enteral e precauções de contato, para os pacientes com diarreia nosocomial.

Palavras-chave: Anti-Infeciosos. *Clostridium difficile*. Diarreia. Infecção Hospitalar.

ABSTRACT

Nosocomial diarrhea (ND) is a healthcare - associated infections (HAI) with increasing incidence and severity. It is proposed to determine the incidence of ND, the associated risk factors and the incidence of disease associated to *Clostridium difficile* (*C. difficile*).

For this, a case - control study, pairing patients by age, sex, length of admission, and clinical diagnosis was conducted 06 / Feb/12 to 05/Fev/13 in the University Hospital of the UFC. Cases: patients with DN and controls: patients without ND. Nosocomial diarrhea is defined as watery stools, three or more times within 24 hours, over 12 hours without further diagnostic procedures or inflammatory causes. ND was detected by active surveillance, visiting the patients of Hematology, Liver and Renal Transplant. DN was defined as loose stools, 3 or more times in 24 hours, with duration longer than 12 hours, without other inflammatory causes or diagnostic procedures. The ELISA TOX A / B II test was used to detect toxin A and/or B and to diagnose *C. difficile* associated disease. Others HAI were investigated by the notification records of nosocomial infection (NI). The overall rate of Nosocomial infection was 7.17 %. The incidence of DN in the wards of Hematology, Liver and Renal Transplant was 4.80% (44/925) and *C. difficile* associated with DN was 0.12 % (01/925). Toxins A/B were detected in the case of *C. difficile* [1/43 (2.32%)] and controls [3/72 (4.17%)]. DN was significantly associated with previous use > 6 antimicrobials per patient, beyond the prior use of ciprofloxacin, metronidazole, polymyxin B and enteral feeding ($p \leq 0.05$). Patients with ND remained in hospital longer, had more vomiting, cramps and fever, verifying high statistical significance ($p \leq 0.05$). Other identified HAI were mainly urinary infection 54% (15/28), followed by bacterial bloodstream infection 32% (8/28), surgical site infection 11% (3/28) and soft tissue infection 4% (1/28). ND entails risks to the already debilitated patients. The data demonstrate the presence of endemic *C. difficile*. The updated of the local epidemiology guide control measures NI, such as judicious use of antibiotics, enteral feeding precautions and contact precautions for patients with nosocomial diarrhea.

Keywords: Anti-Infective-Agents. *Clostridium difficile*. Diarrhea. Cross Infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 –	Características demográficas e fatores de risco associados ao estudo caso-controle da DN, em hospital público universitário em Fortaleza, CE, entre 2012-2013	37
Gráfico 1 –	Histograma da idade com curva normal	38
Tabela 2 –	Variáveis clínicas e epidemiológicas do estudo caso-controle da DN, em hospital público universitário em Fortaleza-CE, entre 2012-2013.....	39
Figura 1 –	Placa de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de ambas toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>	41
Figura 2 –	Aquisição nosocomial de <i>Clostridium difficile</i> e acompanhamento dos pacientes do estudo caso-controle no HUWC.....	44
Gráfico 2 –	Patógenos isolados de infecção hospitalar em pacientes de alto risco no HUWC	46
Gráfico 3 –	Topografia das infecções relacionadas à saúde (IRAS) em pacientes do estudo caso-controle no HUWC.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β	Beta
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Center for Disease for Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Manual Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Colite pseudomembranosa
DADC	Doença associada ao <i>Clostridium difficile</i>
DN	Diarreia nosocomial
EIA	Ensaio imunoenzimáticos
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESBL	Betalactamases de espectro ampliado
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantidio
ICD	Infecção por <i>Clostridium difficile</i>
ICS	Infecção da corrente sanguínea
IH	Infecção hospitalar
IPM	Infecção de partes moles
IRAS	Infecção relacionada à assistência à saúde
ISC	Infecção do sítio cirúrgico
ITU	Infecção do trato urinário
IV	Intravenosa
NAPI	<i>Pulsed-field gel eletroforesis</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
Nº	Número
PAF	Fator ativador de plaquetas
SUS	Sistema Único de Saúde
TNFα	Fator de necrose tumoral
Tx	Transplante
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPC	Unidade de Pesquisas Clínicas
%	Percentual
TOS	Transplante de órgão sólido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O contexto hospitalar.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Abordagem histórica e definição de infecção hospitalar.....	15
2.2	Diarreia nosocomial.....	16
2.3	Doença associada ao <i>Clostridium difficile</i>	17
2.3.1	Epidemiologia.....	19
2.3.2	Fatores de risco para doenças associadas a <i>Clostridium difficile</i>	21
2.3.3	Etiologia e patogênese	21
2.3.4	Diagnóstico.....	24
2.3.5	Tratamento.....	26
2.3.6	Prevenção e controle.....	28
3	JUSTIFICATIVA DA PESQUISA	29
4	OBJETIVOS.....	30
4.1	Objetivo geral	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
4.2.1	Primários.....	30
4.2.2	Secundários.....	30
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1	Local e período.....	31
5.2	Desenho do estudo.....	31
5.2.1	Tipo de estudo e população.....	31
5.2.2	Critérios de inclusão dos pacientes no estudo.....	32
5.2.3	Critérios de exclusão dos pacientes no estudo.....	32
5.3	Protocolo do estudo.....	32
5.3.1	Definição da diarreia nosocomial	32
5.3.2	Sistemática de vigilância epidemiológica da diarreia nosocomial.....	33
5.3.3	Análise de fatores de risco da diarreia nosocomial	33
5.4	Sistemática da coleta.....	33
5.4.1	Coleta de dados.....	33
5.4.2	Coleta e acondicionamento de amostras fecais.....	33

5.5	Métodos microbiológicos.....	34
5.5.1	Teste ELISA para toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>	34
5.6	Monitoramento de outras infecções adquiridas.....	34
5.7	Análise estatística.....	34
5.8	Ética do estudo.....	35
6	RESULTADOS	36
6.1	Unidades do estudo.....	36
6.2	Pacientes do estudo.....	36
6.3	Variáveis clínicas e epidemiológicas.....	36
6.3.1	Fatores de risco para diarreia nosocomial.....	40
6.3.2	Outras características associadas com diarreia nosocomial (DN).....	42
6.4	Outras infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), adquiridas por pacientes do estudo caso-controle, monitoradas pela CCIH/HUWC	45
7	DISCUSSÃO.....	47
8	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICE A – Roteiro de coleta de dados do estudo caso - controle de pacientes com diarreia nosocomial e outras infecções adquiridas no HUWC	67
	APÊNDICE B – XVIII Congresso Brasileiro de Infectologia	70
	ANEXO A–Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa (COMEPE) do HUWC.....	72
	ANEXO B–Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa (COMEPE) do HUWC	73
	ANEXO C–Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	74
	ANEXO D – Teste para toxina A/B II TM de <i>Clostridium difficile</i> (<i>Clostridium difficile</i> TOX A/B teste, Blacksburg, V.A., U.S.A., Techlab.).....	75
	ANEXO E –Processamento das amostras de fezes.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 O contexto hospitalar

O hospedeiro é o elo mais importante da cadeia epidemiológica, quando se refere à infecção hospitalar, pois alberga os principais microrganismos que na maioria dos casos desencadeiam processos infecciosos. Vários fatores relativos a cada elemento da tríade hospedeiro – agente infeccioso – ambiente contribuem para a prevalência e dificuldade em controlar este tipo de infecção (MONTEIRO, 1993).

Compreendendo-se o hospital um local fechado, a terapia com antimicrobianos tem seu maior impacto ecológico, sendo a exposição a fômites e a objetos contaminados fontes de infecção, que fazem este ambiente se tornar propício à proliferação de bactérias e reservatório de cepas resistentes.

Embora o uso clínico dos antimicrobianos, por volta de 1935, tenha revolucionado o tratamento das infecções em geral, com significativa melhoria e controle das infecções, a prática rotineira inadequada da terapêutica antimicrobiana na atualidade é preocupante, pois contribui para maior frequência de fenótipos de resistência antimicrobiana de patógenos isolados em hospitais brasileiros (BALASSIANO et al., 2011; BALASSIANO et al., 2010; CARVALHO; GONTIJO FILHO, 2008; MARCON; GAMBA; VIANNA, 2006).

O aumento crescente de pacientes internados com doenças graves, imunossuprimidos, escores de gravidade elevados, complicações cirúrgicas, transplantados, falência renal ou de outros órgãos, compromete os mecanismos de defesa, determinando que eles tenham maiores chances de adquirir infecção hospitalar, incluindo infecção por *Clostridium difficile* (ICD), que pode se tornar recorrente em pacientes que recebem transplante de órgãos. Esse risco aumentado resulta de procedimentos invasivos, dispositivos médicos, bem como da exposição maciça dessas pessoas aos antimicrobianos (NEFF, 2010; BALASSIANO et al., 2009; DIDIER, 2009).

Nos hospitais da atualidade, os agentes causadores das infecções hospitalares são microrganismos oportunistas com baixa capacidade de invasão e que apenas na presença de condições especiais ligadas à baixa defesa do hospedeiro conseguem invadir e multiplicar-se na intimidade dos tecidos (COUTO; CARDOSO; PEDROSA, 2009).

Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, fazendo da infecção hospitalar uma complicação importante em pacientes internados e, em todo o mundo, um contínuo desafio à saúde pública, pela

morbidade e mortalidade associadas, sobrecarga econômica de recursos hospitalares adicionais e repercussão em termos de sofrimento humano (PITTET; TARARA; WENZEL, 1994; POUTANEN; SIMOR, 2004; LOO et al., 2005; GARCÍA-GARCÍA et al., 2010; BLONDEAU et al., 2012).

Bactérias multirresistentes, como *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp*, disseminam-se em todo o mundo (BRASIL, ANVISA 2013a; CARBONE, 2009; HOOKMAN; BARKIN, 2009) e poderão ser um problema mais expressivo em hospitais de países em desenvolvimento como o Brasil, onde os recursos não são fáceis e os laboratórios requerem um investimento regular e significativo para a identificação rotineira dos agentes etiológicos.

O aumento da resistência aos antimicrobianos torna as infecções hospitalares motivo de maiores preocupações para os profissionais da área da saúde, principalmente quando ocorrem nas unidades que atendem pacientes mais susceptíveis às infecções, como as unidades oncológicas (CATANEO et. al., 2011) e unidades de transplantes (SHIELDS et. al., 2012).

Embora subdocumentada, a diarreia nosocomial (DN) é uma complicação comum de pacientes hospitalizados, mas sua epidemiologia, assim como causas e consequências para a instituição e para a população hospitalar, são pouco referenciadas em estudos prospectivos, lidando com infecções nosocomiais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abordagem histórica e definição de infecção hospitalar

A infecção hospitalar é tão antiga quanto a origem dos hospitais, cujas primeiras referências remontam a 325 d.C., quando o Concílio de Niceia determinou que os hospitais fossem construídos ao lado das catedrais. No início do século XIX, na Inglaterra, é estabelecido, formalmente, o isolamento de pacientes com algumas doenças, como a varicela, e, por sua eficiência, este procedimento é frequentemente seguido. Em 1843, Oliver Wendel Homes evidenciou que a febre puerperal era contagiosa, além de descrever medidas para evitar sua disseminação. Em 1847, Ignaz Philipp Semmelweis colaborou de maneira definitiva com o controle de transmissão da doença infecciosa hospitalar, após introduzir a lavagem das mãos com solução clorada antes de se examinarem pacientes, logrando uma redução na taxa de incidência de infecção de 1,3%. Em 1860, James Simpson formulou uma consistente teoria de disseminação por contato (COUTO; CARDOSO; PEDROSA, 2009).

Em 1863, Florence Nightingale descreveu uma série de cuidados sobre práticas hospitalares como critério de melhora da qualidade da assistência. Em 1864, em Londres, foi evidenciada a diferença da disseminação de infecções em hospitais com e sem isolamento. Em 1929, Cuthbert descreveu as bases da origem e diagnóstico da infecção relacionada à sondagem vesical. Na década de 1940, com a introdução dos antimicrobianos, o problema das infecções hospitalares e comunitárias parecia relegado ao passado, mas, em pouco mais de uma década, as expectativas criadas em relação ao controle das infecções, com a introdução dos antimicrobianos, foram desenganadas, ao ponto de, em meados de 1950, os EUA serem assolados por uma pandemia de estafilococos resistentes aos antimicrobianos disponíveis. Em 1960, o avanço tecnológico fez surgir as infecções oportunistas por bactérias Gram-negativas e fungos. Em 1994, em estudo realizado pelo Ministério da Saúde do Brasil em hospitais terciários do SUS, encontrou-se prevalência de IH de 13,9% (COUTO; CARDOSO; PEDROSA, 2009).

De acordo com a Portaria nº 2616 (BRASIL, 1998), infecções nosocomiais são quaisquer infecções adquiridas após a internação do paciente e que se manifestam após 72h de admissão ou mesmo após a alta, quando puderem ser relacionada com a internação ou com procedimentos hospitalares.

2.2 Diarreia nosocomial

A diarreia é definida como a passagem de três ou mais fezes moles ou líquidas (que tomam a forma do recipiente que as contém), pelo menos durante 24 horas (SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013).

Esta doença é considerada infecção hospitalar (IH) quando o início dos sintomas ocorre, pelo menos, 72 horas após o internamento do paciente. A diarreia de perfil infeccioso, normalmente, é acompanhada de fezes líquidas por mais de 12 horas, além de outros sintomas, como vômitos, febre, dor abdominal e perda hidroeletrólítica, podendo estar associada à detecção de enteropatógenos, respeitando-se o período de incubação do patógeno agressor (GARNER et al., 1998).

As de teor infeccioso classificam-se em infecciosa não inflamatória, causada por *Cryptosporidium* spp., *Vibrio cholerae*, *E. coli* (ETEC, EPEC), *C. perfringens*, *Rotavírus*, *Giárdia*, *Norwalk vírus*;s e inflamatória, motivada por *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter. jejuni*, *E. coli* (EIEC), *Clostridium difficile* (*C. difficile*), *Entamoeba histolytica* (GUERRANT; BOBAK, 1991). Portanto, as diarreias de etiologia infecciosa podem estar associadas a vírus, bactérias e protozoários. Dentre estes patógenos, a bactéria *C. difficile* é apontada como importante causa da espécie inflamatória e colite associada ao uso de antimicrobianos (ROCHA; SIDRIM; LIMA, 1999; BENNETT, 1993; PICKERING, 1991).

O CDC (Center for Disease Control and Prevention) define gastroenterite seguindo os seguintes critérios (GARNER, 1988):

- 1 início agudo (fezes líquidas por mais de 12 horas) com ou sem vômitos ou febre (38°C), sem doenças não infecciosas concomitantes que justifiquem o quadro, como, por exemplo, testes diagnósticos, estresse psicológico, regime terapêutico, exacerbação aguda de uma condição crônica;
- 2 duas das seguintes características sem uma causa definida—náusea, vômitos, dor abdominal ou dor de cabeça, e algum dos achados ora delineados—
 - a) enteropatógeno isolado de cultura de fezes ou swab anal;
 - b) enteropatógeno recuperado via rotina ou em técnica de microscopia eletrônica;
 - c) enteropatógeno detectado por análise de antígeno ou anticorpo em fezes ou sangue;
 - d) evidência de enteropatógeno detectado por mudanças citopáticas em cultura de tecidos (teste para toxina); e

e) detecção de anticorpo IgM ou aumento de IgG em amostras de sangue para um patógeno específico.

Na determinação da etiologia da diarreia nosocomial, é importante o estudo microbiológico para isolamento do patógeno causador da infecção, uma vez que uma grande variedade de agentes infecciosos está implicada na etiologia da doença diarreica na forma aguda e eles são propensos a adquirir resistência antimicrobiana, podendo se disseminar no ambiente hospitalar (BRACHMAN, 1993; WANKE; LIMA; GUERRANT, 1987).

Além do conhecimento dos enteropatógenos, as vias de transmissão comumente envolvidas na diarreia nosocomial, bem como as medidas de controle e terapêutica a serem adotadas para prevenção e tratamento de contaminação hospitalar, podem ter impacto determinante na morbidade e mortalidade para esta enfermidade nos pacientes hospitalizados (ESCOBAR; GRISI; TELLES JÚNIOR, 2000).

Diversos fatores são apontados como riscos potenciais para a ocorrência dessa doença nosocomial, tais como pacientes em idade avançada, com debilitada condição clínica em razão da doença de base, que tenham recebido agentes antimicrobianos, em uso de alguns agentes antineoplásicos, além do internamento hospitalar, mediante infecção cruzada (BRACHMAN, 1993; MANIAN et. al., 2007; MOHAN et. al., 2007; BOUZA; MUÑOZ; ALONSO, 2005).

Diarreia nosocomial (DN) de qualquer causa predispõe, significativamente, a outras infecções nosocomiais, pois o trato gastrointestinal abriga, com frequência, organismos Gram-negativos, que são os principais patógenos em outros sítios corporais, particularmente infecções do trato urinário, as quais são dez vezes mais comuns após a forma diarreica nosocomial (LIMA et. al., 1990; GUERRANT; BOBAK, 1991).

2.3 Doença associada ao *Clostridium difficile* (DACD)

A ocorrência de enteropatógenos responsáveis pela diarreia nosocomial varia de acordo com o país, a instituição e com a população de pacientes. Em países desenvolvidos, *C. difficile* é o agente da DN mais frequentemente implicado na população adulta. Em todo o mundo, *C. difficile* é a principal causa da diarreia infecciosa nosocomial e o agente etiológico da colite pseudomembranosa, sendo o consumo de antibióticos o principal fator de risco para o seu surgimento (POLAGE; SOLNICK; COHEN, 2012; SILVA et. al., 2012; VIEIRA et. al., 2010; BARTLET, 2002).

Diarreia associada a *C. difficile* é definida como aquela sem outra explicação, que ocorre em associação com o consumo de antimicrobianos, e sua frequência varia entre os agentes utilizados (BARTLET, 2002).

C. difficile é responsável pelo desenvolvimento da diarreia e colite associadas a antibioticoterapia, contudo, após a colonização por *C. difficile*, a abrangência clínica da doença resulta num largo espectro de manifestações clínicas, que vão desde portador assintomático, diarreia leve autolimitada, colite pseudomembranosa, a sepse ou até mesmo podem levar à morte. Por isso, este patógeno nosocomial tem importância clínica reconhecida. Além disso, mais de 90% das infecções por *C. difficile* ocorrem após ou durante a terapia antimicrobiana, entretanto de 25% a 40% dos pacientes podem não apresentar sintomas até dez semanas após o término da antibioticoterapia (GRONCZEWSKI; KATZ, 2006; SILVA; SALVINO, 2003; BARTLET, 2002).

Os sintomas de infecção por *C. difficile* (ICD) descritos na literatura, manifestam-se como diarreia aquosa leve a moderada, raramente com sangue; dor abdominal; indisposição; anorexia, leucocitose; leucócitos fecais; hipoalbuminemia; espessamento do cólon na tomografia computadorizada; modificações características evidentes na endoscopia ou biópsia e febre, principalmente, nos casos mais severos. O exame físico pode revelar, ainda, desidratação, dor com percussão no abdome inferior, perfuração do cólon e peritonite (GRONCZEWSKI; KATZ, 2006; BARTLET, 2002).

Pacientes hospitalizados usam antimicrobianos com frequência, e por isso, têm risco aumentado para adquirir doença associada a *C. difficile* (DACD). Cerca de 20% deles adquirem esta bactéria, no meio ambiente hospitalar, o que pode impor risco à vida, pois, dependendo da severidade da doença diarreica, a taxa de mortalidade varia de 10% a 30% (GRONCZEWSKI; KATZ, 2006).

Colite pseudomembranosa (CPM) é uma severa condição considerada patognomônica para *C. difficile* (SUNENSHINE; McDONALD, 2006). Tal afirmação se apoia na evidência de *C. difficile* ser o único organismo que produz uma citotoxina similar ou idêntica à citotoxina encontrada em fezes de pacientes com colite pseudomembranosa (BARTLETT, 1979). Denota-se, entretanto, que a frequência de recuperação da toxina de amostras fecais está de acordo com a severidade da doença, variando de 15-25% dos casos da diarreia associada a antibióticos, 50% a 75% dos pacientes com colite associada a antibiótico e de 90% a 100% dos casos de colite pseudomembranosa (BARTLET, 1986).

2.3.1 Epidemiologia

Diarreia e colite associadas a *C. difficile* ocorrem com alarmante frequência. Somente nos Estados Unidos são infectados três milhões de pacientes hospitalizados por ano (GRONGZEWSK; KATS, 2006). Há relatos científicos do aumento da incidência e virulência de *C. difficile*, desde meados do ano 2000, com surtos da diarreia e colite em associação com antibiótico, enfatizando a importância do diagnóstico precoce e do tratamento apropriado (HOOKMAN; BARKIN, 2009; LOO et al., 2005; PÉPIN et al., 2004).

Estudo prospectivo realizado em Quebec, Canadá, em 2002, identificou severo surto da diarreia, associada ao *C. difficile*, com elevadas morbidade e mortalidade. A incidência da diarreia associada à *C. difficile* foi de 22,5 para 1000 admissões, com uma taxa de mortalidade de 6,9%, e uma cepa predominante e resistente a fluoroquinolonas foi encontrada em 82,2%. (LOO et al., 2005).

No Hospital Maisonneuve-Rosemont, a incidência de infecção por *C. difficile* aumentou de 11 em 1000 admissões (1999 a 2002) para 27 em 1000 admissões (2003 a 2005). Uma epidemia, de agosto de 2004 a julho de 2007, envolveu estudo multicêntrico com registro de mais de 20.000 casos. Óbito foi atribuído à infecção por *C. difficile* em 63% dos pacientes infectados com a cepa do ribotipo 027 e em 17% dos pacientes infectados com a cepa do ribotipo 001 (LABBÉ et al., 2008).

Uma cepa mais virulenta denominada NAP1/B1/027 carrega a terceira toxina denominada toxina binária (CdT), que produz 16 vezes mais toxina A (TcdA) e 23 vezes mais toxina B (TcdB) em relação a outras cepas de *C. difficile*, além de produzir mais esporos. Esta cepa mais virulenta provoca aumento na severidade da doença, frequente progressão para megacólon tóxico, mais recaídas, além de ser refratária à terapia-padrão, aumentando o número de mortes (HOOKMAN; BARKIN, 2009; SUNENSHINE; MACDONALD, 2006; WARNY et al., 2005).

Na Inglaterra e País de Gales, *C. difficile* é a causa mais comum da diarreia adquirida em hospital, representando um grave e crescente problema, com um aumento de 28% dos casos de mortes de 2006 a 2007 (GASH; BROWN; PULLYBLANK, 2010).

Na Holanda, mais recentemente, evidenciou-se o fato de que a taxa de mortalidade entre pacientes com diarreia causada por *C. difficile*, diarreia sem infecção por *C. difficile* (não ICD) e pacientes sem diarreia variou, respectivamente, de 7,5%, 1,6% e 0% (HENSGENS et al., 2011).

Estudo realizado na Áustria relata a gravidade da ICD, em que quatro pacientes com infecção associada ao *C. difficile* necessitaram de internamento em Unidade de Terapia Intensiva (3,01%), um caso (0,71%) de intervenção cirúrgica e 33 (16,54%) casos morreram em 30 dias (WENISCH et al., 2012). Em Montreal, seis hospitais universitários (cinco em Québec e um em Ontario), durante 15 meses, participaram de um estudo no qual se mostra que em razão de ICD, um em 117 pacientes (0,8%) necessitou de cuidados intensivos (LOO et al., 2011).

C. difficile é uma das mais comuns causas da diarreia em pacientes submetidos a realização de transplante de órgãos sólidos (TOS). Num estudo desenvolvido na Áustria, de 2.474 pacientes submetidos a TOS, 43 desenvolveram diarreia associada ao *C. difficile*, registrando-se aumento da incidência de ICD de 1996 a 2005 (STELZMUELLER et al., 2007).

Existem poucas informações disponíveis sobre *C. difficile* como causa da diarreia na América Latina. O impacto clínico e financeiro da infecção nosocomial por esta bactéria, entretanto, é significativo, pois se sabe que doença associada a *C. difficile* (DACD) é um problema emergente em hospitais, nos países latino-americanos. No Brasil, pode-se mencionar estudos realizados por Balassiano et. al. (2010) e Dias et. al. (2010). Na Costa Rica e Argentina, Gómez et. al. (2010) e Legaria, Lumelsky e Rosetti (2003), respectivamente. Nesses experimentos diarreia associada a *C. difficile* foi relacionada com exposição prévia aos agentes antimicrobianos.

No Brasil, os principais antibióticos associados à diarreia por *C. difficile* foram piperacilina/tazobactam, teicoplanina, carbapenêmicos, quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e cefalosporinas (BALASSIANO et. al., 2010) e na Argentina a maioria dos pacientes tinha recebido ampicilina, terceira geração de cefalosporinas e clindamicina (LEGARIA; LUMELSKY; ROSETTI, 2003). Nesse país platino, resultados de pesquisa realizada num hospital geral são preocupantes e indicam que doenças associadas ao *C. difficile* são um problema emergente, na população em estudo, com alta prevalência de cepas toxigênicas de *C. difficile*, sendo recomendada uma rotina para realização de testes diagnósticos que detectam as toxinas desta bactéria (LEGARIA; LUMELSKY; ROSETTI, 2003).

As cepas toxigênicas isoladas no Brasil (BALASSIANO et. al., 2010) e na Costa Rica (GOMÉZ et. al., 2010) assemelham-se quanto à expressão do padrão de resistência a clindamicina e fluoroquinolonas. Para caracterização das cepas isoladas, associadas à diarreia, durante um surto epidêmico em Unidade de Terapia Intensiva, utilizou-se a reação de

amplificação. Uma das quatro cepas isoladas (ribotipo 135) é exclusiva do Brasil, com perfil toxigênico relacionado à presença de genes das toxinas A (tcdA) e B (tcdB) (BALASSIANO, et al., 2010).

2.3.2 Fatores de risco para doença associada ao *C. difficile*

Exposição aos antimicrobianos é o principal fator de risco da diarreia associada a *C. difficile* (LOO et. al., 2005). Outros fatores incluem, além do consumo de antibióticos, pacientes com idade acima de 65 anos, e hospitalização, que aumenta o risco de aquisição de *C. difficile*, na mesma proporção do tempo da permanência no hospital (BALASSIANO et al., 2010; BARTLETT, 2002). Além da transmissão intra - hospitalar, estudos evidenciam a transmissão de cepas predominantes entre hospitais, a qual ocorre como resultado da transferência de pacientes infectados ou por meio de profissionais da saúde, que trabalham em múltiplas instituições (LOO et. al., 2005).

Terapia com antimicrobianos foi associada com o desenvolvimento de colite pseudomembranosa, mesmo antes de *C. difficile* ser reconhecido como agente etiológico e, embora a doença seja uma infecção bacteriana mediada por toxina, quase todos os pacientes afetados são previamente tratados com antimicrobianos ou, ocasionalmente, com agentes quimioterápicos. O grande trio, frequentemente associado com colite pseudomembranosa, é clindamicina, ampicilina e cefalosporinas (JOHNSON; GERDING, 1998). As penicilinas estão associadas em 50%, as cefalosporinas em 30% e o grupo clindamicina/lincomicina em cerca de 10% a 14%, respectivamente (MÖLLBY et. al., 1985).

Em 2004 e 2005, o CDC enfatizou que o risco de *C. difficile* associado a diarreia está aumentado em populações de pacientes que consomem antibióticos, inibidores da bomba de prótons, valaciclovir, com doença intestinal inflamatória, grave doença de base associada, cirurgia gastrintestinal, idade avançada, condição imunológica comprometida, no período de pré e pós-parto prolongados, permanência denotada em instituições de saúde, hipoalbuminemia, baixo nível de anticorpos para toxinas de *C. difficile*, condições ambientais e laboratoriais (HOOKMAN; BARKIN, 2009).

2.3.3 Etiologia e patogênese

C. difficile é um bacilo anaeróbio obrigatório, Gram-positivo, formador de esporos, situado entre um micro-organismo comensal e um patógeno altamente invasivo. Esta bactéria

enteropatogênica foi isolada nos estudos iniciais, como componente de fezes de recém-nascidos saudáveis (POPOFF; GENY, 2011; HAL; O'TOOLE, 1935). O papel de *C. difficile* como agente etiológico da diarreia e da colite pseudomembranosa (CPM) só foi esclarecido nos anos de 1970, quando estudos evidenciaram que esta bactéria produz uma potente toxina (GRONGZEWSK; KATS, 2006).

C. difficile produz toxina-A (uma enterotoxina) e toxina-B (uma citotoxina) (MÖLBY; ARONSON; NORD, 1985). Estas duas exotoxinas são os fatores de virulência primários, que melhor contribuem para a patogênese da doença gastrointestinal associada a antibiótico (BORRIELLO, 1998).

A patogênese de *C. difficile* envolve uma tríade de fatores, que inclui o uso de antibióticos, especialmente aqueles de largo espectro, que facilitam a colonização por *C. difficile*, a capacidade de defesa do hospedeiro e a contaminação adquirida no meio ambiente hospitalar ao qual o paciente é exposto.

Os antibióticos agem desestabilizando a microbiota normal do cólon intestinal, que tem a função de formar uma barreira de proteção contra patógenos oportunista. Perdendo esta proteção, o hospedeiro pode se tornar susceptível a patógenos como *C. difficile*, permitindo a esta bactéria, de origem endógena ou exógena, se estabelecer, proliferar e agredir a barreira intestinal, desencadeando severa resposta inflamatória no hospedeiro (POPOFF; GENY, 2011; SILVA; SALVINO, 2003).

A capacidade do sistema imunológico do hospedeiro de produzir anticorpos protetores contra as toxinas de *C. difficile* desempenha importante papel na redução da gravidade da doença, além de impedir recorrências (McFARLAND, 2005).

A exposição do paciente a *C. difficile*, no ambiente hospitalar, é facilitada pela transmissão via fecal-oral. Os pacientes adquirem esta bactéria por infecção cruzada, por contaminação transportada pelas mãos da equipe de saúde, paciente a paciente e, indiretamente, por meio de fômites e de objetos contaminados (McFARLAND, 2005). É necessário, contudo que *C. difficil,e* em sua forma vegetativa e/ou de esporos, seja ingerido (SUNENSHINE; McDONALD, 2006; TEDESCO, 1982).

Após colonizar o intestino, os danos aos enterócitos ocorrem em razão das toxinas de *C. difficile*, TcdA (toxina A), TcdB (toxina B) e CdT (toxina binária), que causam alteração no citoesqueleto, resultando na liberação de fluidos e produtos inflamatórios. A diarreia é o sintoma mais comum, mas febre e leucocitose podem estar presentes (RUPNIK; GRABNAR; GERIC, 2003).

Evidências definem a toxina A (TxA) de *C. difficile* como o principal fator de

virulência desta bactéria, mediante seus efeitos enterotóxicos em alça intestinal de coelho. Visto claramente, em experimento, no qual a toxina A isolada, causou hemorragia e aumento da permeabilidade, provocando uma intensa secreção de fluidos, ocorrendo uma marcada separação das células ao longo da superfície da mucosa, que precede a resposta secretória e severa necrose. A toxina B (TxB), entretanto, mostrou menor enterotoxicidade (LIMA et al., 1988).

Estudos posteriores mostram que a toxina A de *C. difficile*, pela ativação da proteína G ligada a receptores presentes na membrana dos macrófagos, faz com que estes liberem o fator secretório intestinal (FSI), capaz de provocar a secreção intestinal e de induzir inflamação tecidual com severa secreção de fluido hemorrágico e inflamatório. As toxinas A e B do *C. difficile* são potentes indutores da migração de neutrófilos, dependente da presença de macrófagos, capazes de estimulá-los a liberar potentes mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, citocinas, prostaglandinas, PAF e TNF- α , óxido nítrico, e citocinas, sendo a indução deste processo dependente de fosfolipase A2 (LIMA et al., 2008; ROCHA; SIDRIM; LIMA, 1999; ROCHA et al., 1998; FONTELES et al., 1995).

As toxinas A e B de *C. difficile*, ao induzirem a síntese de IL-1 beta, causam alteração na resposta eletrogênica intestinal. Bloqueadores farmacológicos contra produtos da ciclo-oxigenase, PAF e TNF- α e inibidores de proteases têm o potencial de afetar a síntese e liberação de IL-1 beta, que, provavelmente, é o fator estimulante intestinal (FSI), liberado por macrófagos em resposta a toxina A (ROCHA; SIDRIM; LIMA, 1999; ROCHA et al., 1998; MELO FILHO et al., 1997; ROCHA et al., 1997).

Pode-se ainda mencionar a atividade enzimática das TxA e TxB de inativar um subconjunto de pequenas GTPases, envolvidas na arquitetura do citoesqueleto e movimento celular (Rho e Ras), por meio de glicosilação. Deste modo, as toxinas A e B de *C. difficile* induzem a despolimerização do citoesqueleto de actina das células, levando destruição de filamentos de actina-F nas junções intercelulares, aumento da permeabilidade das barreiras epitelial e endotelial, perda das fibras de actina, retração do citoplasma, arredondamento e morte celular (POPOFF; GENY, 2011; HOOKMAN; BARKIN, 2009; LIMA et al., 2008; GRONCZEWSKI; KATZ, 2006; WAR et al., 2005).

Em estudos utilizando o modelo animal, a TxA altera a morfologia celular do epitélio intestinal e a organização do citoesqueleto, reduzindo a proliferação e aumentando a apoptose celular (SANTOS et al., 2013). Estudos em células T84 do epitélio intestinal humano demonstram que a TxA de *C. difficile* induz apoptose de modo dose e tempo-dependente, mediante a inativação de Rho, ativação de caspases 3, 6, 8, 9 e Bid e destruição mitocondrial,

seguida pela liberação do citocromo c. Este mecanismo pode contribuir para a ruptura da mucosa, visto na enterite induzida pela toxina A (BRITO et al., 2002b).

C. difficile se reproduz nas criptas intestinais, liberando TxA e TxB, causando severa inflamação nestes locais. Portanto, a colite desencadeada por *C. difficile* resulta de um distúrbio na flora bacteriana do cólon intestinal, colonização e liberação de toxinas. Uma característica é um grande influxo de neutrófilos na mucosa do cólon provocados pela toxina A, que também atrai monócitos. Estes efeitos, somados à degradação das células epiteliais pela toxina B, são responsáveis pela inflamação colônica (colite), formação de pseudomembranas e diarreia aquosa (SUNENSHINE; McDONALD, 2006).

Na colite pseudomembranosa ocorre a destruição da mucosa com resposta inflamatória mais severa e formação de abscessos nas criptas do epitélio intestinal, das quais flui um exudato rico em muco e leucócitos, que se aprofunda na lâmina própria, expulsos da cripta para o lúmen no intestino grosso e, à semelhança de um minivulcão, são expelidos em direção à mucosa, onde ficam aderidos, conduzindo à formação de pseudomembranas, facilmente arrancadas, expondo erosões superficiais e, com a progressão deste processo, ocorrem necrose e desnudamento da mucosa (SUNENSHINE; McDONALD, 2006; PRICE; DAVIES, 1977).

A toxina A (TcdA) pode favorecer a formação de pseudomembranas, induzindo à reorganização do citoesqueleto de actina, levando agregação e aumento de uma adesão secundária, associada à produção de secreção intestinal, hemorragia e acentuada inflamação com presença de citocinas (BRITO et al., 2002a; BRITO et al., 2005; ROCHA et al., 1997).

Outros fatores de virulência de *C. difficile*, além da quimiotaxia e da adesão a receptores intestinais, são a secreção de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, expressão de fímbria e flagelos, produção de cápsula (BORRIELLO, 1998) e formação de esporos, que o tornam resistente ao calor do meio ambiente e ao ácido do estômago, permitindo a sobrevivência do microrganismo nestes locais. Os esporos formados de eliminação difícil, permanecem no ambiente hospitalar, durante meses, resultando numa importante fonte de surtos hospitalares da doença associada ao *C. difficile* (GRONGZEWSK; KATS, 2006).

2.3.4 Diagnóstico

Um caso de infecção por *C. difficile* (ICD) é definido como a presença da diarreia ou megacólon tóxico, sem outra etiologia conhecida, em combinação com um teste laboratorial positivo para toxina A e/ou B de *C. difficile* ou detecção do organismo em amostra de fezes, por via de meio de cultura ou de outro meio, ou, se colite pseudomembranosa, é observada em

exame endoscópico ou em cirurgia, ou colite pseudomembranosa é observada no exame histopatológico (DUBBERKE et al., 2008).

Portanto, diagnóstico de infecção causada por *C. difficile* pode ser baseado em achados clínicos, estudos anatômicos (sigmoidoscopia ou colonoscopia) e testes laboratoriais para detecção do referido patógeno e de suas toxinas (KOFISK et al., 1991; BARTLETT; GORBACH, 1976; BARTLETT, 1990).

O ensaio utilizando a cultura de células para detecção de toxina citopática de *C. difficile* é considerado o teste padrão-ouro para estabelecer o diagnóstico da diarreia ou colite induzida por este microrganismo (BARTLETT, 1986). Demais técnicas de diagnóstico podem detectar *C. difficile* (coprocultura) e suas toxinas.

C. difficile pode ser um agente indutor da diarreia induzida por antimicrobianos. Para facilitar seu isolamento de amostras fecais, foi desenvolvido um meio ágar seletivo e diferencial, contendo cicloserina, cefoxitina, frutose e gema de ovo (CCFA). Colônias de *C. difficile* que crescem neste meio de cultura têm morfologia distinta e propriedades fluorescentes, suficientes para identificação presuntiva da bactéria. Este método permite a detecção de colônias típicas de *C. difficile* dentro de 24 a 48 horas (BARTLETT, 1986; GEORGE et al., 1979).

Quantificação de microrganismos em fezes é mais acurada em amostras frescas semeadas imediatamente em ágar seletivo ou caldo, pois a recuperação diminui após congelamento ou exposição ao ar. Apesar desses avanços na técnica de cultura para isolamento de *C. difficile* de fezes, ainda se faz necessária meticulosa técnica anaeróbica, não geralmente disponível na maioria dos laboratórios hospitalares de Microbiologia (TRNK; LAMONT, 1984).

O método mais comum de testes para detecção das toxinas de *C. difficile* são os ensaios imunoenzimáticos (EIA) disponíveis no mercado, os quais detectam toxinas A e/ou B. A sensibilidade média destes testes varia de 72% a 82%, com especificidade média de 97% a 98% (SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013).

O teste ELISA é um método imunoenzimático, que utiliza anticorpos imunoabsorventes, marcados com enzimas, em placas de microtitulação. Muitos “kits” comerciais estão disponíveis para a detecção isolada de toxina A, bem como de ambas as toxinas (A e B) em amostras fecais. Estes testes têm sensibilidade que varia de 50% a 90% e especificidade de 70% a 95%. São testes rápidos, cujos resultados podem ser obtidos em cerca de duas horas e meia, mas, por seu alto custo, é preciso tratamento por lotes de amostras. Além disso, alguns resultados podem ser falso-negativos (VAISHNAVI, 2009).

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 1980. É uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (amplificação) na presença da enzima DNA polimerase. Um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma, pois DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu, diretamente em gel de eletroforese, por meio de corantes específicos para DNA (SILVA, 2012; PETERSON et al., 2007; ANTONINI et al., 2004).

Para determinar se as características epidemiológicas estão relacionadas a um surto clonal, pode-se realizar uma análise, por via de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de *C. difficile* isolados. É um teste que utiliza um marcador de peso molecular para cada *C. difficile*, que migra através do gel (LOO et al., 2005).

O teste de aglutinação pelo látex é baseado na presença de glutamato dehidrogenase (GDH), uma enzima produzida por *C. difficile*; entretanto, um resultado positivo indica somente a presença do microorganismo (LOO et al., 2005).

2.3.5 Tratamento

Doença associada à *C. difficile* é uma complicação da antibioticoterapia, portanto, a interrupção do antibiótico, se possível, é o primeiro passo para o tratamento da infecção associada e, em muitos casos, a única intervenção necessária (ARMSTRONG et al., 2013; SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013). Para corrigir a desidratação, é importante a administração de fluidos e eletrólitos, mantendo-se um estado de hidratação balanceado até a recuperação do paciente (ARMSTRONG et al., 2013; POTANEM; SIMOR, 2004).

Em muitos casos, antibioticoterapia direcionada a *C. difficile* deve ser administrada. Metronidazol e vancomicina são os principais antimicrobianos usados no tratamento da infecção por *C. difficile*. Metronidazol é a droga de primeira escolha, por sua eficácia clínica, baixo custo e não indução à resistência. Para tratar casos de suaves a moderados de ICD, devem ser administrados por via oral 500mg, três vezes ao dia, por dez a 14 dias. Vancomicina, entretanto, deve ser indicada para terapia inicial de pacientes com doença de moderada a severa, casos de recorrência e para aqueles que não respondem ao metronidazol na dose de 125mg, quatro vezes ao dia por dez a 14 dias. Deve-se considerar a mudança da terapia para vancomicina, dentro de cinco-sete dias, se a terapia com metronidazol falhar

(SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013; SURAWICZ et. al., 2013; NEFF et al., 2010; SUNENSHINE; McDONALD, 2006).

Outros agentes antimicrobianos com atividade contra *C. difficile* incluem nitazoxanida, rifaximina, teicoplanina, ácido fusídico e fidaxomicina, sendo este último o primeiro da classe de antimicrobianos macrocíclicos, que deve ser administrado na dose de 200mg a cada 12 horas por dez dias (SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013; BLONDEAU, 2012; DUGGAN, 2011; JOHNSON; GERDING, 1998). Estudo sugere que a rifaximina pode ser eficaz para o tratamento de recorrência de ICD e, além disso, pode ser uma opção de tratamento para ICD em pacientes imunossuprimidos (NEFF et. al., 2010).

Cirurgia deve ser considerada, mesmo depois de apropriada terapia, se a doença associada a *C. difficile* progride com risco de morte. A colectomia poderá ser indicada diante do quadro clínico de colite fulminante, íleo paralítico, megacólon tóxico e perfuração do cólon (GASH; BROWN; PULLYBLANK, 2010).

Investigadores postulam a ideia de que os probióticos produzem o reestabelecimento da flora normal após a agressão por antibióticos ou fatores de risco outros (MCFARLAND, 2000b). Probióticos tais como *Lactobacillus* e espécies de *Sacharomyces boulardii*, administrados em conjunto com vancomicina ou metronidazol, foram eficazes em reduzir a ocorrência da diarreia associada a antibióticos, bem como a taxa de recorrência (SUNENSHINE; McDONALD, 2006; MCFARLAND, 2000a).

O aumento da incidência de surtos nosocomiais, como os casos de recorrência da diarreia associada ao *C. difficile* e outras complicações (megacólon tóxico, íleo, sepse), alimentou a busca por distintos tipos de tratamentos. A intervenção farmacológica, não antimicrobiana, é uma perspectiva para o tratamento do crescente problema da colite nosocomial associada a *C. difficile*.

Com efeito, é válido, mencionar o estudo da suplementação com alanil-glutamina, que é o principal combustível das células intestinais saudáveis, um dipeptídeo altamente solúvel e bem tolerado, derivado da glutamina, que exerce efeito protetor sobre o epitélio celular intestinal, gerando aumento da expressão de proteína RhoA, contra a destruição induzida por toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB). Esta alternativa é clarificada por meio de estudos dos mecanismos que induzem a apoptose nas células agredidas por estas toxinas (SANTOS et. al., 2013; RODRIGUES et. al., 2013; BRITO et. al., 2002).

2.3.6 Prevenção e Controle

A possibilidade de infecção por *C. difficile* deve ser considerada em todos os pacientes com diarreia sem outra explicação, que receberam ou estão recebendo antimicrobianos (BARTLET, 2002). Isto sinaliza a suma importância do uso cauteloso e adequado de antimicrobianos, restringindo-se a duração e o número de agentes antimicrobianos prescritos para reduzir o risco de ICD. Esta estratégia enfrenta dificuldades para ser implantada em locais onde o tratamento empírico requer o uso de antimicrobianos de amplo espectro (ARMSTRONG et. al., 2013).

Diretrizes para prevenção da diarreia e colite por *C. difficile*, além de limitar o uso de antimicrobianos, estão baseadas na adoção de algumas práticas e atitudes como precauções de barreira, que incluem o uso de luvas e aventais pela equipe do hospital e de visitantes que entram nas enfermarias de paciente suspeito ou com diagnóstico de ICD (SURAWICZ et. al., 2013).

Apropriada higiene das mãos com água e sabão ou sabão desinfetante é mais eficaz na remoção de *C. difficile* e deve ser realizada, preferencialmente, sobre o uso de desinfetantes à base de álcool, quando o contato com *C. difficile* é suspeito ou provável. Os desinfetantes à base de álcool, embora recomendados pelo CDC para reduzir a transmissão de bactérias patogênicas nosocomiais, em geral, são ineficazes contra os esporos de *C. difficile*. Para a desinfecção dos objetos e ambientes contaminados com *C. difficile*, são usados hipoclorito, glutaraldeído ou óxido de etileno, além de medidas educativas direcionadas à equipe de saúde hospitalar sobre a doença e sua epidemiologia (OUGHTON et. al., 2009; FEKETY, 1997).

Precauções de contato para pacientes com ICD devem ser mantidas pelo menos até a resolução da diarreia. Portanto, devem ser mantidos em quartos separados pacientes com suspeita ou com diagnóstico de ICD, sozinho ou com outro paciente na mesma condição (SURAWICZ et al., 2013; COHEN et al., 2010).

Acurada identificação dos fatores de risco pode ser benéfica quanto à sua eliminação e consequente redução da doença; monitoramento dos pacientes ocasionará detecção precoce da infecção e favorecerá oportunos tratamento e introdução de medidas de precaução e controle; além de possibilitar a obtenção de taxas de riscos da infecção local, bem como sua variação, comparando os resultados encontrados com os de outras instituições de saúde (BIGNARDI, 1998).

3 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Diarreia nosocomial é, frequentemente, pouco noticiada em pacientes hospitalizados, nem sempre se considerando os fatores de risco aos quais estes pacientes estão expostos. As infecções adquiridas em hospitais, contudo, em particular, a diarreia nosocomial (DN), são ocorrências de dobrada relevância em hospitais de todo o mundo, em virtude do ônus financeiro que ocasiona para estas instituições e aumento da morbidade e mortalidade, embora pouco documentadas em estudos epidemiológicos.

Diarreia nosocomial pode ter uma etiologia infecciosa ou não infecciosa. De acordo com vários pesquisadores, a causa mais comum associada a diarreia infecciosa nosocomial em pacientes adultos é *C. difficile*, agente etiológico da colite pseudomembranosa, sendo o consumo de antibióticos o principal fator de risco para o seu surgimento. Em estudo anterior, no HUWC, o uso de penicilinas e cefalosporinas foi fator de risco significativo para DN, e colite pseudomembranosa foi identificada em paciente da Hematologia, mediante achados clínico e histopatológico (MESQUITA et. al., 2011).

Em razão da vulnerabilidade dos pacientes em estudo, imposta pela imunossupressão (incluindo doenças malignas, transplante de órgãos e cirrose), quimioterapia, terapia com corticoides, internamento hospitalar e terapia com agentes antimicrobianos (SURAWICZ et. al., 2013), postula-se o argumento de que estão em risco aumentado de adquirir diarreia nosocomial. Nesses pacientes, a diarreia já é importante por si mesma, mas ainda pode acarretar piora no quadro clínico, desde que a DN predis põe a outras infecções hospitalares, particularmente, infecções do trato urinário, as quais são dez vezes mais comuns após seu aparecimento (LIMA et. al., 1990).

O aumento da incidência da diarreia associada a *C. difficile* e o aparecimento de cepas mais virulentas e mais resistentes aos antimicrobianos, em recentes epidemias na Europa e América do Norte, enfatizam a importância do reconhecimento inicial, diagnóstico e tratamento da doença. Publicações, sobre este tema, entretanto, são escassas na literatura brasileira, principalmente no Nordeste.

Num hospital universitário, os pacientes entram em contato com muitos profissionais e estudantes, facilitando o risco de infecções cruzadas. Ante do exposto, revestem-se de importância estudos sobre DN e da doença associada a *C. difficile* (DACD) no HUWC, pela propensão que este microrganismo patogênico tem de se disseminar no ambiente hospitalar e de causar infecções em pessoas suscetíveis.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Determinar a incidência da diarreia nosocomial, fatores de risco associados e a incidência da doença por *C. difficile*, nos pacientes das Clínicas de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC e, adicionalmente, a ocorrência de outras infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), nestes pacientes.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Primários

- i Definir a incidência da diarreia nosocomial, nos pacientes das Clínicas de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC;
- ii determinar a incidência da diarreia nosocomial associada a *C. difficile*, nos pacientes das Clínicas de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC;
- iii estabelecer a ocorrência da doença associada ao *C. difficile* (DACD), nos pacientes das Clínicas de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC; e
- iv identificar fatores de risco associados com diarreia nosocomial nos pacientes das Clínicas de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC.

4.2.2 Secundários

- i Identificar as características clínicas e epidemiológicas de pacientes com DN e seus controles; e
- ii relatar a distribuição de outras infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), por topografia, em pacientes com DN e seus controles.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e período

Este estudo foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), de 06 de fevereiro de 2012 a 05 de fevereiro de 2013. Os pacientes eram provenientes das Enfermarias de Hematologia, Transplante (Tx) Hepático e Tx Renal. Estas unidades dispunham de 32 leitos, dos quais 12 são destinadas à Enfermaria de Hematologia, 08 à do Tx Hepático e 12 à do Transplante (Tx) Renal.

O HUWC é referência terciária no sistema municipal e estadual de saúde a pacientes portadores de patologias de média e de alta complexidade, e é o principal hospital de ensino localizado em Fortaleza – Estado do Ceará, do Nordeste do Brasil. É integrado ao Sistema Único de Saúde (SUS), que por meio do atendimento público e gratuito destina 100% dos 247 leitos à internação, cuja principal clientela é composta de pacientes oriundos de áreas mais carentes da cidade de Fortaleza, da zona rural, de outros municípios e de estados circunvizinhos.

5.2 Desenho do estudo

5.2.1 Tipo de Estudo e População

No período em estudo, 6620 pacientes foram internados no HUWC/UFC. Destes, 966 foram avaliados, prospectivamente, constituindo a população internada nas enfermarias em estudo. A amostra foi representada por 116 pacientes envolvidos no estudo caso-controle.

O ensaio englobou dois delineamentos: um estudo caso-controle para determinação dos fatores de risco e um prospectivo para determinação da incidência. Portanto, a identificação da DN nos pacientes internados constituiu-se o ponto inicial do estudo, com suporte no qual, se olhando em direção ao passado, se foi em busca dos fatores de risco suspeitos. Enquanto, porém, a pesquisa progredia até uma data de encerramento em época determinada, a ocorrência de novos eventos na população foi acompanhada, para determinação da taxa de incidência.

Após a identificação dos casos de pacientes com diarreia, iniciava-se a busca dos controles. A escolha do grupo de controle ou de comparação deveria obedecer ao princípio de máxima similaridade com os casos, exceto pelo critério de ausência da DN. O controle

selecionado, nem sempre, era concomitante ao caso, podendo durar até \pm seis meses sua procura, de forma que atendesse aos critérios de pareamento definidos no experimento.

5.2.2 Critérios de inclusão dos pacientes no estudo

Foram considerados elegíveis os pacientes internados, portadores de patologias hematológicas, transplantados, no pré ou pós-transplante renal e hepático, admitidos por mais de 72 horas ao hospital e que concordassem em participar do estudo caso-controle, tendo lido e assinado, previamente, ou seus responsáveis, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). Casos: pacientes com diarreia nosocomial, conforme definida nesta pesquisa. Cada caso poderia ter mais de um controle. Controles: pacientes do estudo pareados com os casos, por sexo, idade (com variação máxima de dez anos para adultos e cinco anos para crianças), diagnóstico de admissão, unidade de internação e data da admissão, porém não adquiriram diarreia, durante o tempo de permanência hospitalar.

5.2.3 Critérios de exclusão dos pacientes no estudo

Foram excluídos pacientes, que desistiram de participar da pesquisa, cujo tempo de permanência hospitalar foi inferior a 72 horas, mesmo que aparecesse diarreia neste período, com diarreia decorrente de outras causas inflamatórias ou a procedimentos diagnósticos, à margem dos critérios de inclusão, ou que no momento da admissão apresentassem diarreia.

5.3 Protocolo do estudo

5.3.1 Definição da diarreia nosocomial

Definiu-se diarreia nosocomial (DN) como o aparecimento súbito de fezes liquefeitas, ou que tomam a forma do recipiente que as contém em número maior ou igual a três vezes ao dia, após 72 horas de admissão do paciente, com uma duração superior a 12 horas, sem outras causas inflamatórias ou procedimentos diagnósticos (GARNER et al., 1988).

5.3.2 Sistemática de vigilância epidemiológica da diarreia nosocomial

Seguiram-se 12 meses de vigilância epidemiológica, usando-se o método de busca ativa com visitas periódicas, três vezes por semana, às enfermarias de interesse, entrevistando-se os pacientes ou seus responsáveis. A equipe de saúde da unidade, as enfermeiras da CCIH/HUWC e os prontuários dos pacientes também foram consultados para obtenção de informações. Todos os pacientes do estudo tiveram um acompanhamento sistemático até a alta hospitalar para análise dos fatores de risco da diarreia nosocomial.

5.3.3 Análise dos fatores de risco da diarreia nosocomial

Foram investigados os principais fatores potenciais relacionados com a ocorrência da DN e diarreia associada a *C. difficile*, dentre os quais se mencionam o uso de alimentação enteral, antiácidos, antibioticoterapia, quimioterapia, terapia com corticoides, bloqueadores dos receptores histamínicos H₂, inibidores da bomba protônica, sondagem nasogástrica para nutrição enteral, uso de imunossupressores, tempo de permanência hospitalar, a existência da doença de base e a presença da diarreia em contactantes dos pacientes em estudo.

Considerou-se como doença de base a presença de qualquer uma das seguintes: pré e pós Tx hepático e renal, Tx duplo renal e hepático, hepatectomia associada à esplenomegalia, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, mielofibrose, anemia aplásica.

5.4 Sistemática da coleta

5.4.1 Coleta de dados

A coleta de dados foi registrada em formulário (Apêndice A) no qual foram coletados dados provenientes de variáveis demográficas, como idade e sexo, setor e duração da internação, variáveis para caracterização do episódio diarreico, como tipo e duração, e as variáveis clínicas relacionadas aos fatores de risco da DN, há pouco descritos.

5.4.2 Coleta e acondicionamento de amostras fecais

As amostras fecais de casos e de controles foram obtidas por emissão intestinal espontânea e acondicionadas em recipientes plásticos limpos e descartáveis, tampados e

rotulados com a identificação do paciente (nome completo, número do prontuário, leito e número do protocolo de pesquisa) e da enfermaria. Depois de registradas em livros de protocolo, as amostras eram enviadas, em caixas de “isopor” com gelo, ao Laboratório de Microbiologia da Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde eram armazenadas a uma temperatura de -70° C para testes subsequentes das toxinas A e/ou B de *C. difficile* (Anexo E). Estes ensaios foram realizados no final do período da recolha.

5.5 Métodos microbiológicos

5.5.1 Teste ELISA para toxinas A e B de *C. difficile*

A análise das amostras fecais foi realizada, utilizando-se um teste imunoenzimático, para a detecção das toxinas A/B produzidas por cepas toxigênicas de *C. difficile*. A sensibilidade deste teste varia de 83.3% a 96% e a especificidade é de 100% (*C. difficile* TOX A/B II TM, 2008). O ensaio foi realizado conforme as orientações do fabricante. As placas foram lidas com espectrofotômetro Microplate ELISA Reader (BIO-RAD, USA) em filtro de 450nm e filtro de referência de 620 nm (Anexo D).

5.6 Monitoramentos de outras infecções adquiridas no HUWC

Relatos acerca da aquisição de outras infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), nos pacientes em estudo, foram feitos com base na notificação das infecções hospitalares (Informações, CCIH/ HUWC, 2013), que tem como diretriz prioritária de procedimentos, para vigilância epidemiológica, as infecções do trato respiratório (pneumonia), urinário (ITU), da corrente sanguínea (ICS) e do sítio cirúrgico (ISC), seguindo as diretrizes delineadas pelo Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (LIMA; PARENTI, 2009; ANVISA, 2009b; ANVISA, 2009c; ANVISA, 2009d; ANVISA, 2009e), utilizando as recomendações da Portaria nº 2.616, de 12/05/1998 (BRASIL, 1998).

5.7 Análise estatística

Estatística descritiva de todas as variáveis relevantes para os grupos foi calculada e os

indicadores foram exibidos em tabelas, figuras e gráficos.

Considerou-se como diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$, assinalando-se com asterisco aquelas significantes. Comparações entre os grupos casos e controles, assim como a possível relação entre ocorrência da diarreia com as características demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais da população estudada, foram analisadas em modelo univariado, utilizando-se o teste t de *Student*, o teste do qui - quadrado ou teste exato de Fischer, quando apropriado. A razão de chances foi calculada tanto no modelo univariado, quanto em multivariado, conforme adequação.

Após mostrarem significância na análise univariada, as variáveis uso de antimicrobiano, tipo de antimicrobiano e quantidade de antimicrobianos foram posteriormente estudadas, por intermédio da análise multivariada, em um modelo de regressão logística.

Análises foram interpretadas mediante o “software Statistical Pacakage Social Science” (SPSS) for *windows* (versão 13,0). O banco de dados foi alimentado por dois digitadores e depois validado pelo terceiro.

5.8 Ética do estudo

O projeto desta pesquisa foi aprovado, sem restrições, pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC/UFC, e atendeu aos princípios éticos que regulamentam as pesquisa - *in anima nobili*, tendo-se obtido de todos os pacientes ou de seus responsáveis o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), considerando a Resolução 466/2012, do CNS-MS-Brasil.

Nº de protocolo de aprovação: 108.09.09; data da aprovação: 09 de outubro de 2009 (Anexo A) e 05 de abril de 2011(Anexo B).

6 RESULTADOS

6.1 Unidades do estudo

Foram admitidos às Enfermarias de Hematologia, de Tx Hepático e Tx Renal, respectivamente, 275, 358 e 333 pacientes no período em estudo.

6.2 Pacientes do estudo

Constituíram a população em estudo 966 pacientes. Participaram do estudo caso-controle 116 pacientes (33 da Hematologia, 52 do Tx Hepático, 30 do Tx Renal e 01 paciente com Tx duplo de fígado e rim), sendo 44 do grupo dos casos e 72 do grupo-controle (alguns pacientes-casos foram pareados a mais de um controle). Apenas um paciente não coletou amostra fecal (caso), portanto, não pode ser incluído na análise para *C. difficile* (Figura 2).

6.3 Variáveis clínicas e epidemiológicas

Dentre os 116 pacientes envolvidos no estudo caso-controle, 62,10% (72/116) eram homens e 37,93% (44/116) mulheres. Verificou-se, portanto, um predomínio do sexo masculino. Do quantitativo de homens, 24,14% (28/116) eram casos e 37,93% (44/116) controles e, das mulheres, 13,79% (16/116) eram casos e 24,14% (28/116) controles (Tabela 1).

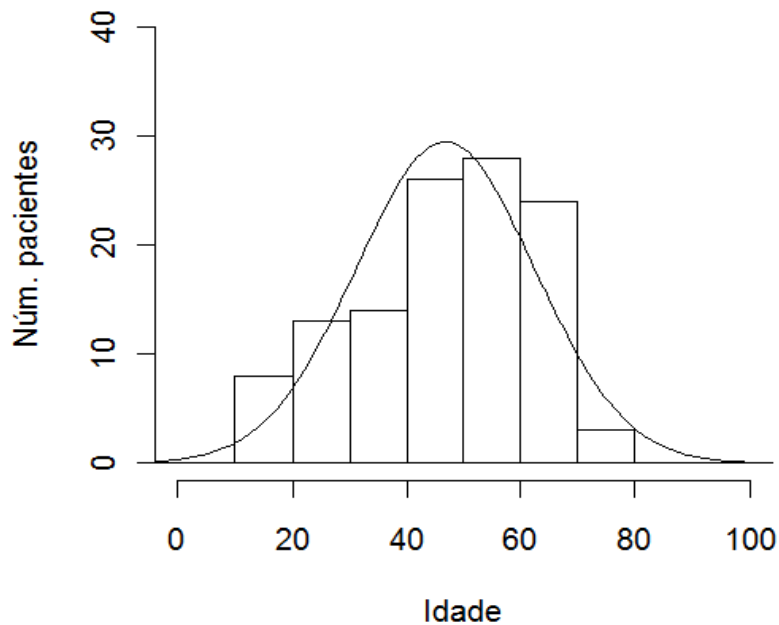
Com relação à variável idade, não existe diferença significativa entre as médias dos casos e controles ($p = 0,464$). No geral, a média de idade foi de $47,28 \pm 15,45$ (semelhante em homens e mulheres) com um mínimo de 12 e um máximo de 72 anos (Gráfico 1). A média de idade dos pacientes com diarreia nosocomial foi de $48,64 \text{ anos} \pm 15,91$ e idade mínima de 15 anos e a máxima de 72. Entre os controles, foi de $46,46 \pm 15,22$ anos, com a idade mínima de 12 e a máxima de 72 anos (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas e fatores de risco associados ao estudo caso-controle da DN, em hospital público de ensino, em Fortaleza – CE, de 2012 a 2013.

Variáveis Clínicas	Casos		Controles		OR	I C (95%)	Qui- qua drado	Teste - t	P
	n	%	n	%					
	(n=44)		(n=72)						
Sexo									
Masculino	28	(24,15)	44	(37,93)	1,114	0,513 - 2,419	0,074		0,786
Feminino	16	(13,79)	28	(24,14)					
Idade									
Média em anos ± DP	48,64±15,91		46,46±15,22					-0,0735	0,464
Duração da* hospitalização									
Média/dias ± DP	36,50±20,67		27,15 ±18,57					-2,519	0,013
IC/Caso						33,39 – 39,61			
IC/Controle						24,96 – 29,34			
Uso de* alimentação enteral									
	11,36		1,40		9,103	1,027 – 80,708			0,029
Uso de* antimicrobiano									
Ciprofloxacina	18,20		4,20		5,511	1,277 – 20,454			0,020
Metronidazol	36,40		9,70		5,306	1,967- 14,317			0,000
Polimixina B	15,90		2,80		6,622	1,309- 33,499			0,010
Imipenem	6,80		9,70		0,679	0,166 – 2,777			0,589
Meropenem	38,60		40,30		0,934	0,433 – 2,013			0,861
Piperacilina/ tazobactam	39,70		60,30		1,230	0,562 – 2.692			0,604
Teicoplanina	47,70		36,10		1,615	0,754 – 3,462			0,216
Vancomicina	22,70		25,90		0,882	0,364 – 2,136			0,781
Quantidades de* Antimicrobianos/ paciente									
≤2	(5) 11,40		(20)27,80					8,739	0,013
3 – 6	(23) 52,30		(41)56,90		2,244	0,743 – 6,775			0,152
6 >	(16) 36,40		(11)15,30		5,818	1,676 – 20,203			0,006
Inibidores da bomba de prótons									
	29,89±17,930		23,25±18,226						

*Diferença estatisticamente significativa

Fonte: elaboração própria, com os dados da pesquisa (2014).

Gráfico 1–Histograma da idade com curva normal.

Fonte: elaboração própria, com os dados da pesquisa (2014).

Não se observou diferença estatisticamente significativa quanto à influência da doença de base nos pacientes com e sem diarreia. Os diagnósticos mais comuns nos pacientes casos foram Tx hepático 43,18% (19/44), Tx renal 22,73% (10/44) e leucemia 18,18% (8/44) e nos controles foram Tx hepático 33,33% (24/72), Tx renal 23,61% (17/72) e leucemia 20,83% (15/72). Outros diagnósticos encontrados nos casos foram mieloma múltiplo (5), hepatectomia+esplenectomia (1) e transplante duplo renal e hepático (1), totalizando 15,91% (7/44) e nos controles pós-Tx hepático (6), pós-Tx renal (4), linfoma (3), mielofibrose (1), anemia aplásica (1) e pré-Tx hepático (1) 19,44% (16/72).

A presença de companheiros de enfermaria com diarreia foi observada desde o dia em que cada paciente foi incluído no estudo: 47,73% (21/44) dos casos e 58,33% (42/72) dos controles tiveram contactantes com diarreia, contudo, não houve associação significativa com o aparecimento da diarreia (Tabela 2). Um dos controles com toxina positiva para *C. difficile* esteve internado na mesma enfermaria do paciente com ICD e foram contactantes por um dia, e três pacientes com toxina positiva estavam internados na mesma ala hospitalar deste paciente.

Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas do estudo caso-controle da DN, em hospital público de ensino, em Fortaleza - CE, de 2012 a 2013.

Variáveis	Casos		Controles		OR	I C (95%)	Qui- quadra do	P
	N	%	N	%				
	(n=44)		(n=72)					
Companheiro de enfermaria com diarreia	(21)	47,73	(42)	58,33		0,307 -1,387	1,238	0,652
Febre*	(20)	45,50	(8)	11,11	6,667	2,592 – 17,146		0,000
Dor abdominal (cólica)*	(27)	61,40	(2)	2,80	5,588	12,025 – 256,964		0,000
Vômitos*	(14)	31,82	(4)	5,60	7,933	2,410 – 26,113		0,000
Leucócitos/mm³								
<1000	(8)	18,20	(9)	12,50			0,934	0,640
1000 – 10000	(30)	68,20	(50)	69,44				
>10000	(6)	13,64	(13)	18,10				

*Diferença estatisticamente significativa.

Fonte: elaboração própria, com os dados da pesquisa (2014).

6.3.1 Fatores de risco para diarreia nosocomial

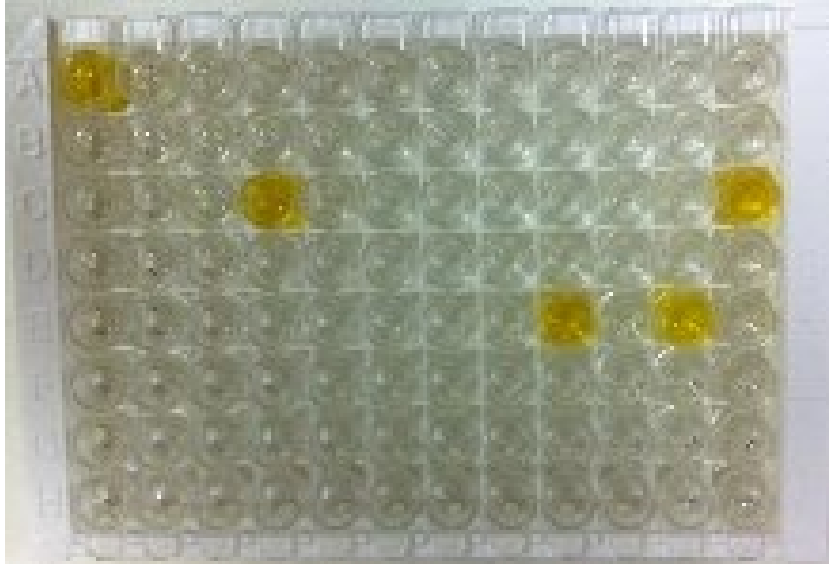
A incidência da DN foi observada em cerca de 4,56 % dos pacientes das unidades em estudo (44/966). A duração média da diarreia foi de 6,16 dias \pm 2,772, com um mínimo de dois e máximo de 13 dias. Em média, a diarreia surgiu em 17 dias \pm 14,75 após o internamento hospitalar.

A incidência da diarreia associada a *C. difficile* (DACD) foi cerca de 0,11% (1/966), em população internada por período \geq 72h. Somente nos pacientes do estudo caso- controle foi de 0,86% (1/115). Embora a diarreia associada a *C. difficile* tenha ocorrido em apenas um paciente, as toxinas A e B de *C. difficile* analisadas por ensaios imunoenzimáticos ELISA TOX A/B (Figura 1), nas 115 amostras fecais (43 casos e 72 controles), mostrou quatro resultados positivos. Toxinas de *C. difficile* estavam presentes em 2,33% (1/43) dos casos e em 4,20% (3/72) dos controles (Figura 2), como será descrito a seguir.

- Paciente de 49 anos, colonizado e infectado por *C. difficile* apresentou sintomas de dor abdominal em cólicas, diarreia líquida, durante sete dias, com frequência de quatro vezes ao dia, vômitos, febre de 37,5°C e leucocitose (19.000/mm³), além de imunossuprimido (pelo Tx renal, corticoterapia e imunossupressor), usou antimicrobianos de largo espectro (ciprofloxacina, sulfametoxazol + trimetoprima). Adquiriu infecção urinária, um dia após o término da DN, cujo agente etiológico foi *Escherichia coli*, produtora de ESBL, aumentando a morbidade deste paciente. Figura 2.

- Paciente-controle de 24 anos, assintomático, apresentou toxina positiva de *C. difficile* em amostra fecal, estava em imunossupressão pela leucemia mielóide aguda (LMA), quimioterapia e corticoterapia. Além disso, usou sulfametoxazol+trimetoprima, piperacilina/tazobactam, vancomicina, levofloxacina e meropenem. Outro controle de 60 anos, assintomático, estava em imunossupressão pela realização do Tx renal, uso de imunossupressor, corticoterapia e antiviral (valaciclovir/ganciclovir); usou sulfametoxazol +trimetoprima, piperacilina/tazobactam, teicoplanina e meropenem. O terceiro controle, de 55 anos, também assintomático, estava em imunossupressão pela realização do transplante hepático, uso de imunossupressor, corticoterapia e antiviral (valaciclovir); usou sulfametoxazol + trimetoprima e ampicilina + sulbactam. Figura 2.

Figura 1. Placa de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de ambas toxinas A e B de *Clostridium difficile*



Fonte: elaboração própria, com os dados da pesquisa (2014).

Na análise dos fatores de risco, o período é considerado, para os casos, desde a admissão até um dia antes do aparecimento da diarreia, e todo o internamento, para os controles. Alguns fatores de risco destacaram-se, estatisticamente, quanto à sua significância em relação à ocorrência do episódio diarreico. Destes, é possível citar o uso prévio de antimicrobianos e nutrição enteral por sonda nasogástrica.

A variável alimentação enteral correspondeu a 11,36% dos pacientes acometidos por DN e 1,40 % dos controles, sendo um determinante bastante significativo, $p = 0,029 (\leq 0,05)$. (Tabela 1). São necessários, porém, estudos posteriores para identificação das causas.

Houve associação da ocorrência da diarreia com o uso de ciprofloxacina, $p = 0,020 (\leq 0,05)$, nos casos 18,20% (8/44) em comparação com 4,20% (3/72) dos controles; com o uso de metronidazol, $p = 0,00 (\leq 0,05)$, em 36,40 % (16/44) dos casos e 9,70% (7/72) dos controles e de polimixina B, $p = 0,010 (\leq 0,05)$, em 15,90% (7/44) dos casos e 2,80% (2/72) dos controles (Tabela 1). Nenhum outro antimicrobiano, como clindamicina, cefalosporinas de terceira geração e penicilinas, ou outro fator de risco, como uso de inibidores da bomba de prótons, corticoterapia, quimioterapia, e imunossupressor, foi associado com diarreia nosocomial.

Quando analisado o número de variados antimicrobianos usados por paciente, verificou-se que existe associação entre a quantidade de antibióticos utilizados e o aparecimento da diarreia, $p = 0,013 (\leq 0,05)$, ou seja, existe indicação de algum comportamento diferente entre casos e controles em algum dos intervalos de consumo de antibióticos. A análise multivariada, mediada pelo modelo de regressão logística, mostrou que o uso de > 6 antimicrobianos por paciente é uma significativa associação com o aparecimento da diarreia (Tabela 1).

6.3.2 Outras características associadas com diarreia nosocomial (DN)

Com relação à variável duração da hospitalização, existe diferença estatística significativa entre as médias dos casos e controles e presença da diarreia $p = 0,013 (\leq 0,05)$. Enfatizando, que este período é considerado, para os casos, desde a admissão até um dia antes do aparecimento da diarreia, e todo o internamento, para os controles. A duração média do tempo de internamento para os casos foi de 36,5 dias $\pm 20,7$ com um mínimo de nove dias e máximo de 93 dias. Para os controles, a média de internamento foi de 27 dias $\pm 18,6$ com um mínimo de sete dias e máximo de 104. A duração da hospitalização dos pacientes com DN foi, em média, nove dias a mais do que seus controles (Tabela 1).

Quanto ao quadro clínico, os sinais e sintomas mais frequentes foram vômitos, cólicas e febre, existindo associação estatisticamente significativa entre o aparecimento da diarreia e a presença destes sintomas, $p = 0,00 (p \leq 0,01)$. Os vômitos aparecem em 12,06% (14/44) dos casos e 3,44% (4/72) dos controles; a cólica em 23,28% (27/44) dos casos e 1,72% (2/72) controles; e febre em 17,24% (20/44) dos casos e 6,90% (8/72) dos controles. Os sintomas que acompanharam o paciente colonizado [25% (1/4)] e infectado por *C. difficile* foram diarreia líquida, durante sete dias, com frequência de quatro vezes ao dia, cólicas, vômitos, febre de 37,5°C (considerando-se febre um aumento da temperatura do corporal acima de 37,2°C) e leucocitose de 19.000/mm³. Este paciente apresentou ITU logo após o término da DN por *E. coli* produtora de ESBL (Figura 2).

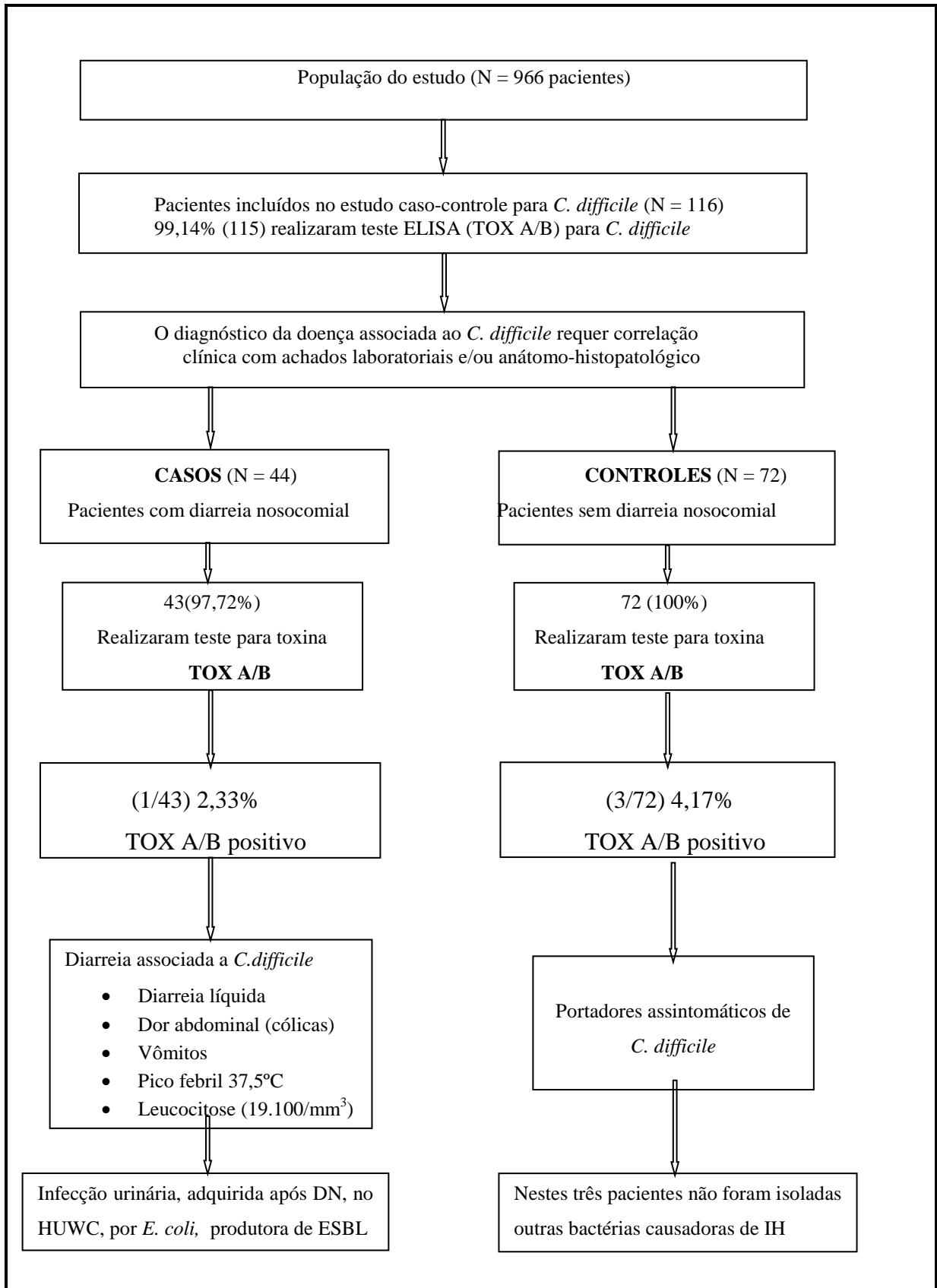
A quantidade de leucócitos no sangue periférico não teve associação estatisticamente significativa para diarreia (Tabela 2).

O teste imunoenzimático ELISA TOX A/B para *C. difficile* identificou quatro amostras positivas, sendo 75% (3/4) em controles, ou seja, foram colonizados por *C. difficile*, mas sem apresentarem diarreia. Outros agentes causadores de infecção hospitalar (IH) não

estavam presentes, nestes três pacientes, pelo monitoramento da CCIH. Impõem-se dizer que coproculturas não foram feitas (Figura 2).

Os óbitos corresponderam a 6% (7/116) dos pacientes, três casos e quatro controles.

Figura 2. Aquisição nosocomial de *Clostridium difficile* e acompanhamento dos pacientes do estudo caso-controle no HUWC/UFC de 2012 a 2013



Fonte: elaboração própria, com os dados da pesquisa (2014).

6.4 Outras infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), adquiridas por pacientes do estudo caso-controle monitoradas pela CCIH/HUWC

A taxa geral de incidência de infecção hospitalar no período em estudo foi 7,17% (CCIH/ HUWC, 2013); a taxa de infecção no Tx Renal foi de 3,98% (13 infecções/327 altas), no Tx Hepático, 2,59% (9 infecções/347 altas) e, na Hematologia, 2,39% (6 infecções/251 altas).

Destas infecções foram isoladas 28 bactérias, obtidas de amostras biológicas nos pacientes do estudo caso-controle. Nos pacientes com diarreia nosocomial, foram identificadas 36,40% (16/44) das IH, com isolamento de patógeno em 32% (14/44) durante ou após a diarreia.

Quanto aos patógenos isolados, *Escherichia coli* representou 35,72% (10/28) das bactérias isoladas em casos e controles, e foram provenientes, principalmente, de infecções urinárias. A segunda bactéria com maior prevalência entre as amostras foram a *Klebsiella pneumoniae* 17,90% (5/28) oriunda, principalmente, de infecções urinárias e sanguíneas, seguida de *Staphylococcus (coagulase negativa e hominis)* (4/28) de infecções sanguíneas. Outras bactérias somam 32,15% (9/28): *Serratia* (2/28), *Pseudomonas* (2/28), *Elizabeth meningoseptica* (1/28), *Burkholderia cepacia* (1/28), *Enterobacter cloacae complex* (1/28), *Aeromonas hydrophila* (1/28) e *Acinetobacter baumannii* (1/28), (Gráfico 2).

Os tipos de IH identificados por intensidade de acometimento nos casos e controles foram infecção do trato urinário - ITU 54% (15/28), da corrente sanguínea - ICS 32% (8/28), do sítio cirúrgico - ISC 11% (3/28) e de partes moles - IPM 4% (1/28), (Gráfico 3).

A ITU foi confirmada em 25% (7/28) dos casos, sendo associada a *Escherichia coli* (3), *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (2) e *Pseudomonas spp* (2); seguida da ICS 21,43% (6/28) associada a *Staphylococcus coagulase negativa* (2), *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (1), *Enterobacter cloacae complex* (1), *Escherichia coli* (1), *Aeromonas hydrophila/caviae* (1) e ISC 3,60% (1) associada à *Acinetobacter baumannii* (1) e IPM 3,60% (1/28) associada à *Escherichia coli* (1).

A ITU foi identificada em 29% (8/28) dos controles, sendo associada a *Escherichia coli* (5), *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (1), *Burkholderia cepacia* (1), *Serratia rubidea* (1); seguida de ICS 11% (3/28) associada à *Staphylococcus hominis ssp. hominis* (1), *Staphylococcus coagulase negativa* (1), *Serratia marcescens* (1) e ISC 7,14% (2/28) associada à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (1), *Elizabeth kingea meningoseptica* (1).

GRÁFICO 2. Patógenos isolados de infecção hospitalar, em pacientes de alto risco, no HUWC, em 2012

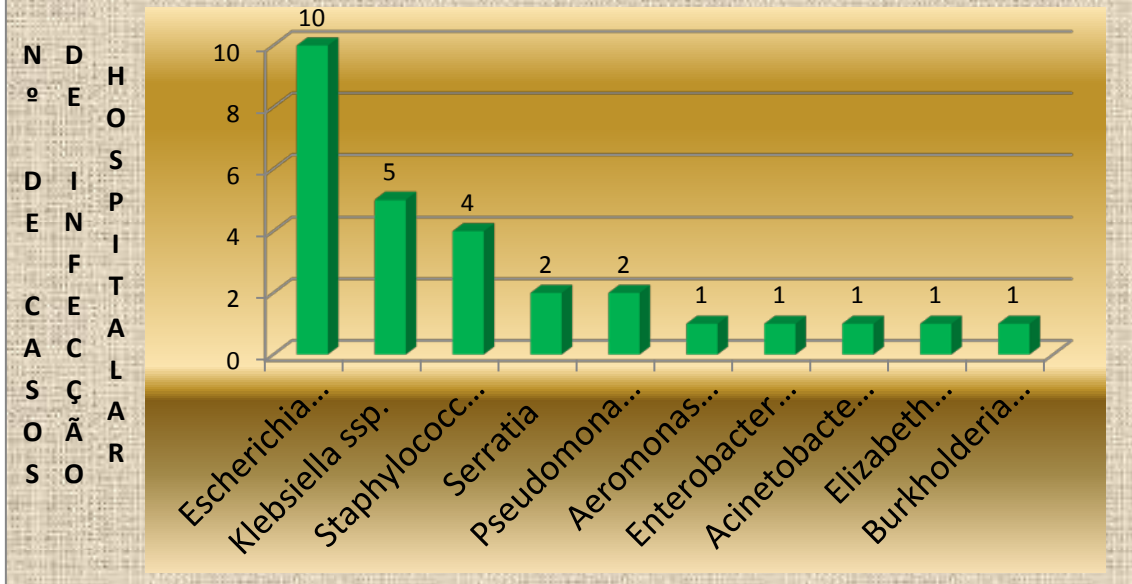
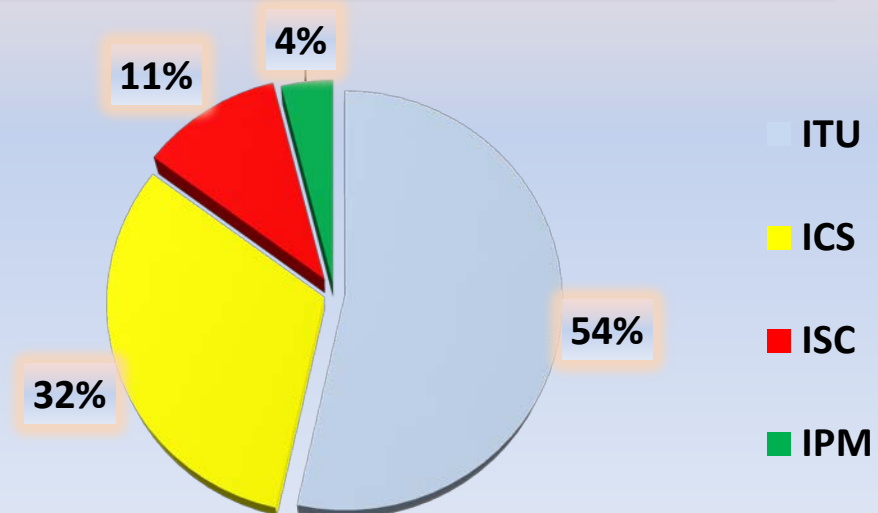


Gráfico 3. Topografias das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em pacientes de estudo caso-controle no HUWC, em 2012



7 DISCUSSÃO

O HUWC é um hospital público de ensino, composto de 247 leitos com atendimento de alta complexidade, cuja clientela é constituída por pessoas carentes de recursos financeiros, principalmente, da cidade de Fortaleza, Estado do Ceará, do Nordeste do Brasil e das regiões circunvizinhas. Os pacientes provenientes de outras regiões do País são atendidos em sua maioria para a realização de transplantes. Tendo em vista as características peculiares desse hospital, o atendimento de grande parte da população brasileira por hospitais públicos, bem como o crescimento da população de pacientes imunossuprimidos, ressalta-se a importância deste estudo para a comunidade.

A incidência da diarreia nosocomial (DN) neste estudo foi 4,56% (44/966), dez vezes maior do que na Turquia, um país situado entre a Ásia e a Europa, cuja taxa de DN foi 5 para 1000 pacientes admitidos (ERGEN et al., 2009). A incidência da DN observada numa casuística em Minas Gerais foi 2,6% (RIBEIRO et al., 1998). Em Unidade de Terapia Intensiva, também em Minas Gerais, há relatos de uma incidência de 29,9% (BORGES, et al., 2008). Estudos clínicos indicam que cerca de 12% a 33% de pacientes hospitalizados desenvolvem diarreia (GAREY et al., 2006; McFARLAND, 1995; SAMORE et al., 1994).

Em estudo anterior a este, no HUWC, durante 18 meses de pesquisa na Enfermaria de Hematologia, verificou-se um declínio na casuística da DN, após 12 meses de vigilância até os 18 meses finais (de 6,9% para 4,9%). Esse resultado que se mantém na pesquisa atual, mesmo envolvendo outras clínicas com pacientes de alto risco, conduzindo a se pensar num reflexo das medidas de controle de infecção, implementadas neste hospital (MESQUITA et al., 2011).

A média de idade dos pacientes com diarreia foi de 46,46 anos e a mediana 47,28 anos. O mais jovem paciente entre ambos, casos e controles, tinha 12 anos, e o mais velho 72 anos em ambos os grupos. O fator idade não teve significância para desencadear a diarreia, portanto, parece não proporcionar risco no meio local. Um dos fatores que justificariam seria a baixa proporção de pacientes idosos nesta população, haja vista que o grupo de pacientes com idade ≥ 65 anos correspondeu a 18, 19% dos casos e a 8, 33% dos controles. O grupo com idade acima de 50 anos correspondeu a 20% dos casos e 16,7% dos controles.

A literatura aponta a idade avançada como fator de risco para esta doença, com um aumento marcante da incidência da diarreia associada ao *C. difficile* (DACD) em pacientes hospitalizados após a idade de 50 anos, e a taxa de mortalidade aumentada a partir de 65 anos de idade (LOO et al., 2005) e ≥ 75 anos (WENISCH et al., 2012; LABBÉ et al., 2008). Em

uma Unidade de Cuidados Intensivos, a média de mortalidade atribuída a ICD foi de 55.5 anos e 37,9% dos pacientes estavam acima de 60 anos de idade (MARRA et al., 2007) Em estudo realizado em São Paulo, Brasil, a média de idade entre pacientes com diarreia nosocomial foi de 53,9 anos (MARCON; GAMBÁ; VIANNA, 2006). No Rio de Janeiro, *C. difficile* foi isolado de pacientes com média de idade de 48 anos (BALASSIANO, 2011).

Neste experimento a duração média da diarreia foi de 6,6 dias. Estudos mostram resultados diferentes quanto à duração média da diarreia nosocomial de 5 ± 2 dias (Mac FARLAND, 1995), enquanto outros apontam uma duração \geq dez dias (WENISCH et al., 2012). Em estudo de pacientes transplantados renais na Bélgica, foi relatada diarreia grave, com duração \geq sete dias (MAES et al., 2006).

Neste estudo caso-controle, o tempo médio dos dias da admissão até o início da diarreia, foi 17 dias. Num estudo em Minas Gerais o tempo do início da diarreia em relação à internação foi 17,8 dias (BORGES et al., 2008). Em estudo que analisou a ocorrência da diarreia associada a antibióticos (DAA) em pacientes hospitalizados, na Suécia, a média de tempo, desde a admissão hospitalar até o início dos sintomas, foi 13 dias (WISTRÖN et al., 2001). Num hospital de ensino em Jerusalém, estudo analisou a presença da toxina nas fezes em relação ao tempo de hospitalização; mostrou que os pacientes com presença de toxina de *C. difficile* nas fezes permaneciam de 21.2 ± 12 dias internados antes do início da diarreia e aqueles com toxina negativa $15 \pm 12,7$ dias (SCHWABER et al., 2000).

Neste estudo, a duração da hospitalização foi em média 36,5 dias para os casos e 27,15 dias para os controles com um aumento de nove dias, em média, para os casos. Pacientes com diarreia permaneceram, significativamente, mais tempo internados do que seus controles. DN desenvolveu-se, nos casos, cerca de 17 dias após a admissão hospitalar, Este dado, comparado com a média de permanência de 27 dias para controles, sugere que a diarreia nosocomial causou aumento da permanência hospitalar e não o oposto.

Diarreia de aquisição hospitalar é descrita como fator para prolongar o tempo de hospitalização em 26 dias (FORSTER, 2012). A ocorrência de IH determina um aumento no tempo de internação em cinco dias, em média, nos custos de internação e nos índices de mortalidade na população acometida (APECIH, 2008).

Estudos desenvolvidos pelo CDC, Atlanta, mostram que a infecção hospitalar prolonga a permanência dos pacientes no hospital em, pelo menos, quatro dias, ao custo adicional de US\$ 1.800,00 (PEDROSA et al., 2009). Nos Estados Unidos, DACD tem um custo estimado entre US\$ 435 milhões a US\$ 3 bilhões de dólares, anualmente, (BLONDEAU, 2012). Havendo prolongamento no tempo de internação, os pacientes ficam

mais expostos a patógenos hospitalares e a mais procedimentos terapêuticos, aumentando os riscos para aquisição de infecção hospitalar (IH).

Neste estudo, pacientes com diarreia nosocomial permaneceram mais tempo internados, e tiveram mais vômitos, mais cólicas e febre do que seus controles. A duração da hospitalização, bem como os sintomas mencionados, foram significativamente associados à ocorrência da DN (Tabela 2). Este prolongamento do período de hospitalização, imposto pela diarreia e suas consequências, certamente, repercutiu em aumento da morbidade e de custos hospitalares, embora não tenha havido nenhum óbito ocasionado, diretamente, por diarreia nosocomial.

Estudos mostram que colite associada ao *C. difficile* representou séria complicação após transplante de órgãos sólidos (TOS), como coração, pâncreas, fígado, pulmão, rins, pâncreas e de medula. Além disso, todos os pacientes com colite associada a *C. difficile* apresentaram diarreia e dor abdominal, com incidência da diarreia associada a *C. difficile* variando de 2% a 8% (NEFF, 2010; ALBRIGHT et al., 2007; STELZMUELLER et al., 2007; GINSBURG; THULUVATH, 2005).

Em países desenvolvidos, DN é causa comum em pacientes adultos hospitalizados e uma complicação subestimada, especialmente, em pacientes hospitalizados de alto-risco (internados em unidades de terapia intensiva, de transplantes e de oncologia). Pode-se exemplificar Portugal, cuja incidência anual média foi de 0,37/1000 internamentos (VIEIRA et al., 2010), a Espanha, cuja incidência de infecção associada a *C. difficile* aumentou de 0,39 a 1,2 caso para 1000 pacientes hospitalizados (ASENSIO et al., 2008).

Embora *C. difficile* seja apontado como a causa primária em países desenvolvidos, se conhece pouco sobre outros fatores de risco da DN. Em muitos casos, pode predominar uma etiologia não infecciosa, incluindo medicações, com seus efeitos colaterais, ruptura da microbiota intestinal, doença de base e alimentação enteral (POLAGE; SOLNICK; COHEN, 2012; MAES et. al., 2006; RIBEIRO et. al., 1998; McFARLAND, 1995).

Quando avaliados os possíveis fatores de risco relacionados à ocorrência da diarreia na população deste estudo, as causas incluíram antimicrobianos e procedimentos terapêuticos. *C. difficile* enterotoxigênico foi isolado de paciente com diarreia e de pacientes - controle. Verificou-se que tiveram significância estatística o uso de algumas classes de antimicrobianos, bem como a quantidade de antimicrobianos usados por paciente e ingesta de alimentação enteral.

Neste estudo, alimentação enteral foi fator de risco para DN. Este resultado está de acordo com a literatura, que aponta a importância de se avaliar a etiologia não infecciosa da

diarreia, incluindo medicações, doença de base e alimentação enteral (POLAGE; SOLNICK; COHEN, 2012; SCHWABER et al., 2000; RIBEIRO et al., 1998). Verifica-se que uma proporção significativamente maior de casos foi submetida a esta modalidade nutricional em relação aos controles.

Relatos sobre nutrição enteral predispondo a diarreia já foram divulgados há mais de uma década em Minas Gerais, tendo-se concluído que 40% dos pacientes que apresentaram diarreia nosocomial haviam sido submetidos à nutrição enteral, comparados a 5% no grupo sem diarreia. Estes resultados podem estar associados a estase intestinal, contaminação do nutriente ou mesmo uso de medicações antiácidas, predispondo à ocorrência deste agravo (RIBEIRO et al., 1998).

Quanto aos antimicrobianos, houve significativa associação entre o número de antimicrobianos usados e o aparecimento da DN, representado pelo grupo de pacientes, que usou mais de seis antibióticos diferentes. Ciprofloxacina, metronidazol e polimixina foram as classes de antimicrobianos usados e estatisticamente associadas à DN.

Em consonância os resultados deste experimento um dos fatores significativamente associado com DN foram pacientes que receberam maior número de antimicrobianos distintos, em uso de antibióticos de largo espectro e imunossuprimidos pela doença de base ou pela terapia (BALASSIANO et al., 2011; SCHWABER et al., 2000).

Em pacientes hospitalizados, antibióticos e outras intervenções causam diarreia, mediante rompimento da microbiota intestinal nativa, principalmente antibióticos de largo espectro e aqueles que alcançam altas concentrações no lúmen do cólon intestinal, sendo este desequilíbrio entre esta microbiota e o hospedeiro o primeiro passo para o estabelecimento da ICD. Penicilinas, β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases por administração IV, teicoplaninas, carbapenêmicos, quinolonas (em especial, ciprofloxacinas), cefalosporinas, principalmente as de terceira geração (cefotaxima, cefotazidima), e clindamicina, são intensamente implicadas (POLAGE; SOLNICK; COHEN, 2012; BALASSIANO et al., 2010; PÉPIN et al., 2005; LEGARIA; LUMELSKY; ROSETTI, 2003; SCHWABER et al., 2000).

Os antibióticos mais frequentemente implicados na predisposição a ICD são fluoroquinolonas, clindamicina, cefalosporinas e penicilinas. Praticamente, contudo, todos os antibióticos, incluindo metronidazol e vancomicina, podem predispor ao *C. difficile* (HOOKMAN; BARKIN, 2009).

Poder-se-ia pensar, também, quanto ao impacto do uso do metronidazol, nos pacientes em estudo, que ocorreu numa proporção cinco vezes maior nos casos (estes pacientes usaram metronidazol $4,56 \pm 7,402$ dias em média, antes do aparecimento da diarreia). Ao mesmo

tempo em que poderia ser causa da diarreia, poderia mascarar os efeitos das toxinas, reduzindo sua detecção aos testes imunoenzimáticos.

Neste estudo, foram investigados aspectos da diarreia nosocomial e doença associada a *C. difficile*. A incidência de *C. difficile* foi de 0,11% (01/966 internamentos). Comparativamente, estudo em Portugal, considerando um cenário não epidêmico, a incidência foi de 1,6 caso/1000 internamentos (SILVA et al., 2012); na Bélgica, a média de incidência de ICD em 150 hospitais pesquisados foi 1,87; 1,82 e 1,52 para 1000 admissões, em 2008, 2009 e 2010, respectivamente (VISEUR et al., 2011).

No Rio de Janeiro, um surto da diarreia associada ao *C. difficile* em uma unidade de tratamento intensivo mostrou taxa média de incidência de 1,8 por 1000 pacientes. Ligeiramente inferiores e mais concordantes com os indicadores desta investigação, na Espanha, a incidência permaneceu de 0,39 a 1,22 caso/1000 internamentos de 1999 a 2007 (ASENSIO et al., 2008). Apesar das diferenças, é interessante realçar a tendência para o crescimento do número de casos desta infecção no ambiente hospitalar.

A análise de *C. difficile* foi feita pela detecção, em amostras fecais, de exotoxinas produzidas pela bactéria, mediante o teste imunoenzimático ELISA TOX A/B. O método enzimático usado neste estudo detectou, simultaneamente, a presença das toxinas A/B de *C. difficile* na proporção de 2,33% (1/43) das amostras de fezes diarreicas (casos) e de 4,17% (3/72) nas amostras de fezes formadas (controles). Portanto, tem-se que a toxina A/B foi identificada em quatro amostras de fezes, das quais 75% (3/4) foram de pacientes sem diarreia e 25% (1/4) de paciente com diarreia. Estes pacientes com toxina positiva estavam sob imunossupressão e em uso de terapia antimicrobiana de largo espectro, condições consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de ICD.

Segundo Bartlet (1990), para que ocorra a doença associada ao *C. difficile*, faz-se necessário um distúrbio da flora bacteriana intestinal, uma fonte de contaminação relacionada à bactéria, a produção de toxina e pacientes idosos, que juntos formam os quatro componentes críticos para desencadear esta doença, condições fáceis de encontrar em pacientes hospitalizados.

Na vigilância epidemiológica, a definição de caso associado à infecção por *C. difficile* deve incluir a presença da diarreia ou evidência de megacólon e/ou um teste diagnóstico positivo ou evidência de colite pseudomembranosa, demonstrada por endoscopia ou por histopatologia (COHEN et al., 2014; NEVES et al., 2008).

O espectro de manifestações clínicas da doença associada a *C. difficile* é bastante abrangente, e estas podem variar desde ausência, diarreia não complicada, septicemia, e

mesmo morte (SUNENSHINE; MACDONALD, 2006). Além disso, a doença associada a *C. difficile* deve ser considerada em qualquer paciente com diarreia nosocomial, que esteja recebendo ou que tenha recebido antibióticos recente em especial, se febre também está presente (POUTANEN; SIMOR, 2004; BARTLET, 2002).

Pacientes-controle tiveram colonização assintomática por *C. difficile* toxigênico. Estes portadores, embora assintomáticos, são uma fonte potencial da disseminação hospitalar para outros pacientes e servem como reservatório para a contaminação ambiental, desde que cerca de 3% dos adultos saudáveis e 20% a 40% de pacientes hospitalizados são colonizados por *C. difficile*, tornando-se um fator de risco para a doença, quando tratados com antibióticos, que destroem a microflora intestinal nativa (HOOKMAN; BARKIN, 2009).

O risco de colonização por *C. difficile* é proporcional ao tempo de hospitalização, variando de 1% em pacientes com uma semana de internação a 50% entre aqueles que permanecem mais de quatro semanas (POUTANEN; SIMOR, 2004).

Pesquisa caso-controle, na Sérvia, isolou *C. difficile* toxigênicos e não toxigênicos, de amostras de fezes diarreicas e formadas. A proporção encontrada foi 66,25% (53/80) A+/B+, 1,25% (1/80) A-/B+ e 32,50% (26/80) A-/B-, nos pacientes com diarreia. No grupo-controle, *C. difficile* toxigênico foi cultivado em amostras de dois pacientes 2% (2/100) e *C. difficile* não-toxigênico de cinco pacientes 5% (5/100). Esta pesquisa confirma a importância clínica de *C. difficile* em pacientes com DN e a possibilidade de sua transmissão, evidenciada em pacientes assintomáticos (PREDRAG, 2012).

Além de outros aspectos, a reduzida taxa de incidência de *C. difficile*, no meio local, poderia ser atribuída à realização, somente, do teste imunoenzimático para toxina A/B, sem adicional isolamento de *C. difficile*, mediante a cultura anaeróbica das fezes em meio seletivo, que é método indicado em estudos epidemiológicos (PEDRAG et al., 2012).

Diretrizes para diagnóstico de *C. difficile* sugerem que somente métodos enzimáticos para toxina A e B não devem ser usados como testes por terem a sensibilidade reduzida (75% - 95%), quando comparado a padrões de referência (SURAWICZ et al., 2013), como o método-padrão de cultura de tecido. Isto porque, embora a sensibilidade do método imunoenzimáticos utilizado neste estudo seja recomendável (83,3% a 96%), além de este detectar ambas TxA e TxB de *C. difficile*, ainda existe a possibilidade das amostras fecais conterem baixos níveis destas toxinas, inviabilizando a detecção (VAISHNAVI, 2009).

Além disso, resultados do teste para detecção de toxina produzida por *C. difficile* são associados ao potencial do microrganismo em produzir doença, ou seja, são diretamente associados à severidade da doença. De acordo com esta afirmação, resultados são positivos

em 15% a 25% de pacientes com diarreia associada a antibiótico e em 90% a 100% nos pacientes com colite pseudomembranosa (CPM) (BARTLET, 1986). Mesmo assim, em 70% a 80% dos casos, a detecção da toxina de *C. difficile* apresenta resultados negativos. Resultado negativo de toxina nas fezes, entretanto, não exclui o diagnóstico de ICD, portanto, a decisão de iniciar, parar ou continuar tratamento deve ser individualizada (COHEN et. al., 2010; VIEIRA et. al., 2010).

Doença associada a *C. difficile* é mediada por toxinas (KIM et. al., 2011; DUBBERKE, et al., 2008; BARTLET, 1979). Cepas patogênicas produzem duas distintas toxinas (TxA e TxB), que são fatores de virulência primários de *C. difficile*. (CARTER; ROOD; LYRAS, 2012; HOOKMAN; BARKIN, 2009; GRONCZEWSKI; KATZ, 2006; WARNY et al., 2005). Além destas, a cepa epidêmica NAP1/B1 ribotipo 027 e 078 causa surtos da diarreia e colite associadas a antibióticos e modifica a epidemiologia da ICD (O'DONOGHUE; KYNE, 2011; HOOKMAN; BARKIN, 2009; LOO et. al., 2005; PÉPIN et. al., 2004). A alteração de uma doença, anteriormente leve, noutra que pode causar severa morbidade e mortalidade em poucos dias, desafia toda abordagem terapêutica para esta infecção.

No Brasil, estas informações ainda são limitadas, principalmente quanto à incidência de ICD, a disseminação deste patógeno nas unidades hospitalares, o espectro genético de suas toxinas e seu perfil de resistência antimicrobiana (BALASSIANO et. al., 2011; BALASSIANO et. al., 2009; BORGES et al., 2008). Estudo anterior no HUWC/UFC, na Unidade de Hematologia, diagnóstico histopatológico, evidenciou colite pseudomembranosa (CPM), em paciente assintomática para diarreia, até o dia do óbito. Referida paciente teve morte súbita, inviabilizando a coleta de amostra fecal para exame (MESQUITA et. al., 2011).

No Rio de Janeiro, identificou-se ICD em 27,1% dos pacientes em hospital universitário por via de resultados obtidos por ELISA TOX A/B, bem como a identificação dos tipos clonais 233 e 133, enfatizando a ocorrência de infecção cruzada (BALASSIANO et al., 2011). Esses resultados enfatizam a importância do diagnóstico correto para um tratamento bem-sucedido, evitando intervenções mais invasivas ou evolução grave, desde que o controle da ICD poderá prevenir o surgimento de clones de *C. difficile* em hospitais, bem como surtos epidêmicos (BALASSIANO et. al., 2011; NEVES et al., 2008).

Cultivos de outras bactérias, fungos, vírus e protozoários, comumente causadores da diarreia em pacientes hospitalizados, não foram realizados, e pode ser uma das limitações da avaliação da diarreia neste estudo. Além de *C. difficile*, citomegalovírus é uma etiologia infecciosa comum em pacientes submetidos a TOS. Outros microrganismos patogênicos do

trato gastrointestinal (TGI) pertencentes aos gêneros *Campylobacter jejuni*, *Salmonella entérica*, sorotipo *Typhimurium*, *Candida albicans* e, em menor quantidade, *Rotavírus* e *Cryptosporidium parvum* já foram isolados de pacientes com diarreia 61,54% (16/26), cujos isolados foram *C. difficile* não toxigênicos (PREDRAG et. al., 2012; GINSBURG et al., 2005).

A diarreia é também um efeito colateral frequente de medicamentos imunossupressores. Para graus variáveis, micofenolato de mofetil (MMF), ciclosporina A (CSA), tacrolimus e sirolimus estão associados com a diarreia. Nesta investigação, entretanto, os imunossupressores não foram associados com diarreia nosocomial.

Considerando as diretrizes para vigilância de *C. difficile*, chama a atenção o fato de que muitos pacientes podem adquirir *C. difficile* na instituição de saúde e desenvolver os sintomas da ICD após a alta hospitalar, representando importante impacto sobre as taxas de infecção na instituição (COHEN et. al., 2014).

Estudo prévio corrobora esta diretriz, evidenciando o início da ICD de cinco a 2.453 dias após TOS, e colite por *C. difficile* representou complicação grave em pacientes pós-transplantados, incluindo megacólon tóxico, ressecção colônica e morte. Além disso, é frequentemente observado aumento dramático da incidência desta complicação, neste centro (STELZMUELLER et. al., 2007).

Para controlar a DN, bem como a disseminação de *C. difficile* no ambiente hospitalar, estratégias devem estar voltadas para o risco potencial de infecção cruzada e de como reduzi-las, adotando-se medidas de controle do uso de antimicrobianos, identificando-se pacientes com DN, isolando os colonizados e infectados, separando-os dos susceptíveis, além da limpeza ambiental com hipoclorito de sódio e apropriada higiene das mãos.

8 CONCLUSÕES

- Nos pacientes internados nas unidades de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC, a incidência da diarreia nosocomial continua sendo importante tipo de infecção hospitalar, comparando-se com estudo anterior neste hospital, e com a literatura vigente.
- Nos pacientes das unidades de Hematologia, Transplante Hepático e Renal do HUWC, a incidência de ICD foi baixa, compatível com a literatura, não configurando um cenário epidêmico.
- A presença da diarreia nosocomial teve implicações clínicas em pacientes internados, repercutindo na duração da hospitalização. Por conseguinte, estes pacientes permaneceram mais tempo expostos a outras infecções nosocomiais em hospital universitário, do Nordeste do Brasil.
- Diarreia nosocomial associada ao *C. difficile* impõe riscos aos pacientes vulneráveis, e a presença de pacientes portadores assintomáticos de *C. difficile* enterotoxigênico alerta para os riscos de infecção cruzada e disseminação intra-hospitalar.
- A etiologia não infecciosa é importante causa da diarreia nosocomial, em pacientes hospitalizados no HUWC.

REFERÊNCIAS

ALBRIGHT, J. B.; BONATTI, H.; MENDEZ, J.; KRAMER, D.; STAUFFER, J.; HINDER, R.; MICHEL, J.A.; DICKSON, R.C.; HUGHES, C.; NGUYEN, J.; CHUA, H.; HELLINGER, W. Early and late onset *Clostridium difficile*-associated colitis following liver transplantation, **Transpl. Int.**, v. 20, p. 856-866, 2007.

ANTONINI S.R.C.; MENEGHIN, S.P.; URASHIMA, A.S.; ANTONINI, S.R.C.; MENEGHIN, S.P.; URASHIMA, A.S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Araras, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2004. Apostila do Curso de Extensão Universitária “Técnicas básicas de biologia molecular”.

ANVISA. Boletim informativo da rede nacional de monitoramento da resistência microbiana, 2009a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/indexhtm>. Acesso em: 02 dez. 2013.

ANVISA. **Corrente sanguínea**: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. 2009b. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/.../manual_corrente_sanguinea.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 maio 2014.

ANVISA. **Sítio cirúrgico**: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. 2009c. Disponível em: <anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/criterios_nacionais_ISC.pdf>. Acesso em: 1 maio 2014.

ANVISA. **Trato respiratório**: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. 2009d. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/.../trato%2Brespiratorio+setembro+2009.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 maio 2014.

ANVISA. **Trato urinário**: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. 2009e. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/.../ITU%2Bfinal%2B02-02-10_setembro+2009.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 maio 2014.

ARMSTRONG, G.D.; PILLAI, D.R.; LOUIE, T.J.; MAC DONALD, J.A.; BECK, P.L. Potential new tool for managing *Clostridium difficile* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 207, p. 1484-1486, 2013.

ASENSIO, A.; VAQUE-RAFAR, J.; CALBO-TORRECILLAS, F.; GESTAL-OTERO, J.J.; LÓPEZ-FERNANDEZ, F.; TRILLA-GARCIA, A.; CANTON, R. Increasing rates in *Clostridium difficile* infection (CDI) among hospitalised patients, Spain 1999-2007. **Euro. Surveill.**, v. 13, n. 7/9, July/Sept. 2008.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR (APECIH). **Infecções hospitalares no Brasil**: uma medida da sua magnitude nos anos 1990 e comparação com os índices europeus. 2008. Disponível em: <http://www.apecih.org.br/infecções_hospitalares.htm>. Acesso em: 12 mar. 2008.

BALASSIANO, I.T.; MIRANDA, K.R.; BOENTE, R.; PAUER, H.; OLIVEIRA, I.C.M.; SANTOS-FILHO, J.; AMORIM, E.L.T. et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains

isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, v. 9, p. 61-64, 2009.

BALASSIANO, I.T.; SANTOS-FILHO, J.; OLIVEIRA, M.P.B.; RAMOS M.C.; JAPIASSU, A.M.; REIS, A.M.; BRAZIER, J.S.; FERREIRA, E. O.; DOMINGUES, R.M.C.P. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 68, p. 449-455, 2010.

BALASSIANO, I.T.; SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M.; NOUÉR, S.A.; SOUZA, C.R.C.; BRAZIER, J.S. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 249-255, 2011.

BARTLET, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, n. 5, p.334-339, Jan. 2002.

BARTLET, J.G. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 1, n. 3, p. 530-539, 1979.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: pseudomembranous colitis and antibiotic associated diarrhea. In: GORBACH, S. L. **Infectious diarrhea**. Chicago: Scientific Publications, 1986. cap. 10, p. 157 – 177.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: Clinical Considerations. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, Suppl. 2, p. 243-251, Jan./Feb. 1990.

BARTLETT, J.G.; GORBACH, S.L.; BARTLETT, J.G.; GORBACH, S.L. Anaerobic infections of the head and neck. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v.9, p. 655-678, 1976.

BENNETT, R.G. Diarrhea among residents of long-term care facilities. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v .14, n.7, p.397-404, July 1993.

BIGNARDI, G.E. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. **J. Hosp. Infect.**, v. 40, n. 1, p. 1-15, 1998.

BLONDEAU, J.M. Macrocyclic antibiotics: a novel class of drug for the treatment of *Clostridium difficile* infection. **Expert Rev. Clin. Pharmacol.**, v. 5, v. 1, p. 9-11, Jan. 2012.

BORGES, S.L.; BRUNO DO VALLE PINHEIRO, B. V.; LIMA, F. H.; PACE, F.H. L.; CHEBLI, J.M.F. Diarréia nosocomial em unidade de terapia intensiva: incidência e fatores de risco. **Arq. Gastroenterol.**, v. 45 , n. 2, abr./jun. 2008.

BORRIELLO, S. P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.41, Suppl. C, p.13-19, 1998.

BOUZA, E.; MUÑOZ, P.; ALONSO, R. Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, Suppl. 4, p. 57-64, 2005.

BRACHMAN, P.S. Nosocomial Infectious Surveillance. **Infect. Control Hospital**

Epidemiology, v. 14, n. 4, p. 195-196, abril, 1993.

BRASIL. Ministério da saúde - Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos [legislação na internet]. Brasília; 2012 [citado 2014 ago. 23]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/3013/reso466_12_12_2012.html.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. Programa de Controle de Infecção Hospitalar. **Conceitos e critérios diagnósticos das infecções hospitalares**. 1998. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html. Acesso em 01. maio 2014.

BRITO, G. A.; CARNEIRO-FILHO, B.; ORIÁ, R.B.; DESTURA, R.V.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. *Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 7, p. 1271-1278, 2005.

BRITO, G.A.; FUJII, J.; CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R. L. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 10, p. 1438-1447, 2002b.

BRITO, G.A.; SULLIVAN, G.W.; CIESLA JR, W.P.; CARPER, H.T.; MANDELL, G.L.; GUERRANT, R.L. *Clostridium difficile* Toxin A alters In Vitro-Adherent Neutrophil Morphology and Function. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 9, p. 1297-1306, 2002a.

C. DIFFICILE TOX A/B II™. An ELISA for the detection of *Clostridium difficile* toxins A and B. Catalog nº T5015 (96 Tests).Blacksburg, VA, USA:Techlab, 2008.

CARBONE, A.; THIOLET, J.M.; FOURNIER, S.; FOURNIER, N.; KASSIS-CHIKHANI, N.; BOYTCHEV, I.; AGGOUNE, M.; SÉGUIER, J.C.; SÉNÉCHAL, H.;TAVOLACCI, M.P.; COLGNARD, B.;ASTAGNEAU, P.; JARLIER, V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, setembro to October 2009. **Euro. Surveill.**, v. 15, n. 48, p. 1-6, 2010.

CARTER, G.P.; ROOD, J.I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. **Trends Microbiol.**, v. 20, n. 1, p. 21-29, Jan. 2012.

CARVALHO, R.H.; GONTIJO FILHO, P.P. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. **BJM**, v. 39, n. 4, p. 623-629, Dec. 2008.

CATANEO, C.; CANINI, S.R.M. S.; CASTRO, P. T.O.; HYASHIDA, M.; GIR, E. Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 19, n. 5, p. 1-8, set./out. 2011.

COHEN, S.H.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; KELLY, C.P.; LOO, V.G.; MCDONALD, L.C.; PEPIN, J.; WILCOX, M.H. *Clostridium difficile* infecção em adultos: 2010 atualização

pela Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) e os Infectious Diseases Society of America (IDSA). Society for Healthcare Epidemiology of America. Infectious Diseases Society of America. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.31, n.5, p. 431-455, 2010.

COUTO, R.C.; CARDOSO, E.R.P.; PEDROSA, T.M.G. História do controle de infecção hospitalar. In: COUTO, R. C.; PEDROSA, T.M.G.; CUNHA, A. F. A.; AMARAL, D.B. **Infecção hospitalar e outras complicações não-infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 1, p. 3-7.

DIAS, M.B.S.; YAMASHIRO, J.; BORRASCA, V.L.; STEMPLIUK, V.A.; ARAÚJO, R.E.; COSTA, S.F.; LEVIN, A.S. Pseudo-outbreak of *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) in a tertiary-care hospital. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 53, n. 3, p. 133-137, 2010.

DIDIÉ, M.E.V. Prevenção das infecções em próteses cardiovasculares e ortopédicas. In: PEDROSA, T.M.G.; COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A.de A.; FONSECA, V.P. **Infecção hospitalar e outras complicações não-infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 25, p. 492-496.

DUBBERKE, E.R.; GERDING, D.N.; CLASSEN, D.; ARIAS, K.M.; PODGORNÝ, K.; ANDERSON, D.J.; BURSTIN, H.; CALFEE, D.P.; COFFIN, S.E.; FRASER, V.; GRIFFIN, F.A.; GROSS, P.; KAYE, K.S.; KLOMPAS, M.; LO, E.; MARSCHALL, J.; MERMEL, L.A.; NICOLLE, L.; PEGUES, D.A.; PERL, T.M.; SAINT, S.; SALGADO, C.D.; WEINSTEIN, R.A.; WISE, R.; YOKOE, D.S. Strategies to prevent *Clostridium difficile* infections in acute care hospitals. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 29, Suppl. 1, p. 81-92, 2008.

DUGGAN, S.T. Fidaxomicin in *Clostridium difficile* infection. **Drugs**, v.7, n.18, p. 2445-2456, 2011.

ERGEN, E.K.; AKALIN, H.; YILMAZ, E.; SINIRTAS, M.; ALVER, O.; ÖZAKIN, C.; BAKKER, D.; ENER, B.; MISTIK, R.; HELVACI, S.; KUIJPER, E.J. Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. **Med. Mal. Infect.**, v. 39, n. 6, p. 382-387, 2009.

ESCOBAR, A.M. U.C.; GRISI, S.J.F.E.; TELLES JUNIOR, M. Diarreia de aquisição intra-hospitalar. In: FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO FILHO, N. (Org.). **Infecções hospitalares e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. cap. 34, p. 734-739.

FEKETY, R.; KIM, K. H.; BROWN, D.; BATTS, D. H.; CUDMORE, M.; SILVA JR, J. Epidemiology of antibiotic-associated colitis: isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. **Am. J. Med.**, v.70, p.906-908, Apr. 1981.

FONTELES, M.; FANG, G.; THIELMAN, N.M.; YOTSEFF, P.S.; GUERRANT, R.L. Role of platelet activating factor in the inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. **J. Lipid. Mediat. Cell. Signal**, v. 11, n. 12, p. 133-143, 1995.

FORSTER, A.J.; TALJAARD, M.; OAKE, N.O.; WILSON, K.; ROTH, V. The effect of hospital-acquired infection with *Clostridium difficile* on length of stay in hospital. **CMAJ**, v.10, p. 37-42, 2012.

GARCÍA-GARCÍA, L.; JIMÉNEZ-CORONA, M.E; RAMÍREZ-LÓPEZ, L.E.; BÁEZ-SALDAÑA, R.; FERREYRA-REYES, L.; FERREIRA-GUERRERO, E.; CANO-ARELLANO, B.; CRUZ-HERVERT, P.; TÉLLEZ-VÁZQUEZ, N.A.; VERDUZCO-RODRÍGUEZ, L.; JARAMILLO-COSME, Y.; LUNA-TÉLLEZ, E.; PONCE DE LEÓN-ROSALES, S. Surveillance of nosocomial infections in a Mexican community hospital. **Salud Publica Mex.**, v. 52, p. 511-516, July 2010.

GAREY, K.W.; GRAHAM, G.; GERARD, L.; DAO, T.; JIANG, Z. D.; PRICE, M.; DUPONT, H. L. Prevalence of diarrhea at a university hospital and association with modifiable risk factors. **Ann. Pharmacother.**, v. 40, p. 1030-1034, 2006.

GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORY, T.G.; HORAN, T. C.; HUGHES, J. M. Center for Disease Control (CDC) definitions for nosocomial infections. 1998. **Am. J. Infect. Control.**, v. 16, p. 128-140, June 1988.

GASH, K.; BROWN, E.; PULLYBLANK, A. Emergency subtotal colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis--is a surgical solution considered for all patients?. **Ann. R. Coll.Surg. Engl.**, v. 92, p. 56-60, 2010.

GEORGE, W.L; SUTTER, V.L; CITRON, D.; FINEGOLD, S.M. Seletive and diferencial medium for isolation of *Clostridium difficile*. **J. Clin. Microbiol.**, v.9, n.2, p.214-219, Feb. 1979.

GINSBURG, P.M.; THULUVATH, P. J. Diarrhea in liver transplant recipients: etiology and management. **Liver Transpl.**, v.11, p. 881-890, 2005.

GOMÉZ, C.Q.; RODRIGUEZ, C.; GAMBOA-CORONADO, M.D.M.; RODRIGUEZ-CAVALLINI, E.; DU, T.; MULVEY, M.R.; VILLALOBOS-ZÚÑIGA, M.; BOZA-CORDEIRO, R. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 669-670, 2010.

GRONCZEWSKI, C.A.; KATS, J.P. *Clostridium difficile* Colitis. Disponível em: <[http://emedicine.medscape.com/article/186458. Overview](http://emedicine.medscape.com/article/186458.Overview)>. Acesso em: 7 maio 2009.

GUERRANT, R. L.; BOBAK, D. A. Bacterial and protozoal gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 5, p. 327-340, 1991.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with description of a new pathogenic anaerobe, **Am. J. Dis. Child.**, v.49, 1935.

HENSGENS, M.P.M.; GOORHUIS, A.; VAN KINSCHOT, C.M.; CROBACH, M. J.; HARMANUS, C.; KUIJPER, E. J. *Clostridium difficile* infection in an endemic setting in the Netherlands. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, p. 587 – 593, 2011.

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

JOHNSON, S.; GERDING, D.N. State-of-the-art clinical article. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1027-1036, May 1998.

KIM, J.; PAI, H.; SEO, M-R.; KANG, J.O. Epidemiology and clinical Characteristics of *Clostridium dificile* in a Korea tertiary hospital. **J. Korean Med. Sci.**, v.26, n. 10, p. 1258-1264, Oct. 2011.

KOFSKY, P.; ROSEN, L.; REED, J.; TOLMIE, M.; UFBERG, D. *Clostridium difficile* a common and costly colitis. **Dis. Colon Rectum**, v. 34, p.244-248, 1991.

LABBÉ, A.C.; POIRIER L; MAcCANNELL, D.; LOUIE, T.; SAVOIE, M.; BÉLIVEAU, C.; LAVERDIÈRE, E. M.; PÉPIN, J. *Clostridium difficile* Infections in a Canadian Tertiary Care Hospital before and during a Regional Epidemic Associated with the BI/NAP1/027 Strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 9, p. 3180-3187, 2008.

LEGARIA, M.C.; LUMELSKY, G.; ROSETTI, S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. **Anaerobe**, v. 9, p. 113-116, 2003.

LIMA, A.A.M.; LYERLY, D.M.; WILKINS, T.D.; INNES, D.J.; GUERRANT, R. L. Effects *Clostridium difficile* toxin A and B in Rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 582-588, 1988.

LIMA, A.A.M.; NASCIMENTO, N.R.F.; FANG, G.D.; YOTSEFF, P.; TOYAMA, M.H.; GUERRANT, R.L.; FONTELES, M.C. Role of phospholipase A2 and tyrosine kinase in *Clostridium difficile* toxin A-induced disruption of epithelial integrity, histologic inflammatory damage and intestinal secretion. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, n. 7, p. 849-857, 2008.

LIMA, A.A.M; INNES, D.J.; CHADEE, K.; LYERLY, D.M.; WILKINS, T.D.; GUERRANT, R. L. *Clostridium difficile* toxin A interactions with mucus and early sequential histopatologic effects in rabbit small intestine. **Lab. Invest.**, v. 61,p. 419-425, 1989.

LIMA, C.P.; PARENTI, C.F. **Crêterios NNISS para o diagnóstico de infec es hospitalares.** Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/aula_NNISS.pdf>. Acesso em: 7 maio 2009.

LIMA, N.L.; GUERRANT, R.L.; KAISER, D.L.; GERMANSON, T.; FARR, B.M.; A retrospective cohort study of nosocomial diarrhea as a risk factor for nosocomial infection. **J. Infect. Dis.**, v.16, p. 948-952, 1990.

LOO, V. G.; POIRIER, L.; MILLER, M.A.; OUGHTON M., LIBMAN, M.D.; MICHAUD S.; BOURGAULT, A.-M.; NGUYEN, T.; FRENETTE, C.; KELLY, M.; VIBIEN, A.; BRASSARD, P.; FENN, S.; DEWAR, K.; HUDSON, T. J.; HORN, R.; RENÉ, P.; MONCZAK, Y.; DASCAL, A. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality. **N. Engl. J. Med.**, v., 353, n. 23, p. 2442-2449, Dec. 2005.

LOO, V.G.; BOURGAULT, A-M.; LOUISE POIRIER, L.; LAMOTHE, F.; SOPHIE MICHAUD, S.; TURGEON, M.P.M.N.; TOYE, B.; BEAUDOIN, A.; FROST, E.H.; GILCA, M.; BRASSARD P.; DENDUKURI, N.; BÉLIVEAU, C.; OUGHTON, M.; BRUKNER, I.; AND DASCAL, A. Host and Pathogen Factors for *Clostridium difficile* Infection and Colonization. **N. Engl. J. Med.**, n. 365, p. 1693-703, Nov. 2011.

MAES, B.; HADAYA, K.; MOOR, B.; CAMBIER, P.; PEETERS, P.; DE MEESTER, J.; DONCK, J.; SENNESAEL, J.; SQUIFFLET, J.P. Severe Diarrhea in Renal Transplant Patients: Results of the DIDACT Study. **Am. J. Transplant.**, v.6, n. 6, p. 1466-1472, June 2006.

MANIAN, F. A.; ARADHYULA, S.; SENKEL, D.; SETZER, J.; WIECHENS, M.; MEYER, P. L. Is it *Clostridium difficile* infection or something else? A case control study of 352 hospitalized patients with new-onset diarrhea. **South. Med. J.**, v. 100, n. 8, p. 782-786, 2007.

MARCON, A.P.; GAMBA, M.A.; VIANNA, L.A.C. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 6, p. 384-389, Dec. 2006.

MARRA, A. R.; EDMOND, M.B.; WENZEL, R.P.; BEARMAN, G.M.L. Hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated disease in the intensive care unit setting: epidemiology, clinical course and outcome. **BMC Infect. Dis.**, v. 7, n. 42, p. 1- 6, 2007.

McFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microbiol. Ecol. Health. Dis.**, v.12 , n. 4, 193 –207, 2000b .

McFARLAND, L.V. A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. **Microbiol. Ecol. Health. Dis.**, v.12, n. 2, 65 –76, 2000a.

McFARLAND, L.V., Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? **J. Med. Microbiol.**, v. 54 n. 2, p. 101-111, 2005.

McFARLAND, L.V. Epidemiology of infectious and iatrogenic nosocomial diarrhea in a cohort of general medicine patients. **Am. J. Infect. Control.**, v. 23, p. 295-305, 1995.

MELO FILHO, A.A.; SOUZA, M.; LYERLY, D.M.; CUNHA, F.Q.; LIMA, A.A.M.; RIBEIRO, R.A. Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. **Toxicon**, v. 35, n. 5. p. 743-752, 1997.

MESQUITA, A.M.R. C.; RODRIGUES, J.L. N.; MESQUITA, V. P.; LIMA, N. L.; LIMA, A.A.M. Diarreia nosocomial e outras infecções adquiridas em hospital universitário. **Rev. Cienc. Med. Biol.**, v. 10, n. 1, p. 54-61, jan./abr. 2011.

MOHAN, S. S.; MCDERMOTT, B. P.; PARCHURI, S.; CUNHA, B. Lack of value of repeat stool testing for *Clostridium difficile* toxin 2007. **Am. J. Med.**, v. 119, n. 4, p. 356-358, 2007.

MÖLBY, R.; ARONSON, B.O.; NORD, C.E. Pathogenesis and diagnosis of *Clostridium difficile* enterocolitis. **Scand. J. Infect. Dis.**, Suppl. 46, p. 47-56, 1985.

MONTEIRO, J.A. Infecções nosocomiais. Alguns aspectos. **Acta Méd. Port.**, v. 6, p. 135-140, abr. 1993.

NEFF, G.; ZACHARIAS, V.; KAISER, T.E.; GADDIS, A.; KEMMMER, N. Rifaximina for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* after liver transplantation: A case series. **Liver Transplant.**, v. 16, p. 960-963, 2010.

NEVES, O.P.; PIMENTEL, C.F.M.G.; SOARES JÚNIOR, C.; PAULO, G. A.; COSTA, S.M.C.R. Colite pseudomembranosa simulando abdome agudo cirúrgico — relato de caso. **Rev. Med. Minas Gerais** , v. 18, n. 1, p. 63 – 66, 2008.

O'DONOGHUE, C.; KYNE, L. Update on *Clostridium difficile* infection. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 27, p. 38-47, 2011.

OUGHTON, M.; LOO, V.; DENDUKURI, N.; FENN, S.; LIBMAN, M. P68 soap and water are superior to alcohol rub and antiseptics wipes for removal of *Clostridium difficile* by hand washing: a randomized controlled trial. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 30, n. 10, p. 939-944, 2009.

PEDROSA, T.M.G.; COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A. A.; FONSECA, V. P. Eficácia dos programas de controle de infecção hospitalar – impacto nos custos da assistência médica. In: PEDROSA, T.M.G.; COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A. A.; FONSECA, V.P. **Infecção hospitalar e outras complicações não - infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 3, p. 31-41.

PÉPIN, J.; SAHEB, N.; COULOMBE, M-A.; ALARY, M-E.; CORRIVEAU, M-P.; AUTHIER, S.; LEBLANC, M.; RIVARD, G.; BETTEZ, M.; PRIMEAU, V.; NGUYEN, M.; LANTHIER, L. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 9, p. 1254-1260, 2005.

PÉPIN, J.; VALIQUETTE, L.; ALARY, M.E.; VILLEMURE P.; PELLETIER A.; FORGET, K.; PÉPIN, K.; CHOUINARD, D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. **CMAJ**, v.171, n. 5, p.466-72, Aug. 2004.

PETERSON, L.R.; MANSON, R.U.; PAULE, S.M.; HACEK, D.M.; ROBICSEK, A.; THOMSON JR, R.B.; KAUL, K.L. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis**, v. 45, n. 9, p. 1152-1160, 2007.

PICKERING, L. K. Therapy for acute infectious diarrhea in children. **J. Pediatr.**, v. 118, n. 4 pt. 2, p. 118-127, 1991.

PITTET, D.; TARARA, D.; WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients, excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. **JAMA**, v. 271, n.20, p. 1598 – 1601, May 1994.

POLAGE, C.R.; SOLNICK, J.V.; COHEN, S.H. Nosocomial diarrhea: evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 7, p. 982-989, 2012.

POPOFF, M.R.; GENY, B. Rho/Ras-GTPase-dependent and – independent activity of *Clostridial* glucosylating toxins. **J. Med. Microbiol.**, v. 60, p.1057-1069, 2011.

POUTANEN, S.M.; SIMOR, A.E. *Clostridium difficile*- associated diarrhea in adults. **CMAJ**, v., 171, n., 1, p. 51-58, July, 2004.

PREDRAG, S.; BRANISLAVA, K.; MIODRAG, S.; SELIMOVIC BILJANA, M.; SUZANA, T.; TASIC NATASA, M.; TATJANA, B. Clinical importance and representation toxigenic and non-toxigenic *Clostridium difficile* cultivated from stool samples of hospitalized patients. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 215-223, 2012.

PRICE, A.B.; DAVIES, D.R. Pseudomembranous colitis. **J. Clin. Pathol.**, v. 30, p. 1-12, 1977.

RIBEIRO, T.C. R.; CHEBLI, L.A.; MALHEIROS, A.P.R.; GABURRI, D.; MATTAR, P.T.; PEIXOTO, D. S.; BERTOLINI, D.; PONZO, C.K.N.; PINHEIRO, B. V.; FERREIRA, L.E.V.V. C.; GABURRI, P.D.; SOUZA, A.F.M.; CHEBLI, J.F. Diarreia nosocomial: aspectos epidemiológicos de um problema emergente. **HURevista**, v. 24, n. 2/3, p. 16-22, maio/dez. 1998.

ROCHA, M.F.G.; MAIA, M.E.; BEZERRA, L.R.; LYERLY, D.M.; GUERRANT, R.L.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A.M. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha and leukotrienes. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 7, p. 2440-2446, 1997.

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.G.; LIMA, A.A.M. *Clostridium difficile* como agente inductor da diarreia inflamatória. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, v.32, p. 47-52, jan./fev. 1999.

ROCHA, M.F.G.; SOARES, A.M.; FLORES, C.A.;STEINER, T.S.; LYERLY, D.M.; GUERRANT, R.L.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A.M. Intestinal secretory fator released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1 β . **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4910-4916, 1998.

RODRIGUES, R.S.; OLIVEIRA, R.A.C.; LI, Y.; ZAJA-MILATOVIC, S.; COSTA, L.B.; BRAGA NETO, M.B.; KOLLING, G.L.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L.; WARREN, C.A. Intestinal epithelial restitution after TcdB challenge and recovery from *Clostridium difficile* infection in mice with alanyl-glutamine treatment. **J. Infect. Dis.**, v. 207, n.10, p. 1505-1515, 2013.

RUPNIK, M.; GRABNAR, M.; GERIC, B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. **Anaerobe**, v. 9, n.6, p. 289-294, 2003.

SAMORE, M.H.; DEGIROLAMI, P. C.; TLUCKO, A.; LICHTENBERG, D. A.; MELVIN, Z. A.; KARCHMER, A. W. *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. **Clin. Infect. Dis.**, v.18, p. 181-187, 1994.

SANTOS, A.A.; BRAGA-NETO, M.B.; OLIVEIRA, M.R.; FREIRE, R.S.; BARROS, E.B.; SANTIAGO, T.M.; REBELO, L.M.; MERMELSTEIN, C.; WARREN, C.A.; GUERRANT, R.L.; BRITO, G.A. Glutamine and alanyl-glutamine increase RhoA expression and reduce *Clostridium difficile* toxin-A-induced intestinal epithelial cell damage. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p.1-13, 2013.

SCHUTZE, M.D.; WILLOUGHBY JR, R.E. Policy offers recommendations on managing *C. difficile* infections in pediatric patients. **AAP News**, v. 131, p.196-200, 2013.

SCHWABER, M.J.; SIMHON, A.; BLOCK, C.; ROVAL, V.; FERDERBER, N.; SHAPIRO, M. Factors associated with nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile*-associated disease on the adult wards of a urban tertiary care hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 9-15, 2000.

SHIELDS, R.K.; CLANCY, C.J.; GILLIS, L.M.; KWAK, E.J; SILVEIRA, F.P; MASSIH, R.C.A.; ESCHENAUER, G.A.; POTOSKI, B.A.; NGUYEN, M.H. Epidemiology, Clinical Characteristics and Outcomes of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections among Solid Organ Transplant Recipients. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. 1932-6203, 2012.

SILVA JR, M. Recentes mudanças da infecção por *Clostridium difficile*. **Einstein (São Paulo)**, v.10, n.1, p. 105-109, 2012.

SILVA, C.H.P.M.; SALVINO, C.R. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções por *Clostridium difficile*. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v.35, n.2, p. 65-71, 2003.

SILVA, J.D.; VELOSO, N.; GODINHO, R.; ROSA, I.; GONÇALVES, L.; MEDEIROS, I.; VIVEIROS, C. Diarreia associada ao *Clostridium difficile* – casuística de 8 anos. **J. Port. Gastreterol.**, v. 19, n. 6, p. 284-289, maio 2012.

STELZMUELLER, I.; GOEGELE, H.; BIEBI, M.; WIESMAYR, S.; BERGER, N., TABARELLI, W.; RUTTMANN, E.; ALBRIGHT, J.; MARGREITER, R.; FILLE, M.; BONATTI, H. *Clostridium difficile* Colitis in Solid Organ Transplantation—A Single-Center Experience. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52, p. 3231-3236, 2007.

SUNENSHINE, R.H.; MACDONALD, L.C. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. **Cleve. Clin. J. Med.**, v. 73, n.2, p.187-197, 2006.

SURAWICZ, C.M.; BRANDT, L.J.; BINION, D.G.; ANANTHAKRISHNAN, A.N.; CURRY, S.R.; GILLIGAN, P.H.; MCFARLAND, L.V.; MELLOW, M. AND ZUCKERBRAUN, B.S. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Practice guidelines. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 108, p. 478-498, 2013.

TEDESCO, F. J. Pseudomembranous colitis: pathogenesis and therapy. **Med. Clin.North Am.**, v. 66, n.33, p.655-664, May 1982.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Hospital Universitário Walter Cantídio. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar – CCIH. **Informações 2013**. Fortaleza, 2014.

VAISHNAVI, C. Established and potential risk factors for *Costridium dificile* infection. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 27, n. 4, p. 289-300, 2009.

VIEIRA, A.M.; MACHADO, M.V.; LITO, L.; CRISTINO, J.M.; FERNANDES, A.; MALDONADO, R.; VALENTE, A.; PALMA, R.; ALEXANDRINO, P.; VELOSA, J. Diarreia associada a *Clostridium difficile* num hospital central. **J. Port. Gastreterol.**, v.17,

n. 3, p. 10-17, jan. 2010.

VISIER, N.; LAMBERT, M.L.; DELMÉE, M.; BROEK, V.; CATRY, B. Nosocomial and non-nosocomial *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients in Belgium – compulsory surveillance data from 2008 to 2010. **Euro. Surveill.**, v. 16, n. 43, Oct. 2011.

WANKE, C. A.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Infectious diarrhea in tropical and subtropical regions. **Baillieres Clin. Gastroenterol.**, v. 1, n. 2, p. 335-339, 1987.

WARNY, M.; PEPIN, J.; FANG, A.; KILLGORE, G.; THOMPSON, A.; BRAZIER, J.; FROST, E.; McDONALD, L.C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet**, v. 366, n. 24, p. 1079-1084. 2005.

WENISCH, J.M.; SCHMID, D.; KUO, H.-W.; SIMONS, E.; ALLERBER, F.; MICHL, V.; TESLAK, P.; TUCEK, G.; WENISCH, C. Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: determinants for severe disease. **Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis**, v.31 , n.8, p. 1923-1930, Aug. 2012.

WISTRÖN, J.; NORRBY, S.R.; MYHRE, E.B.; ERIKSSON, S.; GRANSTRÖM, G.; LAGERGREN, L.; ENGLUNG, G.; NORD, C.E.; SVENUNGSSON, B. Frequency of antibiotic-associated diarrhea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, n. 1, p. 43-50, 2001.

**APÊNDICE A – ROTEIRO DE COLETA DE DADOS DO ESTUDO CASO-
CONTROLE DE PACIENTES COM DIARRÉIA NOSOCOMIAL E OUTRAS
INFECÇÕES ADQUIRIDAS NO HUWC**

FOLHA Nº

1. DADOS DEMOGRÁFICOS DO PACIENTE

Nome _____

Idade _____ Sexo _____ (1= Masc.; 2= Fem.)

2. DADOS HOSPITALARES

Prontuário _____ Leito Nº _____

A. Unidade de Internação _____ (1= Clínica I;
2 = Transplante). Data de Admissão _____
de Alta _____ Duração da
_____ Internação (dias).

Óbito _____ (1= sim; 2= não).

3. CARACTERÍSTICAS DA DIARRÉIA HOSPITALAR

A. Consistência B. Frequência

| 1 | Líquida s/ muco, s/ pus, s/ sangue ___ x ao dia

| 2 | Líquida c/ muco, c/ pus, c/ sangue ___ x ao dia

| 3 | Líquida c/ muco _____ x ao dia

| 4 | Líquida c/ pus _____ x ao dia

| 5 | Líquida c/ sangue _____ x ao dia

4. SINTOMAS ADICIONAIS

Vômitos 1 = sim Dor abdominal 1 = sim
2 = não 2 = não

Febre 1 = sim _____ Pico Febril
2 = não

5. DADOS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO

A. Citotoxina positiva para *Clostridium difficile*

Teste ELISA 1 = positivo
2 = negativo

B. Leitura/quantificação de DNA de *C. difficile*

Reação PCR 1 = positivo
2 = negativo. Peso molecular _____ pb.

C. Genótipo das toxinas de *Clostridium difficile* 1 = positivo
2 = negativo

Gene tcdA Gene tcdB

Gene tcdA/tcdB

B. Laudos Diagnósticos

Hipótese diagnóstico/ Diagnóstico principal

C.I.D. _____ DATA _____.
Diagnóstico secundário

C.I.D. _____ DATA _____.

C. Amostra

Data da Coleta _____ Hora _____ Nº _____
Consistência _____ (1 = normal; 2 = pastosa; 3 = líquida)

Data de: Início ____/____/____ Término ____/____/____
Duração da diarreia _____ (dias)

C. DADOS DE INVESTIGAÇÃO

| 1 | Enfermaria com paciente com diagnóstico GI
| 2 | Uso comunitário de sanitário de paciente com diarreia

Recorrência da diarreia _____ Nº vezes/dia _____

1 = sim 2 = não Nº de dias _____

Tenesmo 1 = sim
2 = não

D. Lactoferrina fecal 1 = positivo/2 = negativo

E. Citocinas fecais 1 = positivo/2 = negativo
c/inibidores de proteases

F. Extração de DNA na saliva
1 = positivo/2 = negativo. Peso Molecular _____ pb.

Microrganismo
identificado: _____

6. FATORES DE RISCO

Código	especificação	Dias	início	término
[6.1]	Anti-úlceras	___	__/__/	__/__/
[6.2]	Anti-ácidos	___	__/__/	__/__/
[6.3]	Antibióticos	___	__/__/	__/__/
[6.4]	Valaciclovir	___	__/__/	__/__/
[6.5]	Corticoterapia	___	__/__/	__/__/
[6.6]	Cirurgia GI	___	__/__/	__/__/

Código	especificação	Dias	início	término
[6.7]	Alimentação enteral	___	__/__/	__/__/
[6.8]	Hipoalbuminemia	___	__/__/	__/__/
[6.9]	Quimioterapia	___	__/__/	__/__/
[6.10]	Freq. Admissões	___	__/__/	__/__/
[6.11]	Grave doença base	___	__/__/	__/__/
[6.12]	Imunossupressor	___	__/__/	__/__/

7. USO DE ANTIBIÓTICOS

Via	Código	Dias	Início	Término
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/

Via	Código	Dias	Início	Término
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/
___	[][]	___	__/__/	__/__/

8. TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Agente Antimicrobiano	Código	especificação	Sensível	Resistente
Indeterminado	[]	_____	_____	_____
	[]	_____	_____	_____
	[]	_____	_____	_____
	[]	_____	_____	_____

Agente Antimicrobiano	Código	especificação	Sensível	Resistente
Indeterminado	[]	_____	_____	_____
	[]	_____	_____	_____
	[]	_____	_____	_____
	[]	_____	_____	_____

9. AGENTES ANTIMICROBIANOS – CODIFICAÇÃO

- 01.Ácido Nalidíxico
- 02.Ácido Oxolínico
- 03.Ácido pipemídico
- 04.Amicacina
- 05.Amoxicilina
- 06.Ampicilina
- 07.Anfotericina
- 08.Aztreonam
- 09.Bacitracina
- 10.Carbenicilina
- 11.Cefaclor
- 12.Cefalexina
- 13.Cefalonidina
- 14.Cefalotina
- 15.Cefazolina
- 16.Cefepime
- 17.Cefotaxima
- 18.Cefoxicitina
- 19.Cefperazona
- 20.Ceftazidima
- 21.Ceftriaxona

AGENTES ANTIMICROBIANOS – CODIFICAÇÃO

- 22.Cetoconazol
- 23.Ciprofloxacina
- 24.Clindamicina
- 25.Cloranfenicol
- 26.Cloxacilina
- 27.Colistina
- 28.Dicloxacilina
- 29.Doxicilina
- 30.Estreptomicina
- 31.Fluconazol
- 32.Gentamicina
- 33.Imipenem
- 34.Isoniazida
- 35.Itraconazol
- 36.Kanamicina
- 37.Levofloxacina
- 38.Lincomicina
- 39.Meropenem
- 40.Meticilina

APÊNDICE B – XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA



VIII Congresso Brasileiro de Infectologia

<http://www.infecto2013.com.br>

1 - **SESSÃO** **DE** **PÔSTER** **1**
 01/09/2013 08:30 - 18:00
 ÁREA DE EXPOSIÇÃO

DIARRÉIA NOSOCOMIAL E OUTRAS INFECÇÕES ADQUIRIDAS EM HOSPITAL DE GRANDE PORTE

ANA MARIA CARDOSO MESQUITA¹; MARTA MARIA COSTA FREITAS²; JORGE LUIZ NOBRE RODRIGUES³; ALDO ANGELO MOREIRA LIMA⁴.
 1,2,3.HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTIDIO, FORTALEZA - CE - BRASIL; 4.DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA DE UFC, FORTALEZA - CE - BRASIL.

Palavras-chave: Infecção hospitalar; *Clostridium difficile*; diarreia nosocomial.

Introdução: Infecção hospitalar (IH) é aquela adquirida após a admissão do paciente, manifestando-se na internação ou após a alta, se relacionada com a hospitalização ou procedimentos hospitalares. Diarreia associada à *Clostridium difficile* (DACd) é uma das principais causas da diarreia infecciosa e está relacionada à assistência à saúde (RAS). Os principais fatores que predispõem a DACd são a antibioticoterapia, a idade avançada, o tempo de hospitalização. O espectro de lesão desta bactéria engloba o portador assintomático, diarreia associada aos antibióticos, colite pseudomembranosa e colite fulminante. **Objetivo:** Determinar a incidência da diarreia nosocomial (DN), o risco associado à *Clostridium difficile* (CD) e outras infecções hospitalares em pacientes vulneráveis. **Metodologia:** No Hospital Universitário da UFCE, em Fortaleza, um estudo caso – controle prospectivo foi conduzido de 06/ Fev/12 a 05/Fev/13. **Casos:** Pacientes com diarreia nosocomial. **Controles:** Os que não adquiriram diarreia. DN foi detectada em 3 visitas semanais nos leitos de Hematologia, Tx Hepático e Renal. Controles foram pareados por idade, sexo, data de admissão, Clínica, permanência e diagnóstico do caso. DN foi definida como fezes de consistência líquida, 3 ou mais vezes em 24 horas, após 72 horas de admissão, sem outras causas inflamatórias ou procedimentos diagnósticos. Foi realizado ensaio imunoenzimático que detecta toxinas A e B de CD (ELISA TOX A/B II, TechLab, USA). Demais infecções foram investigadas através das fichas de notificação de infecção hospitalar (IH). **Resultados:** O índice geral de infecção hospitalar (IH) foi de 7,17%, em 2012. No estudo caso-controle foi de 7,78%. A incidência da DN foi 4,76% (44 casos para 925

altas). 72 pacientes controles foram pareados com os casos. CD foi encontrado em: caso [1/43 (2,32%)], controle [3/72 (4,17%)]. As topografias por intensidade de acometimento e os patógenos causadores de IH foram **trato urinário (54%)**: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* e *Pseudomonas spp.*, *Burkholderia cepacia* e *Serratia rubideae*; **sanguínea (32%)**: *Staphylococcus spp.*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae complex* e *K. pneumoniae ssp pneumoniae* e *Serratia marcescens*, **sítio cirúrgico (11%)**: *Acinetobacter baumannii*, *Elizabethkingea meningoseptica*, *K. pneumoniae ssp pneumoniae*, **partes moles (4%)**: *E. coli*. **Discussão**: Estes agentes são referência em surtos hospitalares. Ocorrência de CD em pacientes controles sugere a condição de transportador assintomático, transmissão via fecal-oral e propagação de esporos no ambiente hospitalar. *E. coli* é principalmente associada com trato urinário em IH relacionada à assistência à saúde. *Klebsiella* em IH urinárias e pneumonias. *A. baumannii* é uma importante causa de IH, superada pela *P. aeruginosa*. **Conclusão**: Atualização da epidemiologia local promove o controle das IH. DN impõe riscos aos já debilitados. Medidas de controle da DN devem ser enfatizadas, além de pesquisa para outros enteropatógenos.

ANEXO – A

DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA/HUWC

HUWC/UFC
Comitê de Ética em Pesquisa
Cód CEP- 303.09.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuws@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 108.09.09
Pesquisadora Responsável: Ana Maria Ribeiro Cardoso Mesquita
Departamento / Serviço: CEAPS
Título do Projeto: “Diarréia nosocomial associada à *Clostridium difficile*, fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana e fatores de virulência”

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou em reunião ordinária o projeto de pesquisa supracitado e baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO.**

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 09/10/10).

Fortaleza, 09 de outubro de 2009.

Dra. Mônica Cardoso Façanha
Coordenadora do CEP-HUWC

ANEXO - B
DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA/HUWC

HUWC/UFC
Comitê de Ética em Pesquisa
Cód CEP- 408 09 09



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo - 60 430-370 - Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 108.09.09
Pesquisador Responsável: Ana Maria Ribeiro Cardoso Mesquita
Departamento / Serviço:
Título do Projeto: "Diarréia nosocomial associada à *Clostridium difficile*, fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana e fatores de virulência".

Prezada pesquisadora,

Em resposta à solicitação datada de 14 de fevereiro de 2011, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio/UFC informa ter aprovado a extensão da coleta de dados da referida pesquisa aos pacientes pós-transplantados, tendo em vista as justificativas e esclarecimentos apresentados.

Atenciosamente,

Fortaleza, 05 de abril de 2011.


Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC

ANEXO – C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você a participar do projeto de pesquisa intitulado diarreia nosocomial associada à *clostridium difficile*, fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana e fatores de virulência. Este projeto tem por objetivo estudar as diarreias ocorridas no Hospital Universitário Walter Cantídio e identificar fatores que fazem com que estas doenças ocorram e como podem ser prevenidas.

Para realizarmos este estudo precisamos de sua participação colhendo uma amostra de fezes e uma amostra de saliva, que serão enviadas ao laboratório para serem examinadas. Não haverá riscos ou desconfortos para você. A amostra de fezes deverá ser colhida por eliminação espontânea, sem uso de laxantes ou qualquer outro tipo de procedimento. E sua salvação não será estimulada, portanto é só cuspir no recipiente. Estudos adequados da diarreia de origem hospitalar podem beneficiar todos os pacientes, através de medidas de prevenção e de controle a serem implantadas pela Instituição, além de especificar o tratamento mais apropriado para os pacientes acometidos por esta doença e daqueles que estão sob risco.

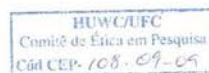
Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas para estudo e seu nome não será mencionado. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Não haverá gastos, nem compensações financeiras para você. Além disso, você terá o direito de ficar sabendo dos resultados obtidos, que forem do conhecimento do pesquisador.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso ao profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecer qualquer dúvida. O principal investigador é a **Dra. Ana Maria Ribeiro Cardoso Mesquita** que pode ser encontrada no endereço: Rua Joaquim Manoel Macedo, 1221, Bairro Henrique Jorge; telefones: 3366-8153/3290-1125. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589; E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br. Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo solicitamos que assine no espaço abaixo.

..... Data ____/____/____
Assinatura do Paciente/ representante legal

..... Data ____/____/____
Assinatura da testemunha

..... Data ____/____/____
Assinatura do responsável pelo estudo



ANEXO D

TESTE PARA TOXINA A/B II TM DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* (*Clostridium difficile* TOX A/B teste from Techlab, Blacksburg, V.A., U.S.A.)

Objetivo:

C. difficile TOX A / B II é um ensaio imunoenzimático para detecção de toxinas A e B produzidas por estirpes toxigênicas de *Clostridium difficile*. Ele pode ser usado para detectar as toxinas A e B, em amostras fecais de pessoas suspeitas de terem a doença causada por esta bactéria. O teste é para ser usado como um auxiliar no diagnóstico da doença causada por *C. difficile* e os resultados devem ser considerados em conjunto com a história do paciente.

Princípio:

Este teste utiliza anticorpos para a detecção da toxina A e B de *Clostridium difficile*. Os poços de microtitulação fornecidos com o kit contém anticorpo policlonal de cabra imobilizado e purificado por afinidade contra as toxinas A e B. No ensaio, uma alíquota da amostra fecal é emulsionada no *diluyente* e a amostra diluída é então transferida para o poço de microtitulação, contendo o anticorpo de detecção. Se as toxinas A e B estão presentes na amostra, se ligarão ao anticorpo de detecção e ao anticorpo policlonal imobilizado durante a fase de incubação. Qualquer material não ligado é removido durante os passos de lavagem. Após a adição do substrato, a cor é detectada devido ao complexo enzima-anticorpo-antígeno, que se forma na presença de toxina. O anticorpo de detecção é constituído por um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase e a toxina B de anticorpo policlonal conjugado com *peroxidase*.

Materiais necessários:

Kit Tox A/B teste para *C. difficile* (Techlab); pipetas; geladeira de 2°C a 8°C; incubador a 37°C; misturador vortéx, água destilada, espectrofotômetro, tubos para a diluição das amostras; cronômetro; papel toalha; container para descarte.

Precauções:

1. Usar luvas durante o procedimento;
2. Reagentes de diferentes kits não devem ser misturados. Não usar um kit após a data de validade;
2. Os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes do uso;
3. As tampas e pontas dos tubos dos reagentes são codificadas por cores, não misturá-las;
4. Ao manusear poços de ensaio, não riscar o fundo dos poços, porque isto pode resultar em leituras elevadas de absorbância.

5. Segurar frascos conta-gotas verticalmente para deixar cair a gota sem demora e do tamanho certo;
6. As amostras e poços de microtitulação utilizadas devem ser imediatamente descartadas após o uso, como material potencialmente contaminado.
7. Os reagentes contêm 0,2% de timerosal como conservante e devem ser manuseados com precauções laboratorial normal.
8. A *solução de paragem* contém 0,6 N de ácido sulfúrico. Lavar com água imediatamente se ocorrer contato.
9. Não retirar poços de ensaio até pouco antes do teste. Micro poços não utilizados podem ser colocados de volta na embalagem original, com o dessecante para os proteger da humidade;
10. Executar o procedimento de lavagem conforme as instruções para evitar altas reações de fundo.
11. Para obter resultados óptimos use amostras fecais em 24 horas de coletadas. As amostras que estão congeladas (-20 ° C ou menos) podem perder atividade devido ao congelamento e descongelamento.
12. O *substrato* é sensível à luz e deve ser protegido da luz solar direta ou de fontes de UV.

Preparo e manuseio das amostras:

Não utilizar amostras que foram coletadas ou armazenadas em formalina a 10%, MF, SAF, ou PVA fixadores. Sempre que possível, testar amostras de fezes com menos de 24 horas de coleta. Armazenar amostras a -20 ° C, ou inferior, se o teste não pode ser realizada no prazo de 48 horas após a coleta. Amostras devem ser transportadas e diluído no diluente de kit, logo que possível. O diluente foi formulado para estabilizar as toxinas em amostras fecais e minimizar a degradação.

Preparando-se amostras diluídas:

Preparar um tubo de diluição para cada amostra a ser testada. Adicionar 200 µL *diluente* para cada tubo. Etiquetar o tubo diretamente sobre o lado.

Preparando-se amostras para fezes formadas, utiliza-se uma vareta aplicadora para transferir a amostra fecal para o tubo. Transfere-se uma quantidade igual em torno de 3 mm de diâmetro, com o aplicador para o *diluente*. Para **fezes líquidas**, usa-se uma pipeta de plástico para transferir 50 µL de amostra para tubo.

Homogeneizar os tubos por 10 segundos e armazenar entre 2 ° e 8 ° C até que o ELISA seja realizado. Homogeneizar, novamente, antes de transferir a amostra diluída para a micro titulação. Isto assegura uma mistura completa da amostra.

Procedimento do teste:

1. Adicionar uma gota (50 μ L) do *Conjugado* (tampão vermelho) a cada poço. Certifique-se de segurar o tubo verticalmente ao adicionar as gotas. Use um poço para cada amostra de fezes, um poço para o *controle positivo* e um poço para o controle negativo. Marcar a posição de cada poço.
2. Transferir 100 μ L das amostras diluídas (2 gotas, utilizando uma pipeta de transferência do kit acessório). Adicione 1 gota (50 μ L) para o *Controle Positivo* (tampa preta) e 50 μ L do controle negativo (ou seja, o próprio diluente) .
3. Cortar a folha de plástico adesiva com o tamanho necessário para cobrir os poços. e incubar a $37\text{ C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ durante 50 minutos e Incubar a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos.
4. Descartar o conteúdo dos poços e lavá-los com solução de lavagem. Cobrir a placa com uma toalha de papel seco e repetir a lavagem quatro vezes usando uma toalha de papel seca de cada vez. Se quaisquer partículas são vistas nos poços, continuar a lavagem até que toda partícula seja removida.
6. Remover completamente todo o líquido residual nas cavidades batendo a placa mais uma vez em uma toalha de papel seco até remover todo o excesso de líquido. Descarte de toalhas de papel e recipientes de amostras corretamente.
7. Após a lavagem, adicionar duas gotas (100 μ L) de tampão *de substrato* (azul) a cada poço. Agitar levemente os poços para misturar o substrato. Incubar os poços à temperatura ambiente durante 10 minutos. Bata levemente os poços novamente em 5 minutos.
8. Adicionar 1 gota de *solução de parada* (tampa amarela) a cada poço. Bater levemente os poços e esperar dois minutos antes da leitura. A adição da *solução de parada* converte a cor azul a uma cor amarela que pode ser quantificada através da medição da densidade óptica a 450 nm num leitor de microplacas ELISA em filtro de 450 nm. Seque a parte inferior de cada poço antes de se medir a densidade óptica. Leia dentro de dez minutos após a adição *da solução de parada*.
9. Registrar os valores de absorbância para o controle positivo, controle negativo, e cada amostra testada.

Notas:

1. Leitor de ELISA [Especificações: espectrofotômetro *Microplate ELISA Reader* (BIO-RAD, USA) em filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm.]

78

2. Não é possível distinguir qual toxina é detectada, visto que o kit detecta ambas as toxinas simultaneamente.
3. A lavagem dos poços foi realizada de forma manual, assim como as diluições.

Fortaleza, 16 de maio 2013.

ANEXO E

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE FEZES

Projeto: Diarreia Nosocomial Associada ao *Clostridium difficile*, Fenótipo e Genótipo de Resistência Antimicrobiana e Fatores de Virulência.

SOP

Recepção e Armazenamento de Amostra de Fezes

1. Objetivo:

Este documento descreve os procedimentos para o recebimento de amostras de fezes coletadas dos sujeitos do estudo. Os procedimentos são designados para manter a integridade das amostras clínicas através de manipulação, armazenagem e manuseio adequados dos registros associados.

2. Responsabilidade:

O coordenador de campo é responsável por garantir que a metodologia padrão descrita aqui seja seguida na coleta e transporte de fezes.

3. Material

- 3.1 Criotubos;
- 3.2 Refrigerador;
- 3.3 Freezer -20 e -70°C;
- 3.4 Etiquetas com código de barra para identificação das amostras;
- 3.5 Racks para criotubos;
- 3.6 Computador com programa Controle de amostras_LDI;
- 3.7 Impressora de código de barra;
- 3.8 Leitor de código de barras;
- 3.9 Caixas para estocagem;

4. Procedimento

4.1 Segurança

- A. As precauções universais devem ser seguidas durante o manuseio das amostras. (http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation_standard.html).
- B. Os técnicos devem usar equipamentos de proteção individual (EPI) adequados (ex. luvas, máscaras, etc.) durante o manuseio das amostras, bem como durante o manuseio de itens no freezer.
- C. Desinfetar as áreas de trabalho antes e após a realização destes procedimentos.

4.2 Recebimento das Amostras de fezes

- A. O técnico do laboratório irá receber as amostras e assinar o protocolo de recebimento;
- B. O Laboratório de Doenças infecciosas funciona de Segunda a Sexta das 09:00 às 17:00 horas;
- C. Ao chegarem, as amostras serão etiquetadas com código de barra e darão entrada no formulário de registro de recebimento;
- D. As amostras devem estar sob refrigeração entre 2-8°C.

4.3 Aliquotagem e armazenamento

A. Serão armazenadas 4 alíquotas de fezes sem conservante que serão armazenadas para os testes a que se propõem;

B. As amostras terão posição definida dentro dos congeladores e caixas depois que dão entrada no sistema de Controle de amostras.

5. Referências

- DMID Protocol 05-0071: Micronutrient Intervention in Brazil Long Term Impact and Intervention with Micronutrients
- Orientation Manual: Good Clinical Practices (17Jan.1997)