



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

CATARINA TENÓRIO DE LIMA

DIARREIA NOSOCOMIAL POR *Clostridioides difficile*: PREVALÊNCIA, RESPOSTA CLÍNICA, DESFECHO, FATORES DE RISCO E CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS EM HOSPITAIS DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO PERÍODO DE 2017 A 2019 EM RECIFE-PE

Recife

2021

CATARINA TENÓRIO DE LIMA

DIARREIA NOSOCOMIAL POR *Clostridioides difficile*: PREVALÊNCIA, RESPOSTA CLÍNICA, DESFECHO, FATORES DE RISCO E CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS EM HOSPITAIS DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO PERÍODO DE 2017 A 2019 EM RECIFE-PE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Magalhães da Silveira

Coorientador: Prof^o Dr^o Carlos Roberto Weber Sobrinho

Recife

2021

Catálogo na fonte
bibliotecária: Elaine Freitas CRB4:1790

L732d Lima, Catarina Tenório de
Diarreia nosocomial por *Clostridioides difficile*: prevalência, resposta clínica, desfecho, fatores de risco e caracterização das cepas em hospitais de referência em oncologia no período de 2017 a 2019 em Recife-PE / Catarina Tenório de Lima. – 2021.
132 f.: il.

Orientadora: Vera Magalhães da Silveira.
Coorientador: Carlos Roberto Weber Sobrinho.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de pós-graduação em Medicina tropical. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Câncer - Pacientes. 2. Clostridioides difficile. 3. CDI. 4. qPCR. 5. Ribotipagem. I. Silveira, Vera Magalhães da. (Orientadora). II. Weber Sobrinho, Carlos Roberto (Coorientador). III. Título.

616 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2021 - 194)

CATARINA TENÓRIO DE LIMA

DIARREIA NOSOCOMIAL POR *Clostridioides difficile*: PREVALÊNCIA, RESPOSTA CLÍNICA, DESFECHO, FATORES DE RISCO E CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS EM HOSPITAIS DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO PERÍODO DE 2017 A 2019 EM RECIFE-PE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovação em: 29 de julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Vera Magalhães da Silveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Líbia Cristina Rocha Vilela Moura
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Paulo Sérgio Ramos de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Michele Maria Gonçalves de Godoy
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Bruno Henrique Andrade Galvão
Universidade Federal da Paraíba

Dedico este estudo aos meus pais Ailton Lopes da Silva e Albene Tenório Lopes (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter iluminado minha caminhada, dando forças para continuar mesmo quando pensava em desistir ou quando perdia as esperanças.

Ao meu querido filho Cauã, que me estimulou nesta trajetória de muito trabalho, dedicação, resiliência e perseverança.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Magalhães, por toda paciência, incentivo e empenho dedicados para realização deste trabalho. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados em todos esses anos que estive ao seu lado, sendo fundamental para minha formação acadêmica e profissional. A ela, todo meu respeito e admiração.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho, pelas sugestões e material conferidos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo, por sua colaboração nas diversas etapas da pesquisa, pelas palavras de tranquilidade e disponibilidade de um espaço para execução da mesma.

À Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HCP, em especial à Cândida, que colaborou com a coleta de dados e amostras. Sem o seu auxílio, esta pesquisa não seria possível.

Às estudantes de enfermagem Rayane e Rayssa, que prestaram um auxílio valioso durante a busca de casos no Hospital das Clínicas/UFPE.

À Profa. Dra. Ana Kelly Lins, pela dedicação, paciência com minhas dúvidas e profissionalismo na execução do diagnóstico molecular.

À Profa. Dra. Eliane Ferreira, do Instituto de microbiologia PAULO de GÓES da UFRJ, grande exemplo de profissional, que ajudou imensamente com a realização de exames na segunda fase da pesquisa e na revisão do segundo artigo. Não tenho palavras para expressar minha enorme gratidão. Profissional nota mil.

À doutoranda Kelly Rainha, que dedicou seu tempo para realização dos exames na UFRJ.

Ao professor Edmilson Mazza, pela contribuição fundamental na análise estatística.

A todos os pacientes que aceitaram participar do trabalho, cooperando com boa vontade, compreensão e fornecendo inspiração.

Aos funcionários do Laboratório Marcelo Magalhães, que contribuíram para a realização da pesquisa. Grandes colaboradores.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade de poder aprender e me transformar na profissional que hoje sou.

Ao funcionário da pós-graduação em Medicina Tropical, Walter, pessoa iluminada, que me auxiliou tanto durante toda a pós-graduação.

Aos queridos amigos e irmãos da CEJA (em especial a João de Assis), por incentivarem todo este percurso de construção e realização deste projeto.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

(ROOSEVELT, 2005)

RESUMO

As infecções por *Clostridioides difficile* (CDI) aumentaram em gravidade e incidência durante a última década. O câncer predispõe os pacientes à CDI, devido à maior exposição aos fatores de risco, como o uso frequente de antibióticos e agentes quimioterápicos. O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência, resposta clínica, desfecho, descrever os fatores de risco estabelecidos na literatura, além de caracterizar as cepas do *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) em pacientes oncológicos com CDI. A pesquisa foi realizada em dois serviços de referência em oncologia de Recife/PE e envolveu pessoas com idade ≥ 18 anos, que apresentaram o quadro de diarreia após 48h da admissão hospitalar, no período de 2017 a 2019. Um total de 156 pacientes foram incluídos. A CDI foi identificada em 7,05% (11/156) dos pacientes, todos os isolados foram rastreados e amplificados por qPCR quanto à presença dos genes que codificam as toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB*), toxina binária (*cdtA*) e o gene espécie-específico da triose fosfato isomerase (*tpi*). A maioria, 54,5% (6/11), foram positivas apenas para a toxina A (TcdA⁺), sendo estas cepas consideradas raras; 45,5% (5/11) foi positivo para as toxinas TcdA⁺/TcdB⁺. Para a caracterização molecular das cepas, nove (9/11) isolados foram inoculados no meio diferencial CDBA (*Clostridioides difficile* brucella agar), e a identificação das seis colônias sugestivas de *C. difficile* foi confirmada por MALDI-TOF MS (Bruker®). A PCR-ribotipagem demonstrou que, dos seis isolados, dois deles pertenciam aos ribotipos 106 e 143. Quatro cepas, incluindo a CBA0021, não foram tipáveis com base no banco de cepas de referência utilizado. O câncer de mama 27,3% (3/11) e a leucemia linfóide aguda 18,2% (2/11) foram os cânceres mais frequentes; 90,9% (10/11) fizeram uso de antibióticos e 63,6% (7/11) dos casos evoluíram para óbito. Este é o primeiro estudo na América Latina a descrever uma prevalência elevada de cepas variantes de *C. difficile* com gene *tcdA*⁺/*tcdB*⁻ em pacientes imunocomprometidos. Apesar de utilizar a técnica qPCR, que é a mais sensível e específica, a prevalência de CDI foi baixa, sendo a maioria dos casos leves, mesmo em pacientes imunocomprometidos, o que sugere uma circulação de cepas com baixa virulência.

Palavras-chave: pacientes oncológicos; *Clostridioides difficile*; CDI; qPCR; PCR-ribotipagem.

ABSTRACT

The severity and incidence of *Clostridioides difficile* infection (CDI) have increased over the last decade. Cancer predisposes patients to CDI due to increased exposure to risk factors, such as frequent use of antibiotics and chemotherapy agents. The present study aimed to determine the prevalence, clinical response, outcomes, risk factors as supported in the literature, and characterization of *C. difficile* strains in cancer patients with CDI. The study was performed in two oncology reference services in Recife/PE between 2017 and 2019 and involved people aged ≥ 18 years who presented with diarrhea 48 hours after hospital admission. A total of 156 patients were included in the study. CDI was identified in 7.05% (11/156) of patients; all isolates were screened and amplified using qPCR to detect the presence of genes encoding toxins A and B (*tcdA* and *tcdB*), binary toxin (*cdtA*), and the species-specific triose isomerase gene (*tpi*). A total of 54.5% (6/11) of patients tested positive only for *tcdA* (TcdA⁺), and these strains were considered rare, and 45.5% (5/11) tested positive for toxins *tcdA/tcdB* (TcdA⁺/TcdB⁺). For the molecular characterization of the strains, nine (9/11) isolates were inoculated in *C. difficile* brucella agar (CDBA) differential medium; the identification of six *C. difficile*-suggestive colonies was confirmed using MALDI-TOF MS (Bruker®). PCR-ribotyping showed that two of the six isolates belonged to ribotypes 106 and 143. Four strains, including CBA0021, were not typeable based on the reference strain bank used. Breast cancer and acute lymphoid leukemia were the most frequent cancers (27.3% [3/11] and 18.2% [2/11], respectively); 90.9% (10/11) of the cases used antibiotics, and the mortality rate was 63.6% (7/11 patients). This is the first study in Latin America to describe a high prevalence of *C. difficile* *tcdA*⁺/*tcdB*⁻ variant strains in immunocompromised patients. Using qPCR, which is the most sensitive and specific laboratory technique, CDI prevalence was found to be low. Most cases were mild, even in immunocompromised patients, suggesting a circulation of low virulence strains.

Keywords: cancer patients; *Clostridioides difficile*; CDI; qPCR; PCR-ribotyping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Lócus de patogenicidade (PaLoc) contém os genes que codificam as toxinas A e B	22
Figura 2 -	Organização genética das cepas RA09-70 e SA10-050/CD10-165 PaLoc..	22
Figura 3 -	CdtLoc contém os genes que codificam a toxina binária (CDT)	23
Figura 4 -	Patogênese da infecção por <i>Clostridioides difficile</i>	25
Quadro 1-	Classes dos antibióticos e associação com a Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>	26
Figura 5 -	Incidência da infecção nosocomial associada ao <i>C. difficile</i> por faixa etária – EUA	28
Quadro 2 -	Classificação da Infecção por <i>Clostridioides difficile</i> baseada na severidade da doença	30
Quadro 3 -	Recomendações para o tratamento da infecção por <i>Clostridioides difficile</i> em adultos	35
Figura 6 -	Distribuição geográfica de ribotipos de PCR de <i>Clostridioides difficile</i> , pelos países europeus participantes a, EUCLID, 2012-13 e 2013b (n = 1.196)	42
Figura 7 -	Representação dos casos de Infecção por <i>Clostridioides difficile</i> nos estados brasileiros. O mapa destaca os estados onde os estudos associados à notificação deste microrganismo, mostrando o panorama dos principais ribotipos identificados no Brasil	44
Quadro 4 -	Definições de casos de CDI.....	49
Quadro 5 -	Variáveis relacionadas ao estudo	50
Figura 8 -	Fluxograma – Coleta dos dados / Amostras	52
Figura 9 -	Exame Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real do <i>C. difficile</i>	53
Quadro 6 -	Primers e Sondas usados para detecção do gene tcdB do <i>Clostridioides difficile</i>	55
Quadro 7 -	PCR multiplex em tempo real e as sondas TaqMan para detecção de <i>Clostridioides difficile</i> , suas toxinas específicas A e B e genes da toxina binária A	55
Quadro 8 -	Primers utilizados para detecção do gene da Região Intergênica 16S	58

Artigo 2

Figura 1 – PCR-ribotipagem das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> isolados em dois Hospitais de Referência em Oncologia em Pernambuco, Brasil	74
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de Zar para <i>Clostridioides difficile</i> - Gravidade Associada à Diarreia	36
Tabela 2 - Taxa de Mortalidade em 30, 60, 90 e 180 dias em pacientes com e sem recorrência da infecção por <i>Clostridioides difficile</i> (CDI)	39
Artigo 1	
Tabela 1 – Características clínico-epidemiológicas de pacientes oncológicos segundo os resultados de CDI	63
Tabela 2 – Principais antibióticos e quimioterápicos utilizados em pacientes oncológicos segundo os resultados de CDI	64
Tabela 3 – Tratamento para diarreia hospitalar e desfecho dos casos segundo os resultados de CDI	65
Artigo 2	
Tabela 1 - PCR multiplex em tempo real e as sondas TaqMan para detecção de <i>Clostridioides difficile</i> , suas toxinas específicas A e B e genes da toxina binária A	72
Tabela 2 - Características de pacientes e Isolados de <i>Clostridioides difficile</i> analisados neste estudo	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASS	Meio ágar sangue suplementado
BHI-PRAS	Brain Heart Infusion-prereduced anaerobically and sterilized
CA	Califórnia
CCFA	Meio cultura Ágar, Cicloserina, Cefoxitima, Frutose
CCNA	Ensaio de neutralização de citotoxicidade celular
CDAD	<i>C.difficile</i> -associated diarrhea
CDBA	<i>Clostridioides difficile</i> brucella ágar
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> infections
<i>C.difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CDT	Toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtA</i>	Gene que codifica a subunidade enzimática A da toxina binária produzida por <i>C.difficile</i>
CdtA	Proteína correspondente à subunidade enzimática A da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CDTa	Subunidade a da toxina binária produzida por <i>C.difficile</i>
<i>cdtB</i>	Gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtB	Proteína correspondente à subunidade ligante da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CDTb	Subunidade b da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtLoc	Região gênica que codifica a toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtR</i>	Gene que codifica o regulador positivo da expressão das subunidades A e B da toxina binária produzida pelo <i>C. difficile</i>
CPM	Colite pseudomembranosa
DNA	Deoxyribonucleic acid
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUA	Estados Unidos da América
EUCLID	Estudo Europeu Multicêntrico Prospectivo de infecção por <i>C. difficile</i>
EV	Via endovenosa

FDA	Food and Drug Administration
FliC	Flagelina
FliD	Proteína cap flagelar
FMT	Transplante de microbiota fecal
GHD	Antígeno Glutamato Desidrogenase
IBP	Inibidores de Bomba de Próton
IDSA	Infection Disease Society of América
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight
MLST	Multilocus sequence typing
NAATS	Testes de Amplificação de Ácido Nucleico
NCCN	Diretrizes da National Comprehensive Cancer Network
NAPI1	North American PFGE1
NAPI1/B1/027	Ribotipo 027
PaLoc	Pathogenicity locus
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
pg	Picogramas
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
rCDI	Infecção por <i>C.difficile</i> recorrente
RNAr	Ribonucleic acid ribosomal
SAME	Sistema de Arquivamento Médico e Estatístico
SHEA	Society for Healthcare Epidemiology of America
S-layer proteins	Proteínas de camada superficial
SlpA	Proteína de camada superficial A
TC	Cultura toxigênica
tcdA	Gene que codifica a enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
TcdA	Proteína correspondente à enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
tcdB	Gene que codifica a enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
TcdB	Proteína correspondente à enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
tcdC	Gene que codifica o regulador negativo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por <i>C. difficile</i>
tcdE	Gene que codifica uma proteína responsável pela liberação extracelular das enterotoxinas A e B produzidas por <i>C. difficile</i>
tcdR	Gene que codifica o regulador positivo da expressão das enterotoxinas

	A e B produzidas por <i>C. difficile</i>
<i>tpi</i>	Gene triose fosfato isomerase
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VO	Via oral
VRE	Enterococcus resistente a vancomicina
WGS	Sequência do genoma completo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Histórico e características do <i>Clostridioides difficile</i>	20
2.2	Fatores de virulência e Patogênese do <i>Clostridioides difficile</i>	21
2.3	Fatores de risco da CDI em pacientes oncológicos	25
2.4	Manifestações clínicas da CDI	29
2.5	Diagnóstico da CDI	31
2.6	Tratamento da CDI	34
2.7	Resposta clínica e desfecho	38
2.8	Aspectos epidemiológicos e predominância de ribotipos de <i>Clostridioides difficile</i>	40
2.9	Prevenção de CDI	44
2.10	Modelo teórico-hipotético	46
2.11	Justificativa	46
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo geral	47
3.2	Objetivos específicos	47
4	METODOLOGIA	48
4.1	Desenho do estudo	48
4.2	População alvo e local do estudo	48
4.3	Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra	48
4.4	Critérios de inclusão	48
4.5	Critérios de exclusão	49
4.6	Operacionalização e categorização das variáveis	49
4.7	Métodos de coleta e processamento de dados	51
4.7.1	Coleta das amostras de fezes diarreicas	51
4.8	Identificação do <i>Clostridioides difficile</i> (Laboratório Recife-PE)	53
4.8.1	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de genes específicos do <i>Clostridioides difficile</i>	53
4.8.1.1	<i>Primeira etapa: extração do DNA</i>	54
4.8.1.2	<i>Segunda etapa: amplificação do DNA</i>	54

4.9	Caracterização molecular das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> (Laboratório UFRJ)	55
4.9.1	Cultura em meio diferencial <i>Clostridioides difficile</i> Brucella agar (CDBA)..	55
4.9.2	Espectrometria de massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo – MALDI-TOF MS	56
4.9.3	Obtenção do DNA genômico	57
4.9.4	Ribotipagem das cepas de <i>C. difficile</i>	57
4.10	Análise estatística	58
4.11	Considerações éticas	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Artigo 1 - Baixa prevalência de infecções por <i>Clostridioides difficile</i> em hospitais de referência em oncologia	60
5.2	Artigo 2 - Identificação de cepa rara de <i>Clostridioides difficile</i> produtora apenas da Toxina A em pacientes oncológicos	70
6	CONCLUSÕES	79
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A – FORMULÁRIO DA PESQUISA	94
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	97
	APÊNDICE C - ARTIGO 1 EM INGLÊS	100
	ARTIGO 1 - LOW PREVALENCE OF <i>CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE</i> INFECTION IN REFERENCE HOSPITALS IN ONCOLOGY	100
	APÊNDICE D - ARTIGO 2 EM INGLÊS	110
	ARTIGO 2 - IDENTIFICATION OF A RARE STRAIN OF <i>CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE</i> PRODUCING ONLY TOXIN A IN CANCER PATIENTS	110
	APÊNDICE E – RESULTADOS DA PESQUISA	120
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	127
	ANEXO B – NORMAS DAS REVISTAS	132

1 INTRODUÇÃO

As infecções por *Clostridioides* (anteriormente: *Clostridium*) *difficile* (CDI) aumentaram em gravidade e incidência durante a última década (FUEREDER *et al.*, 2016) e representam a causa mais importante de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos, com uma crescente incidência de mais de 250 mil casos/ano nos Estados Unidos da América (EUA) (McGLONE *et al.*, 2012).

Um estudo evidenciou que a taxa de CDI hospitalar era duas vezes maior entre os pacientes com câncer em comparação com todos os outros pacientes internados (KAMBOJ *et al.*, 2012), devido a maior exposição aos fatores de risco, como internações frequentes ou prolongadas, o uso de antibióticos de largo espectro e agentes quimioterápicos (DELGADO *et al.*, 2017).

O aumento de CDI foi atribuído ao surgimento de uma nova cepa epidêmica, caracterizada como pulsotipo NAP1 (North American Pulsotype) ou BI (restriction enzyme a analysis type) ou PCR ribotipo 027 (NAP1/BI/027) (McDONALD *et al.*, 2005; WARNY *et al.*, 2005). Essa cepa hipervirulenta é caracterizada por sua maior capacidade de produzir 16 vezes mais toxina A e 23 vezes mais toxina B quando comparada às cepas tradicionais, além da produção da toxina binária (McDONALD *et al.*, 2005).

Desde 2004, foram descritos grandes surtos de diarreia, com casos de colite grave nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido, atribuídos a essa cepa (LECLAIR *et al.*, 2010). Além disso, o ribotipo 027 foi encontrado em 16 países europeus em 2008 (KUIJPER *et al.*, 2008). No mesmo ano, Bauer *et al.* (2011), estimaram uma prevalência de 5% do ribótipo 027 em 34 países europeus. Na América Latina, a presença de cepas hipervirulentas foi reportada no Chile, Panamá, Colômbia e Costa Rica (AGUAYO *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2016; QUESADA-GÓMEZ *et al.*, 2010). Contudo, esta cepa ainda não foi isolada no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2019).

A doença tem um espectro clínico amplo, variando desde diarreia leve e aquosa à colite pseudomembranosa, colite fulminante e morte (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Na população oncológica onde a diarreia é um efeito adverso comum dos regimes quimioterápicos, o diagnóstico pode ser um desafio e precisa de um alto grau de suspeita clínica. Neste grupo, a detecção e o tratamento precoces da CDI são cruciais e estão associados à redução da mortalidade (DELGADO *et al.*, 2017).

A incidência de CDI entre pacientes com câncer hospitalizados varia nacionalmente (CHUL *et al.*, 2016). Nos EUA, a taxa de CDI foi de aproximadamente 7-14% em adultos com

câncer (SCAPPATICCI *et al.*, 2017). Gorschluter *et al.* (2001), reportaram que a CDI ocorre em aproximadamente 7,0% dos pacientes com câncer que estão realizando quimioterapia. Por outro lado, percentuais maiores (20,5%) foram encontrados no leste da China em três hospitais oncológicos (FANG *et al.*, 2014) e na Espanha, 17,3% (GARZOTTO *et al.*, 2015).

No Brasil, há particularidades em relação aos casos de CDI nas diferentes regiões. Pires *et al.* (2014), Balassiano *et al.* (2010), detectaram uma frequência de CDI que variou de 8,3% até 28,5%. Diferentemente da taxa elevada de CDI (48%) em pacientes oncológicos, que foi observada no Hospital de Fortaleza (COSTA *et al.*, 2017). Estes estudos utilizaram diferentes metodologias para o diagnóstico, como também incluíram pacientes não oncológicos (pacientes transplantados e pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva). Ademais, os pacientes imunocomprometidos que desenvolvem a infecção por *C. difficile* apresentam maior probabilidade de evoluir com mau prognóstico (ALONSO *et al.*, 2012; CHOPRA *et al.*, 2011).

Considerando a importância mundial de CDI e a carência de estudos sobre a prevalência em pacientes imunocomprometidos, assim como a dispersão de tipos clonais do *C. difficile*, resolveu-se realizar este estudo, que foi o primeiro no estado de Pernambuco, cujos principais objetivos foram determinar a prevalência da diarreia nosocomial associada ao *C. difficile* utilizando-se como método diagnóstico a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), verificar a resposta clínica, desfecho e fatores de risco na população de pacientes oncológicos, além de caracterizar as cepas circulantes de *C. difficile*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico e características do *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos, produtor de toxinas, que é transmitido através da via fecal-oral (KHAN *et al.*, 2012; LEFFLER; LAMONT, 2015). A transmissão também pode ocorrer a partir do mobiliário hospitalar, chão, janelas e banheiros, assim como das mãos e vestimentas da equipe envolvida no atendimento aos pacientes (McFREE; ABDELSAYED, 2009; POUTANEN; SIMOR, 2004). Os esporos podem permanecer no ambiente por períodos prolongados, pois são resistentes ao calor e ao uso de desinfetantes comerciais, o que favorece a propagação hospitalar (KELLY; LAMONT, 2008).

Essa espécie foi primeiramente descrita em 1935 como *Bacillus difficilis*, fazendo parte da microbiota intestinal de recém-nascidos (HALL; O'TOLLE, 1935). O *C. difficile* não é uma bactéria invasiva (LEFFLER; LAMONT, 2015), faz parte da microbiota intestinal de cerca de 7% a 15% da população adulta normal, onde normalmente existe em um estado quiescente e não patogênico (NEEMANN; FREIFELD, 2017). *C. difficile* é amplamente distribuído, há relatos do microrganismo no solo, na água, no trato gastrointestinal de alguns animais, na vagina e uretra de seres humanos (KONEMAN *et al.*, 2008).

Somente na década de 1970 ele foi vinculado como principal agente etiológico da Colite pseudomembranosa (CPM), quando estudos evidenciaram que este microrganismo produzia uma potente toxina (BARTLETT *et al.*, 1978). Posteriormente foi identificado como um microrganismo capaz de causar colite associada a antibióticos (HOOKMAN; BARKIN, 2009; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Lawson *et al.* (2016) propuseram com base em análises fenotípicas e filogenéticas, o novo gênero *Clostridioides* gen. nov. para *Clostridium difficile* como *Clostridioides difficile* gen. nov. Esta nova nomenclatura reflete as diferenças taxonômicas entre esta espécie e outros membros da *Clostridium* gênero, mantendo o nome comum como *C. difficile*.

No mesmo ano, 2016, o novo gênero *Clostridioides* gen. nov. foi publicado na Lista de novos nomes e novas combinações de forma efetiva no International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology por Oren e Garrity (2016), tornando válida a utilização do termo *Clostridioides difficile* (nome base: *Clostridium difficile* (Hall and O'Toole 1935 - Prévot 1938) proposto por Lawson *et al.* (2016).

2.2 Fatores de virulência e Patogênese do *Clostridioides difficile*

Diversos fatores de virulência do *C. difficile* contribuem para a patogênese no hospedeiro participando de várias etapas do processo infeccioso. A etapa de adesão é um dos principais fatores para a colonização e desenvolvimento do processo infeccioso pelo microrganismo. Entre os fatores de virulência, as proteínas de superfície (*S-layer proteins*) são importantes no processo de adesão do *C. difficile*. Elas atuam na aderência à mucosa intestinal do hospedeiro induzindo resposta inflamatória e a produção de anticorpos. A proteína de camada superficial A (SlpA) é a mais abundante e está presente em toda a superfície bacteriana (DRUDY *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2005). Os flagelos e as enzimas hidrolíticas auxiliam no estabelecimento da infecção favorecendo a sobrevivência do microrganismo através da multiplicação e disseminação de tecidos infectados (BABAN *et al.*, 2013; BORRIELLO *et al.*, 1990).

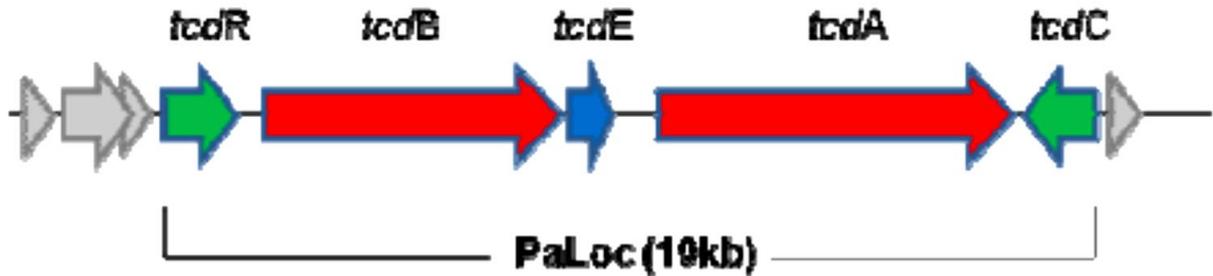
A capacidade de produzir esporos é um dos fatores que mais contribui para a dinâmica da infecção e transmissão do *C. difficile*. Os esporos podem sobreviver por longos períodos, persistindo por meses ou até mesmo anos no ambiente hospitalar (POUTAMEN; SIMOR, 2004).

Eles são extremamente resistentes a temperaturas extremas, assim como aos desinfetantes utilizados na rotina hospitalar (FAWLEY *et al.*, 2007). Wilcox (2003) relatou que os pacientes com CDI podem excretar mais de 100 endosporos e células vegetativas de *C. difficile* por grama de fezes.

Apesar de todos esses fatores citados anteriormente contribuírem para o processo infeccioso, sem dúvida, o principal fator de virulência de *C. difficile* é a produção de toxinas, uma vez que as doenças relacionadas ao CDI são mediadas por estas toxinas. São produzidos dois tipos de toxinas: a toxina A (TcdA), a qual possui um efeito enterotóxico e citotóxico, e a toxina B (TcdB), a qual tem uma forte atividade citotóxica (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009), com seus genes codificadores (*tcdA* e *tcdB*) integrados com dois genes reguladores (*tcdC* e *tcdR*) e o gene (*tcdE*) formam uma região cromossômica de 19,6 kb que denominou o locus de patogenicidade (PaLoc) (figura 1) (LOO *et al.*, 2005; MERRIGAN *et al.*, 2010).

O gene *tcdC* atua como regulador negativo, evitando a expressão de todo PaLoc. Já o gene *tcdR* que codifica a proteína TcdR, atua como regulador positivo da expressão de *tcdA* e *tcdB* (VOTH; BALLARD, 2005). O gene *tcdE* codifica uma proteína do tipo holina, que permite a liberação de TcdA e TcdB por meio da permeabilização da parede celular (TAN; WEE; SONG, 2001).

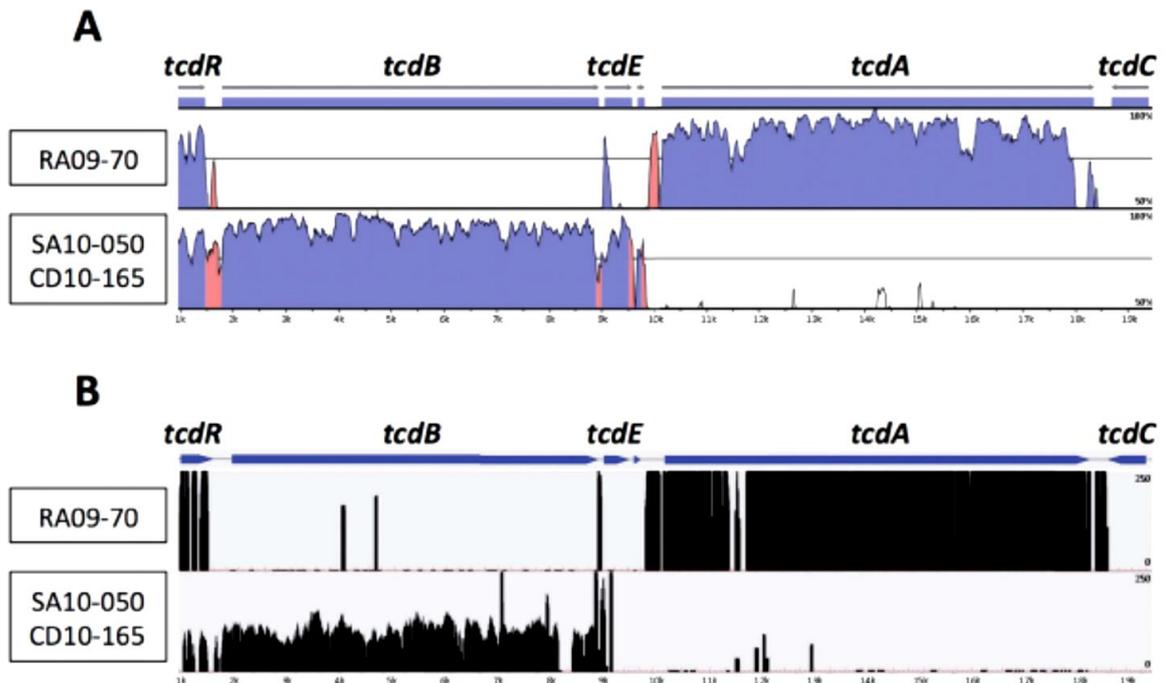
Figura 1 - Lócus de patogenicidade (PaLoc) contém os genes que codificam as toxinas A e B



Fonte: Rupnik, Wilcox e Gerding (2009).

A maioria dos isolados clínicos de *C. difficile* são capazes de expressar as toxinas TcdA e TcdB, enquanto um subconjunto produz apenas TcdB; os isolados clínicos com TcdA+ TcdB- são extremamente raros (VAN DEN BERG *et al.*, 2004). No laboratório do Instituto Pasteur em Paris, Monot *et al.* (2015) descreveram pela primeira vez uma cepa variante que produz apenas TcdA (TcdA+,TcdB-) em um paciente de 60 anos, através da demonstração de um novo tipo de organização genômica do *C. difficile* PaLoc, por meio da análise de três cepas atípicas isoladas de CDI (figura 2).

Figura 2 - Organização genética das cepas RA09-70 e SA10-050/CD10-165 PaLoc



Fonte: Monot *et al.* (2015).

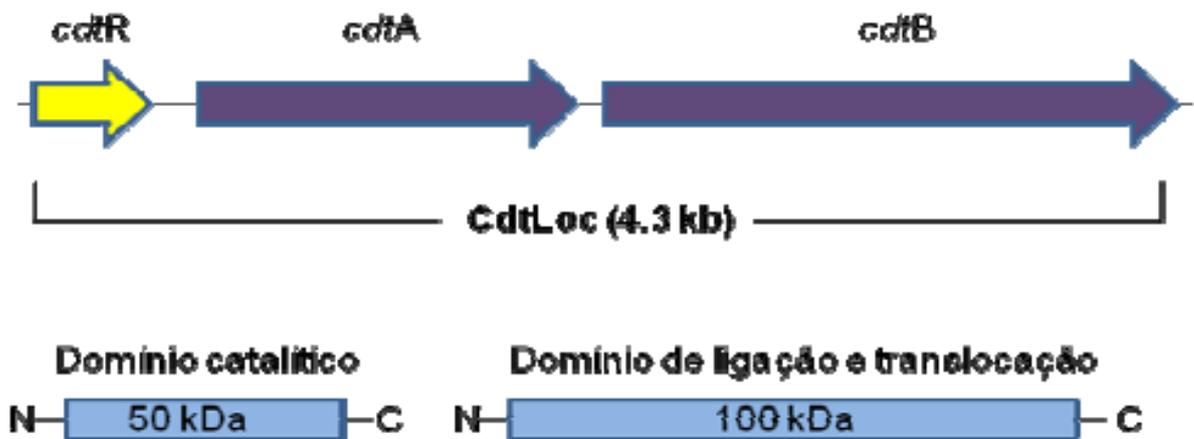
O surgimento de variantes genéticas dos genes *tcdA* e *tcdB* levantaram a questão do papel de TcdA e TcdB na patogênese do *C. difficile*. Ambas as toxinas TcdA e TcdB são capazes de intoxicar as células epiteliais intestinais *in vitro* e causar CDI. No entanto, pesquisas

elaboradas para investigar a contribuição relativa dessas toxinas para a patogênese têm sido contraditória; Lyras *et al.* (2009) e Carter *et al.* (2015) analisaram toxinas de duas diferentes cepas de *C. difficile*, demonstrou que o mutante TcdA+/TcdB- era menos virulento do que as cepas que produzem as toxinas TcdA+/TcdB+ e TcdA-/TcdB+, enquanto que estudos realizados por Kuehne *et al.* (2010), no modelo de hamster, o mutante era quase tão virulento quanto as cepas que produzem as toxinas TcdA+/TcdB+ e TcdA-/TcdB+. Esses resultados sugerem fortemente que TcdB, e não TcdA, desempenha um papel importante na virulência do *C. difficile*.

Além das toxinas A e B, algumas cepas do *C. difficile* produzem uma terceira toxina, denominada de toxina binária (CDT), formada por duas subunidades CDTa e CDTb. Os genes *cdtA* e *cdtB* que codificam estas duas subunidades estão localizados no locus do cromossomo separado do PaLoc, denominado CdtLoc, que também contém um gene regulador *cdtR* (figura 3) (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Casos de cepas não hipervirulentas produtoras apenas da CDT (TcdA-, TcdB-, CDT+) são infrequentes (GERIC *et al.*, 2003).

A toxina binária está associada a uma maior toxicidade porque aumenta a adesão do *C. difficile*, portanto, as cepas portadoras desta toxina estão associadas a uma maior virulência (HERNANDEZ-ROCHA *et al.*, 2012). No início do ano de 2000, surgiu uma nova cepa, mais virulenta com produção de uma toxina binária caracterizada pelo gene NAP1/BI/027, que produz 16 vezes toxina A e 23 vezes toxina B (MCDONALD *et al.*, 2005).

Figura 3 - CdtLoc contém os genes que codificam a toxina binária (CDT)

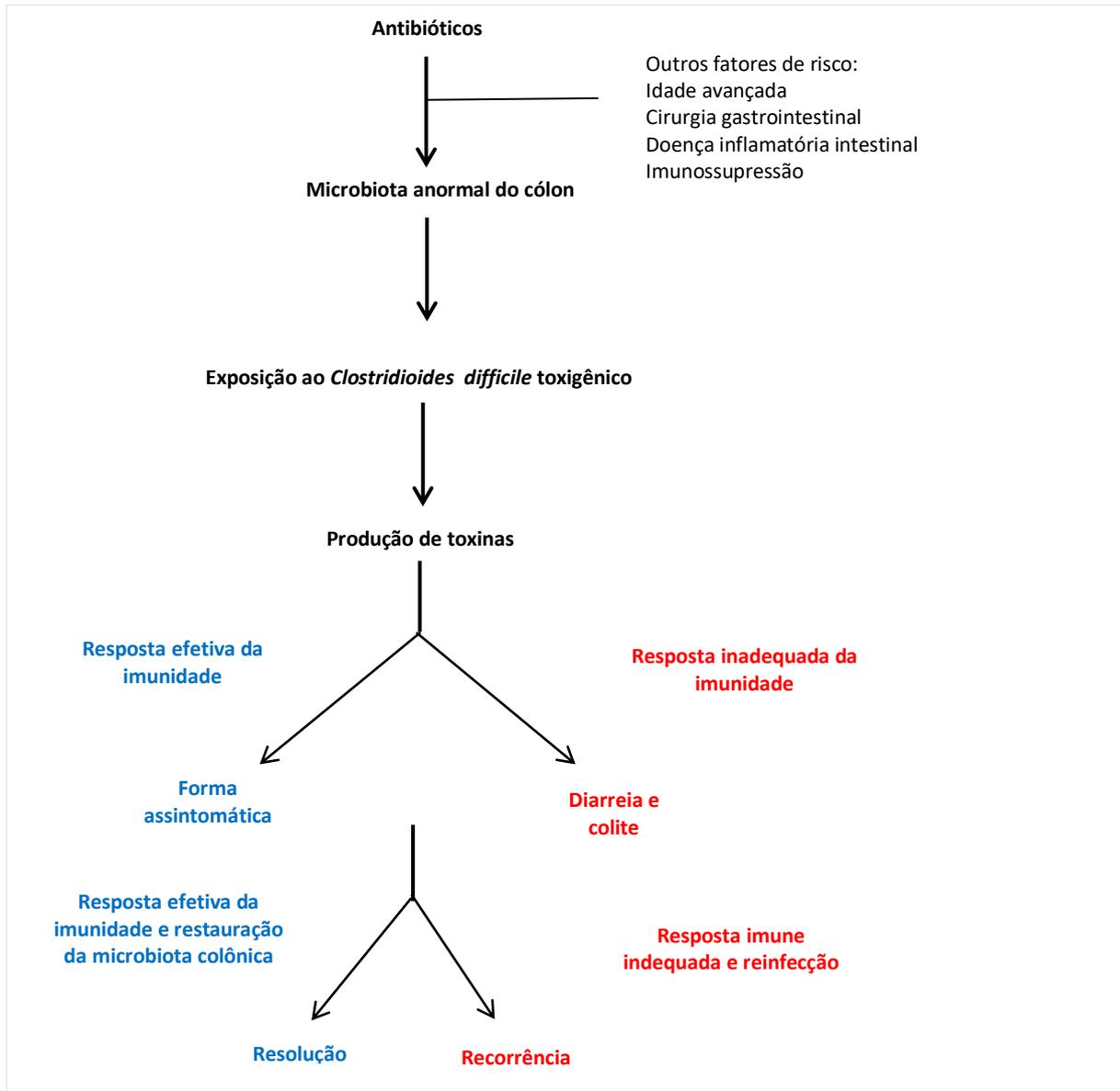


Fonte: Rupnik, Wilcox e Gerding (2009).

C. difficile é um patógeno oportunista que causa doenças através da interrupção da diversidade normal da microbioma intestinal (geralmente por tratamento com antibióticos ou quimioterapia para câncer), como também da colonização do hospedeiro com uma cepa

toxigênica *C. difficile* capaz de produzir toxinas celulares (NEEMANN; FREIFELD, 2017) (figura 4). O processo de infecção inicia com a ingestão de *C. difficile*, tanto na forma vegetativa como em esporos. As células vegetativas são mortas no estômago, mas os esporos são resistentes a ácidos e podem sobreviver no meio ambiente. Os esporos podem germinar no intestino delgado após a exposição aos ácidos biliares e se transformarem em um estado vegetativo, e com o auxílio de flagelos multiplicam-se e aderem ao epitélio do cólon. Após a adesão, as células vegetativas de *C. difficile* produzem toxinas A e B, que são liberadas no lúmen intestinal causando danos à mucosa entérica e inflamação local (POUTANSEN; SIMOR, 2004).

A toxina A induz uma secreção aquosa intensa e as toxinas A e B causam um aumento da permeabilidade vascular devido à destruição das ligações entre as células com subsequente hemorragia. Além disso, induzem a produção de interleucinas pró-inflamatórias e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), contribuindo para uma resposta inflamatória e formação de pseudomembranas (KHAN *et al.*, 2012).

Figura 4 - Patogênese da infecção por *Clostridioides difficile*

Fonte: Leffer e Lamont (2015, tradução nossa).

2.3 Fatores de risco da CDI em pacientes oncológicos

Pacientes com câncer mantêm um risco aumentado para CDI. Um estudo demonstrou que a taxa de CDI hospitalar era duas vezes maior entre os pacientes com câncer em comparação com todos os outros pacientes internados (KAMBOJ *et al.*, 2012).

Essa associação provavelmente se explica pelo maior grau de exposição a *C. difficile* devido a hospitalizações frequentes ou prolongadas, pela imunossupressão da doença que predispõe os pacientes com câncer a desenvolver infecção clínica, em vez de colonização (ALONSO *et al.*, 2012; CHOPRA *et al.*, 2011). Além disso, os pacientes com câncer são

frequentemente expostos a medicamentos e outros fatores que podem alterar a microbiota intestinal, como agentes quimioterápicos, antibióticos, medicamentos supressores de ácido gástrico e manipulação do trato gastrointestinal (BRITTON, 2012; McCALEB *et al.*, 2016).

Exposição aos antimicrobianos é o principal fator de risco da diarreia associada a *C.difficile*, pois rompem o equilíbrio da microbiota intestinal, diminuindo a resistência à colonização pelo microrganismo e facilitando a transformação dos esporos em formas vegetativas (LOO *et al.*, 2005). Em princípio, todos os antibióticos podem causar CDI. Entretanto, as quinolonas, as cefalosporinas, a clindamicina e as penicilinas de largo espectro são as mais envolvidas (BROWN *et al.*, 2013; LEFFLER; LAMONT, 2015) (Quadro 1), enquanto outros, como a tetraciclina, pode não aumentar esse risco (DELANEY *et al.*, 2007).

Stevens *et al.* (2011) utilizaram análise de sobrevivência incorporando exposições a antibióticos que variaram no tempo e indicaram que aumento da duração, número e dosagens de antibióticos foram associados a risco aumentado de CDI. Entretanto, um estudo realizado na Alemanha, a administração de carbapenêmicos foi o único fator de risco independente para a aquisição de CDI nos pacientes com Leucemia mieloide aguda (VEHRESCHILD *et al.*, 2014).

Quadro 1- Classes dos antibióticos e associação com a Infecção por *Clostridioides difficile*

Classe antibiótico	Associação com a infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
Clindamicina	Muito comum
Ampicilina	Muito comum
Amoxicilina	Muito comum
Cefalosporinas	Muito comum
Fluoroquinolonas	Muito comum
Outras penicilinas	Pouco comum
Sulfonamidas	Pouco comum
Trimetoprim	Pouco comum
Trimetoprim-sulfametoxazol	Pouco comum
Macrolídeos	Pouco comum
Aminoglicosídeos	Incomum
Bacitracina	Incomum
Metronidazol	Incomum
Teicoplanina	Incomum
Rifampicina	Incomum
Cloranfenicol	Incomum
Tetraciclina	Incomum
Carbapenêmicos	Incomum
Daptomicina	Incomum
Tigeciclina	Incomum

Fonte: Leffler e Lamont (2015, tradução nossa).

Embora os antibióticos estejam claramente ligados ao desenvolvimento de diarreia associada a *C. difficile*, a quimioterapia em pacientes onco-hematológicos tem sido relatada como fator de risco independente para CDI (RAZA *et al.*, 2010). Os agentes quimioterápicos

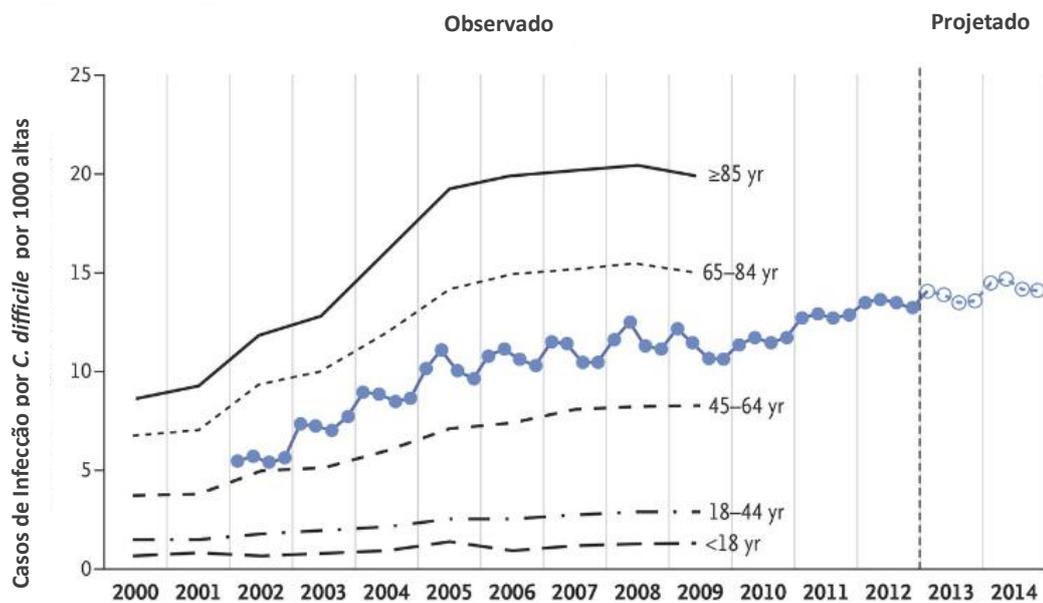
precipitam a diarreia como consequência do dano à mucosa gastrointestinal por diminuição da proliferação celular intestinal e aumento da apoptose das células criptas. Essas alterações estão associadas a modificações na microbiota intestinal que associada a infecção *por C. difficile* podem contribuir para o desenvolvimento de mucosite (LESLIE *et al.*, 2015; STRINGER, 2013).

Fainstein *et al.* (1981), relataram o primeiro caso de colite *por C. difficile* relacionada à quimioterapia em um paciente com carcinoma de células embrionárias testiculares tratado com ciclos de cisplatina, bleomicina e vimblastina. O uso de agentes platinantes foi identificado em dois estudos como um fator de risco potencial para CDI (EMOTO *et al.*, 1996; KAMTHAN *et al.*, 1992). Em uma revisão sistêmica, vários agentes quimioterápicos estão ligados ao desenvolvimento do CDI (CHOPRA *et al.*, 2010).

Várias pesquisas relataram exposição a outros quimioterápicos, como metotrexato, cisplatina, bleomicina, vinblastina, 5-fluorouracil, ciclofosfamida, doxorubicina, etoposídeo, paclitaxel e citarabina como risco para CDI (KHAN *et al.*, 2012; MORALES *et al.*, 2005; RAZA *et al.*, 2010; TSUJIMURA *et al.*, 2007). Por outro lado, um estudo recente avaliou os fatores de risco de CDI em pacientes onco-hematológicos e revelou que a quimioterapia não foi um fator de risco significativo para CDI em comparação com a exposição anterior a antibióticos, um fator que permanece o mais significativo (FUEREDER *et al.*, 2016).

Outros fatores que contribuem de forma significativa para o risco de CDI em pacientes com câncer incluem hospitalização prolongada, pacientes com idade acima de 65 anos, supressão do ácido gástrico, comorbidades como diabetes, insuficiência renal ou cirurgia gastrointestinal (FUEREDER *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2012). Hebbard *et al.* (2017), identificaram que a laparotomia, procedimentos gastroesofágicos, e cistectomia com formação de conduto ileal estavam comumente associadas ao CDI.

O risco de CDI e a gravidade aumentam com a idade (CARIGNAN *et al.*, 2008; LESSA; GOULD; McDONALD, 2012) (figura 5). Em um estudo, o risco de ser infectado pelo *C. difficile* durante um surto foi maior entre as pessoas com mais de 65 anos de idade que entre os pacientes mais jovens (PÉPIN; VALIQUETTE; COSSETTE, 2005).

Figura 5 - Incidência da infecção nosocomial associada ao *C. difficile* por faixa etária – EUA

Fonte: Steiner *et al.* (2014) e Lessa *et al.* (2012 *apud* LEFFLER; LAMONT, 2015).

O uso de inibidores da bomba de prótons (IBP) foi considerado um fator de risco para CDI (DIAL *et al.*, 2004). McCaleb *et al.* (2016), avaliaram a relação entre os inibidores de bomba de próton e infecção por *C. difficile* e descobriram que o uso dessas medicações aumentam o risco de CDI, enquanto outros estudos não confirmaram esse aumento (KYNE *et al.*, 2005; NOVACK *et al.*, 2014).

Chung *et al.* (2016), demonstraram que a malignidade era um fator de risco independente para CDI, incluindo infecções recorrentes. Entre os pacientes com neoplasias hematológicas, o CDI é 2,5 vezes mais comum do que naqueles com cânceres sólidos, especificamente leucemia e linfoma (DELGADO *et al.*, 2017). Esse fato pode ser explicado pela neutropenia decorrente dos tratamentos com quimioterápicos e uso de antibióticos nesses pacientes em comparação com outros tipos de câncer (GUPTA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2013). Na Austrália, uma coorte retrospectiva evidenciou que a neutropenia estava fortemente associada ao risco de contrair CDI (SELVEY *et al.*, 2016), como também, o tempo prolongado de neutropenia aumenta o risco nos pacientes onco-hematológicos (APOSTOLOPOULOU *et al.*, 2011; SCHALK *et al.*, 2010).

Os principais fatores de risco para CDI recorrente (rCDI) são idade avançada, uso de antibióticos, a supressão do ácido gástrico e infecção com uma cepa hipervirulenta. Embora o fator de risco relatado com mais frequência para rCDI é a idade avançada (DESHPANDE *et al.*, 2015; GAREY *et al.*, 2008). Em um estudo retrospectivo, as probabilidades de rCDI eram 25,0%, 27,1% e 58,4% entre indivíduos com idade de 0 a 17, 18 a 64 e ≥ 65 anos, respectivamente

(PÉPIN *et al.*, 2005). O motivo da recorrência de CDI em pessoas idosas pode ser explicado pela diminuição da resposta imunológica ao CDI e presença de comorbidades.

2.4 Manifestações clínicas da CDI

Havendo o desequilíbrio da microbiota e a aquisição de endoesporos de *C. difficile* a partir do ambiente, estes microrganismos podem iniciar o processo de germinação em células vegetativas (SCHROEDER, 2005). É importante ressaltar que nem todo hospedeiro colonizado desenvolverá algum processo infeccioso associado a *C. difficile*, uma vez que a sua patogenia é uma consequência tanto dos atributos de virulência do microrganismo, quanto da capacidade de resposta imunológica do hospedeiro (HOOKMAN; BARKIN, 2009).

O início dos sintomas de CDI pode ocorrer imediatamente após o início dos agentes quimioterápicos. O intervalo médio entre o término de um curso de tratamento para o diagnóstico de CDI foi de 20,3 dias (LESLIE *et al.*, 1998). Febre, dor abdominal, diarreia e desidratação comumente visto em pacientes pós-quimioterapia, também podem ser manifestações de CDI (KHAN *et al.*, 2012). Nestes pacientes, as complicações incluem distúrbios hidroeletrólíticos, insuficiência renal aguda e hipotensão.

Pacientes com CDI conhecida ou suspeita devem ser avaliados quanto à gravidade da doença. As manifestações clínicas podem variar desde uma infecção assintomática até manifestações clínicas moderadas, como a CDI e graves como a colite pseudomembranosa (CPM) e o megacólon tóxico (inflamação aguda do cólon, que se apresenta dilatado, podendo ocorrer perfuração intestinal) (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Os casos leves e moderados constituem a maioria dos casos sintomáticos. A diarreia é o principal sintoma de CDI, podendo ter uma consistência aquosa ou mucoide (≥ 3 episódios de fezes amolecidas em 24 horas), ocorrendo dor abdominal e, em alguns casos, febre baixa, náuseas e anorexia (BAGDASARIAN; RAO; MALANI, 2015; WANAHITA *et al.*, 2002). A diarreia pode estar associada a muco ou sangue oculto, mas melena ou hematoquezia são raras. A febre está associada a CDI em cerca de 15% dos casos; temperatura $>38,5^{\circ}\text{C}$ pode ocorrer no contexto de CDI não grave ou grave.

A CDI é comumente associada a uma contagem média de leucócitos de 15.000 cel/ μL (WANAHITA *et al.*, 2003). Os critérios laboratoriais propostos para CDI não grave incluem contagem de leucócitos ≤ 15.000 cel/ μL e creatinina sérica $<1,5$ mg/dL; são necessários escores de gravidade validados prospectivamente para CDI (McDONALD *et al.*, 2018) (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação da Infecção por *Clostridioides difficile* baseada na severidade da doença

Categoria	Sinais clínicos e laboratoriais	Fatores de risco associados
Leve à Moderada	Diarreia com sinais sistêmicos de infecção, leucocitose <15,000/μl ou creatinina sérica <1,5x basal.	Uso de antibióticos, hospitalização prévia, longa hospitalização, uso de inibidores da bomba de prótons, quimioterapia, doença renal crônica e presença de cateter nasogástrico
Severa	Sinais sistêmicos de infecção e/ou leucocitose ≥15,000/μl ou creatinina sérica ≥1,5x do nível pré-mórbido	Idade avançada, infecção pela cepa BI/NAP1/027
Severa complicada	Sinais sistêmicos de infecção incluindo hipotensão, Íleo ou megacólon	Os mesmos da infecção severa, acrescentando cirurgia recente, história de doença inflamatória intestinal e tratamento com imunoglobulina intravenosa.
Recorrente	Recorrência até oito semanas do final do tratamento completo	Paciente com idade ≥65 anos de idade, uso concomitante de antibióticos, presença de comorbidades significantes, uso de inibidores da bomba de prótons e aumento inicial da severidade da doença.

Fonte: Bagdasarian, Rao e Malani (2015, tradução nossa).

As manifestações clínicas da colite grave incluem diarreia, dor abdominal difusa, distensão abdominal, febre, hipovolemia, acidose láctica, hipoalbuminemia, creatinina elevada e leucocitose acentuada, que pode ser tão alta quanto 50.000 cel/μL ou superior (BURNHAM; CARROLL, 2013). Os critérios propostos para CDI grave incluem contagem de leucócitos >15.000 cel/μL ou creatinina sérica ≥1,5 mg/dL (McDONALD *et al.*, 2018).

Na Espanha, um estudo demonstrou que a duração da diarreia na maioria dos pacientes com CDI foi inferior a 3 semanas (90,24%), sem sangramentos (87%). No que diz respeito aos dados clínicos associados à gravidade do quadro clínico, cerca de 20% tinha febre, 35% tinha uma leucocitose maior que 15.000 cel/μL no momento do diagnóstico e cerca de 7% tinha valores de creatinina sérica maiores que 1,5 vezes o valor basal (RUIZ *et al.*, 2014).

A colite fulminante (anteriormente referida como CDI grave e complicada) pode ser caracterizada por hipotensão grave que progride para falência de órgãos multissistêmicos, íleo agudo com dilatação e espessamento do cólon, febre e leucocitose ou megacólon com

toxicidade sistêmica grave, que pode ser complicado por perfuração intestinal (McDONALD *et al.*, 2018).

A infecção recorrente por *C. difficile* é definida pelo reaparecimento dos sintomas entre duas a oito semanas após o tratamento adequado (McDONALD *et al.*, 2018). Um percentual de 20% a 35% dos pacientes com CDI apresentam recidiva ou reinfecção após o primeiro episódio da doença (DUBBERKE, 2012; McFARLAND *et al.*, 2002; MUSHER *et al.*, 2005).

Chung *et al.* (2016), descobriram que a recorrência era mais frequente em pacientes com câncer do que naqueles sem câncer (20,4% v 9,5%; $P = 0,005$, respectivamente). Um estudo incluindo mais de 1.500 pacientes com CDI observou que 34% dos pacientes com infecções recorrentes precisavam de internação, 28% desenvolveram doença grave e 4% desenvolveram colite fulminante (SHEITOVAN-PESANT *et al.*, 2016).

Outras formas clínicas são as manifestações extraintestinais que, apesar de raras, são geralmente decorrentes de infecções polimicrobianas, tais como, enterite, apendicite, celulite, infecção de partes moles e artrite reativa (BROWN *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2014; JACOBS *et al.*, 2001).

2.5 Diagnóstico da CDI

A diarreia associada à *C. difficile* pode ser difícil de distinguir da diarreia secundária aos agentes quimioterápicos; portanto, o diagnóstico laboratorial da CDI é essencial para o manejo rápido dos pacientes afetados e para garantir o isolamento apropriado para o controle da infecção (NEEMANN *et al.*, 2017). A detecção e o tratamento precoces são cruciais em pacientes com câncer e estão associados à redução da mortalidade e dos custos com saúde (KHAN *et al.*, 2012). A diarreia em qualquer paciente oncológico deve ser avaliada para CDI, mesmo sem uma história de uso recente de antibióticos (KAMTHAN *et al.*, 1992).

De acordo com as diretrizes da Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) e Infectious Diseases Society of America (IDSA) de 2018, o exame laboratorial é recomendado quando ocorre diarreia ≥ 3 evacuações de fezes mal formadas nas 24 horas, (McDONALD *et al.*, 2018). Isto porque alguns exames não conseguem diferenciar entre colonização e infecção ativa (NEEMANN *et al.*, 2017), e o tratamento de pacientes não infectados pode piorar a disbiose intestinal (WOODWORTH; KRAFT, 2017).

Vários métodos são recomendados para o diagnóstico de CDI, cada um com vantagens e desvantagens, incluindo cultura toxinogênica (TC), ensaio de neutralização de citotoxicidade celular (CCNA), enzima imunoensaios (EIA) para toxinas A, B e/ou glutamato desidrogenase

(GDH) e testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs) (CARROLL; BARTLETT, 2011; CROBACH *et al.*, 2016; DEBAST *et al.*, 2014; RYDER *et al.*, 2010).

As diretrizes atuais orientam o uso do teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) para o diagnóstico laboratorial de *C. difficile*, isolado ou como parte de um algoritmo incluindo a triagem de imunoensaio enzimático (EIA) inicial para o antígeno glutamato desidrogenase (GDH) e toxinas A e B (LEFFLER; LAMONT, 2015; McDONALD *et al.*, 2018).

Entre esses métodos, o TC ou CCNA foi considerado o padrão ouro para o diagnóstico de CDI nos últimos 30 anos (MURAD *et al.*, 2016), mas este método raramente é usado para diagnóstico clínico de rotina. TC tem baixa especificidade para doença clínica (CDI). O CCNA é analiticamente sensível à toxina B, mas depende dos fatores pré-analíticos e técnicos experientes, portanto, casos de CDI podem ser perdidos (PENG *et al.*, 2018). O principal uso do TC ou CCNA é em estudos epidemiológicos (McDONALD *et al.*, 2018).

Considerado o teste padrão ouro, conforme mencionado acima, a cultura toxigênica (TC) utiliza o meio cicloserina-cefoxitina-frutose-ágar (CCFA), com tratamento preliminar com choque alcoólico para recuperar *C. difficile* em amostras de fezes; onde os 2 primeiros componentes inibem outro crescimento bacteriano e frutose atua como um nutriente (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ *et al.*, 2017). Colônias suspeitas são selecionadas por testes presuntivos, que incluem morfologia da colônia, coloração de Gram, teste para indol e hidrólise de L-prolina-naftilamida. A identificação de *C. difficile* em colônias suspeitas é confirmada pela espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight* (MALDI-TOF MS). A TC isola tanto cepas toxigênicas quanto não toxigênicas, o que implica na necessidade de utilização de outra metodologia subsequente para diferenciá-las (CROBACH *et al.*, 2016).

Como uma tecnologia emergente, a espectrometria de massas é uma técnica que consiste na ionização por dessorção a laser assistida por matriz, seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF MS) tem sido amplamente utilizado no diagnóstico microbiológico na última década. Está substituindo gradualmente os métodos tradicionais de identificação (COLTELLA *et al.*, 2013; PROD'HOM *et al.*, 2010). A tecnologia de espectrometria de massas foi desenvolvida no final dos anos 1980 com sensibilidade relativamente alta a vários tipos de amostras. É uma ferramenta rápida para análises laboratoriais de rotina e tem sido usado para identificar anaeróbios (JUSTESEN *et al.*, 2011; SCOLA *et al.*, 2011).

O Ensaio de neutralização de citotoxicidade celular em cultura de tecidos, também é considerado um padrão ouro, tem uma alta sensibilidade (90,8%) e alta especificidade (98,3%)

(MARTÍNEZ-MELÉNDEZ *et al.*, 2017). Porém, sem aplicação em laboratórios de rotina, por ser metodologia laboriosa e com demora na liberação de resultados. Este teste é realizado adicionando uma amostra de fezes preparada (diluída, tamponada e filtrada) a uma monocamada de células cultivadas (SHANNON-LOWE *et al.*, 2010). Se a toxina B do *C. difficile* estiver presente, ela exerce um efeito citopático caracterizado pelo arredondamento das células; a especificidade da citotoxicidade é demonstrada pela neutralização do efeito citopático com anti-soro específico (LAMONT *et al.*, 2020). A toxina B é 1000 vezes mais citotóxico que a toxina A (HEBBARD *et al.*, 2016).

Ensaio imunoenzimático (EIA) para o antígeno glutamato desidrogenase (GDH), detecta o antígeno GDH, que é uma enzima produzida por todos os isolados de *C. difficile*, sendo encontrado em cepas toxigênicas e não-toxigênicas (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ *et al.*, 2017). O teste foi proposto como a primeira etapa em dois estágios algoritmos para diagnóstico de CDI, mas sua baixa especificidade torna-o inadequado como teste independente (PLANCHE *et al.*, 2013). Tem boa sensibilidade e os resultados estão disponíveis em menos de uma hora, apesar de não diferenciar cepas toxigênicas e não-toxigênicas, ocasionando altas taxas de resultados falso-positivos; assim, testes confirmatórios mais específicos, como toxina A e B, EIA ou NAAT devem seguir em amostras positivas (KHAN *et al.*, 2012).

EIA para toxinas A e B de *C. difficile* é muito específico para infecção ativa, pois detecta toxinas que são produzidas diretamente pelas cepas toxigênicas (KHAN *et al.*, 2012). A sensibilidade do EIA para as toxinas A e B é de cerca de 75%; a especificidade é alta (até 99%) (BLOSSOM; McDONALD, 2007; SWINDELLS *et al.*, 2010). Há uma taxa relativamente alta de falso-negativos, já que 100 a 1000 pg de toxina devem estar presentes para que o teste seja positivo (BARTLETT, 2002). Erb *et al.* (2015), descobriram que um EIA negativo para toxinas não afasta CDI em pacientes imunocomprometidos sintomáticos, pacientes que fazem uso de altas doses de corticosteroides, leucopênicos (leucócitos <1000/ μ L) e casos de CDI leve. Esses achados sugerem que o teste não é indicado para pacientes imunocomprometidos ou pacientes após quimioterapia.

A maioria dos NAATs tem como alvo os genes codificadores de TcdB, TcdA e/ou a toxina binária (CHEN *et al.*, 2017; GERDING *et al.*, 2014). Em particular, alguns NAATs, como NAATs multiplex, podem simultaneamente detectar cepas de *C. difficile* e genes que codificam toxinas de amostras de fezes (SMITS *et al.*, 2016). Existem vários NAATs comercialmente disponíveis, incluindo um PCR em tempo real (qRT-PCR).

Bélanger *et al.* (2003), descreveram pela primeira vez um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção de *C. difficile* em fezes, tendo como alvos os genes para as toxinas

TcdA e TcdB. Esta metodologia provou ser bastante rápida e sensível, sendo seu limite de detecção 100 vezes maior que o da PCR convencional. Estudos posteriores foram realizados para validar esta ferramenta como uma técnica de diagnóstico plausível para uso na rotina laboratorial (BARBUT *et al.*, 2009; SLOAN *et al.*, 2008).

É o método preferido para o diagnóstico na prática clínica porque é rápido e tem alta sensibilidade (87-98%) e especificidade (perto de 100%) (MARTÍNEZ-MÉLENDEZ *et al.*, 2017; LEFFLER; LAMONT, 2015; RAZA *et al.*, 2010). Algumas limitações desses métodos moleculares inclui seu alto custo e que não testa a produção de toxina ativa; assim, ele pode detectar pacientes que são colonizados (KHAN *et al.*, 2012). Portanto, apenas amostras de fezes diarreicas (diarreia ≥ 3 evacuações de fezes mal formadas nas 24 horas) devem ser testadas e os resultados podem estar disponíveis em até uma hora. O uso crescente de PCR melhorou a detecção de CDI, explicando aumento das taxas do CDI (LESSA *et al.*, 2012).

Geralmente, a colonoscopia pode ser realizada em circunstâncias em que se suspeite de um diagnóstico alternativo ou que tenha indicação de visualização direta e/ou biópsia da mucosa intestinal. O exame também é útil em pacientes com íleo ou colite fulminante na ausência de diarreia, pois pode permitir a visualização de pseudomembranas (inflamação grave do revestimento interno do intestino), um achado altamente sugestivo de infecção por *C. difficile*. A decisão de prosseguir com a endoscopia deve ser feita com cuidado, em função do risco de perfuração intestinal; caso seja realizada, a sigmoidoscopia flexível limitada é preferida com insuflação mínima ou nenhuma insuflação de ar para evitar a perfuração do cólon inflamado (LAMONT *et al.*, 2020).

2.6 Tratamento da CDI

As diretrizes do SHEA/IDSA - 2018 (Quadro 3), são usadas para orientar o tratamento de CDI em pacientes oncológicos. O tratamento depende da gravidade da doença e é semelhante ao da população em geral. Vários critérios estão disponíveis para determinar a gravidade da CDI. De acordo com as diretrizes, a doença grave é definida como uma contagem de leucócitos > 15.000 células/ μL ou um nível de creatinina sérica $\geq 1,5$ mg/dl (McDONALD *et al.*, 2018).

Quadro 3 - Recomendações para o tratamento da infecção *por Clostridioides difficile* em adultos

Definição clínica	Dados clínicos de suporte	Tratamento recomendado ^a
Episódio inicial, não grave	Leucocitose com contagem de glóbulos brancos ≤ 15000 células/ μ L e nível de creatinina sérica $< 1,5$ mg/dL	<ul style="list-style-type: none"> • VAN, 125 mg via oral 4 vezes ao dia por 10 dias, OU • FDX, 200 mg via oral administrados duas vezes ao dia por 10 dias • Alternativa se os agentes acima não estiverem disponíveis: metronidazol, 500 mg, 3 vezes por dia por via oral, durante 10 dias
Episódio inicial, grave ^b	Leucocitose com contagem de glóbulos brancos ≥ 15000 células/ μ L ou nível sérico de creatinina $> 1,5$ mg/dL	<ul style="list-style-type: none"> • VAN, 125 mg via oral 4 vezes por dia por via oral por 10 dias, OU • FDX 200 mg via oral administrados duas vezes ao dia por 10 dias
Episódio inicial, fulminante	Hipotensão ou choque, fêo, megacólon	<ul style="list-style-type: none"> • VAN, 500 mg 4 vezes por dia por via oral ou sonda nasogástrica. Se houver fêo, considere adicionar instilação retal de VAN. O metronidazol por via intravenosa (500 mg a cada 8 horas) deve ser administrado em conjunto com a VAN oral ou retal, principalmente se houver fêo.
Primeira recorrência	<ul style="list-style-type: none"> • VAN 125 mg via oral 4 vezes ao dia por 10 dias se metronidazol foi usado no episódio inicial, OU • Use um regime prolongado de VAN se um regime padrão foi usado para o episódio inicial (por exemplo, 125 mg via oral 4 vezes por dia durante 10-14 dias, 2 vezes por dia durante uma semana, uma vez por dia durante uma semana, e a cada 2 ou 3 dias por 2 a 8 semanas), OU • 200 mg de FDX via oral administrados duas vezes ao dia por 10 dias se VAN foi usada no episódio inicial
Segunda recorrência ou subsequente	<ul style="list-style-type: none"> • VAN, 125 mg, 4 vezes por dia por via oral, durante 10 dias, seguido de rifaximina 400 mg via oral, 3 vezes ao dia, durante 20 dias, OU • FDX, 200 mg via oral administrado duas vezes ao dia por 10 dias, OU • Transplante de microbiota fecal ^c

Fonte: McDonald *et al.* (2018, tradução nossa).

Notas: Abreviações: FDX, fidaxomicina; Van, vancomicina.

^a Todos os estudos randomizados compararam os cursos de tratamento de 10 dias, mas alguns pacientes (particularmente aqueles tratados com metronidazol) podem ter uma resposta tardia ao tratamento e os médicos devem considerar estender a duração do tratamento para 14 dias nessas circunstâncias.

^b Os critérios propostos para a definição de infecção *por Clostridioides difficile* (CDI) grave ou fulminante são baseados na opinião de especialistas. Estes podem precisar ser revistos no futuro após a publicação de pontuações de gravidade validadas prospectivamente para pacientes com CDI.

^c A opinião do painel é que tratamentos antibióticos apropriados para pelo menos 2 recorrências (isto é, 3 episódios de CDI) devem ser tentados antes de se oferecer um transplante de microbiota fecal.

A gravidade da população oncológica é difícil de avaliar usando esses critérios, porque os pacientes com câncer são frequentemente neutropênicos e têm creatinina mais alta em comparação com pacientes sem câncer no momento do diagnóstico. Wang *et al.* (2013), questionaram o uso desses marcadores de gravidade nesses pacientes e sugeriram o uso dos Critérios de Zar (Tabela 1) como uma melhor avaliação da gravidade (WANG *et al.*, 2013).

De acordo com Zar *et al.* (2007), a CDI é considerada grave se 2 ou mais pontos forem atendidos a partir da seguinte escala: um ponto é dado para os fatores de risco: idade avançada, febre, níveis baixos de albumina ou leucocitose nas primeiras 48h da admissão. Dois pontos são dados para evidência endoscópica de colite pseudomembranosa ou admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Apesar de alguns autores recomendarem o uso desses critérios, eles não foram validados para a população com câncer.

Tabela 1 - Critérios de Zar para *Clostridioides difficile* - Gravidade Associada à Diarreia

Fatores de Risco	Pontos
Idade >60 anos	1
Temperatura $\geq 38,3^{\circ}\text{C}$	1
Albumina <2,5 mg/Dl	1
Leucócitos ≥ 15.000 cel/ μL nas primeiras 48h da admissão	1
Endoscopia com colite pseudomembranosa	2
Internamento na UTI	2

Fonte: Zar *et al.* (2007).

Nota: Doença grave é definida com ≥ 2 pontos.

Entre as principais medidas para o tratamento de CDI é eliminar o antibiótico que desencadeou a infecção pelo risco de recorrência (KUKLA *et al.*, 2020). Mullane *et al.* (2011), analisaram os pacientes em uso de antibiótico sistêmico que evoluíram com infecção por *C. difficile* e concluíram que, em casos em que a antibioticoterapia foi suspensa, em comparação ao grupo em que foi mantida, houve maior taxa de cura e menor recidiva.

Recentemente as diretrizes do SHEA/IDSA-2018 recomendaram a retirada do metronidazol como uma opção terapêutica para infecções de CDI. Os medicamentos de escolha são vancomicina ou fidaxomicina recomendados durante 10 dias. Metronidazol pode ser usado no primeiro episódio de CDI não grave (doença leve a moderada), nos casos em que não há acesso à vancomicina e fidaxomicina, mas deve-se evitar um curso prolongado do metronidazol devido ao risco de neurotoxicidade (McDONALD *et al.*, 2018). No Brasil, não há disponibilidade da vancomicina oral e nem da fidaxomicina.

Com o aumento de cepas hipervirulentas, quase 8% dos pacientes hospitalizados com CDI sofrem de CDI grave ou CDI fulminante (CHENG; FISCHER, 2019). CDI fulminante é uma doença complicada que se caracteriza por hipotensão ou choque, íleo, ou megacólon tóxico agudo. Quando a CDI é complicada por íleo, a vancomicina pode ser administrada por via retal, como um enema de retenção. O metronidazol deve ser administrado por via intravenosa junto com vancomicina oral ou retal, especialmente se houver obstrução intestinal (McDONALD *et al.*, 2018).

Uma coorte retrospectiva e análises de eficácia foram conduzidos entre adultos com CDI agudo e demonstrou que o metronidazol não foi inferior à vancomicina para CDI leve, mas a vancomicina foi um preditor independente para aquisição de VRE pós-CDI (ZILBERMAN-ITSKOVICH *et al.*, 2019). As diretrizes da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para 2018 preferem a vancomicina oral para tratar os pacientes com câncer (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2018). Outra vantagem da vancomicina sobre o metronidazol é que ela está associada com menos efeitos colaterais gastrointestinais que os pacientes oncológicos costumam apresentar (NEEMANN; FREIFELD, 2017).

A fidaxomicina é um antibiótico macrolídeo, foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de CDI em 2011 (LEFFLER; LAMONT, 2015). Em dois ensaios duplo-cegos com fidaxomicina e vancomicina, a análise de subgrupos de pacientes oncológicos indicou que a cura era mais provável de ocorrer com fidaxomicina do que com vancomicina (odds ratio [OR], 2,0; $P = 0,065$), a recorrência foi menos provável (OR, 0,37; $P = 0,018$) e a resposta sustentada foi mais frequente (OR, 2,56; $P = 0,003$) (CORNELLY *et al.*, 2013).

Os maiores desafios para o tratamento da CDI são a recorrência múltipla e a presença de casos complicados de doença fulminante ou grave. Nas recorrências de CDI estão indicados vancomicina ou fidaxomicina (McDONALD *et al.*, 2018). A fidaxomicina reduz o risco de recorrência em cepas não BI/NAP1/027 apenas em comparação com a vancomicina (LEFFLER; LAMONT, 2015), porque ele mantém a flora colônica normal (MATHUR *et al.*, 2014).

O uso de probióticos para prevenir CDI é um tema controverso e tem evoluído bastante nas pesquisas. Atualmente, os probióticos não são recomendados pelas diretrizes da SHEA/IDSA (McDONALD *et al.*, 2018). No entanto, uma meta-análise demonstrou que o uso de probióticos durante o início de antibióticos pode reduzir o risco de CDI em > 50% em adultos hospitalizados (SHEN *et al.*, 2017). Além disso, Osterlund *et al.* (2007), realizaram um estudo em que suplementação de lactobacilos diários para pacientes com câncer de cólon usando

quimioterapia com 5-fluorouracil foi associado à diminuição no grau de diarreia, dor abdominal e no tempo de internação. Por outro lado, existem alguns casos relatados sugerindo que os probióticos podem estar associados com o desenvolvimento de sepse (LAND *et al.*, 2005).

O transplante de microbiota fecal (FMT) é recomendado para o tratamento em pacientes com múltiplas recorrências de CDI, onde a antibioticoterapia direcionada se mostrou ineficaz. FMT envolve administração de filtrado fecal obtido de um doador saudável aos intestinos do paciente, com o objetivo de curar a CDI. O tratamento restaura a diversidade do trato gastrointestinal e impede o crescimento de *C. difficile*. O efeito pode ser observado após a administração de uma ou duas doses através de um colonoscópio ou por infusão retal (NEEMANN; FREIFELD, 2017).

Um estudo evidenciou que FMT foi mais eficaz no tratamento de CDI recorrente do que vancomicina. Entretanto, este estudo não foi realizado em pacientes com câncer (VAN NOOD *et al.*, 2013). FMT é agora considerada uma opção de tratamento para pacientes imunocomprometidos com recorrências ou falha de outras alternativas (DI BELLA *et al.*, 2015; NEEMANN; FREIFELD, 2017). Se o tratamento médico for ineficaz, a cirurgia deve ser considerada, incluindo a colectomia subtotal que preserva o reto (SARTELLI *et al.*, 2019), embora a intervenção cirúrgica resulte em altas taxas de mortalidade de aproximadamente 30% (CHENG; FISCHER, 2019).

2.7 Resposta clínica e desfecho

A morbidade e mortalidade de CDI aumentaram nos últimos anos, e evoluiu de uma doença de menor morbidade para uma grande preocupação para os Sistemas de Saúde. Embora a CDI ocorra em populações imunocomprometidas, não tem recebido a mesma atenção que as infecções fúngicas invasivas ou virais nesses pacientes até recentemente (SI-LAN GU *et al.*, 2015).

CDI recorrente (rCDI) é definida como um novo episódio de CDI, que ocorre dentro de 8 semanas após um episódio anterior resolvido com o tratamento. Enquanto cura sustentada é definida como a ausência de recorrência de sintomas até 12 semanas após o episódio anterior (TSCHUDIN-SUTTER *et al.*, 2018). rCDI pode ser devido a mesma cepa de CDI anterior ou reinfeção por uma cepa diferente (TANG-FELDMAN *et al.*, 2003). A taxa de recorrência de CDI na população em geral é de 15-30%. O risco é maior em imunocomprometidos (incluindo pacientes com câncer) e pacientes idosos (KHAN *et al.*, 2012).

A resposta à terapia de diarreia associada a *C. difficile* é significativamente menor entre pacientes com câncer em comparação com pacientes sem câncer. Cornely *et al.* (2013), em dois grandes ensaios duplo-cegos comparando terapêutica para CDI, a taxa de cura foi significativamente menor entre pacientes oncológicos em comparação com pacientes sem câncer (n = 922; 79,2% v 88,6%; p <0,001, respectivamente).

Apesar de várias opções de tratamento, a CDI está associada a 15.000-30.000 mortes nos EUA (McDONALD *et al.*, 2018). Yoon *et al.* (2014), avaliaram os preditores de mortalidade de CDI em pacientes com câncer e descobriram que neutropenia grave (contagem absoluta de neutrófilos $\leq 500/\mu\text{L}$) foi associada a um pior resultado. Eles realizaram um estudo com 5594 pacientes adultos com CDI que receberam tratamento contra o câncer, a mortalidade relacionada a CDI foi de 19,7%. Verificaram que a neutropenia prediz independentemente a mortalidade relacionada ao CDI nessa população (YOON *et al.*, 2014).

Depois de primeiro rCDI, o risco de múltiplas recorrências aumenta para 40% (GIACOBBE *et al.*, 2020). Chung *et al.* (2016), avaliaram 580 pacientes com CDI (159 deles com câncer), e a recorrência no grupo com câncer foi maior do que nos pacientes sem câncer (20,4% vs 12,3%, respectivamente). Este achado foi apoiado por outro estudo, que encontrou uma taxa de recorrência em pacientes com malignidade hematológica de 33,2% em 60 dias (SCAPPATICCI *et al.*, 2017). Delgado *et al.* (2017), demonstraram um pior desfecho com maior mortalidade entre pacientes com câncer que desenvolveram CDI do que entre pacientes sem CDI (9,4% vs. 7,5%, respectivamente).

Nos EUA, uma coorte retrospectiva realizada por Olsen *et al.* (2015), demonstraram que o percentual de pacientes com recidiva ou sem recidiva da CDI que evoluíram a óbito foi semelhante nos primeiros 30 dias (7,8% contra 8,7%, respectivamente), mas divergiu após este período. Em 60 dias, 17,8% dos pacientes que apresentaram recidiva da CDI foram a óbito contra 14,3% dos pacientes sem recidiva, e a diferença na mortalidade entre os dois grupos aumentou com o incremento de 90 e 180 dias (Tabela 2).

Tabela 2 - Taxa de Mortalidade em 30, 60, 90 e 180 dias em pacientes com e sem recorrência da infecção por *Clostridioides difficile* (CDI).

Período do óbito	CDI recorrente n(%)	Sem recorrência de CDI n(%)	p-valor
<30 dias	33 (7.8)	306 (8.7)	0.532
<60 dias	75 (17.8)	506 (14.3)	0.076
<90 dias	102 (24.2)	627 (17.7)	0.002
<180 dias	153 (36.3)	909 (25.7)	<0.001

Fonte: Olsen *et al.* (2015).

2.8 Aspectos epidemiológicos e predominância de ribotipos de *Clostridioides difficile*

A incidência de infecção por *C. difficile* entre pacientes hospitalizados varia amplamente de ano para ano e em locais diferentes, mas geralmente vem aumentando (AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY, 2014). É a causa mais comum de diarreia nosocomial nos Estados Unidos, implicada em 15% a 25% dos pacientes com uma morbimortalidade significativa entre pacientes hospitalizados (BARTLETT; GERDING, 2008; KELLY; LAMONT, 2008). A infecção parece ser mais comum e com maior gravidade entre os pacientes oncológicos que são submetidos à quimioterapia. Uma pesquisa multicêntrica em centros de câncer relatou que as taxas de CDI nosocomial em pacientes oncológicos eram duas vezes a taxa relatada para todos os pacientes nos Estados Unidos (15,8 v 7,4 por 10.000 pacientes-dia, respectivamente) (CHOPRA *et al.*, 2011). Estudos adicionais mostraram que até 7% dos indivíduos submetidos a cursos de quimioterapia mielossupressora para neoplasias hematológicas desenvolverão CDI, dos quais 8,2% desenvolverão doença grave, em comparação com a incidência de 2,8% nas coortes de pacientes internados em geral (GORSCHLÜTER *et al.*, 2001; LOO *et al.*, 2011).

Recentemente, Scappaticci *et al.* (2017), estimaram a incidência de CDI em 1-2% na população geral hospitalizada e aproximadamente 7-14% em adultos com câncer. Esses resultados foram corroborados por uma pesquisa nacional que utilizou os dados do National Hospital Discharge Survey (NHDS) e demonstrou que a incidência em pacientes com câncer (1,09%) foi maior do que em outros pacientes sem câncer (0,77%) (GUPTA *et al.*, 2017).

Adicionalmente, as taxas de CDI variaram com base no tipo de câncer, a infecção é 2,5 vezes mais comum entre os pacientes com câncer hematológico em comparação com aqueles com câncer sólido, o que se explica pela maior incidência de neutropenia febril resultante da quimioterapia citotóxica. Além disso, pacientes com câncer hematológico permanecem um tempo prolongado internados, em comparação com pacientes com tumores sólidos (JOLIS *et al.*, 2013).

No início dos anos 2000, hospitais começaram a relatar o aumento da incidência da infecção grave por *C. difficile*. Isolados foram caracterizados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças como toxinótipo III; pela análise de endonuclease de restrição foram agrupados na classe BI; através da eletroforese de campo pulsado (PFGE, do inglês “pulsed field gel electrophoresis”) classificados como NAP1 (“North American PFGE 1) e com a técnica da ribotipagem foram definidos como ribotipo 027, sendo posteriormente conhecidos como NAP1/BI/027 (O’CONNOR *et al.*, 2009).

Em 2008, esta cepa que apresenta resistência a fluoroquinolona (McDONALD *et al.*, 2005) e elevada taxa de mortalidade (WARNY *et al.*, 2005) foi relatada em 40 estados dos EUA, 16 países europeus e no Canadá (GERDING, 2010; KUIJPER *et al.*, 2008). Nesse mesmo ano, Bauer *et al.* (2011), estimaram uma prevalência de 5% do ribótipo 027 em 34 países europeus. A gravidade das infecções decorrentes de cepas BI/NAP1/027 está associada a inativação do regulador negativo de PaLoc *tcdC*, o que resulta na hiperprodução das toxinas A e B em 16 e 23 vezes, respectivamente (McFARLAND, 2009).

Semelhante às cepas BI/NAP1/027, as cepas do ribótipo 078 também produzem a toxina binária, e apresentam deleções em *tcdC* que levam à superexpressão de TcdA e TcdB, causando infecções mais graves com altas taxas de mortalidade. Países europeus têm sido os principais a relatarem a emergência de cepas do ribótipo 078, com 8% dos casos em 2008 (FREEMAN *et al.*, 2010). Os pacientes que apresentam infecção causada por cepas do ribótipo 078 são significativamente mais jovens (67,4 versus 73,5 anos), no entanto são poucos os relatos de epidemias devido a cepas do ribótipo 078 (FREEMAN *et al.*, 2010; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

A prevalência de CDI apresenta uma variabilidade nos diferentes locais, o que ressalta a importância das investigações regionais. No leste da China, Fang *et al.* (2014), encontraram uma prevalência de 20,5% de CDI em três hospitais oncológicos; na Espanha esse percentual foi de 17,3% (GARZOTTO *et al.*, 2015) e nos EUA, a incidência de CDI foi de aproximadamente 7-14% em adultos com câncer (SCAPPATICCI *et al.*, 2017).

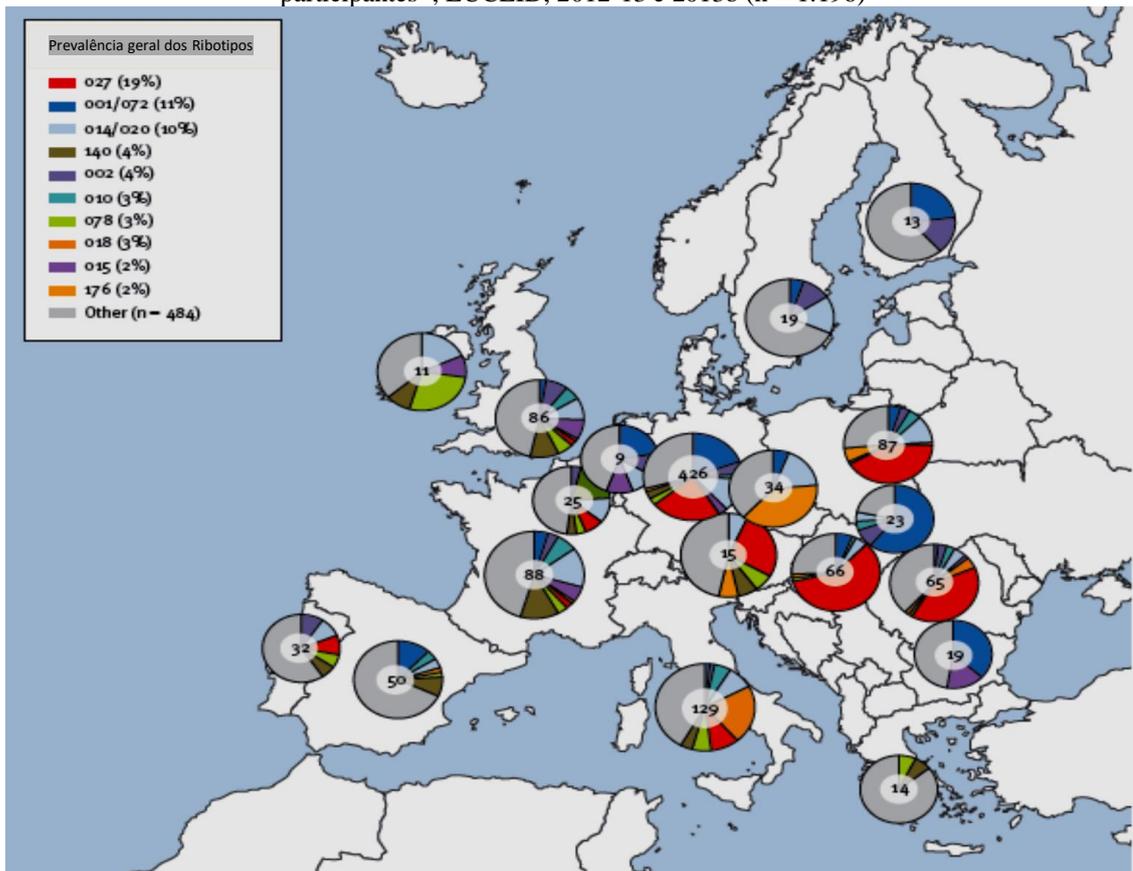
No Brasil, há particularidades em relação à prevalência de CDI nas diferentes regiões. Balassiano *et al.* (2009), em estudo realizado na Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro encontraram uma prevalência de 28,5%. Em 2011, resultados semelhantes foram descritos em outra investigação por Balassiano *et al.* (2009), onde a CDI foi identificada em 27,1% do grupo de pacientes imunossuprimidos. No Rio Grande do Sul, Pires *et al.* (2014), coletaram amostras de 96 pacientes e a frequência de isolamento de *C. difficile* foi 8,3%, diferentemente de Costa *et al.* (2017) que encontraram uma frequência de CDI elevada (48%) em pacientes oncológicos no Ceará. Estes estudos utilizaram diferentes metodologias para o diagnóstico, como também incluíram pacientes não oncológicos (pacientes transplantados e pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva).

Com o aumento da incidência de CDI em todo o mundo, a caracterização molecular de cepas tem permitido o reconhecimento de determinados ribótipos da bactéria associados a uma maior ou menor virulência. A utilização dos métodos moleculares nos estudos epidemiológicos do *C. difficile* é importante para caracterizar as cepas circulantes em cada país. Esses métodos

incluem tipagem da sequência multilocus (MLST), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), PCR ribotipagem, toxintipagem e sequência do genoma completo (WGS) (FOXMAN *et al.*, 2005; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

A distribuição de isolados (n=1196) de *C. difficile* na Europa foi investigada como parte do estudo europeu, multicêntrico, prospectivo de prevalência de infecção por *C. difficile* em pacientes hospitalizados com diarreia (EUCLID), com a participação de 19 países europeus. Deste total, 596 amostras eram de pacientes com CDI, o ribotipo 027 foi detectado em 22% (32/144) dos casos com idade entre 18 a 65 anos, mas a prevalência diminuiu naqueles com idade ≥ 65 anos (14% (59/412)) e mais ainda naqueles com idade ≥ 81 anos (9% (18/195)). A PCR ribotipagem foi realizada em todos os casos de CDI, 125 ribotipos foram identificados, os ribotipos 027 (19%, n=222), 001/072 (11%, n=134) e 014/020 (10%, n=119) foram os mais prevalentes (DAVIES *et al.*, 2016) (Figura 6).

Figura 6 - Distribuição geográfica de ribotipos de PCR de *Clostridioides difficile*, pelos países europeus participantes^a, EUCLID, 2012-13 e 2013b (n = 1.196)



Fonte: Davies *et al.* (2016, tradução nossa).

Nota: EUCLID-estudo europeu, multicêntrico, prospectivo, bianual, de prevalência pontual de infecção por *Clostridioides difficile* em pacientes hospitalizados com diarreia; Os gráficos de pizza mostram a proporção dos ribotipos mais comuns por país e o número no centro dos gráficos é o número de isolados no país.

^a Áustria, Bélgica, Bulgária, República Tcheca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Irlanda, Itália, Holanda, Polónia, Portugal, Romênia, Eslováquia, Espanha, Suécia e Reino Unido.

Dados de vigilância de ribotipagem mostraram que a epidemiologia molecular da CDI está mudando. A prevalência do ribotipo epidêmico 027 está diminuindo globalmente (KATZ *et al.*, 2018). Nos EUA, Gonzales-Luna *et al.* (2020), incluíram isolados de 50 hospitais no período de 2011 e 2018, e os ribotipos mais comuns isolados foram 014-020 (16,9%), seguido por 027 (16,5%) e 106 (12%). A prevalência do ribotipo 027 diminuiu em mais de 50% no Texas desde seu pico em 2012–13, consistente com outros relatórios do EUA (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019; SNYDMAN *et al.*, 2017; TICKLER *et al.*, 2019). Com o declínio desta epidemia, houve um aumento correspondente em ambos ribotipos específicos, como 106 e 014-020 (GONZALES-LUNA *et al.*, 2020). E um ribotipo raro, 255 foi isolado ao longo do período de estudo (SNYDMAN *et al.*, 2017).

Fang *et al.* (2014), realizaram uma investigação abrangente de *C. difficile* entre pacientes com câncer de três hospitais no leste da China. A maioria dos pacientes eram jovens (<50 anos) e os ribotipos das 82 amostras de *C. difficile* foram determinados. Entre os resultados estão 12 padrões de ribotipos, incluindo ribotipo 001 (n=22), ribotipo 017 (n=15), ribotipo 017/1 (n=16), ribotipo 014/0 (n=12), ribotipo 017/2 (n=10), e um de cada um dos ribotipos 666, 650, 555, 445, 220, 037 e 087. Nenhuma das cepas pertencia ao ribotipo 027.

No Brasil, os dados epidemiológicos sobre o número de casos de CDI e ribotipos são escassos, principalmente em unidades hospitalares (públicas e privadas) (BALASSIANO *et al.*, 2009, 2011) (Figura 7). Alguns estudos demonstraram a importância de notificar os casos relacionados ao CDI no país, a fim de minimizar a disseminação de cepas epidêmicas no Brasil que podem causar um surto (TRINDADE *et al.*, 2019).

Balassiano *et al.* (2009), por meio da ribotipagem identificaram dois ribotipos, 106 e 014. O ribotipo 106 é comumente encontrado no Reino Unido, e esta foi sua primeira notificação no Brasil. Posteriormente em 2011, os pesquisadores identificaram quatro ribotipos diferentes (133, 233, 020 e 010) com base no perfil de bandas de DNA fragmentadas (BALASSIANO *et al.*, 2011).

Em 2014, Secco *et al.*, ao analisar amostras de pacientes imunocomprometidos no Hospital Universitário, identificaram a presença de três ribotipos diferentes: 014, 043 e 046. No Brasil até o momento, a cepa epidêmica NAP1/027 não foi isolada, embora a incidência de CDI nos hospitais apresente uma variação a cada ano. Os principais ribotipos que circulam nos estados brasileiros são 014, 043, 046, 106, 132, 133, 134, 135, 136, 142, 143 e 233 (TRINDADE *et al.*, 2019).

Figura 7 - Representação dos casos de Infecção por *Clostridioides difficile* nos estados brasileiros. O mapa destaca os estados onde os estudos associados à notificação deste microrganismo, mostrando o panorama dos principais ribotipos identificados no Brasil



Fonte: Trindade *et al.* (2019).

Nota: (*) Identificação de casos de cepas positivas de toxina binária (CDT)

2.9 Prevenção de CDI

C. difficile está presente em vários locais do ambiente hospitalar, os esporos viáveis podem ser identificados nas mãos e estetoscópios dos profissionais de saúde, na roupa de cama, nos telefones, nos banheiros, e na mobília de cabeceira (OTTER *et al.*, 2011).

Pacientes com suspeita de infecção por *C. difficile* devem ser isolados em quarto com banheiro privativo, os profissionais de saúde devem realizar as precauções de contato, higienizar as mãos com água e sabão (KHAN *et al.*, 2012; RAZA *et al.*, 2010); a desinfecção terminal também é recomendada (MUTO *et al.*, 2007). As precauções de contato devem permanecer pelo menos por 48 horas após a resolução da infecção. No entanto, a precaução de contato prolongada pode ser concluída até dia da alta se a taxa de CDI permanecer elevada, apesar da aplicação das medidas de controle (McDONALD *et al.*, 2018).

O uso de um desinfetante à base de álcool não reduz o número de esporos viáveis de *C. difficile*, por estes serem resistentes ao produto (LEFFLER; LAMONT, 2015); enquanto a higienização com sabão e água reduz os esporos de forma eficaz (JABBAR *et al.*, 2010).

Opióides e agentes antimotilidade devem ser interrompidos porque podem contribuir para o megacólon tóxico (KHAN *et al.*, 2012). Apesar da associação epidemiológica entre CDI e inibidores de bomba de próton, não há recomendação para a suspensão dos mesmos (McDONALD *et al.*, 2018).

Nos casos de CDI associado à quimioterapia, a interrupção da quimioterapia e/ou mudança para um regime alternativo, pode ser necessária. A melhora sintomática pode ser esperada em 72 horas (KHAN *et al.*, 2012). Além disso, o retratamento com o mesmo quimioterápico não é contraindicado (EMOTO *et al.*, 1996).

A etapa mais importante para prevenir CDI é utilizar o programa de Stewardship, que gerencia o uso racional dos antimicrobianos. Minimizar o uso de antibióticos tem sido sucesso na redução da infecção por *C. difficile* em pacientes hospitalizados (VONBERG *et al.*, 2008). A proibição do uso de rotina de ceftriaxona e ciprofloxacina acompanhada por uma campanha educacional reduziu a taxa de infecção por *C. difficile* em 77% em um hospital na Escócia com 450 leitos (DANCER *et al.*, 2013). Em um hospital no Canadá, Valiquette *et al.* (2007), observaram uma diminuição de CDI em 60%, como consequência de uma redução em 23% no total de uso de antibióticos.

Nos últimos anos, o Bezlotoxumab, um anticorpo monoclonal contra a toxina B de *C. difficile*, foi aprovado para prevenção de rCDI. Bezlotoxumab é administrado como uma única dose via EV durante o curso da antibióticoterapia para CDI em pacientes com alto risco de rCDI (GERDING *et al.*, 2018; ORTH *et al.*, 2014; WILCOX *et al.*, 2017). Um ensaio recente comparou pacientes que receberam uma infusão de bezlotoxumabe versus placebo após o tratamento de CDI. A taxa de recorrência foi significativamente menor em pacientes que receberam bezlotoxumab (17% em comparação com 28% no grupo de placebo) (WILCOX *et al.*, 2017).

Algumas vacinas para CDI estão atualmente em ensaios clínicos (LEGENZA *et al.*, 2003; HENDERSON *et al.*, 2017). Essas vacinas produzem antitoxina Anticorpos A e B, são geralmente bem toleradas, os eventos adversos comuns são dor no local da injeção e sintomas semelhantes aos da gripe. No entanto, todos esses estudos estão em fase II ou fase III e os dados de eficácia ainda não estão disponíveis (HENDERSON *et al.*, 2017).

2.10 Modelo Teórico-hipotético

- 1) Existe uma alta prevalência de CDI em pacientes oncológicos internados em dois hospitais de referência em Oncologia em Recife;
- 2) As cepas de *C. difficile* isoladas são toxigênicas produtoras das toxinas A e B;
- 3) As cepas toxigênicas de *C. difficile* isoladas no estudo pertencem aos principais ribotipos (014, 043, 046, 106, 132, 133, 134, 135, 136, 142, 143 e 233) que circulam nos estados brasileiros;
- 4) Os casos de CDI em pacientes imunocomprometidos são classificados em sua maioria como grave ou complicado.

2.11 Justificativa

A prevalência da infecção pelo *C. difficile* vem aumentando no Brasil (BALASSIANO *et al.*, 2010) e no Mundo, além disso, é uma importante causa de diarreia hospitalar associada ao uso de antimicrobianos (NEEMANN; FREIFELD, 2017).

Estudos de diarreia por *C. difficile* em pacientes oncológicos são escassos, apesar da taxa de CDI hospitalar ser duas vezes maior entre os pacientes com câncer em comparação com todos os outros pacientes internados, devido a maior exposição aos fatores de risco (KAMBOJ *et al.*, 2012).

Poucos hospitais no Brasil dispõem de métodos moleculares para seu diagnóstico e o método Ensaio Imunoenzimático (EIA) que tem baixa especificidade, é um dos mais utilizados nos centros brasileiros (SOUZA SPADÃO, 2014). Neste estudo utilizaremos um método mais sensível (sensibilidade de 93,8% e especificidade de 94%) como diagnóstico, que será a qPCR (RAZA *et al.*, 2010).

A realização de estudos de prevalência e a caracterização molecular das cepas de *C. difficile* é fundamental para a compreensão de sua dispersão entre as unidades hospitalares brasileiras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência, resposta clínica, desfecho e fatores de risco, além de caracterizar as cepas de *C. difficile* em pacientes com diarreia nosocomial em Hospitais de Referência em Oncologia em Recife-PE.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a prevalência da diarreia nosocomial associada ao *C. difficile*, nos pacientes internados em Hospitais de Referência em Oncologia;
- b) Detectar os genes *tcdA* (toxina A), *tcdB* (toxina B), *cdtB* (toxina binária) e gene *tpi* de *C. difficile*;
- c) Descrever as características clínicas (febre, dor abdominal, hipotensão, choque e insuficiência renal) e laboratoriais dos pacientes com diarreia nosocomial, com exames positivos e negativos para *C. difficile*;
- d) Analisar a resposta clínica (resolução dos sintomas, resposta parcial ou piora clínica) e o desfecho (alta, recidiva ou óbito) dos pacientes com diarreia nosocomial, com exames positivos e negativos para *C. difficile*;
- e) Analisar os fatores de risco (idade > 65 anos, antibioticoterapia prévia, presença de outras comorbidades, uso de quimioterápicos, neutropenia febril, uso de protetores gástricos, cirurgia gastrointestinal e tempo de internamento) já definidos na literatura da diarreia nosocomial nos pacientes com exames positivos e negativos para *C. difficile*;
- f) Realizar a caracterização molecular das cepas de *C. difficile* por PCR-ribotipagem.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

O ensaio foi constituído de um estudo prospectivo, corte transversal para determinação da prevalência, resposta clínica, desfecho e fatores de risco. Portanto, a identificação da diarreia nosocomial nos pacientes oncológicos internados nas Enfermarias de Oncologia, Onco-hematologia ou UTI foi o ponto inicial do estudo.

4.2 População alvo e local do estudo

A população do estudo foi composta por pacientes oncológicos admitidos nas enfermarias de Oncologia, Onco-hematologia e UTI de dois Hospitais de Referência em Oncologia (Hospital do Câncer de Pernambuco e Hospital das Clínicas) no período de novembro/2017 a agosto/2019, que apresentaram o quadro de diarreia após 48h da admissão e concordaram em participar da pesquisa.

Para o preenchimento do protocolo de pesquisa, foram consultados os prontuários no SAME dos Hospitais de Referência em Oncologia. Os exames Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR) foram realizados no Setor de Bacteriologia e Biologia molecular do Laboratório Marcelo Magalhães. A caracterização molecular das cepas de *Clostridioides difficile* com obtenção do DNA genômico e ribotipagem das cepas foi realizada em parceria com pesquisadores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes UFRJ.

4.3 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra

Devido à baixa prevalência (3%) de CDI, com apenas dois casos positivos nos primeiros 60 pacientes pesquisados, não foi possível determinar um tamanho amostral científico plausível de ser obtido, então foi estimada a possibilidade de se obter uma amostra de 150 pacientes, dentro do prazo utilizado para a coleta de dados. A amostra final obtida foi de 156 pacientes.

4.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os indivíduos com idade acima de 18 anos, que após 48 horas de internamento, apresentaram quadro de diarreia nosocomial sugestiva de CDI.

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

Quadro 4 - Definições de casos de CDI

Definição de caso de diarreia por <i>C. difficile</i>	Paciente admitido no hospital que apresente diarreia (três ou mais fezes líquidas em 24 horas) após 48 horas de internamento e exame da toxina A/B positiva para <i>C. difficile</i> .
Definição de caso suspeito de diarreia por <i>C. difficile</i>	Os pacientes considerados suspeitos foram aqueles internados no hospital que apresentaram diarreia após 48 horas de internamento e que coletaram fezes para a pesquisa de toxina A/B para <i>C. difficile</i> .
Definição de recidiva de diarreia por <i>C. difficile</i>	Episódio de infecção por <i>C. difficile</i> em oito semanas ou menos do início do primeiro episódio, desde que o primeiro episódio tenha sido resolvido.

Fonte: McDonald *et al.* (2018).

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, pacientes com diarreia comunitária, patologias que acometem o trato gastrointestinal causando diarreia crônica (doença de Crohn, retocolite ulcerativa, síndrome do intestino curto, síndrome do intestino irritável, síndrome da má-absorção, doença celíaca) ou ainda qualquer condição médica que comprometa a capacidade do paciente de participar do estudo.

4.6 Operacionalização e categorização das variáveis

As variáveis relacionadas ao estudo estão relacionadas no quadro 5, abaixo.

Quadro 5 - Variáveis relacionadas ao estudo

(continua)

Variáveis	Definição	Categorização
Sexo	Referente ao sexo biológico	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Anos de vida completos até o dia do diagnóstico do <i>C. difficile</i>	1. 18 - 64 anos 2. > 65 anos
Manifestação clínica	Caracterização dos sinais e sintomas encontrados	1. Febre (temperatura axilar > 37.8°) 1. Sim 2. Não 2. Dor abdominal 1. Sim 2. Não 3. Hipotensão (PAS <90mmHg ou PAD <60 mmHg) 1. Sim 2. Não 4. Choque (uso de drogas vasoativas) 1. Sim 2. Não 5. Insuficiência renal (diminuição de 50% do clearance de creatinina) 1. Sim 2. Não
Leucócitos	Dosagem sérica dos leucócitos	1. < 4.000/mm ³ 2. 4.000 – 11.000/ mm ³ 3. > 11.000/ mm ³ 4. Ignorado
Ureia	Dosagem sérica da ureia	1. < 19 mg/dl 2. 19.2 – 49.2 mg/dl 3. > 49.2 mg/dl 4. Ignorado
Creatinina	Dosagem sérica de creatinina	1. < 0.5 mg/dl 2. 0.5 – 1.3 mg/dl 3. > 1.3 mg/dl 4. Ignorado
Albumina	Dosagem sérica de Albumina	1. 3,6-5,0 g/dl 2. < 3,6 g/dl 3. Ignorado
Sódio	Dosagem sérica do sódio	1. < 136 mEq/l 2. 136 – 142 mEq/l 3. > 142 mEq/l 4. Ignorado
Potássio	Dosagem sérica do potássio	1. < 3,5 mEq/l 2. 3,5 – 5,5 mEq/l 3. > 5,5 mEq/l 4. Ignorado
Patógeno <i>Clostridioides difficile</i>	Pesquisa do <i>C. difficile</i> pelo método qPCR	1. Positivo 2. Negativo
Potenciais fatores de risco	Antibioticoterapia prévia	1. Sim (qual?) 2. Não a. Clindamicina b. Penicilina + inibidores de betalactamases c. Cefalosporinas d. Aminoglicosídeos e. Fluoroquinolonas f. Glicopeptídeos g. Macrolídeos h. Carbapenênicos i. Metronidazol j. Polimixina B k. Daptomicina l. Antifúngicos

Quadro 5 - Variáveis relacionadas ao estudo

(conclusão)

Variáveis	Definição	Categorização
Potenciais fatores de risco	Uso de quimioterápicos	1. Sim (qual?) 2. Não a. Agentes antimetabólitos b. Agentes alquilantes c. Agentes platinantes d. Alcalóides da vinca e. Taxanos f. Inibidores da Topoisomerase g. Antraciclina h. Rituximabe i. Imatinib
Potenciais fatores de risco	Idade avançada (>65 anos)	1. Sim 2. Não
Potenciais fatores de risco	Doença subjacente grave	1. Sim 2. Não
Potenciais fatores de risco	Uso de protetores gástricos	1. Sim () Inibid. de bomba de próton () Antagonista do canal H2 2. Não
Potenciais fatores de risco	Cirurgia gastrointestinal	1. Sim 2. Não
Potenciais fatores de risco	Tempo prolongado de internamento >7dias	1. Sim 2. Não
Potenciais fatores de risco	Neutropenia Tempo de Neutropenia Número neutrófilos	1. Sim 2. Não (≤7d ou >7d) (500-101/mm ³) (<100/mm ³)
Tratamento clínico	Antibiótico escolhido para o tratamento da diarreia por <i>C. difficile</i>	1. Metronidazol VO 1. Sim 2. Não 2. Metronidazol EV 1. Sim 2. Não 3. Vancomicina VO 1. Sim 2. Não
Resposta clínica dos casos tratados com antibiótico	Evolução do paciente no tratamento da diarreia por <i>C. difficile</i>	1. Resolução dos sintomas 2. Resposta parcial 3. Piora clínica (megacólon e/ou perfuração)
Desfecho	Situação do paciente após o tratamento com antibióticos em 30/60 dias	1. Cura 2. Recidiva após 30d 3. Recidiva após 60d 4. Óbito

Fonte: A autora.

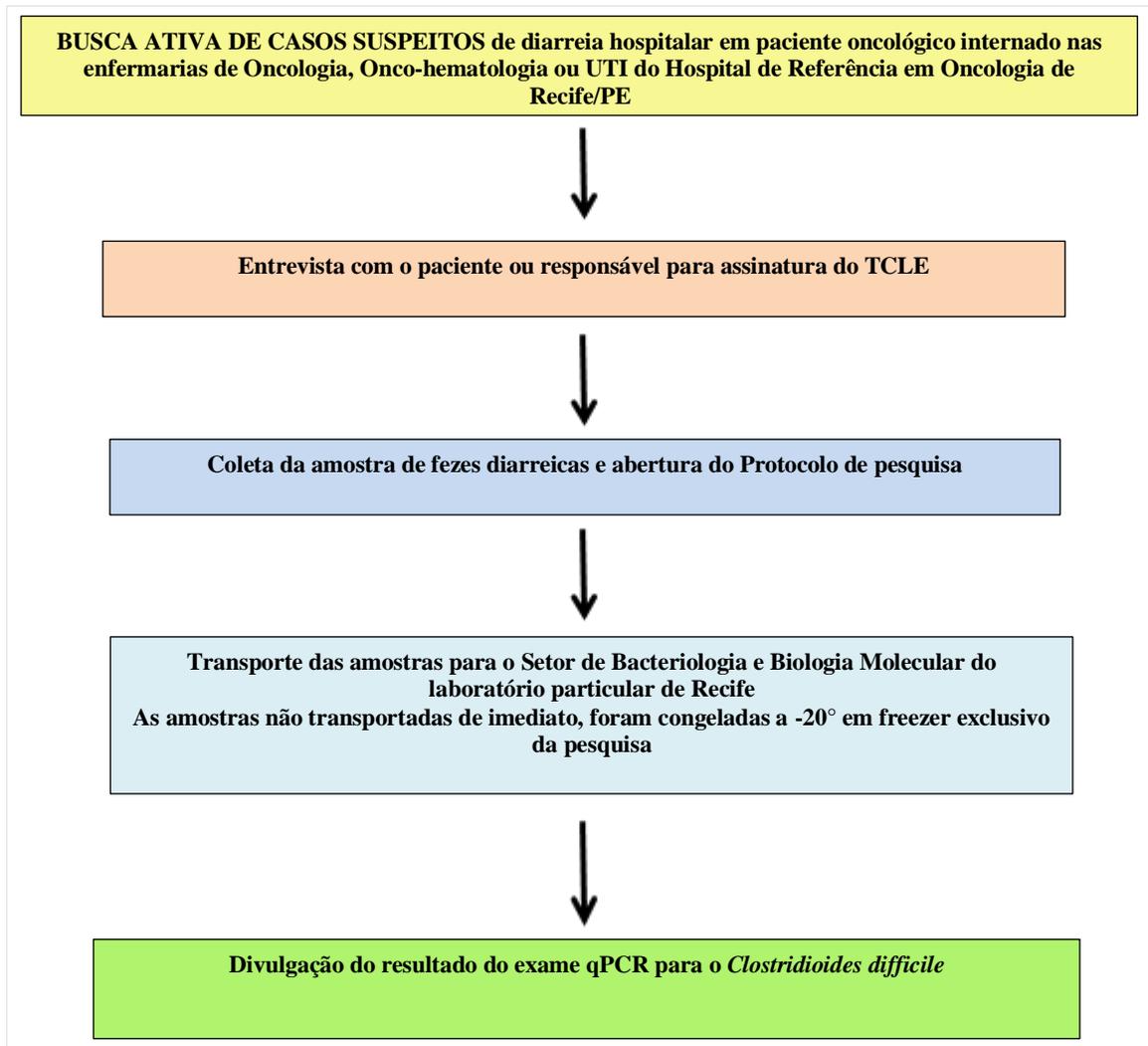
4.7 Métodos de coleta e processamento de dados

4.7.1 Coleta das amostras de fezes diarreicas

Para identificação dos casos suspeitos de CDI, foi realizada uma busca ativa dos pacientes que após 48h da admissão hospitalar apresentaram diarreia (Figura 8). As fezes diarreicas coletadas foram inseridas dentro de um frasco de coleta estéril apropriado para fezes,

com boca larga e uma tampa bem ajustada. As amostras foram identificadas, e em seguida armazenadas no freezer específico para a pesquisa com temperatura -20° . Posteriormente, estas amostras foram acondicionadas em uma caixa térmica com baterias e transportadas para o laboratório Marcelo Magalhães, setor de bacteriologia e biologia molecular para realização da técnica Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), pesquisa dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* e do gene espécie-específico *tpi* (*triose phosphate isomerase*) do *Clostridioides difficile*. Na segunda fase da pesquisa, as amostras positivas do *Clostridioides difficile* foram enviadas para o Instituto de Microbiologia PAULO de GÓES na UFRJ, para realizar a cultura em meio *Clostridioides difficile* brucella ágar (CDBA), o ensaio MALDI-TOF MS, a obtenção do DNA genômico e Ribotipagem das cepas.

Figura 8 - Fluxograma – Coleta dos dados / Amostras



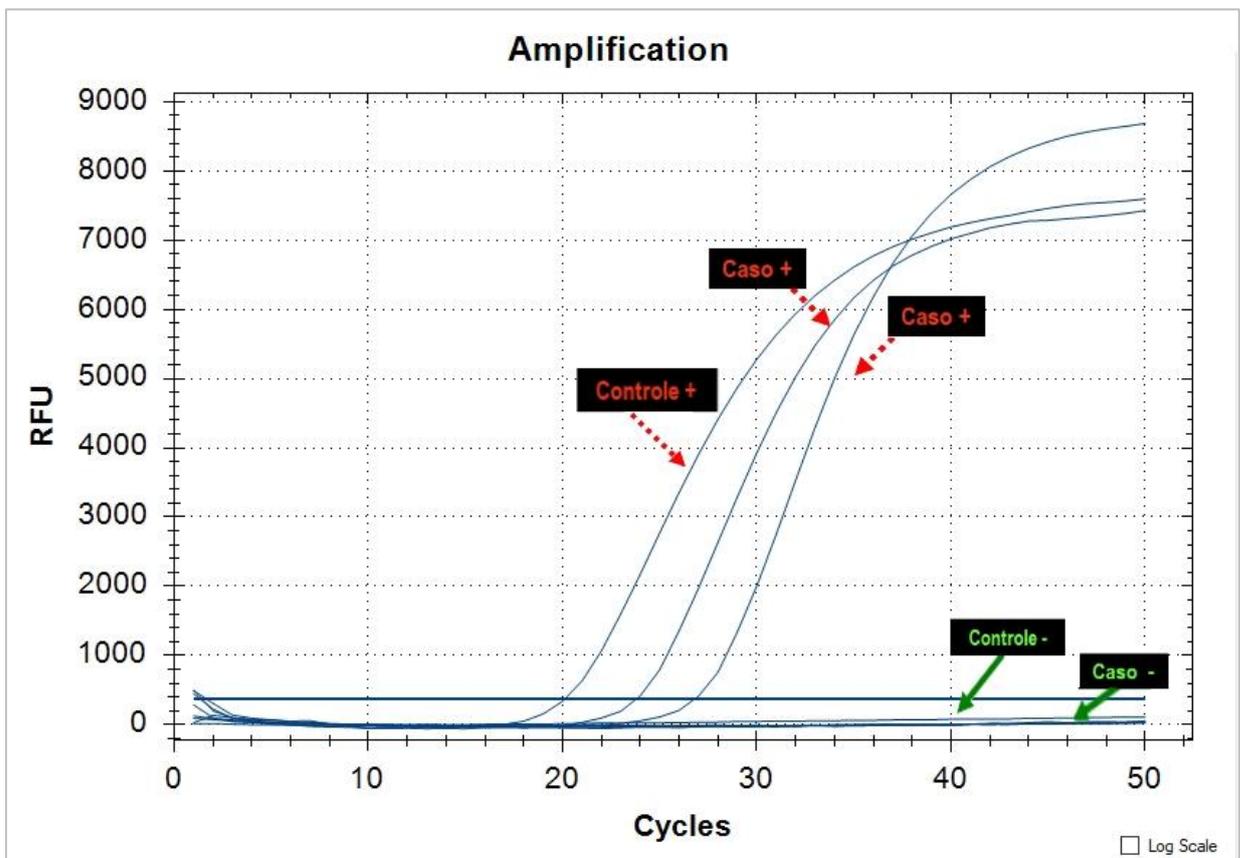
Fonte: A Autora.

4.8 Identificação do *Clostridioides difficile* (Laboratório Recife-PE)

4.8.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de genes específicos do *Clostridioides difficile*

No laboratório, as amostras de fezes diarreicas foram preparadas para realização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) (figura 9). Essa técnica permite monitorar a PCR enquanto os ciclos se sucedem e detectar o produto da amplificação à medida que ele está sendo formado, dispensando a etapa de eletroforese em gel. O sistema é baseado na detecção e quantificação de um corante fluorescente, cujo sinal aumenta em proporção direta à quantidade de fragmentos amplificados na reação de PCR. A visualização da reação se faz por meio de sondas marcadas com corante fluorescente, conhecida como TaqMan®. Este sistema apresenta alta especificidade, ligando-se somente ao produto da PCR.

Figura 9 - Exame Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real do *C. difficile*



Fonte: A autora a partir do Laboratório Marcelo Magalhães, 2020.

4.8.1.1 Primeira etapa: extração do DNA

As amostras de fezes foram coletadas em recipiente estéril, e posteriormente transferidas para microtubos tipo *eppendorf* e armazenados para congelamento a -20°C até a etapa de extração. As amostras de fezes foram degeladas e o DNA extraído empregando-se o kit comercial *QIAamp Stool DNA Mini Kit* (Qiagen; Chattersworth, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

4.8.1.2 Segunda etapa: amplificação do DNA

As reações de amplificação do material genômico foram realizadas em máquina de PCR em tempo real (CFX96, BioRad) utilizando o sistema TaqMan[®] para detecção do produto de amplificação. O princípio do sistema utilizado na PCR em tempo real consiste na combinação de um termociclador com a detecção de fluorescência emitida em cada ciclo.

O método de TaqMan[®] utiliza uma sonda marcada com uma molécula fluorescente (fluoróforo) e outra de apagamento intramolecular (*quencher*) além do par de oligos iniciadores (*primers*) que se utilizam na PCR comum. A sonda é constituída de uma sequência-alvo que está entre os dois oligos iniciadores. Enquanto a sonda está livre em solução, o fluoróforo e o *quencher* que ficam nas extremidades da sonda só emitem sinal quando são separados por meio da clivagem da sonda pela enzima Taq[®] DNA polimerase durante a reação. Portanto, durante a reação, quando as sondas se ligam na sequência-alvo, o fluoróforo e o *quencher* são separados, e a fluorescência pode ser mensurada pela máquina.

Foi utilizada a plataforma CFX96 (BioRad), com o seguinte protocolo de ciclagem: um ciclo de 50°C durante 2 minutos; um ciclo de 95°C durante 10 minutos; 50 ciclos de 90°C durante 50 segundos e 60°C durante 1 minuto. Os primers e sondas que foram usados para detecção dos genes para a toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*), toxina binária (*cdtA* e *cdtB*), assim como do gene espécie-específico *tpi* (*triose phosphate isomerase*) estão descritos nos quadros 6 e 7.

Quadro 6 - Primers e Sondas usados para detecção do gene *tcdB* do *Clostridioides difficile*

PCR em tempo real	Alvo	Primer ou Sonda	Sequência nucleotídeo (5' → 3')
LUMC	<i>tcdB</i>	398CLDs 399CLDas 551CLD-tq-FAM	GAAAGTCCAAGTTTACGCTCAAT GCTGCACCTAAACTTACACCA FAM-ACAGATGCAGCCAAAGTTGTTGAATT-BHQ1

Fonte: Knetsch *et al.* (2011).

Quadro 7 - PCR multiplex em tempo real e as sondas TaqMan para detecção de *Clostridioides difficile*, suas toxinas específicas A e B e genes da toxina binária A

Alvo principal	Gene principal	Sequência nucleotídeo (5' → 3')	Número do Banco de genes
<i>C. difficile</i>	<i>tpi</i>	F: 5'-gaagctactaagggtacaaa-3' R: 5'-ggctattcctacttctaagc-3' Probe: 5'-VIC ataagaggtgaaacttctcctgtaaactgctcc TAMRA-3'	FN668944 FN668941 FN668375 FN665654 FN665653
Toxina A	<i>tcdA</i>	F: 5'-tgataacgtatagcttgacc-3' R: 5'-atggtttacctcagatagg-3' Probe: 5'-FAM tgaatacttgcacctgctaatacggatg TAMRA-3'	DQ117264 DQ117255 DQ117249 DQ117248 DQ117247
Toxina B	<i>tcdB</i>	F: 5' - -gaaggattacctgtaattgc-3' R: 5'-ctgccattatacctattctttagc-3' Probe: 5'-VIC ctctttgattgctgcacctaaacttacacc TAMRA-3'	HM062511 HM062510 HM062509 HM062508 HM062507
Toxina binária A	<i>cdtA</i>	F: 5'-tatattaaagcagaagcatctgt-3' R: 5'-ctggaccatttgatattaataaatt-3' Probe: 5'-FAM tcctccacgcatataatcattatcagc TAMRA-3'	DQ102377 DQ102378 DQ102375 DQ102376 AJ238325

Fonte: Kilic *et al.* (2015).

Nota: Abreviações: *tpi*, gene espécie-específico do *Clostridioides difficile*; *tcdA*, gene da toxina A; *tcdB*, gene da toxina B; *cdtA*, gene da toxina binária.

4.9 Caracterização molecular das cepas de *Clostridioides difficile* (Laboratório UFRJ)

4.9.1 Cultura em meio diferencial *Clostridioides difficile* Brucella agar (CDBA)

Para o isolamento, aproximadamente um grama de fezes, das amostras recebidas, foi transferido para um tubo estéril contendo 1 mL de caldo de infusão de cérebro e coração pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente - BHI-PRAS (do inglês, *Brain Heart Infusion – pre-reduced anaerobically and sterilized*), acrescido de 0,1% de cisteína (w/v), 0,4% de rezasurina (v/v), 1% de hemina (v/v), 0,1% de menadione (v/v) e 0,1% de taurocolato de sódio (p/v) (utilizado para favorecer a germinação dos esporos). Todos os tubos foram homogenizados em

vortéx por aproximadamente 30 s e aquecidos a 56°C por 1 hora, a fim de reduzir a presença de formas vegetativas de micro-organismos. A partir desta mistura foi realizada uma semeadura no meio seletivo e diferencial *Clostridioides difficile* Brucella agar (CDBA) acrescido de 0,01% de taurocolato de sódio e dos antibióticos D-cicloserina (0,5mg/mL) e cefoxitina (0,0128mg/mL), com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C em anaerobiose (80% N₂, 10% H₂ 10% CO₂) por até 7-10 dias (Nerandzic e Donskey, 2009). Após a incubação no meio CDBA, foi observado o aspecto característico das colônias presentes no meio com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Zeiss, Alemanha), com aumento de 400X. Todas as colônias com morfologia característica, possuindo aspecto de vidro quebrado e odor característico foram submetidas a coloração morfotinturial de Gram (Ferreira, Domingues & Uzeda, 2003). As colônias com bastonetes Gram-positivos e que apresentaram as características descritas acima foram identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF MS (Bruker®).

4.9.2 Espectrometria de massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo – MALDI-TOF MS

A identificação das colônias sugestivas de *C. difficile* foi feita por espectrometria de massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF MS do inglês, *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time off light mass spectrometry*) utilizando o sistema MALDI Biotyper (Bruker®). Neste, colônias sugestivas de *C. difficile* foram passadas com um palito estéril, em duplicata, para uma placa metálica, seguido da adição de 1 µL de ácido fórmico 0,1% em água *High Pure Liquid Chromatography* (HPLC) (Tedia) e 1µL de matriz composta por *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%. Após secar em temperatura ambiente (TA), o material foi analisado. No aparelho, a identificação é dada pela comparação entre os espectros do banco de dados do equipamento e o espectro obtido da análise da amostra, gerando *scores* que podem variar de 0,0 a 3,0. Valores de 0,0 a 1,699 não apresentam identificação confiável; de 1,7 a 1,999 representam provável identificação de gênero, de 2,0 a 2,299 representam confirmação de gênero e provável identificação de espécie e de 2,3 a 3,0 representam alta probabilidade de identificação de espécie. No presente estudo, amostras com *score* igual ou maior que 2,3 tiveram a identificação confirmada como *C. difficile*.

4.9.3 Obtenção do DNA genômico

Para a obtenção do DNA bacteriano foi feito um cultivo em meio semissólido de ASS (ágar sangue suplementado) por 18 h a 37°C em atmosfera de anaerobiose. Em seguida, 4 colônias foram selecionadas com a alça microbiológica, transferidas para microtubo contendo 100 µL de solução de extração [5% de Chelex 100 (Bio-Rad) e 2% de Proteinase K a 20 mg/L (Sigma)] e homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 h a 56°C. Após o término da incubação, os tubos foram homogeneizados com o auxílio de um vórtex e fervidos por 10 min. Após a fervura, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 16000 xg por 2 min. Ao final da centrifugação os sobrenadantes foram transferidos para novo microtubo e mantidos a -20°C até o momento do uso.

4.9.4 Ribotipagem das cepas de *C. difficile*

A ribotipagem das cepas foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Bidet *et al.* (1999), utilizando o método da PCR a fim de amplificar as regiões intergênicas presentes entre as subunidades ribossomal 16S-23S. A mistura utilizada na reação continha 5 µL de Green GoTaq® G2 tampão 5x (Promega), 10 mM de dNTP, 10 pmol/µL de cada iniciador, 5 µL de DNA (1 ng/ µL) e 0,3 µL de Taq polimerase (5U/µL). A reação de amplificação foi feita utilizando-se o seguinte ciclo: 95°C por 7 min e 34 ciclos de 94 °C por 3 min, 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Após a amplificação, os amplicons obtidos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% (SeaKem® Gold Lonza), em tampão 1x TBE (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA) a 85 V, 400 mA por 3 h. Após a eletroforese, o gel foi mantido em uma solução de brometo de etídio 0,5% por 30 min. A análise das bandas foi realizada no programa BioNumerics® (Applied Maths®, Bélgica), utilizando como perfil de comparação o padrão de peso molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen) e a cepa epidêmica R20291 (Ribotipo 027). A nomenclatura dos ribotipos encontrados foram designadas seguindo a norma Cardiff/Leeds (001, 002, 014...). Se o perfil encontrado não corresponder a nenhum outro existente na biblioteca de referência, o ribotipo é designado como “não tipável”.

Quadro 8- Primers utilizados para detecção do gene da Região Intergênica 16S

Genes	Primers	Tamanho esperado do amplicon (pb)	Referências
Região Intergênica 16S	RIBO-1 [5'- GTGCGGCTGGATCACCTCCT -3'] RIBO-2 [5'- CCTTGCACCCTTAATAACTTGACC -3']	N/A	Bidet et al., 1999

Fonte: Bidet *et al.* (1999).

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas: média, desvio padrão e mediana da variável idade. Para avaliar diferença entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher quando a condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

4.11 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal e da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, com autorização, CAAE 63059516.7.0000.5208 (Anexo A). O estudo utilizou o TCLE (apêndice B), obedecendo às diretrizes da resolução nº 466/2012-IV do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

5 RESULTADOS

Os dados desse estudo resultaram em dois artigos científicos. O artigo 1 foi publicado na revista *Research, Society and Development*, e o artigo 2 foi submetido na revista *Journal of Infection and Public Health* e aguarda aprovação.

5.1 Artigo 1 - Baixa prevalência de infecções por *Clostridioides difficile* em hospitais de referência em oncologia

Este artigo determinou a prevalência de *Clostridioides difficile* em dois serviços de referência em oncologia utilizando para o diagnóstico, o exame Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

Resumo

As infecções por *Clostridioides difficile* (CDI) aumentaram em gravidade e incidência durante a última década. O câncer predispõe os pacientes à CDI, devido à maior exposição aos fatores de risco. O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência, resposta clínica, desfecho, descrever os fatores de risco estabelecidos na literatura em pacientes oncológicos com CDI. O estudo foi realizado em dois serviços de referência em oncologia de Recife/PE e envolveu pessoas com idade ≥ 18 anos, que apresentaram o quadro de diarreia após 48 horas da admissão hospitalar, no período de novembro/2017 a agosto/2019. Para o diagnóstico de CDI foi utilizado o exame Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Um total de 156 pacientes foram incluídos, a CDI foi identificada em 7,05% (11/156) dos pacientes estudados, todos isolados foram rastreados e amplificados por qPCR quanto à presença dos genes que codificam as toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB*), toxina binária (*cdtA*) e triose fosfato isomerase (*tpi*). O câncer de mama 27,3% (3/11) e a leucemia linfóide aguda 18,2% (2/11) foram os cânceres mais frequentes; 90,9% (10/11) fizeram uso de antibióticos e 63,6% (7/11) dos casos evoluíram para óbito. Apesar de utilizar a técnica qPCR, que é a mais sensível e específica, a prevalência de CDI foi baixa 7,05% (11/156), não houve registros de casos de CDI graves, sendo a maioria dos casos leves, o que sugere uma circulação de cepas com baixa virulência que determinam menor morbidade e mortalidade.

Palavras chaves: *Clostridioides difficile* infecção; Câncer; Antibióticos; Quimioterápicos; qPCR.

Abstract

The severity and incidence of *Clostridioides difficile* infection (CDI) have increased over the last decade. Cancer predisposes patients to CDI due to increased exposure to risk factors. The present study aimed to determine the prevalence, clinical response, outcomes, risk factors as supported in the literature in cancer patients with CDI. This was a prospective cross-sectional study conducted at two reference centres in oncology in Recife-PE, Brazil and involved individuals aged ≥ 18 years who presented with diarrhoea 48 hours after hospital admission, from November 2017 to August 2019. CDI was diagnosed using real-time polymerase chain reaction (qPCR). A total of 156 patients were included in the study, and CDI was detected in 7.05% (11/156) of the patients. All isolates were screened, and the DNA was isolated and amplified by qPCR for the detection of genes coding for toxins A and B (*tcdA* and *tcdB*), binary toxin (*cdtA*), and triose phosphate isomerase (*tpi*). Breast cancer and acute lymphoid leukemia were the most frequent cancers (27.3% [3/11] and 18.2% [2/11], respectively); 90.9% (10/11) of the cases used antibiotics, and the mortality rate was 63.6% (7/11 patients). Despite the use of the qPCR technique, which is the most sensitive and specific method for diagnosing CDI, it was found that the prevalence of the disease was low (7.05%; 11/156). There were no cases of severe CDI, and most cases found were mild, which suggests the circulation of strains with low virulence that determine lower morbidity and mortality.

Keywords: *Clostridioides difficile* infection; Cancer; Antibiotics; Chemotherapy; qPCR.

Resumen

Las infecciones por *Clostridioides difficile* (CDI) han aumentado en gravedad e incidencia durante la última década. El cáncer predispone a los pacientes a la CDI, debido a una mayor exposición a factores de riesgo. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia, respuesta clínica, resultado, describir los factores de riesgo establecidos en la literatura en pacientes oncológicos con CDI. El estudio se llevó a cabo en dos servicios de referencia oncológica de Recife/PE e involucró a personas ≥ 18 años, que presentaron diarrea a las 48 horas del ingreso hospitalario, de noviembre/2017 a agosto/2019. Para el diagnóstico de CDI se utilizó el examen de Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (qPCR). Se incluyeron un total de 156 pacientes, la CDI se identificó en el 7,05% (11/156) de los pacientes estudiados, todos los aislamientos se rastrearon y amplificaron mediante qPCR para detectar la presencia de los genes que codifican las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*), toxina binaria (*cdtA*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*). El cáncer de mama el 27,3% (3/11) y la leucemia linfocítica aguda el 18,2% (2/11) fueron los cánceres más frecuentes; el 90,9% (10/11) utilizaba antibióticos y el 63,6% (7/11) de los casos fallecieron. A pesar de utilizar la técnica qPCR, que es la más sensible y específica, la prevalencia de CDI fue baja 7,05% (11/156), no se registraron casos de CDI grave, siendo la mayoría de casos leves, lo que sugiere una circulación de cepas de baja virulencia que determinan una menor morbilidad y mortalidad.

Palabras clave: Infección por *Clostridioides difficile*; Cáncer; Antibióticos; Quimioterápicos; qPCR.

1. Introdução

As infecções por *Clostridioides difficile* (CDI) aumentaram em gravidade e incidência durante a última década (Fuereder et al., 2016) e representam a causa mais importante de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos, com uma crescente incidência de mais de 250 mil casos/ano nos Estados Unidos da América (EUA) (Mcglone et al., 2012). O câncer predispõe os pacientes à CDI, devido a maior exposição aos fatores de risco, como o uso frequente de antibióticos de largo espectro e agentes quimioterápicos (Delgado et al., 2017).

A doença tem um espectro clínico amplo, variando desde diarreia leve e aquosa à colite pseudomembranosa, colite fulminante e morte (Rupnik, Wilcox & Gerding, 2009). Na população oncológica onde a diarreia é um efeito adverso comum dos regimes quimioterápicos, o diagnóstico pode ser um desafio e precisa de um alto grau de suspeita clínica. Neste grupo, a detecção e o tratamento precoces da CDI são cruciais e estão associados a redução da mortalidade (Khan et al., 2012).

No Brasil, a infecção causada pelo *C. difficile* em pacientes oncológicos é certamente subnotificada, uma vez que o diagnóstico não tem sido rotina nos hospitais. Apesar da importância mundial, há poucas pesquisas na região sudeste e nordeste, sendo este o primeiro estudo em Pernambuco sobre *Clostridioides difficile*.

Diante da crescente importância da CDI e da carência de investigações sobre o tema no Brasil, resolveu-se realizar esse estudo cujos objetivos principais foram determinar a prevalência, resposta clínica, desfecho e fatores de risco dos pacientes com diarreia nosocomial por *C. difficile* em dois centros de referência em oncologia em Recife-PE.

2. Metodologia

Trata-se de um estudo prospectivo, quantitativo, corte transversal para determinação da prevalência, resposta clínica, desfecho, assim como, descrever os fatores de risco (idade >65 anos, antibioticoterapia prévia, presença de outras comorbidades, uso de quimioterápicos, neutropenia febril, uso de protetores gástricos, cirurgia prévia gastrointestinal e tempo de internamento) estabelecidos na literatura, realizado em dois serviços de referência em oncologia de Recife/PE, Brasil.

O estudo envolveu pessoas com idade ≥ 18 anos, que apresentaram o quadro de diarreia após 48 horas da admissão hospitalar, no período de novembro/2017 a agosto/2019. Para o diagnóstico foi utilizado o exame Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

Todos os isolados foram rastreados e amplificados quanto à presença dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* e *tpi*, usando primers conhecidos como descrito por Knetsch et al., (2011) e Kilic et al., (2015). O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer e do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas com autorização, CAAE 63059516.7.0000.5208.

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas: média, desvio padrão e mediana da variável idade. Para avaliar diferença entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher, quando a condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada. A margem de erro utilizada nos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

3. Resultados

Na Tabela 1, ressalta-se que no grupo total, a maioria 59,6% (93/156) era do sexo feminino, e apenas 29,5% (46/156) tinha idade avançada (65 anos ou mais). Um pouco mais da metade, 53,2% (83/156) apresentava comorbidades. Entre os pacientes com neutropenia 21,8% (34/156), a maioria 58,8% (20/34) evoluiu com duração de 1 a 7 dias e 81,6% (124/152) utilizou

ranitidina como protetor gástrico. Os tipos de câncer mais frequentes foram: mama 15,4% (24/156), linfoma não Hodgkin 14,1% (22/156), colo de útero 10,9% (17/156), colorretal 9,6% (15/156), leucemia mieloide aguda (LMA) 9,6% (15/156) e leucemia linfóide aguda (LLA) 5,8% (9/156). Não foram registradas diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 1 – Características clínico-epidemiológicas de pacientes oncológicos segundo os resultados de CDI

Variável	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		N	%	
	N	%	N	%	N	%	
Sexo							p ⁽¹⁾ = 0,201
Masculino	2	18,2	61	42,1	63	40,4	
Feminino	9	81,8	84	57,9	93	59,6	
Idade avançada							p ⁽¹⁾ = 0,509
Sim	2	18,2	44	30,3	46	29,5	
Não	9	81,8	101	69,7	110	70,5	
Comorbidades							p ⁽²⁾ = 0,016*
Sim	2	18,2	81	55,9	83	53,2	
Não	9	81,8	64	44,1	73	46,8	
Neutropenia (neutrófilos ≤ 500/mm³)							p ⁽¹⁾ = 0,257
Sim	4	36,4	30	20,7	34	21,8	
Não	7	63,6	115	79,3	122	78,2	
Uso de protetores gástricos							p ⁽¹⁾ = 0,393
Ranitidina	7	70,0	117	82,4	124	81,6	
Omeprazol	3	30,0	25	17,6	28	18,4	
Tempo internamento (antes coleta fezes)							p ⁽¹⁾ = 0,168
Até 7 dias	3	27,3	67	46,2	70	44,9	
De 8-14 dias	2	18,2	41	28,3	43	27,6	
Mais de 14 dias	6	54,5	37	25,5	43	27,6	
Tipo de Câncer							p ⁽¹⁾ = 0,385
Colo de útero	2	18,2	15	10,3	17	10,9	
Bexiga	1	9,1	-	-	1	0,6	
Colorretal	-	-	15	10,3	15	9,6	
Gástrico	1	9,1	8	5,5	9	5,8	
Leiomiossarcoma uterino	1	9,1	-	-	1	0,6	
Leucemia linfóide aguda (LLA)	2	18,2	7	4,8	9	5,8	
Leucemia mieloide aguda (LMA)	1	9,1	14	9,7	15	9,6	
Linfoma não Hodgkin	-	-	22	15,2	22	14,1	
Mama	3	27,3	21	14,5	24	15,4	

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*. Fonte: Dados da pesquisa (2020).

(*) Diferença significativa a 5%;

(1) Através do teste Exato de Fisher.

A Tabela 2 mostra que: no grupo total a maioria 69,2% (108/156) fez uso de antibiótico prévio (até 4 semanas antes da data da coleta das fezes). Entre os antibióticos mais utilizados foram: piperacilina + tazobactam 40,7% (44/108), meropenem 28,7% (31/108) e cefepima 25,9% (28/108). Piperacilina + tazobactam foi o único medicamento com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. A maioria 62,2% (97/156) realizou quimioterapia e os quimioterápicos mais frequentes foram: agentes antimetabólitos 52,6% (51/97), antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina) 42,3% (41/97) e agentes platinantes 33,0%

(32/97). Não foram registradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos para nenhuma das variáveis.

Tabela 2 – Principais antibióticos e quimioterápicos utilizados em pacientes oncológicos segundo os resultados de CDI.

Potenciais fatores de risco	Grupo						Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		Grupo total		
	N	%	N	%	N	%	
Antibioterapia prévia (4 semanas antes coleta da amostra)							$p^{(1)} = 0,174$
Sim	10	90,9	98	67,6	108	69,2	
Não	1	9,1	47	32,4	48	30,8	
Antibióticos utilizados previamente							
Cefepima							$p^{(1)} = 1,000$
Sim	2	20,0	26	26,5	28	25,9	
Não	8	80,0	72	73,5	80	74,1	
Piperacilina + Tazobactam							$p^{(1)} = 0,046^*$
Sim	1	10,0	43	43,9	44	40,7	
Não	9	90,0	55	56,1	64	59,3	
Meropenem							$p^{(1)} = 0,721$
Sim	2	20,0	29	29,6	31	28,7	
Não	8	80,0	69	70,4	77	71,3	
Quimioterapia (30 dias antes do episódio diarreico)							$p^{(1)} = 1,000$
Sim	7	63,6	90	62,1	97	62,2	
Não	4	36,4	55	37,9	59	37,8	
Classe dos quimioterápicos							
Agentes antimetabólitos							$p^{(1)} = 0,705$
Sim	3	42,9	48	53,3	51	52,6	
Não	4	57,1	42	46,7	46	47,4	
Antraciclina							$p^{(1)} = 0,451$
Sim	4	57,1	37	41,1	41	42,3	
Não	3	42,9	53	58,9	56	57,7	
Agentes platinantes							$p^{(1)} = 0,420$
Sim	1	14,3	31	34,4	32	33,0	
Não	6	85,7	59	65,6	65	67,0	

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*. Fonte: Dados da pesquisa (2020).

(*) Diferença significativa a 5%

(1) Através do teste Exato de Fisher

No grupo CDI positivo, 18,2% (2/11) foram tratados para diarreia hospitalar, enquanto que no grupo CDI negativo, esse percentual foi de 13,1% (19/145). Entre os pacientes que fizeram uso da medicação, 5,8% (9/21) foi tratado para CDI com metronidazol VO e 8,3% (13/21) com metronidazol EV. Dos 21 tratados, 81,0% (17/21) evoluiu com resolução dos sintomas e 19,0% (4/21) com resposta parcial. No grupo total, o desfecho foi de cura para 60,3% (94/156) dos pacientes e óbito para 39,7% (62/156), conforme resultados apresentados na Tabela 3. Não foram registradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 3 – Tratamento para diarreia hospitalar e desfecho dos casos segundo os resultados de CDI

Variável	Grupo						Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		Grupo total		
	n	%	N	%	N	%	
Tratamento para <i>C. Difficile</i>							p ⁽¹⁾ = 0,644
Sim	2	18,2	19	13,1	21	13,5	
Não	9	81,8	126	86,9	135	86,5	
Metronidazol VO							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	9	6,2	9	5,8	
Não	11	100,0	136	93,8	147	94,2	
Metronidazol EV							p ⁽¹⁾ = 0,229
Sim	2	18,2	11	7,6	13	8,3	
Não	9	81,8	134	92,4	143	91,7	
Resposta clínica dos casos tratados com antibióticos							p ⁽¹⁾ = 1,000
Resolução sintomas	2	100,0	15	78,9	17	81,0	
Resposta parcial	-	-	4	21,1	4	19,0	
Desfecho							p ⁽¹⁾ = 0,115
Cura	4	36,4	90	62,1	94	60,3	
Óbito	7	63,6	55	37,9	62	39,7	

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*. Fonte: Dados da pesquisa (2020).

(1) Através do teste Exato de Fisher

4. Discussão

Apesar dos esforços para prevenir a CDI nos últimos anos, sua incidência vem aumentando no mundo (Raza et al., 2010), com uma variabilidade nas diferentes regiões, ressaltando a importância das investigações regionais. No leste da China, Fang et al., (2014) encontraram uma prevalência de 20,5% de CDI em três hospitais oncológicos; na Espanha esse percentual foi de 17,3% (Garzotto et al, 2015) e nos EUA, a incidência de CDI foi de aproximadamente 7-14% em adultos com câncer (Scappaticci et al., 2017).

No Brasil, há particularidades em relação à prevalência de CDI nas diferentes regiões. Pires et al., (2014), Balassiano et al., (2010) e Cecília Costa (2014) detectaram uma incidência de CDI que variou de 8,3% até 46,3%, percentuais maiores que o obtido no presente estudo (7,05%). Mesmo utilizando a qPCR, que é o método mais sensível e específico, nossos resultados apresentaram menor prevalência de CDI que as demais pesquisas brasileiras uma vez que o ELISA, técnica utilizada pela maioria, pode gerar resultados falso-positivos.

Ademais, os pacientes identificados com CDI foram predominantemente mulheres jovens, o que está relacionado com a elevada incidência de câncer de colo de útero no Brasil (INCA, 2019). PÉPIN et al., (2005), demonstraram que o risco de contrair a infecção durante um surto foi 10 vezes maior entre pessoas com mais de 65 anos de idade, pois a microbiota

intestinal diminui em número com o envelhecimento (Lessa, Gould & McDonald, 2012; Krishna et al., 2013). Além disso, nossa baixa prevalência pode estar associada à maior inclusão de pacientes jovens, diferentemente dos países desenvolvidos, onde a população alvo é composta por mais idosos.

Por outro lado, a influência da supressão ácida no estômago permanece incerta na CDI, mesmo com a viabilidade dos esporos do *C. difficile* no Ph gástrico (Leffler & Lamont, 2009). Alguns investigadores relataram um risco aumentado de infecção associado à supressão ácida (Dial et al., 2004) enquanto outros, depois de se ajustarem à coexistência das condições, não confirmaram um aumento do risco (Kyne et al., 2002; Novack et al., 2014). Entre os casos positivos, muitos não apresentaram neutropenia, ainda que a mesma esteja associada a altas taxas de CDI nos pacientes oncológicos (Chul, Ki-Eun & Hak-Ryul, 2016; Delgado et al, 2017).

Na literatura, o uso prévio de agentes antimicrobianos como clindamicina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos resulta em uma disbiose que favorece o crescimento para o *C. Difficile* (Gorschüter et al., 2001), constituindo o principal fator de risco para CDI (Brown et al., 2013; Britton & Young, 2014). Além disso, o antimicrobiano mais utilizado foi a piperacilina+tazobactam, com uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Resultados semelhantes foram descritos por Chang et al., (2016) nos EUA.

Embora o câncer hematológico apresente um risco de infecção por *C. difficile* de 2,5 vezes quando comparado ao TU sólido, fato que é atribuído a uma permanência prolongada durante as hospitalizações, não encontramos uma variação nas taxas de CDI com base no tipo de câncer (Hebbard et al., 2016; Abughanemeh et al., 2018).

Geralmente o uso dos antibióticos está relacionado ao desenvolvimento de CDI. Contudo, a quimioterapia tem sido descrita como um fator de risco para o desenvolvimento de CDI (Khan et al., 2012). Vários agentes quimioterápicos estão associados ao desenvolvimento de CDI (Chopra, Alangaden & Chandrasckar, 2010). Por outro lado, Fuereder et al., (2016), avaliaram que a quimioterapia não foi um fator de risco significativo para CDI, em comparação com a exposição prévia aos antibióticos.

5. Considerações finais

Diante da importância mundial do *C. difficile*, o presente trabalho contribuiu com o conhecimento dos dados epidemiológicos da CDI em pacientes imunocomprometidos no estado de Pernambuco. Os resultados encontrados auxiliaram a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de aquisição da CDI no ambiente hospitalar, além de promover

estratégias de prevenção para evitar a disseminação do microrganismo nessa população de risco.

Em conclusão, é possível que a baixa virulência das cepas tenha tido um papel preponderante na baixa prevalência visto que a maioria dos casos positivos evoluiu com quadro clínico leve a moderado, sem registro de recidivas no seguimento de 30-60 dias. A mortalidade desses pacientes pode ser explicada pela gravidade do tipo de câncer, pois nenhum paciente apresentou colite pseudomembranosa grave que justificasse os óbitos. Esses dados reforçam que mais estudos de prevalência são fundamentais para a vigilância de casos de CDI nas unidades hospitalares brasileiras.

Referências

- Abughanimeh, O., Qasrawi, A., Kaddourah, O., Momani, L. A. &, Ghanimeh, M. A. (2018). *Clostridium difficile* infection in oncology patients: epidemiology, pathophysiology, risk factors, diagnosis, and treatment. *Hospital Practice*, 46(5), 266-277. <https://doi.org/10.1080/21548331.2018.1533673>.
- 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. (2010). An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 68(4), 449-55.
- Britton, R. A., & Young, V. B. (2014). Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, 146, 1547-53.
- Brown, K. A., Khanafer, N., Daneman, N., & Fisman, D.N. (2013). Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2326–32.
- Chang, G. Y., Dembry, L. M., & Banach, D. B. (2016). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized oncology patients. *American Journal of Infection Control*, 44(11), 1408-1410.
- Chopra, T, Alangaden, G. J., & Chandrasekar, P. (2010). *Clostridium difficile* infection in Cancer patients and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8, 1113-1119.
- Chul, P., Ki-Eun, H., & Hak-Ryul, K. (2016). Overview of *Clostridium difficile* Infection in Cancer Patients. *Journal of Infectious Diseases & Diagnosis*, 1, 109.
- Costa, C. L., Carvalho, C. B. M., González, R. H., Gifoni, M. A. C., Ribeiro, R. A., Quesada-Gómez, C., & Brito, G. A. C. (2017). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. *Anaerobe*, 48, 232-36. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.001>.

Delgado, A., Reveles, I. A., Cabello, F. T., & Reveles, K. R. (2017). Poorer outcomes among cancer patients diagnosed with *Clostridium difficile* infections in United States community hospitals. *BMC Infectious Diseases*, *17*, 448. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2553-z>.

Dial, S., Alrasadi, K., Manoukian, C., Huang, A., & Menzies, D. (2004). Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. *CMAJ*, *171*(1), 33–38.

Fang, W. J., Da-Zhi, J., Yun, L., Cai-Yun, F., Peng, Z., Jiong, Q., Bing-Ru, T., Xiao-Gang, C., Yu-Long, Z., Jing, D., Wei-Hua, Z., Xue-Ren, F., Fan-Long, L., Xiao-Zhou, M., & Shu-Sen, Z. (2014). *Clostridium difficile* carriage in hospitalized cancer patients: a prospective investigation in eastern China. *BMC Infectious Diseases*, *14*:523. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-523>.

Fuereder, T., Koni, D., Gleiss, A., Kund, M., Makristathis, A., Zielinski, C., & Steininger, C. (2016). Risk factors for *Clostridium difficile* infection in hemato-oncological patients: A case control study in 144 patients. *Scientific Reports*, *6*, 31498.

Garzotto, A. R., García, A. M., Unceta, N. M., Lopez, M. M., Orellana-Miguel, M. A., Díaz-García, C. V., Cortijo-Cascajares, S., Cortes-Funes, H., & Agulló-Ortuño, M. T. (2015). Risk factors associated with *Clostridium difficile* infection in adult oncology patients. *Support Care Cancer*, *23*, 1569–1577. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2506-7>.

Gorschlüter, M., Glasmacher, A., Hahn, C., Schakowski, F., Ziske, C., Molitor, E., Marklein, G., Sauerbruch, T., & Schmidt-Wolf, I. G. (2001). *Clostridium difficile* infection in patients with neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, *33*, 786-791.

Hebbard, A. I., Slavin, M. A., Reed, C., Trubiano, J. A., The, B. W., Haeusler, G. M., Thursky, K. A., & Worth, L. J. (2016). The epidemiology of *Clostridium difficile* infection in patients with cancer. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, *14*, 1077-1085.

Khan, A., Raza, S., Batul, S. A., Khan, M., Aksoy, T., Baig, M. A., & Berger, B. J. (2012). The evolution of *Clostridium difficile* infection in cancer patients: epidemiology, pathophysiology, and guidelines for prevention and management. *Recent Patents Antiinfective Drug Discovery*, *7*(2), 157-70.

Kilic, A., Alam, M. J., Tisdell, N. L., Shan, D. N., Yapar, M., Yapar, M., Lasco, T. M., & Garey, K. W. (2015). Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. *Annals of laboratory medicine*, *35*:306-313.

Knetsch, C. W., Bakker, D., De Boer, R. F., Sanders, I., Hofs, S., Kooistra-Smid, A. M. D., Corver, J., Eastwood, K., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2011). Comparison of Real-Time PCR Techniques to Cytotoxigenic Culture Methods for Diagnosing *Clostridium difficile* Infection. *Journal of clinical microbiology*, *49*(1), 227–231.

Krishna, S. G., Zhao, W., Apewokin, S. K., Krishna, K., Chepyala, P., & Anaissie, E. J. (2013). Risk factors, preemptive therapy, and antiperistaltic agents for *Clostridium difficile* infection in cancer patients. *Transplant Infectious Diseases*, *15*, 493-501.

Kyne, L., Sougioultzis, S., McFarland, L. V., & Kelly, C. P. (2002). Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 23, 653-9.

Leffler, D. A., & Lamont, J. T. (2009). Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, 136, 1899-912.

Lessa, F. C., Gould, C. V., & McDonald, L. C. (2012). Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clinical infectious diseases*, 55(2), 65-70.

Mcglone, S. M., Bailey, R. R., Zimmer, S. M., Popovich, M. J., Tian, Y., Ufberg, P., Muder, R. R., & Lee, B. Y. (2012). The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 282-289.

MS/INCA/Estimativa de Câncer no Brasil, 2020- disponível em <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> (acessado em 22/07/2020).

Novack, L., Kogan, S., Gimpelevich, L., Howell, M., Borer, A., Kelly, C. P., Leffler, D. A., & Novack, V. (2014). Acid suppression therapy does not predispose to *Clostridium difficile* infection: the case of the potential bias. *PLoS One*, 9(10), e110790.

Pépin, J., Valiquette, L., & Cossette, B. (2005). Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*, 173, 1037-42.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.

Pires, R. N., Monteiro, A. A., Carneiro, L. C., Baethgen, L. F., Tavares, R., Lincho, C. S., Park, S., Perlin, D., Rodrigues, F. E. M., & Pasqualotto, A. C. (2014). *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? *American Journal of Infection Control*, 42(4), 459-60.

Raza, S., Baig, M. A., Russell, H., Gourdet, Y., & Berger, B. J. (2010). *Clostridium difficile* infection following chemotherapy. *Recent Patents Antiinfective Drug Discovery*, 5(1), 1-9.

Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526-36.

Scappaticci, G. B., Perissinotti, A. J., Nagel, J. L., Bixby, D. L., & Marini, B. L. (2017). Risk factors and impact of *Clostridium difficile* recurrence on haematology patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5), 1488-1495.

5.2 Artigo 2 - Identificação de cepa rara de *Clostridioides difficile* produtora apenas da Toxina A em pacientes oncológicos

Este artigo investigou quais as cepas de *Clostridioides difficile* circulantes em dois serviços de referência em oncologia em Recife-PE.

Introdução

A infecção por *Clostridioides difficile* (CDI) é considerada a principal causa de diarreia infecciosa em ambientes de assistência à saúde [1], com um risco elevado em pacientes com câncer [2]. Existem mais de 800 tipos de cepas reconhecidas (ribotipos) de *C. difficile* [3]. A doença é mediada por toxinas que danificam a mucosa intestinal, causando acúmulo de fluido e destruição do epitélio intestinal [4,5,6]. A toxina A (TcdA) possui um efeito enterotóxico e citotóxico, e a toxina B (TcdB) tem uma forte atividade citotóxica. Elas são codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente, que em conjunto com três genes adicionais (*tcdC*, *tcdR* e *tcdE*), formam o locus de patogenicidade (PaLoc) [7,8].

A maioria dos isolados clínicos toxigênicos de *C. difficile* são capazes de expressar as toxinas TcdA⁺/TcdB⁺ e poucas cepas produzem apenas a toxina TcdB⁺; já os isolados clínicos produtores apenas da toxina TcdA⁺ são extremamente raros [9]. As cepas TcdB positivas foram descritas inicialmente em meados dos anos 90 [10,11], e o TcdB⁺ particularmente é responsável por induzir respostas imunes inatas e inflamatórias do hospedeiro, causando graves danos intestinais e em órgãos sistêmicos [5].

Recentemente, Monot et al (2015) [12] reportaram pela primeira vez uma cepa variante de *C. difficile* que produz apenas toxina A (TcdA⁺/TcdB⁻) em um paciente de 60 anos, com CDI tratada com metronidazol e sem relato de recidiva. Uma terceira toxina considerada como um importante fator de virulência, denominada de toxina binária ou CDT, é codificada pelos genes *cdtA* e *cdtB* e está localizada em outro locus gênico, o CdtLoc [13].

A caracterização molecular pela PCR-ribotipagem [14] das diversas cepas de *C. difficile* vem permitindo um maior conhecimento dos ribotipos deste patógeno associados aos casos mais graves ou não da CDI. A incidência e gravidade de CDI aumentaram nos últimos anos devido ao aparecimento de uma cepa epidêmica conhecida como BI/NAP1/ ribotipo 027 [15], causando uma mudança na epidemiologia de *C. difficile* em diversos países, incluindo a Europa e América do Norte; os ribotipos 014/020, 014, 001, 001/072 e 078 aumentaram sua prevalência, no entanto, o ribotipo 027 continua sendo o mais prevalente [16,1].

Na América Latina, a presença do RT027 já foi relatada no México, Costa Rica, Panamá e Chile [17,18], todavia, até o momento não foi detectada no Brasil. Alguns pesquisadores vêm chamando a atenção da importância da notificação dos casos de CDI nos hospitais brasileiros, para que medidas de prevenção e estratégias sejam tomadas para evitar a disseminação de cepas epidêmicas no país [19].

Materiais e métodos

Para este estudo foram incluídas 156 amostras de fezes diarreicas de pacientes oncológicos, coletadas no período de novembro/2017 a agosto/2019. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer e do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas com autorização, CAAE 63059516.7.0000.5208.

Para o diagnóstico da CDI, o DNA foi extraído das amostras de fezes empregando-se o kit comercial *QIAamp Stool DNA Mini Kit*, seguindo as recomendações do fabricante (Qiagen; Chatsworth, CA, EUA). As reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram preparadas utilizando o reagente *Taq Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)*, contendo dNTPs, tampão, UNG (Uracil-N-Glycosylase), Ampli Taq®. O método de TaqMan® utiliza uma sonda marcada com uma molécula fluorescente (fluoróforo) e outra de apagamento intramolecular (*quencher*) além do par de oligos iniciadores (*primers*) que se utilizam na PCR comum.

As reações da PCR foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Termofischer Scientific, Massachusetts, EUA). Todos os isolados foram rastreados e amplificados quanto à presença dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* e *tpi*, usando oligonucleotídeos descritos por Knetsch et al (2011) e Kilic et al (2015) [20,21] (tabela 1).

Para o isolamento da espécie, um grama de fezes foi misturado com um pouco de PBS 1x e um choque térmico de 60°C por 30 min foi realizado. Em seguida as amostras foram inoculadas no meio seletivo e diferencial *Clostridioides difficile* Brucella agar (CDBA) acrescido de 0,01% de taurocolato de sódio e dos antibióticos D-cicloserina (0,5 mg/mL) e cefoxitina (0,0128 mg/mL) e incubado a 37°C em anaerobiose (80% N₂, 10% H₂ 10% CO₂) por 7-10 dias [22]. As colônias sugestivas de *C. difficile* foram identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF MS (Bruker®).

Para a ribotipagem das cepas, foi empregado o protocolo desenvolvido por Bidet et al, (1999) [14], utilizando o método da PCR afim de amplificar as regiões intergênicas repetidas presentes entre as subunidades ribossomais 16S-23S. Após a eletroforese dos produtos da

amplificação, a análise das bandas foi realizada no programa BioNumerics® (Applied Maths®, Bélgica), utilizando como perfil de comparação o padrão de peso molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen) e a cepa epidêmica R20291 pertencente ao ribotipo 027 (B1/NAP1/027). A nomenclatura dos ribotipos encontrados foram designadas seguindo a norma Cardiff/Leeds (001, 002, 014...). Àquelas que onde o padrão de bandeamento não foi identificado foram consideradas não-tipáveis.

Tabela 1. PCR multiplex em tempo real e as sondas TaqMan para detecção de *Clostridioides difficile*, suas toxinas específicas A e B e genes da toxina binária A

Alvo principal	Gene principal	Sequência nucleotídeo (5'→ 3')	Número do Banco de genes
<i>C. difficile</i>	<i>tpi</i>	F: 5'-gaagctactaagggtacaaa-3'	FN668944
		R: 5'-ggtctattcctacttctaagc-3'	FN668941
		Probe: 5'-VIC ataagagtgaaacttctctgtaaatgctcc TAMRA-3'	FN668375
			FN665654
			FN665653
Toxina A	<i>TcdA</i>	F: 5'-tgataacgtatagcttgacc-3'	DQ117264
		R: 5'-atggtttacctcagatagg-3'	DQ117255
		Probe: 5'-FAM tgaatactttgcacctgctaatacggatg TAMRA-3'	DQ117249
			DQ117248
			DQ117247
Toxina B	<i>TcdB</i>	F: 5'-gaaggattacctgtaattgc-3'	HM062511
		R: 5'-ctgccattatacctatcttagc-3'	HM062510
		Probe: 5'-VIC ctctttgattgctgcacctaactacacc TAMRA-3'	HM062509
			HM062508
			HM062507
Toxina binária A	<i>CdtA</i>	F: 5'-tatattaaagcagaagcatctgt-3'	DQ102377
		R: 5'-ctggaccatttgatattaaataatt-3'	DQ102378
		Probe: 5'-FAM tcctccacgcataataatcattacatcagc TAMRA-3'	DQ102375
			DQ102376
			AJ238325
Toxina B	<i>TcdB</i>	GAAAGTCCAAGTTTACGCTCAAT	398CLDs
		GCTGCACCTAAACTTACACCA	399CLDas
		FAM-ACAGATGCAGCCAAAGTTGTTGAATT-BHQ1	551CLD-tq-FAM

Abreviações: *tpi*, gene espécie-específico do *Clostridioides difficile*; *tcdA*, gene da toxina A; *tcdB*, gene da toxina B; *cdtA*, gene da toxina binária.

Fonte: Knetsch et al., 2011; Kilic A, et al., 2015

Resultados

Das 156 amostras, 11 (7,05%) foram confirmadas como *C. difficile*, todos isolados foram positivos para o gene espécie-específico triose fosfato isomerase (*tpi*). A maioria dos

casos 54,5% (6/11) apresentou positividade para a toxina A (TcdA⁺), enquanto apenas 45,5% (5/11) foi positivo para as toxinas TcdA⁺/TcdB⁺. A tabela 2 lista as características das amostras analisadas nesta pesquisa.

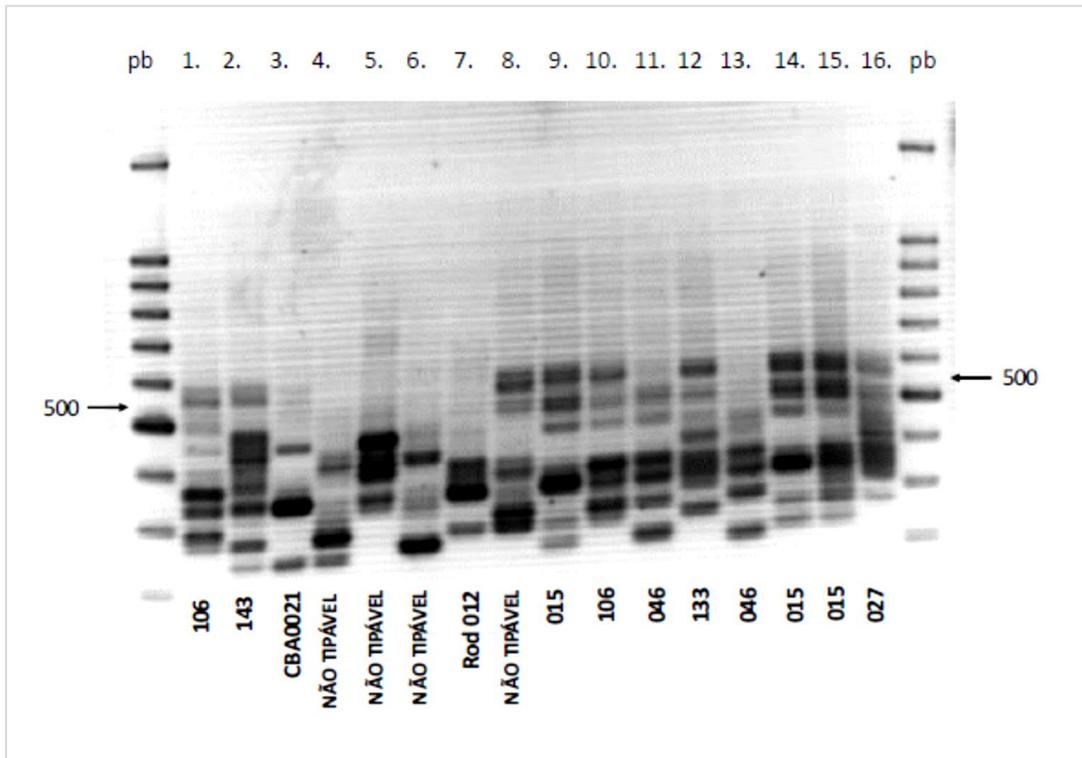
Das nove amostras cultivadas no meio CDBA, *C. difficile* foi recuperado em seis amostras fecais. Análises de tipagem molecular baseadas em PCR-ribotipagem demonstraram que dos seis isolados, dois pertenciam ao ribotipo 106 e 143. Quatro cepas, incluindo a CBA0021 não correspondiam a nenhum outro ribotipo existente na biblioteca de referência, portanto foram classificadas como “não tipável” (Figura 1).

Tabela 2. Características de pacientes e Isolados de *Clostridioides difficile* analisados neste estudo

Pacientes	Tipo de CA	CDI	qRT-PCR (gene <i>tpi</i>)	Perfil Toxigênico	Cultura meio CDBA	Ribotipos
Feminino/42 a	CA útero	Moderada	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	NR	NR
Feminino/58 a	CA útero	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Positivo	106
Feminino/73 a	CA gástrico	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positivo	143
Feminino/46 a	CA mama	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positivo	CBA0021
Masculino/50 a	LMA	Moderada	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Negativo	NR
Feminino/25 a	LLA	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positivo	Não-tipável
Feminino/45 a	CA mama	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Positivo	Não-tipável
Masculino/40 a	LLA	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positivo	Não-tipável
Feminino/53 a	CA mama	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Negativo	NR
Feminino/66 a	CA bexiga	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Negativo	NR
Feminino/55 a	Leiomiossarcoma Uterino	Leve	Positivo	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	NR	NR

Abreviações: CA: câncer; qRT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; *tpi*: *triose phosphate isomerase*; *tcdA*: gene da toxina A; *tcdB*: gene da toxina B; CDBA: *Clostridioides difficile* brucella agar; a: anos; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; NR: não realizado
Classificação de CDI: leve, moderada ou grave

Figura 1 – PCR-ribotipagem das cepas de *Clostridioides difficile* isolados em dois Hospitais de Referência em Oncologia em Pernambuco, Brasil.



Fonte: Instituto de Microbiologia Paulo Góes-UFRJ, 2020.

Discussão

Pesquisas brasileiras conduzidas em hospitais no Rio de Janeiro [23,24], em Porto Alegre [25] e no Ceará [26] em pacientes com diarreia nosocomial e no ambiente hospitalar evidenciaram cepas toxigênicas, todas positivas para TcdA⁺/TcdB⁺. Este é o primeiro estudo na América Latina a descrever uma prevalência elevada, 54,5% (6/11) de cepas variantes de *C. difficile* com gene *tcdA*⁺/*tcdB*⁻ em pacientes imunocomprometidos. A variação genética dos genes *tcdA* e *tcdB* levantou alguns questionamentos sobre qual o papel de cada toxina na infecção por *C. difficile*. Alguns ensaios para investigar a contribuição relativa dessas toxinas para a virulência da CDI tem sido contraditórios.

Lyras et al, (2009)[27] e Carter et al, (2015)[5] analisaram toxinas de duas diferentes cepas de *C. difficile* incluindo a JIR8094, e demonstraram que o mutante TcdA⁺/TcdB⁻ era menos virulento do que as cepas que produzem as toxinas TcdA⁺/TcdB⁺ e TcdA⁻/TcdB⁺. O que corrobora os nossos achados, a maioria dos pacientes com cepas variantes TcdA⁺/TcdB⁻ apresentou quadro de CDI leve, com evolução favorável e sem indicação de tratamento com antimicrobianos. Nenhuma complicação como megacólon tóxico e óbito foi constatada em nossos pacientes, entretanto, danos histológicos cecais foram encontrados com a variante

produzindo apenas a toxina A [28]. De fato, cepas que produzem apenas toxina B causaram epidemias em vários países asiáticos [29].

Ademais, outra pesquisa realizada por Kuehne et al, (2010) [6], em modelo de hamster, o mutante TcdA⁺/TcdB⁻ era quase tão virulento quanto as cepas que produzem as toxinas TcdA⁺/TcdB⁺ e TcdA⁻/TcdB⁺. Carter et al, (2015)[5] também demonstraram letalidade para um mutante TcdA⁺/TcdB⁻ de uma cepa epidêmica canadense (cepa M7404). Possivelmente, outros fatores genéticos possam modular a virulência desta cepa além da produção das toxinas, a análise em modelo animal deverá ser criteriosa [28].

Apesar da importância clínica da infecção por *C. difficile* em muitos países e da descoberta de novos ribotipos a cada ano, no Brasil há poucas informações sobre a circulação das cepas. A PCR-ribotipagem é comumente usado na Europa na identificação dos ribotipos de *C. difficile*, permitindo a homologia entre os laboratórios [30]. Balassiano et al, (2009) demonstraram pela primeira vez o isolamento de cepas do ribotipo 106 fora do Reino Unido, ressaltando o potencial de disseminação desse microrganismo [23]. Enquanto a prevalência do ribotipo epidêmico 027 está diminuindo globalmente, o ribotipo 106 tornou-se um dos principais ribotipos que causa CDI na comunidade europeia [31].

Uma revisão sobre a epidemiologia de *C. difficile* no Brasil ressaltou a importância da notificação de CDI evidenciando os principais ribotipos que circulam nos estados brasileiros (014, 043, 046, **106**, 132, 133, 134, 135, 136, 142, **143** e 233) [19]. Todavia, a maioria dos resultados (66,7%) encontrados em nossa investigação não identificaram nenhum ribotipo semelhante aos que circulam no Brasil, portanto, sem homologia na base de dados utilizada no estudo e que aguardam denominação.

Concluindo, a despeito do número reduzido de pacientes em nossa casuística, descrevemos pela primeira vez na América Latina a presença de cepas variantes de *C. difficile* com produção da toxina A em pacientes oncológicos. Apesar dos casos de CDI terem sido leves, mesmo em pacientes imunossuprimidos, os estudos epidemiológicos são importantes para mostrar que a CDI acontece em nossos hospitais, e que podem ser causadas por ribotipos mundialmente circulantes ou ribotipos prevalentes em nosso país.

Referências

1. K.A. Davies, et al., Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013, Euro. Surveill. 21 (2016) 1-11, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294>.

2. T. Chopra, G.J. Alangaden, P. Chandrasekar, *Clostridium difficile* infection in cancer patients and hematopoietic stem cell transplant recipients, *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 8 (2010) 1113–1119, <https://doi.org/10.1586/eri.10.95>.
3. I. Tonna, P.D. Welsby, Pathogenesis and treatment of *Clostridium difficile* infection, *Postgrad. Med. J.* 81 (2005) 367–369, doi: 10.1136/pgmj.2004.028480.
4. M. Rupnik, M.H. Wilcox, D.N. Gerding, *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis, *Nature Reviews Microbiology* 7 (2009) 526–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>.
5. G.P. Carter, et al., Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections, *MBio* 6 (2015) e00551, <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15>.
6. S.A. Kuehne, et al., The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection, *Nature* 467 (2010) 711–73, <https://doi.org/10.1038/nature09397>.
7. V.G. Loo, et al., A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 2442–2449, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051639>.
8. M. Merrigan, et al., Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 4904–4911, <https://doi.org/10.1128/JB.00445-10>.
9. R. Van Den Berg, et al., Characterization of toxin A negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping, *Journal Clinical of Microbiology* 42 (2004) 1035–1041, <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1035-1041>.
10. S.P. Sambol, et al., Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5480–5487, <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5480-5487>.
11. M. Rupnik, et al., New types of toxin A negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 1118–1125, <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1118-1125>.
12. M. Monot et al., *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus, *Scientific Reports* 5 (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep15023>.
13. S. Perelle, et al., Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196, *Infect. Immun.* 65 (1997) 1402–1407, <https://doi.org/10.1128/IAI.65.4.1402-1407>.
14. P. Bidet, et al., Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing, *FEMS. Microbiol. Lett.* 175 (1999) 261–6, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13629.x>.
15. E.J. Kuijper, et al., Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, *Euro. Surveillance* 13 (2008) 1–7, PMID: 18761903.

16. M.P. Bauer, et al., *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey, *Lancet* 377 (2011) 63-73, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(2011\)61266-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(2011)61266-4).
17. D. Lopez-Urena, et al., Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: Case reports in Panamá, *J. Med. Microbiol.* 63 (2014) 322-324, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.066399-0>.
18. A. Plaza-Garrido, et al., Predominance of *Clostridium difficile* ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, *Epidemiol. Infect.* 144 (2012) 976-979, <https://doi.org/10.1017/S0950268815002459>.
19. C.N.R. Trindade, R.M.C.P. Domingues, E.O. Ferreira, The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty Years, *Anaerobe* 58 (2019) 13-21, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe>.
20. C.W. Knetsch, et al., Comparison of Real-Time PCR Techniques to Cytotoxigenic Culture Methods for Diagnosing *Clostridium difficile* Infection, *Journal of Clinical Microbiology* 49 (2011) 227–231, <https://doi.org/10.1128/JCM.01743-10>.
21. A. Kilic, et al., Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples, *Annals of laboratory medicine* 35 (2015) 306-313, <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.3.306>.
22. M.M. Nerandizc, C.J. Donskey, Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009) 397-400, <https://doi.org/10.1128/JCM.01591-08>.
23. I.T. Balassiano, et al., Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil, *Anaerobe* 3 (2009) 61e64, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.12.007>.
24. I.T. Balassiano, et al., An outbreak case of *Clostridium difficile* associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68 (2010) 449e455, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017>.
25. A. de A. Monteiro, et al., A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil, *Braz. J. Infect. Dis.* 18 (2014) 672e674, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.004>.
26. C.L. Costa, et al., Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in a Brazilian Cancer Hospital, vol. 48, 2017, pp. 232e236, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.001>.
27. D. Lyras, et al., Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*, *Nature* 458 (2009) 1176e1179, <https://doi.org/10.1038/nature07822>.
28. J.C. Marvaud, et al., Virulence of new variant strains of *Clostridium difficile* producing Only toxin A or binary toxin in the hamster model, *New Microbe. and New Infect.* 32 (2019) 100590, <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100590>.
29. D.A. Collins et al., Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 2 (2013) 21, <https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-21>.

30. A. Indra, et al., Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping, *J. Med. Microbiol.* 57 (2008) 1377-82, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47714-0>.
31. A.J. Gonzales-Luna, et al., PCR ribotypes of *Clostridium difficile* across Texas from 2011 to 2018 including emergence of ribotype 255, *Emerging Microbes & Infections* 9 (2020) 341–347, <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1721335>.

6 CONCLUSÕES

- a) A prevalência de CDI encontrada foi de 7,05%, que é baixa em relação a outros estudos, inclusive brasileiros;
- b) Todos os isolados foram positivos para o gene espécie-específico triose fosfato isomerase (*tpi*); a maioria das cepas foram positivas apenas para a toxina A (TcdA⁺), considerada rara. Não detectamos a toxina binária;
- c) O sintoma mais frequente foi dor abdominal, não houve diferenças significativas entre os grupos. Febre e IRA foram associadas a outro quadro infeccioso bacteriano;
- d) A maioria dos casos de CDI foram classificados como leves, sem indicação de antibioticoterapia e com resolução dos sintomas. Não houve registro de casos graves ou complicados, os pacientes evoluíram para óbito em decorrência da gravidade da doença oncológica;
- e) Entre os fatores de risco, a doença pulmonar obstrutiva crônica e a piperacilina + tazobactam apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. O presente estudo não demonstrou associação significativa entre idade avançada, uso de quimioterápicos, neutropenia, uso de protetores gástricos, cirurgia gastrointestinal ou do tempo de internamento com um risco elevado de aquisição de CDI;
- f) A PCR-ribotipagem demonstrou que dois isolados pertenciam ao ribotipo 106 e 143 e quatro cepas, incluindo a CBA0021, foram classificadas como “não tipável”.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta é a primeira investigação sobre *Clostridioides difficile* em Pernambuco, esperamos que os resultados desta tese representem informações relevantes no conhecimento da epidemiologia deste microrganismo. No entanto, serão necessários outros estudos com objetivo de conhecer quais os ribotipos que circulam na região nordeste.

REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY (Estados Unidos). **HCUP projections: *Clostridium difficile* hospitalizations 2001-2013**. Report #2014-01. Rockville: Agency for Healthcare Research and Quality, 2014. Disponível em: <https://hcup-us.ahrq.gov/reports/projections/2014-01.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2019.
- AGUAYO, C. *et al.* Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 143, n. 14, p. 3069–3073, Oct. 2015.
- ALONSO, C. D. *et al.* Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 54, n. 8, p. 1053–1063, Apr. 2012.
- APOSTOLOPOULOU, E. *et al.* Infection Probability Score: a predictor of *Clostridium difficile*-associated disease onset in patients with haematological malignancy. **European Journal of Oncology Nursing**, Edinburgh, v. 15, n. 5, p. 404–409, Dec. 2011.
- BABAN, S. T. *et al.* The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, e73026, Sept. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781105/>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- BAGDASARIAN, N.; RAO, K.; MALANI, P. N. *Diagnosis and treatment of Clostridium difficile* in adults: a systematic review. **JAMA**, Chicago, v. 313, v. 4, p. 398-408, Jan. 2015.
- BALASSIANO, I. T. *et al.* An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of na intensive care unit of tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 68, n. 4, p. 449-455, Dec. 2010.
- BALASSIANO, I. T. *et al.* Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, London, v. 15, n. 3, p. 61-64, Jan. 2009.
- BALASSIANO, I. T. *et al.* Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 2, p. 249-255, July 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-010-9483-8>. Acesso em: 22 mar. 2020.
- BARBUT, F. *et al.* Rapid detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, DC, v. 47, n. 4, p. 1276–1277, Apr. 2009.
- BARTLETT, J. G. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, n. 5, p. 334-339, Jan. 2002.
- BARTLETT, J. G. *et al.* Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 298, n. 10, p. 531-534, Mar. 1978.

- BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, p. S12 - S18, Jan. 2008. Suppl. 1.
- BAUER, M. P. *et al.* Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. **Lancet**, London. v. 377, n. 9559, p. 63-73, Jan. 2011.
- BÉLANGER, S. D. *et al.* Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-timePCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 41, n. 2, p. 730-734, Feb. 2003.
- BIDET, P. *et al.* Development of a new PCR-ribotyping method for Clostridium difficile based on ribosomal RNA gene sequencing. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 261-266, June 1999.
- BLOSSOM, D. B.; McDONALD, L.C. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 222-227, July 2007.
- BORRIELO, S. P. *et al.* Virulence factors of *Clostridium difficile*. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 12, p. S185-S191, Jan./Feb. 1990. Suppl. 2.
- BRITTON, R. A.; YOUNG, V. B. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, n. 7, p. 313-319, July 2012.
- BROWN, K. A. *et al.* Acute appendicitis in the setting of Clostridium difficile colitis: case report and review of the literature. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Philadelphia, v. 5, n. 8, p. 969-971, Aug. 2007.
- BROWN, K. A. *et al.* Meta-Analysis of Antibiotics and the Risk of Community-Associated *Clostridium difficile* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 57, n. 5, p. 2326 -2332, May 2013.
- BURNHAM, C. A.; CARROLL, K. C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: na ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 26, n. 3, p. 604-630, July 2013.
- CARIGNAN, A. *et al.* Risk of *Clostridium difficile* infection after perioperative antibacterial prophylaxis before and during an outbreak of infection due to a hypervirulent strain. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, n. 12, p. 1838-1843, June 2008.
- CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 65, p. 501-521, 2011.
- CARTER, G. P. *et al.* Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. **mBio**, Washington, DC, v. 6, n. 3, p. e00551-15, June 2015.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Clostridioides difficile infection (CDI) Tracking**. Atlanta: CDC, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/eip/cdiff-tracking.html>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- CHEN, S. *et al.* Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins and laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections. **Infection**, Heidelberg, v. 45, n. 3, p. 255-262, June 2017.

CHENG, Y. W. *et al.* Fecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and severe *Clostridium difficile* infection in solid organ transplant recipients: A multicenter experience. **American Journal of Transplantation**, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 501-511, Feb. 2019.

CHOPRA, T. *et al.* Recent epidemiology of *Clostridium difficile* infection during hematopoietic stem cell transplantation. **Clinical Transplantation**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. E82–87, Jan./Feb. 2011.

CHOPRA, T.; ALANGADEN, G. J.; CHANDRASEKAR, P. *Clostridium difficile* infection in Cancer patients and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 8, n. 10, p. 1113-1119, Oct. 2010.

CHUL, P.; KI-EUN, H.; HAK-RYUL, K. Overview of *Clostridium difficile* Infection in Cancer Patients. **Journal of Infectious Diseases and Diagnosis**, Barcelona, v. 1, n. 2, p. 109, 2016.

CHUNG, M. *et al.* Impact of malignancy on *Clostridium difficile* infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 35, n. 11, p. 1771-1776, Nov. 2016.

COLTELLA, L. *et al.* Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 32, n. 9, p. 1183–1192, Sept. 2013.

CORNELY, O. A. *et al.* Resolution of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in patients with cancer treated with fidaxomicin or vancomycin. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 31, n. 19, p. 2493–2499, July 2013.

COSTA, C. L. *et al.* Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in a Brazilian Cancer Hospital. **Anaerobe**, London, v. 48, p. 232-236, Dec. 2017.

CROBACH, M. J. T. *et al.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 22, S63-S81, 2016. Aug. Suppl. 4.

DANCER, S. J. *et al.* Approaching zero: temporal effects of a restrictive antibiotic policy on hospital acquired *Clostridium difficile*, extended-spectrum β -lactamase-producing coliforms and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 137-142, Feb. 2013.

DAVIES, K. A. *et al.* Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhea (EUCLID), 2012 and 2013. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 21, n. 29, July 2016. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294>. Acesso em: 15 mar. 1999.

DEBAST, S. B.; BAUER, M. P.; KUIJPER, E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 20, p. 1–26, Mar. 2014. Suppl. 2.

- DELANEY, C. J. A. *et al.* Antimicrobial Drugs and Community–acquired *Clostridium difficile*–associated Disease. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 761-763, May 2007.
- DELGADO, A. *et al.* Poorer outcomes among cancer patients diagnosed with *Clostridium difficile* infections in United States community hospitals. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 17, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5481960/pdf/12879_2017_Article_2553.pdf. Acesso em: 20 mar. 2019.
- DESHPANDE, A. *et al.* Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta analysis. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 36, n. 4, p. 452-460, Apr. 2015.
- DI BELLA, S.; GOULIOURIS, T.; PETROSILLO, N. Fecal microbiota transplantation (FMT) for *Clostridium difficile* infection: focus on immunocompromised patients. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 21, n. 4, p. 230-237, Apr. 2015.
- DIAL, S. *et al.* Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case–control studies. **Canadian Medical Association journal**, Ottawa, v. 171, n. 1, p. 33-38, July 2004.
- DRUDY, D. *et al.* Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 237-242, July 2004.
- DUBBERKE, E. R. *Clostridium difficile* infection: The scope of the problem. **Journal of Hospital Medicine**, Hoboken, v. 7, S1-S4, Mar. 2012. Suppl. 3.
- EMOTO, M. *et al.* *Clostridium difficile* colitis associated with cisplatin based chemotherapy in ovarian cancer patients. **Gynecologic oncology**, New York, v. 61, n. 3, p. 369–372, June 1996.
- ERB, S. *et al.* Low sensitivity of fecal toxin A/B enzyme immunoassay for diagnosis of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 21, n. 11, p. 998.e9-998.e15, Nov. 2015.
- FAINSTEIN, V.; BODEY, G. P.; FEKETY, R. Relapsing pseudomembranous colitis associated with cancer chemotherapy. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 143, n. 6, p. 865, June 1981.
- FANG, W. J. *et al.* *Clostridium difficile* carriage in hospitalized cancer patients: a prospective investigation in eastern China. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 14, p. 523, 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4261591/pdf/12879_2014_Article_3843.pdf. Acesso em: 20 mar. 2020.
- FAWLEY, W. N. *et al.* Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 28, n. 8, p. 920-925, Aug. 2007.
- FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P.; UZEDA, M. **Manual de bacteriologia de anaeróbios**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2003.

- FOXMAN, B. *et al.* Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, London, v. 2, p. 10, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308839/pdf/1742-5573-2-10.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2020.
- FREEMAN, J. *et al.* H. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 23, n. 3, p. 529–549, July 2010.
- FUEREDER, T. *et al.* Risk factors for *Clostridium difficile* infection in hemato-oncological patients: A case control study in 144 patients. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 31498, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep31498>. Acesso em: 16 fev. 2020.
- GAREY, K. W. *et al.* Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 70, n. 4, p. 298-304, Dec. 2008.
- GARZOTTO, A. R. *et al.* Risk factors associated with *Clostridium difficile* infection in adult oncology patients. **Support Care Cancer**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 1569-1577, June 2015.
- GERDING, D. N. *et al.* B. Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection in patients at increased risk for recurrence. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 67, n. 5, p. 649–656, Aug. 2018.
- GERDING, D. N. *et al.* *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. **Gut Microbes**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 15–27, Jan./Feb. 2014.
- GERDING, D. N. Global epidemiology of *Clostridium difficile* infection in 2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 31, S32–34, 2010. Suppl 1.
- GERIC, B. *et al.* Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 11, p. 5227-5232, Nov. 2003.
- GIACOBBE, D. R. *et al.* Bezlotoxumab for Preventing Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: A Narrative Review from Pathophysiology to Clinical Studies. **Infectious Diseases and Therapy**, London, v. 9, n. 3, p. 481–494, Sept. 2020.
- GONZALES-LUNA, A. J. *et al.* PCR ribotypes of *Clostridioides difficile* across Texas from 2011 to 2018 including emergence of ribotype 255. **Emerging Microbes & Infections**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 341-347, 2020.
- GORSCHLÜTER, M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in patients with neutropenia. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, n. 6, p. 786-791, Sept. 2001.
- GUPTA, A. *et al.* Extraintestinal *Clostridium difficile* infections: a single-center experience. **Mayo Clinic Proceedings**, Oxford, v. 89, n. 11, p. 1525-1536, Nov. 2014.
- GUPTA, A. *et al.* Trends in the Incidence and Outcomes of Hospitalized Cancer Patients With *Clostridium difficile* Infection: A Nationwide Analysis. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 4, p. 466-472, Apr. 2017.
- HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. **American Journal of Diseases of Children**, Chicago, v. 49, n. 2, p. 390-402, 1935.

- HEBBARD, A. I. T. *et al.* Risks factors and outcomes of *Clostridium difficile* infection in patients with cancer: a matched case-control study. **Support Care Cancer**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 1923-1930, June 2017.
- HEBBARD, A. I. T. *et al.* The epidemiology of *Clostridium difficile* infection in patients with cancer. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 14, n. 11, p. 1077-1085, Nov. 2016.
- HENDERSON, M. *et al.* A review of the safety and efficacy of vaccines as prophylaxis for *Clostridium difficile* infections. **Vaccines**, Basel, v. 5, n. 3, p. E25, Sept. 2017.
- HERNÁNDEZ-ROCHA, C. *et al.* Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 29, n. 4, p. 434-445, 2012.
- HOOKMAN, P.; BARKIN, J. S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 15, n. 13, p. 1554-1580, Apr. 2009.
- JABBAR, U. *et al.* Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of *Clostridium difficile* spores from hands. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 31, n. 6, p. 565-570, 2010.
- JACOBS, A. *et al.* Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections. Presentation of 2 cases and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, Baltimore, v. 80, n. 2, p. 88-101, Mar. 2001.
- JOLIS, L. *et al.* Incidence of chemotherapy-induced neutropenia and current practice of prophylaxis with granulocyte colony-stimulating factors in cancer patients in Spain: a prospective, observational study. **European Journal of Cancer Care**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 513-521, July 2013.
- JUSTESSEN, U. S. *et al.* Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 49, n. 12, p. 4314-4318, Dec. 2011.
- KAMBOJ, M. *et al.* Hospital-onset *Clostridium difficile* infection rates in persons with cancer or hematopoietic stem cell transplant: a C3IC network report. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 33, n. 11, p. 1162-1165, Nov. 2012.
- KAMTHAN, A. G. *et al.* *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 152, n. 8, p. 1715-1717, Aug. 1992.
- KATZ, K. C. *et al.* The evolving epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Canadian hospitals during a postepidemic period (2009-2015). **Canadian Medical Association journal**, Ottawa, v. 190, n. 25, p. E758-E765, June 2018.
- KELLY, C. P.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile*-more difficult than ever. **New England Journal Medicine**, Boston, v. 359, n. 18, p. 1932-1940, Oct. 2008.
- KHAN, A. *et al.* The evolution of *Clostridium difficile* infection in cancer patients: epidemiology, pathophysiology, and guidelines for prevention and management. **Recent Patents on Antiinfective Drug Discovery**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 157-170, Aug. 2012.

- KILIC, A. *et al.* Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. **Annals of Laboratory Medicine**, Seoul, v. 35, n. 35, p. 306-313, May 2015.
- KNETSCH, C. W. *et al.* Comparison of Real-Time PCR Techniques to Cytotoxigenic Culture Methods for Diagnosing *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 49, n. 1, p. 227–231, Jan. 2011.
- KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KUEHNE, S. A. *et al.* The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. **Nature**, Basingstoke, v. 467, n. 7316, p. 711–713, Oct. 2010.
- KUIJPER, E. J. *et al.* Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 13, n. 31, p. 1-7, July 2008.
- KUKLA, M. *et al.* Special paper Guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults. **Gastroenterology Review**, Poznań, v. 15, n. 1, p. 1-21, Mar. 2020.
- KYNE, L. *et al.* Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 23, n. 11, p. 653-659, Nov. 2002.
- LAMONT, J. T.; KELLY, C. P.; BAKKEN, J. S. ***Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* infection in adults: clinical manifestations and diagnosis**. 2020. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/clostridioides-formerly-clostridium-difficile-infection-in-adults-clinical-manifestations-and-diagnosis>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- LAND, M. H. *et al.* Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. **Pediatrics**, Elk Grove Village I, v. 115, n. 1, p. 178–181, Jan. 2005.
- LAWSON, P. A. *et al.* Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, London, v. 40, p. 95-99, June 2016.
- LECLAIR, M-A. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. **Journal of Intensive Care Medicine**, Thousands Oaks, v. 25, n. 1, p. 23-30, Jan./Feb. 2010.
- LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* Infection. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 372, n. 16, p. 1539-1548, Apr. 2015.
- LEGENZA, L. M.; BARNETT, S. G.; ROSE, W. E. Vaccines in development for the primary prevention of *Clostridium difficile* infection. **Journal of the American Pharmacists Association (2003)**, Washington, DC, v. 57, n. 4, p. 547-549, July/Aug. 2017.
- LESLIE, W. T. *et al.* *Clostridium difficile* colitis during 5-FU/Leucovorin (5-FU/LV) adjuvant chemotherapy for colon cancer. In: ASCO ANNUAL MEETING, 34., 1998, Los Angeles. [Proceedings...]. Alexandria: American Society of Clinical Oncology, 1998.
- LESSA, F. C.; GOULD, C. V.; MCDONALD, L. C. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 55, p. 65-70, Aug. 2012. Suppl 2.

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

LOO, V. G. *et al.* Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 365, p. 1693-1703, Nov. 2011.

LÓPEZ UREÑA, D. *et al.* Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAPCR1 and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. **Emerging Microbes & Infections**, New York, v. 5, n. 5, e42, May 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4893543/>. Acesso em: 16 jun. 2019.

LYRAS, D. *et al.* Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. **Nature**, London, v. 458, n. 7242, p. 1176–1179, Apr. 2009.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. *et al.* Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 23, n. 9, p. 1552–1567, Mar. 2017.

MATHUR, H. *et al.* The potential for emerging therapeutic options for *Clostridium difficile* infection. **Gut Microbes**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p. 696-710, 2014.

McCALEB, R. V. *et al.* Clinical outcomes of acid suppressive therapy use in hematology/oncology patients at an academic medical center. **Annals of Pharmacotherapy**, Thousand Oaks, v. 50, n. 7, p. 541-547, July 2016.

McDONALD, L. C. *et al.* An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 353, n. 23, p. 2433-2441, Dec. 2005.

McDONALD, L. C. *et al.* Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 66, n. 7, e1-e48, Apr. 2018.

McFARLAND, L. V. Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections-epidemiology and current treatment strategies. **Current Opinion Gastroenterology**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 24-35, Jan. 2009.

McFARLAND, L. V.; ELMER, G. W.; SURAWICZ, C. M. Breaking the cycle: Treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 97, n. 7, p. 1769-1775, July 2002.

McFREE, R. B.; ABDELSAYED, G. C. *Clostridium difficile*. **Disease-A-Month**, St. Louis, v. 55, n. 7, p. 439-470, July 2009.

MCGLONE, S. M. *et al.* Y. The economic burden of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 18, n. 3, p. 282-289, Mar. 2012.

MERRIGAN, M. *et al.* Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, n. 192, n. 19, p. 4904–4911, Oct. 2010.

MONOT, M. *et al.* *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 15023, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4597214/>. Acesso em: 16 jun. 2020.

MORALES, R. *et al.* Pseudomembranous colitis associated with chemotherapy with 5-fluorouracil. **Clinical & Translational Oncology**, Barcelona, v. 7, n. 6, p. 258-261, Aug. 2005.

MULLANE, K. M. *et al.* Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 53, n. 5, p. 440-447, Sept. 2011.

MURAD, Y. M. *et al.* False negative results in *Clostridium difficile* testing. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 16, n. 1, p. 430, Aug. 2016.

MUSCHER, D. M. *et al.* Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, n. 11, p. 1586-1590, June 2005.

MUTO, C. A. *et al.* Control of an outbreak of infection with the hypervirulent *Clostridium difficile* BI strain in a university hospital using a comprehensive “bundle” approach. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, n. 10, p. 1266-1273, Nov. 2007.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (Estados Unidos). **Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections. (Version I.2018)**. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/infections.pdf. Acesso em: 22 abr. 2018.

NEEMANN, K.; FREIFELD, A. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in the oncology patient. **Journal of Oncology Practice**, Alexandria, v. 13, n. 1, p. 25-30, Jan. 2017.

NERANDIZC, M. M.; DONSKEY, C. J. Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 47, p. 397-400, Feb. 2009.

NOVACK, L. *et al.* Acid suppression therapy does not predispose to *Clostridium difficile* infection: the case of the potential bias. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e110790, Oct. 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110790>. Acesso em: 18 mar. 2019.

O’CONNOR, J. R.; JOHNSON, S.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 136, n. 6, p. 1913-1924, May 2009.

OLSEN, M. A. *et al.* Recurrent *Clostridium difficile* infection is associated with increased mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 164-170, Feb. 2015.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 66, n. 7, p. 2469–2470, July 2016.

- ORTH, P. *et al.* Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* toxin B-neutralizing antibody bezlotoxumab revealed by X-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 289, n. 26, p. 18008–18021, June 2014.
- OSTERLUND, P. *et al.* Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. **British Journal of Cancer**, London, v. 97, n. 8, p. 1028-1034, Oct. 2007.
- OTTER, J. A.; YEZLI, S.; FRENCH, G. L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 32, n. 7, p. 687-699, 2011.
- PENG, Z. *et al.* Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. **Emerging Microbes & Infections**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 15, Feb. 2018.
- PÉPIN, J. *et al.* Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, n. 9, p. 1254-1260, Nov. 2005.
- PÉPIN, J.; VALIQUETTE, L.; COSSETTE, B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 173, n. 9, p. 1037-1042, Oct. 2005.
- PIRES, R. N. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? **American Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 42, n. 4, p. 459-460, Apr. 2014.
- PLANCHE, T. D. *et al.* Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of C difficile infection. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 11, p. 936–945, Nov. 2013.
- POUTANEN, S. M.; SIMOR, A.E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 171 n. 1, p. 51-58, July 2004.
- PROD'HOM, G. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 48, n. 4, p. 1481–1483, Apr. 2010.
- QUESADA-GÓMEZ, C. *et al.* Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 48, n. 2, p. 669-670, Feb. 2010.
- RAZA, S. *et al.* *Clostridium difficile* infection following chemotherapy. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 1-9, Jan. 2010.
- RUIZ, M. S. *et al.* Epidemiología de la Enfermedad Asociada a *Clostridium difficile* (EACD) en Salamanca. **Revista Española de Quimioterapia**, Barcelona, v. 27, n. 2, p. 122-126, jun. 2014.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, n. 7, p. 526-536, July 2009.

- RYDER, A. B. *et al.* Assessment of *Clostridium difficile* infections by quantitative detection of tcdB toxin by use of a real-time cell analysis system. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, DC, v. 48, n. 11, p. 4129–4134, Nov. 2010.
- SARTELLI, M. *et al.* 2019 update of the WSES guidelines for management of Clostridioides (*Clostridium*) *difficile* infection in surgical patients. **World Journal of Emergency Surgery**, London, v. 14, p. 8, Feb. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6394026/>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- SCAPPATICCI, G. B. *et al.* Risk factors and impact of *Clostridium difficile* recurrence on haematology patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 72, n. 5, p. 1488-1495, May 2017.
- SCHALK, E. *et al.* *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, a frequent complication in patients with acute myeloid leukaemia. **Annals of Hematology**, Berlin, v. 89, n. 1, p. 9–14, Jan. 2010.
- SCHROEDER, M. S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **American Family Physician**, Kansas City, v. 71, n. 5, p. 921-928, Mar. 2005.
- SCOLA, B. L.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Burden of emerging anaerobes in the MALDI TOF and 16S rRNA gene sequencing era. **Anaerobe**, London, v. 17, n. 3, p. 106-112, June 2011.
- SECCO, D. A. *et al.* *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. **Anaerobe**, London, v. 18, p. 85-89, 2014.
- SELVEY, L. A. *et al.* *Clostridium difficile* Infections amongst Patients with Haematological Malignancies: A Data Linkage Study. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0157839, June 2016.
- SHANNON-LOWE, J. *et al.* Prevention and medical management of *Clostridium difficile* infection. **British Medical Journal**, London, v. 340, p. c1296, Mar. 2010.
- SHEITOYAN-PESANT, C. *et al.* Clinical and Healthcare Burden of Multiple Recurrences of *Clostridium difficile* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 62, n. 5, p. 574-580, Mar. 2016.
- SHEN, N. T.; MAW, A.; TMANOVA, L. L. Timely Use of Probiotics in Hospitalized Adults Prevents *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review With Meta-Regression Analysis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 152, n. 8, p. 1889-1900, June 2017.
- SI-LAN G. *et al.* Risk factors, outcomes and epidemiology associated with *Clostridium difficile* infection in patients with haematological malignancies in a tertiary care hospital in China. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 64, pt. 3, p. 209–216, Mar. 2015.
- SLOAN, L. M. *et al.* Comparison of real-time PCR for detection of the tcdC gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 46, n. 6, p. 1996–2001, June 2008.
- SMITS, W. K. *et al.* *Clostridium difficile* infection. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 2, n. 16020, 2016. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453186/pdf/nihms857742.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

SNYDMAN, D. *et al.* Epidemiologic trends in *Clostridium difficile* isolate ribotypes in United States from 2010 to 2016. **Open Forum Infectious Diseases**, Cary, v. 4, p. S391, 2017. Suppl. 1. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5631345/pdf/ofx163.973.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

STEVENS, V. *et al.* antibiotic exposures over time and the risk of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 42-48, July 2011.

STRINGER, A. M. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. **Nutrients**, Basel, v. 5, n. 5, p. 1488 - 1499, May 2013.

SWINDELLS, J. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, DC, v. 48, n. 2, p. 606-608, Feb. 2010.

TAN, K. S.; WEE, B. Y.; SONG, K. P. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 50, n. 7, p. 613–619, July 2001.

TANG-FELDMAN, Y. *et al.* Molecular analysis of *Clostridium difficile* strains isolated from 18 cases of recurrent *clostridium difficile*-associated diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 41, n. 7, p. 3413-3414, July 2003.

TICKLER, I. A. *et al.* Changes in molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in the United States between 2011 and 2017. **Anaerobe**, London, v. 60, p. 102050, Dec. 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996419301003?via%3Dihub>. Acesso em: 18 maio 2020.

TRINDADE, C. N. R.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, E. O. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. **Anaerobe**, London, v. 58, p. 13-21, Aug. 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996419300411?via%3Dihub>. Acesso em: 18 maio 2020.

TSCHUDIN-SUTTER, S. *et al.* Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 24, n. 10, p. 1051-1054, Oct. 2018.

TSUJIMURA, H. *et al.* Fatal fulminante *Clostridium difficile* colitis during CHOP therapy for lymphoma: an autopsy case. **Internal Medicine**, Tokyo, v. 46, n. 7, p. 401-404, 2007.

VALIQUETTE, L. *et al.* Impact of a Reduction in the Use of High-Risk Antibiotics on the Course of an Epidemic of *Clostridium Difficile*-Associated Disease Caused by the Hypervirulent NAP1/027 Strain. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, S112-21, Sept. 2007. Suppl. 2.

VAN DEN BERG, R. *et al.* Characterization of toxin A negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, DC, v. 42, n. 3, p. 1035–1041, Mar. 2004.

Van NOOD, E.; VRIEZE, A.; NIEUWDORP, M. Duodenal infusion of donor faeces for recurrent *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 368, n. 5, p. 407-415, Jan. 2013.

VEHRESCHILD, M. J. G. T. *et al.* *Clostridium Difficile* Infection in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and in Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation: Epidemiology and Risk Factor Analysis. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v. 20, p. 823-828, June 2014.

VONBERG, R. P. *et al.* Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 14, p. 2-20, May 2008. Suppl. 5.

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

WANAHITA, A.; GOLDSMITH, E.A.; MUSER, D. M. Conditions associated with leukocytosis in a tertiary care hospital, with particular attention to the role of infection caused by *Clostridium difficile*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 12, p. 1585-1592, June 2002.

WANG, M. S. *et al.* *Clostridium difficile* infection and limitations of markers for severity in patients with hematologic malignancy. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 34, n. 2, p. 127-132, Feb. 2013.

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

WILCOX, M. H. *et al.* Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 376, n. 4, p. 305-317, Jan. 2017.

WILCOX, M. H. Gastrointestinal disorders and the critically ill. *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 475-493, June 2003.

WOODWORTH, M. H.; KRAFT, C. S. Diagnostic and Therapeutic Considerations for Oncology Patients With *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Oncology Practice**, Alexandria, v. 13, n. 1, p. 31-32, Jan. 2017.

WRIGHT, A. *et al.* Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 9, p. 2443-2452, June 2005.

YOON, Y. K. *et al.* Predictors of mortality attributable to *Clostridium difficile* infection in patients with underlying malignancy. **Supportive Care in Cancer**, Berlin, v. 22, n. 8, p. 2039-2048, Aug. 2014.

ZAR, F. A. *et al.* A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, n. 3, p. 302-307, Aug. 2007.

ZILBERMAN-ITSKOVICH, S. *et al.* Potential impact of removing metronidazole from treatment armamentarium of mild acute *Clostridioides difficile* infection. **Future Microbiology**, London, v. 14, p. 1489-1495, Nov. 2019.

APÊNDICE A – FORMULÁRIO DA PESQUISA

I- IDENTIFICAÇÃO:

COLETA/HOSPITAL:

NOME:

REG:

UTI () Enfermaria Onco-hematológica () Oncologia ()

Sexo: () Masc. () Fem.

Data Nascimento:

Idade:

Escolaridade:

Grupo () Grupos: 1) analfabeto; 2) 1- 4 anos estudo; 3) 5-9 anos estudo 4) 10-14 anos estudo; 5) mais de 15 anos estudo 6) Ignorado

Profissão:

Procedência:

Estado Civil:

Contato:

II- CONDIÇÕES CLÍNICAS:

Sinais e sintomas durante a diarreia:

- | | | |
|---------------------------------------------------|---------|---------|
| a) Febre (temperatura axilar $\geq 37.8^\circ$) | Sim () | Não () |
| b) Dor abdominal | Sim () | Não () |
| c) Hipotensão (PAD<60mmHg ou PAS<90mmHg) | Sim () | Não () |
| d) Choque (uso drogas vasoativas) | Sim () | Não () |
| e) Insuficiência renal (redução 50% clearance Cr) | Sim () | Não () |

Potenciais fatores de risco:

- a) Antibioticoterapia prévia

Antibiótico	Início	Término
_____	___/___/___	___/___/___
_____	___/___/___	___/___/___

- b) Idade avançada (> 65 anos)

Sim () Não ()

- c) Doenças subjacentes graves: Não ()

Se sim, Qual(is)?

1. TIPO DE CÂNCER –
2. HAS
3. DM
4. IC
5. DPOC

6. DRC
 7. DHC
 8. Outros
- d) Uso de quimioterápicos: Não () RADIO: Sim () Não ()
 Sim() Qual (is)? Tempo?
-
-

- e) Uso de protetores gástricos Não () Sim () Qual??
- Inibid. de bomba de próton IV () VO () Dose _____ Tempo _____
 - Antagonista do canal H2 IV () VO () Dose _____ Tempo _____
- f) Cirurgias gastrintestinais?
 Sim () Não ()
- g) Tempo de internamento
 Data admissão: Data alta:
- h) Dieta: VO () SNE ()

Tratamento do caso suspeito de diarreia por *C. difficile*:

- a) Metronidazol VO Sim () dose _____ tempo _____ Não ()
- b) Metronidazol EV Sim () dose _____ tempo _____ Não ()
- c) Vancomicina VO Sim () dose _____ tempo _____ Não ()

Resposta clínica:

RESPOSTA CLÍNICA	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Resolução dos sintomas														
Resposta parcial														
Piora clínica (megacólon e/ou perfuração)														

Dados relativos aos desfechos e após tratamento em até 30/60 dias:

- a) Cura

- b) Recidiva
c) Óbito

III- LABORATÓRIO:

- a) Pesquisa do *C.difficile* – PCR em tempo real

Positivo ()
Negativo ()

- b) Neutropenia: Sim () % _____ Tempo _____
Não ()

Fluxograma de exames

Data								
Hb								
Ht								
Leuco								
M/M								
Bt/Seg								
Eo/Ba								
Lt/La								
Mo								
Plaq								
Albumina								
TTPA								
AE								
INR								
Glicose								
Uréia								
Creat								
Na								
K								
AST/TGO								
ALT/TGP								
Bt								
Bd								
PCR-CD								

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais manifestem, a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 466/2012-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa (**DIARREIA NOSOCOMIAL POR *Clostridioides difficile*: PREVALÊNCIA, RESPOSTA CLÍNICA, DESFECHO, FATORES DE RISCO E CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS EM HOSPITAIS DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO PERÍODO DE 2017 A 2019 EM RECIFE-PE**), que está sob a responsabilidade da pesquisadora (Catarina Tenório de Lima, Endereço: Rua Alto do Bonfim, 294, Carmo, CEP: 53120-092 - Olinda/PE; Telefones para contato: 31846601/ 988453939; E.mail: catarina.tenoriolima@ufpe.br). Esta pesquisa está sob orientação da Pesquisadora orientadora: Prof^a Dr^a Vera Magalhães, Telefone para contato: 21263633 (Hospital das Clínicas DIP/HC-UFPE).

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Por que esta pesquisa está sendo feita e quais são os objetivos?

A pesquisa está sendo realizada para saber se a diarreia hospitalar em pacientes internados neste Hospital é causada pela bactéria *Clostridioides*.

O que eu deverei fazer se decidir participar da pesquisa?

Para participar da pesquisa serão coletadas amostras de fezes diarreicas que serão enviadas ao laboratório para realizar os exames.

Quanto tempo durará a pesquisa?

Aproximadamente dois anos, mas a sua participação será de apenas no momento da coleta de fezes.

Eu terei algum risco por participar deste estudo?

Não haverá nenhum risco, uma vez que o estudo pretende realizar o diagnóstico da diarreia hospitalar neste Hospital.

Eu terei algum benefício por participar deste estudo?

Os resultados dos exames de fezes serão de utilidade para sabermos quais as causas de diarreia hospitalar neste Hospital. Estes resultados serão encaminhados ao seu médico.

Eu receberei algum dinheiro pela participação neste estudo?

A participação é voluntária, as pessoas não serão remuneradas em dinheiro.

Terei despesas por participar desta pesquisa?

Você não terá nenhuma despesa por participar deste estudo.

Minhas informações pessoais serão divulgadas?

Os dados do estudo são confidenciais e apenas terão acesso a eles os pesquisadores envolvidos no estudo e o comitê de ética que aprova a realização da pesquisa. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Toda a informação será registrada de forma anônima .

Quais são os meus direitos como voluntário(a) em uma pesquisa?

A participação nesta pesquisa tem caráter voluntário e ainda que você decida participar, conserva a possibilidade de se retirar a qualquer momento e por qualquer motivo, sem prejuízo algum para você. Se decidir participar, será solicitado que você dê o seu consentimento por escrito assinando este documento.

Catarina Tenório de Lima (pesquisador responsável)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, portador do documento de Identidade/CPF _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo **“Diarreia hospitalar por *Clostridioides difficile*: prevalência, resposta clínica, desfecho, fatores de risco e caracterização das cepas em Hospitais de Referência em Oncologia no período de 2017 a 2019 em Recife-PE”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Recife, _____

Assinatura do voluntário ou responsável:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

02 testemunhas (imparciais)

Nome: _____

Assinatura: _____

Data ____/____/____

Nome: _____

Assinatura: _____

Data ____/____/____

APÊNDICE C - ARTIGO 1 EM INGLÊS

Low prevalence of *Clostridioides difficile* infection in reference hospitals in oncology

Catarina Tenório¹, Paulo Sérgio Ramos de Araújo^{2,3}, Ana Kelly Lins⁵, Carlos Roberto Weber Sobrinho⁴, Vera Magalhães^{1,5}

¹ Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Centro de Pesquisas Ageu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM-Fiocruz) – Recife (PE), Brazil.

⁴ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁵ Setor de Bacteriologia e Biologia molecular do Laboratório Marcelo Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: catarina_tl@yahoo.com.br

Abstract

The severity and incidence of *Clostridioides difficile* infection (CDI) have increased over the last decade. Cancer predisposes patients to CDI due to increased exposure to risk factors. The present study aimed to determine the prevalence, clinical response, outcomes, risk factors as supported in the literature in cancer patients with CDI. This was a prospective cross-sectional study conducted at two reference centres in oncology in Recife-PE, Brazil and involved individuals aged ≥ 18 years who presented with diarrhoea 48 hours after hospital admission, from November 2017 to August 2019. CDI was diagnosed using real-time polymerase chain reaction (qPCR). A total of 156 patients were included in the study, and CDI was detected in 7.05% (11/156) of the patients. All isolates were screened, and the DNA was isolated and amplified by qPCR for the detection of genes coding for toxins A and B (*tcdA* and *tcdB*), binary toxin (*cdtA*), and triose phosphate isomerase (*tpi*). Breast cancer and acute lymphoid leukemia were the most frequent cancers (27.3% [3/11] and 18.2% [2/11], respectively); 90.9% (10/11) of the cases used antibiotics, and the mortality rate was 63.6% (7/11 patients). Despite the use of the qPCR technique, which is the most sensitive and specific method for diagnosing CDI, it was found that the prevalence of the disease was low (7.05%; 11/156). There were no cases of severe CDI, and most cases found were mild, which suggests the circulation of strains with low virulence that determine lower morbidity and mortality.

Keywords: *Clostridioides difficile* infection; Cancer; Antibiotics; Chemotherapy; qPCR.

1. Introduction

The incidence and severity of *Clostridioides difficile* infection (CDI) have increased in the last decade (Fuereeder et al., 2016). The disease is the most important cause of hospital-acquired diarrhoea associated with antibiotic use, and its incidence is increasing, with over 250,000 cases/year in the United States (McGlone et al., 2012). Cancer predisposes patients to CDI due to an increased exposure to risk factors such as the frequent use of broad-spectrum antibiotics and chemotherapy agents (Delgado et al., 2017).

The disease has a broad clinical spectrum, ranging from mild watery diarrhoea to pseudomembranous colitis, fulminant colitis, and death (Rupnik, Wilcox, Gerding, 2009). In cancer patients, in whom diarrhoea is a common adverse effect of chemotherapy regimens, diagnosis can be challenging and requires a high degree of clinical suspicion. In such patients, the early detection and treatment of CDI are crucial and associated with reduced mortality (Khan et al., 2012).

In Brazil, the infection caused by *C. difficile* in cancer patients is certainly underreported because the routine diagnosis has not been established in hospitals. Despite its importance worldwide, there is little research in the southeast and northeast regions of Brazil, this being the first study conducted in Pernambuco on *C. difficile*.

Given the growing importance of CDI and the lack of research on this disease in Brazil, the present study was conducted at two reference centres in oncology in Recife-PE, with the main objectives of determining the prevalence, clinical response, and outcome of patients with nosocomial diarrhoea due to *C. difficile* and describing the associated risk factors.

2. Methodology

This was a prospective, quantitative, cross-sectional study conducted at two reference centres in oncology in Recife/PE, Brazil, to determine the prevalence, clinical response, and outcomes of cancer patients with CDI and to describe the risk factors established in the literature (age >65 years, previous antibiotic therapy, presence of other comorbidities, use of chemotherapy, febrile neutropenia, use of gastric protectors, previous gastrointestinal surgery, and length of hospital stay).

The study involved individuals aged ≥ 18 years, who presented with diarrhoea 48 hours after hospital admission, from November 2017 to August 2019. The presence of CDI was diagnosed using real-time polymerase chain reaction (qPCR).

All isolates were screened, and the DNA was isolated and amplified for the detection of *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *tpi* genes using the primers described by Knetsch et al (2011) and Kilic

et al (2015). The project was submitted to the Ethics Committees of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco, the Pernambuco Society for the Fight against Cancer (Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer), and Hospital das Clínicas (CAAE number 63059516.7.0000.5208).

The data were analysed descriptively using absolute and percentage frequencies for the categorical variables and the measures, mean, standard deviation, and median for the variable age. Pearson's chi-square test or Fisher's exact test was used to evaluate the difference between two categorical variables when the assumption for using the chi-square test was not met. The margin of error used in the statistical tests was 5%. The statistical analyses were performed using the IBM SPSS software, version 23.

3. Results

Table 1 shows that the majority of patients were female (59.6%; 93/156), and only 29.5% (46/156) were of advanced age (65 years or older). Slightly more than half (53,2%; 83/156) of the sample population considered had comorbidities. The percentage of patients with neutropenia was 21.8% (34/156), and it was observed that the majority of these individuals (58.8%; 20/34) showed this condition from 1 to 7 days. Moreover, 81.6% (124/152) of all patients used ranitidine as a gastric protector. The most frequent types of cancer were breast cancer (15.4%; 24/156), non-Hodgkin lymphoma (14.1; 22/156), cervical cancer (10.9%; 17/156), colorectal cancer (9.6%; 15/156), acute myeloid leukaemia (AML) (9.6%; 15/156), and acute lymphocytic leukaemia (ALL) (5.8%; 9/156). No significant differences were detected between the groups for any of the variables analysed.

Table 1: Clinical and epidemiological characteristics of cancer patients according to CDI status

Variable	Group				Total group		p-value
	CDI positive		CDI negative				
	N	%	N	%	N	%	
Sex							p ⁽¹⁾ = 0.201
Male	2	18.2	61	42.1	63	40.4	
Female	9	81.8	84	57.9	93	59.6	
Advanced age							p ⁽¹⁾ = 0.509
Yes	2	18.2	44	30.3	46	29.5	
No	9	81.8	101	69.7	110	70.5	
Comorbidities							p ⁽²⁾ = 0.016*
Yes	2	18.2	81	55.9	83	53.2	
No	9	81.8	64	44.1	73	46.8	
Neutropenia (neutrophils ≤ 500/mm³)							p ⁽¹⁾ = 0.257
Yes	4	36.4	30	20.7	34	21.8	
No	7	63.6	115	79.3	122	78.2	
Use of gastric protectors							p ⁽¹⁾ = 0.393
Ranitidine	7	70.0	117	82.4	124	81.6	

Omeprazole	3	30.0	25	17.6	28	18.4	p ⁽¹⁾ = 0.168
Length of hospital stay (before faecal sample collection)							
Up to 7 days	3	27.3	67	46.2	70	44.9	
From 8 to 14 days	2	18.2	41	28.3	43	27.6	
More than 14 days	6	54.5	37	25.5	43	27.6	p ⁽¹⁾ = 0,385
Type of cancer							
Cervical	2	18.2	15	10.3	17	10.9	
Bladder	1	9.1	-	-	1	0.6	
Colorectal	-	-	15	10.3	15	9.6	
Gastric	1	9.1	8	5.5	9	5.8	
Uterine leiomyosarcoma	1	9.1	-	-	1	0.6	
Acute lymphocytic leukaemia (ALL)	2	18.2	7	4.8	9	5.8	
Acute myeloid leukaemia (AML)	1	9.1	14	9.7	15	9.6	
Non-Hodgkin lymphoma	-	-	22	15.2	22	14.1	
Breast	3	27.3	21	14.5	24	15.4	

Abbreviations: CDI, *Clostridioides difficile* infection.

(*) Significant difference at 5%;

(1) Fisher's exact test.

Table 2 shows that the majority of patients (69.2%; 108/156) had been receiving antibiotic therapy previously (up to 4 weeks before the date of the faecal sample collection). The most commonly used antibiotics were piperacillin + tazobactam (40.7%; 44/108), meropenem (28.7; 31/108), and cefepime (25.9%; 28/108). The only significant difference (p<0.05) between the groups was in the use of piperacillin + tazobactam. Most patients (62.2%; 97/156) underwent chemotherapy, and the most frequent chemotherapy agents were antimetabolites (52.6%; 51/97), anthracyclines (doxorubicin, daunorubicin, idarubicin) (42.3%; 41/97), and platinum agents (33.0%; 32/97). No significant differences (p<0.05) were found between the groups for any of the variables.

Table 2: Main antibiotics and chemotherapy agents used in cancer patients according to CDI status.

Potential risk factors	Group						p-value
	CDI positive		CDI negative		Total group		
	N	%	N	%	N	%	
Previous antibiotic therapy (4 weeks before sample collection)							p ⁽¹⁾ = 0,174
Yes	10	90.9	98	67.6	108	69.2	
No	1	9.1	47	32.4	48	30.8	
Previous use of antibiotics							p ⁽¹⁾ = 1,000
Cefepime							
Yes	2	20.0	26	26.5	28	25.9	
No	8	80.0	72	73.5	80	74.1	
Piperacillin + Tazobactam							p ⁽¹⁾ = 0,046*
Yes	1	10.0	43	43.9	44	40.7	
No	9	90.0	55	56.1	64	59.3	
Meropenem							p ⁽¹⁾ = 0,721
Yes	2	20.0	29	29.6	31	28.7	
No	8	80.0	69	70.4	77	71.3	
Chemotherapy (30 days before the diarrhoea episode)							p ⁽¹⁾ = 1,000

Yes	7	63,6	90	62,1	97	62.2	
No	4	36,4	55	37,9	59	37.8	
Class of chemotherapy agents							
Antimetabolite agents							
Yes	3	42,9	48	53,3	51	52.6	p ⁽¹⁾ = 0,705
No	4	57,1	42	46,7	46	47.4	
Anthracyclines							
Yes	4	57,1	37	41,1	41	42.3	p ⁽¹⁾ = 0,451
No	3	42,9	53	58,9	56	57.7	
Platinum agents							
Yes	1	14,3	31	34,4	32	33.0	p ⁽¹⁾ = 0,420
No	6	85,7	59	65,6	65	67.0	

Abbreviations: CDI, *Clostridioides difficile* infection

(*) Significant difference at 5%

(1) Fisher's exact test

In the CDI-positive group, 18.2% of patients (2/11) were treated for hospital-acquired diarrhoea, whereas in the CDI-negative group, this percentage was 13.1% (19/145). Among the patients who received medication for CDI, 5.8% (9/21) were treated with oral metronidazole and 8.3% (13/21) with intravenous metronidazole. Of the 21 treated patients, 81.0% (17/21) were observed to have a resolution of the symptoms, and 19.0% (4/21) were observed to have a partial response. In the total group, the outcomes were a cure for 60.3% (94/156) of the patients and death for 39.7% (62/156), as shown in Table 3. There were no significant differences ($p < 0.05$) between the groups.

Table 3: Treatment for hospital-acquired diarrhoea and patient outcomes according to CDI status

Variable	Group				Total group		p-value
	CDI positive		CDI negative		N	%	
	n	%	N	%			
Treatment for <i>C. Difficile</i>							
Yes	2	18.2	19	13.1	21	13.5	p ⁽¹⁾ = 0,644
No	9	81.8	126	86.9	135	86.5	
Oral metronidazole							
Yes	-	-	9	6.2	9	5.8	p ⁽¹⁾ = 1,000
No	11	100.0	136	93.8	147	94.2	
Intravenous metronidazole							
Yes	2	18.2	11	7.6	13	8.3	p ⁽¹⁾ = 0,229
No	9	81.8	134	92.4	143	91.7	
Clinical response of patients treated with antibiotics							
Resolution of symptoms	2	100.0	15	78.9	17	81.0	p ⁽¹⁾ = 1,000
Partial response	-	-	4	21.1	4	19.0	
Outcome							
Cure	4	36.4	90	62.1	94	60.3	p ⁽¹⁾ = 0,115
Death	7	63.6	55	37.9	62	39.7	

Abbreviations: CDI, *Clostridioides difficile* infection

(1) Fisher's exact test

4. Discussion

Despite efforts to prevent CDI in the recent years, its incidence has increased worldwide (Raza et al., 2010), and this increase varies between different regions, which demonstrates the importance of regional research. In eastern China, Fang et al., (2014) found a prevalence of 20.5% of CDI in three cancer hospitals; in Spain, this percentage was 17.3% (Garzotto et al., 2015), and in the USA, the incidence of CDI was 7–14% in adults with cancer (Scappaticci et al., 2017).

In Brazil, there are specificities regarding the prevalence of CDI in different regions. Pires et al., (2014), Balassiano et al., (2010), and Cecilia Costa (2014) reported an incidence of CDI varying from 8.3% to 46.3%, which is higher than that obtained in the present study (7.05%). Even using qPCR, which is the most sensitive and specific method for diagnosing CDI, our results showed a lower prevalence of the disease than that obtained in other Brazilian studies, because ELISA, a technique used by most researchers, can generate false-positive results.

In addition, the patients diagnosed with CDI were predominantly young women, a finding that is related to the high incidence of cervical cancer in Brazil (INCA, 2019). Pépin et al., (2005) demonstrated that the risk of contracting the infection during an outbreak was 10 times higher among people over 65 years of age than among younger patients because the abundance of intestinal microbiota decreases with ageing (Lessa, Gould & McDonald, 2012; Krishna et al., 2013). In addition, the lower prevalence found herein may be associated with the fact that the samples included in our study were from younger patients than samples analysed in studies conducted in developed countries where the target population was composed of older people.

Moreover, the influence of gastric acid suppression on the development of CDI remains uncertain, even when the viability of *C. difficile* spores in gastric pH has been demonstrated (Leffler & Lamont, 2009). Some researchers have reported an increased risk of infection associated with acid suppression (Dial et al., 2004), whereas others, after adjusting for coexisting conditions, have not confirmed this (Kyne et al., 2002; Novack et al., 2014). Many of the positive patients did not show neutropenia, although it is associated with high rates of CDI in cancer patients (Chul, Ki-Eun & Hak-Ryul, 2016; Delgado et al., 2017).

According to earlier reports, the previous use of antimicrobial agents such as clindamycin, fluoroquinolones, cephalosporins, monobactams, and carbapenems results in dysbiosis that favours the growth of *C. difficile* (Gorschüter et al., 2001), and it is the main risk factor for CDI (Brown et al., 2013; Britton & Young, 2014). Moreover, the most commonly

used antimicrobial agent was piperacillin + tazobactam, with a statistically significant difference between the two groups. Similar results were described by Chang et al (2016) in the USA.

Although patients with haematological cancers have a 2.5-fold risk of infection by *C. difficile* compared with those with solid tumours, a fact that is attributed to prolonged hospital stays, we did not find a difference in CDI rates based on the cancer type (Hebbard et al., 2016; Abughanemeh et al., 2018).

The use of antibiotics is usually related to the development of CDI. However, chemotherapy has been described as a risk factor for the development of CDI (Khan et al., 2012). Several chemotherapeutic agents are associated with the development of CDI (Chopra, Alangaden & Chandrasckar, 2010). However, Fuereder et al., (2016) reported that chemotherapy was not a significant risk factor for CDI compared with previous exposure to antibiotics.

5. Final considerations

Given the worldwide importance of *C. difficile*, this study improved our knowledge of the epidemiological data about CDI in immunocompromised patients in the State of Pernambuco. Our results helped in understanding the mechanisms involved in the process of CDI acquisition in hospital environments, as well as promoting strategies to prevent the spread of the infection in this population at risk.

In conclusion, the low virulence of the strains could play a preponderant role in the low prevalence obtained herein because most of the positive patients had a mild to moderate clinical course, with no recurrences recorded in the 30–60-day follow-up. The mortality rate among these patients may be explained by the severity associated with the type of cancer because no patient had severe pseudomembranous colitis, which could justify the deaths. These data reinforced that further prevalence studies are essential for the surveillance of CDI cases in Brazilian hospitals.

References

- Abughanimeh, O., Qasrawi, A., Kaddourah, O., Momani, L. A. &, Ghanimeh, M. A. (2018). *Clostridium difficile* infection in oncology patients: epidemiology, pathophysiology, risk factors, diagnosis, and treatment. *Hospital Practice*, 46(5), 266-277. <https://doi.org/10.1080/21548331.2018.1533673>.
- 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. (2010). An outbreak case of

Clostridium difficile-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 68(4), 449-55.

Britton, R. A., & Young, V. B. (2014). Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, 146, 1547-53.

Brown, K. A., Khanafer, N., Daneman, N., & Fisman, D.N. (2013). Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2326–32.

Chang, G. Y., Dembry, L. M., & Banach, D. B. (2016). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized oncology patients. *American Journal of Infection Control*, 44(11), 1408-1410.

Chopra, T., Alangaden, G. J., & Chandrasekar, P. (2010). *Clostridium difficile* infection in Cancer patients and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8, 1113-1119.

Chul, P., Ki-Eun, H., & Hak-Ryul, K. (2016). Overview of *Clostridium difficile* Infection in Cancer Patients. *Journal of Infectious Diseases & Diagnosis*, 1, 109.

Costa, C. L., Carvalho, C. B. M., González, R. H., Gifoni, M. A. C., Ribeiro, R. A., Quesada-Gómez, C., & Brito, G. A. C. (2017). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. *Anaerobe*, 48, 232-36. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.001>.

Delgado, A., Reveles, I. A., Cabello, F. T., & Reveles, K. R. (2017). Poorer outcomes among cancer patients diagnosed with *Clostridium difficile* infections in United States community hospitals. *BMC Infectious Diseases*, 17, 448. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2553-z>.

Dial, S., Alrasadi, K., Manoukian, C., Huang, A., & Menzies, D. (2004). Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. *CMAJ*, 171(1), 33–38.

Fang, W. J., Da-Zhi, J., Yun, L., Cai-Yun, F., Peng, Z., Jiong, Q., Bing-Ru, T., Xiao-Gang, C., Yu-Long, Z., Jing, D., Wei-Hua, Z., Xue-Ren, F., Fan-Long, L., Xiao-Zhou, M., & Shu-Sen, Z. (2014). *Clostridium difficile* carriage in hospitalized cancer patients: a prospective investigation in eastern China. *BMC Infectious Diseases*, 14:523. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-523>.

Fuereder, T., Koni, D., Gleiss, A., Kund, M., Makristathis, A., Zielinski, C., & Steininger, C. (2016). Risk factors for *Clostridium difficile* infection in hemato-oncological patients: A case control study in 144 patients. *Scientific Reports*, 6, 31498.

Garzotto, A. R., García, A. M., Unceta, N. M., Lopez, M. M., Orellana-Miguel, M. A., Díaz-García, C. V., Cortijo-Cascajares, S., Cortes-Funes, H., & Agulló-Ortuño, M. T. (2015). Risk factors associated with *Clostridium difficile* infection in adult oncology patients. *Support Care Cancer*, 23, 1569–1577. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2506-7>.

Gorschlüter, M., Glasmacher, A., Hahn, C., Schakowski, F., Ziske, C., Molitor, E., Marklein, G., Sauerbruch, T., & Schmidt-Wolf, I. G. (2001). *Clostridium difficile* infection in patients with neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 786-791.

Hebbard, A. I., Slavin, M. A., Reed, C., Trubiano, J. A., The, B. W., Haeusler, G. M., Thursky, K. A., & Worth, L. J. (2016). The epidemiology of *Clostridium difficile* infection in patients with cancer. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 14, 1077-1085.

Khan, A., Raza, S., Batul, S. A., Khan, M., Aksoy, T., Baig, M. A., & Berger, B. J. (2012). The evolution of *Clostridium difficile* infection in cancer patients: epidemiology, pathophysiology, and guidelines for prevention and management. *Recent Patents Antiinfective Drug Discovery*, 7(2), 157-70.

Kilic, A., Alam, M. J., Tisdell, N. L., Shan, D. N., Yapar, M., Yapar, M., Lasco, T. M., & Garey, K. W. (2015). Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. *Annals of laboratory medicine*, 35:306-313.

Knetsch, C. W., Bakker, D., De Boer, R. F., Sanders, I., Hof, S., Kooistra-Smid, A. M. D., Corver, J., Eastwood, K., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2011). Comparison of Real-Time PCR Techniques to Cytotoxigenic Culture Methods for Diagnosing *Clostridium difficile* Infection. *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 227-231.

Krishna, S. G., Zhao, W., Apewokin, S. K., Krishna, K., Chepyala, P., & Anaissie, E. J. (2013). Risk factors, preemptive therapy, and antiperistaltic agents for *Clostridium difficile* infection in cancer patients. *Transplant Infectious Diseases*, 15, 493-501.

Kyne, L., Sougioultzis, S., McFarland, L. V., & Kelly, C. P. (2002). Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 23, 653-9.

Leffler, D. A., & Lamont, J. T. (2009). Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, 136, 1899-912.

Lessa, F. C., Gould, C. V., & McDonald, L. C. (2012). Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clinical infectious diseases*, 55(2), 65-70.

Mcglone, S. M., Bailey, R. R., Zimmer, S. M., Popovich, M. J., Tian, Y., Ufberg, P., Muder, R. R., & Lee, B. Y. (2012). The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 282-289.

MS/INCA/Estimativa de Câncer no Brasil, 2020- disponível em <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> (acessado em 22/07/2020).

Novack, L., Kogan, S., Gimpelevich, L., Howell, M., Borer, A., Kelly, C. P., Leffler, D. A., & Novack, V. (2014). Acid suppression therapy does not predispose to *Clostridium difficile* infection: the case of the potential bias. *PLoS One*, 9(10), e110790.

Pépin, J., Valiquette, L., & Cossette, B. (2005). Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*, 173, 1037-42.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.

Pires, R. N., Monteiro, A. A., Carneiro, L. C., Baethgen, L. F., Tavares, R., Lincho, C. S., Park, S., Perlin, D., Rodrigues, F. E. M., & Pasqualotto, A. C. (2014). *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? *American Journal of Infection Control*, 42(4), 459-60.

Raza, S., Baig, M. A., Russell, H., Gourdet, Y., & Berger, B. J. (2010). *Clostridium difficile* infection following chemotherapy. *Recent Patents Antiinfective Drug Discovery*, 5(1), 1-9.

Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526-36.

Scappaticci, G. B., Perissinotti, A. J., Nagel, J. L., Bixby, D. L., & Marini, B. L. (2017). Risk factors and impact of *Clostridium difficile* recurrence on haematology patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5), 1488-1495.

APÊNDICE D - ARTIGO 2 EM INGLÊS

Identification of a rare strain of *Clostridioides difficile* producing only Toxin A in cancer patients

Catarina Tenório¹, Paulo Sérgio Ramos de Araújo^{2,3}, Ana Kelly Lins⁵, Kelly Cristiny Borges Rainha⁶, Eliane de Oliveira Ferreira⁶, Carlos Roberto Weber Sobrinho⁴, Marcelo Magalhães⁴, Vera Magalhães^{1,5}

¹ Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM-Fiocruz) – Recife (PE), Brazil.

⁴ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁵ Setor de Bacteriologia e Biologia molecular do Laboratório Marcelo Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁶ Departamento de Microbiologia Médica, IMPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author

E-mail: catarina_tl@yahoo.com.br

Abstract

Infection caused by *Clostridioides difficile* (CDI) is the leading cause of nosocomial diarrhea associated with antimicrobial use, constituting a public health problem. The disease is mediated by toxins that damage the intestinal mucosa, causing fluid buildup and destruction of the gut epithelium. The aim of this study was to identify and characterize *C. difficile* strains in fecal samples of cancer patients presenting CDI symptoms. Of the 156 diarrheal fecal samples obtained, 11 (7.05%) showed the presence of *C. difficile*, confirmed by qRT-PCR targeting the species-specific triose phosphate isomerase (*tpi*) gene. The majority of strains - 54.5% (6/11) -

were positive only for toxin A (TcdA⁺), and thus considered rare; 45.5% (5/11) were positive for Toxins TcdA⁺/TcdB⁺. PCR ribotyping of the intergenic region of the RNAr subunit 16S-23S sequence amplification showed that of the six isolates, two of them belonged to ribotypes 106 and 143. Four strains, including CBA0021, were not typeable based on the reference strain bank used. Although the clinical symptoms of CDI in patients was considered mild, even in immunocompromised patients, it is important to conduct prevalence and molecular characterization studies of the *C. difficile* strains circulating in hospitals to prevent CDI outbreaks, especially in at-risk patients such as cancer patients.

Keywords: *Clostridioides difficile*, immunocompromised patients, Real-time PCR, toxin A, PCR ribotyping

Introduction

Infection by *Clostridioides difficile* (CDI) is considered the leading cause of infective diarrhea in health care environments [1], with a high risk in cancer patients [2]. There are more than 800 recognized types (ribotypes) of *C. difficile* strains [3]. The disease is mediated by toxins that damage the intestinal mucosa, causing fluid accumulation and destruction of the gut epithelium [4,5,6]. Toxin A (TcdA) exhibits enterotoxic and cytotoxic effects, whereas toxin B (TcdB) possesses a strong cytotoxic activity. They are encoded by genes *tcdA* and *tcdB*, respectively, which together with three additional genes (*tcdC*, *tcdR* and *tcdE*), form the pathogenicity locus (PaLoc) [7,8].

Most clinical toxigenic *C. difficile* isolates can express TcdA⁺/TcdB⁺ toxins; few strains produce only the TcdB toxin⁺, whereas clinical isolates producing only the TcdA⁺ toxin are extremely rare [9]. TcdB-positive strains were initially described in the mid-1990s [10,11], and TcdB⁺ are particularly responsible for inducing innate and inflammatory immune responses of the host, causing severe intestinal and systemic organ damage [5].

Recently, Monot et al (2015) [12] first reported a *C. difficile* variant strain that expresses only toxin A (TcdA⁺/TcdB⁻) in a 60-year-old CDI patient treated with metronidazole and no recurrence report. A third toxin considered as an important virulence factor, binary toxin or CDT, is encoded by the genes *cdtA* and *cdtB* located in a separate gene locus, CdtLoc [13].

The molecular characterization by PCR ribotyping [14] of the various *C. difficile* strains has allowed a greater knowledge of this pathogen's ribotypes associated with the most severe

or non-severe CDI cases. CDI incidence and severity has increased in recent years due to the appearance of an epidemic strain known as BI/NAP1/ribotype 027 [15], resulting in changes in *C. difficile* epidemiology in several countries, including Europe and North America; while ribotypes 014/020, 014, 001, 001/072 and 078 increased their prevalence, ribotype 027 remains the most prevalent [16,1].

In Latin America, the presence of RT027 has already been reported in Mexico, Costa Rica, Panama, and Chile [17,18], but not in Brazil. Some researchers have drawn attention to the importance of reporting CDI in Brazilian hospitals, so that prevention measures and strategies may be taken to prevent the spread of epidemic strains in the country [19].

Materials and methods

For this study, 156 diarrheal fecal samples from cancer patients collected between November/2017 and August/2019 were included. The project was approved by the Ethics Committee of the Center for Health Sciences of the Federal University of Pernambuco, the Pernambuco Society for Combating Cancer, and the Ethics Committee of the Hospital das Clínicas with authorization **CAAE 63059516.7.0000.5208**.

For the CDI diagnosis, DNA was extracted from stool samples using the *QIAamp Stool DNA Mini Kit* commercial kit, following the manufacturer's recommendations (Qiagen; Chatsworth, CA, USA). Polymerase Chain Reactions (PCR) were prepared using the *Taq Man® Universal PCR Master Mix* reagent (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), containing dNTPs, buffer, UNG (Uracil-N-Glycosylase), Ampli Taq®. The TaqMan® method uses a fluorescent molecule-tagged probe (fluorophore) and one intramolecular quenching molecule (*quencher*), in addition to the pair of primer oligos (*primers*) used in standard PCR.

PCR reactions were performed according to the manufacturer's instructions (Termofischer Scientific, Massachusetts, USA). All isolates were screened and amplified for the presence of genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *tpi*, using oligonucleotides described by Knetsch et al (2011) [20] and Kilic et al (2015) [21] (table 1).

For the isolation of the species, one gram of feces was mixed with a small amount of PBS 1x and subjected to a 60 °C thermal shock for 30 min. Samples were subsequently inoculated in the selective, differential *Clostridioides difficile* Brucella agar (CDBA) medium supplemented with 0.01% sodium taurocholate and antibiotics D-cycloserine (0.5 mg/mL) and cefoxitin (0.012 8 mg/mL), and incubated at 37°C under anaerobiosis (80% N₂, 10% H₂, 10%

CO₂) for 7-10 days [22]. Colonies suggestive of *C. difficile* were identified by MALDI-TOF MS mass spectrometry (Bruker®).

The protocol developed by Bidet et al, (1999) [14] using the PCR method was used for strain ribotyping – the protocol amplifies the repeated intergenic regions present among the ribosomal subunits 16S-23S. The amplification products were separated by electrophoresis, and the analysis of the resulting bands was performed using the BioNumerics® software (Applied Maths®, Belgium), using as a comparison profile the 100 bp DNA ladder molecular weight standard (Invitrogen) and the epidemic strain R20291 belonging to ribotype 027 (B1/NAP1/027). The nomenclature of the ribotypes found followed the Cardiff/Leeds standard (001, 002, 014...). Strains whose band pattern was not identified were considered non-typeable.

Table 1. Real-time multiplex PCR and TaqMan probes for detection of *Clostridioides difficile*, its specific toxin A, toxin B, and binary toxin A genes

Main target	Main gene	Nucleotide Sequence (5' → ' 3')	Gene	Bank number
<i>C. difficile</i>	<i>tpi</i>	F: 5'-gaagctactaagggtacaaa-3'	FN668944	
		R: 5'-ggctattcctacttctaagc-3'	FN668941	
		Probe: 5'-VIC ataagagtgaaactctcctgtaaatgctcc TAMRA-3'	FN668375	
			FN665654	
			FN665653	
Toxin A	<i>TcdA</i>	F: 5'-tgataacgtatagctgacc-3'	DQ117264	
		R: 5'-atggttacctcagatagg-3'	DQ117255	
		Probe: 5'-FAM tgaatacttgcacctgctaatacggatg TAMRA-3'	DQ117249	
			DQ117248	
		DQ117247		
Toxin B	<i>TcdB</i>	F: 5' - -gaagattacctgtaattgc-3'	HM062511	
		R: 5'-ctgcattatacctatcttagc-3'	HM062510	
		Probe: 5'-VIC ctctttgattgctgcacctaaacttacacc TAMRA-3'	HM062509	
			HM062508	
		HM062507		
Binary toxin A	<i>CdtA</i>	F: 5'-tatattaaagcagaagcatctgt-3'	DQ102377	DQ102377
		R: 5'-ctggaccattgatattaaataatt-3'	DQ102378	DQ102378
			DQ102375	DQ102375
		Probe: 5'-FAM tcctccacgcatataatcattacatcagc TAMRA-3'	DQ102376	DQ102376
			AJ238325	AJ238325

Toxin B	<i>TcdB</i>	GAAAGTCCAAGTTTACGCTCAAT	398CLDs
		GCTGCACCTAAACTTACACCA	399CLDas
		FAM-ACAGATGCAGCCAAAGTTGTTGAATT-BHQ1	551CLD-tq-FAM

Abbreviations: *tpi*, species-specific *Clostridioides difficile* gene; *tcdA*, toxin A gene; *tcdB*, toxin B gene; *cdtA*, binary toxin gene.

Source: Knetsch et al., 2011; Kilic A, et al., 2015

Results

Of the 156 samples, 11 (7.05%) were confirmed as *C. difficile* – all isolates were positive for the species-specific gene triose phosphate isomerase (*tpi*). Most cases, 54.5% (6/11), were positive for toxin A (*TcdA*⁺), whereas only 45.5% (5/11) was positive for Toxins A and B (*TcdA*⁺/*TcdB*⁺). Table 2 lists the characteristics of the samples analyzed in this research.

C. difficile was recovered from six out of nine fecal samples grown in CDDBA medium. Molecular typing analyses based on PCR ribotyping showed that two of them belonged to ribotype 106 and 143; the remaining four strains, including CBA0021, did not match any other ribotype in the reference library, and were thus classified as "non-typeable" (Figure 1).

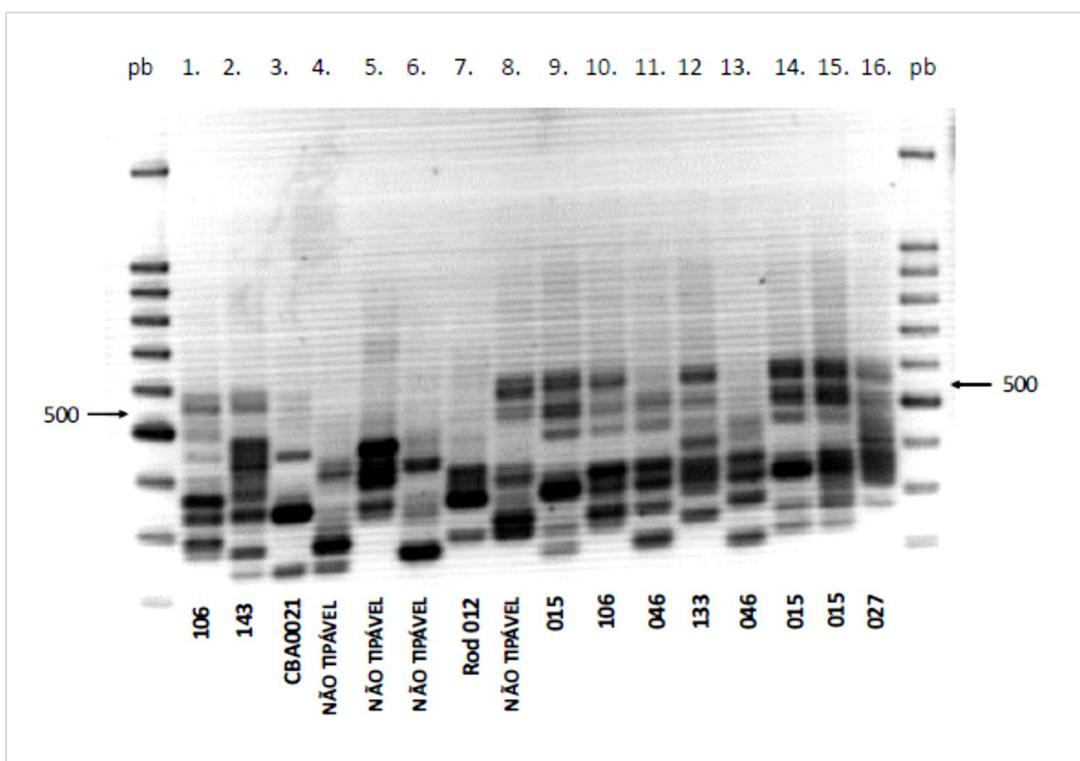
Table 2. Patient characteristics and *Clostridioides difficile* isolates analyzed in this study

Patients	CA type	CDI	qRT-PCR (<i>tpi</i> gene)	Toxigenic profile	Culture Medium CDDBA	Ribotypes
Female/42 y	Uterine CA	Moderate	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	NR	NR
Female/58 y	Uterine CA	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Positive	106
Female/73 y	Gastric CA	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positive	143
Female/46 y	Breast CA	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positive	CBA0021
Male/50 y	AML	Moderate	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Negative	NR
Female/25 y	ALL	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positive	Non-typeable
Female/45 y	Breast CA	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Positive	Non-typeable
Male/40 y	ALL	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Positive	Non-typeable

Female/53 y	Breast CA	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	Negative	NR
Female/66 y	Bladder CA	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁻	Negative	NR
Female/55 y	Uterine Leiomyosarcoma	Mild	Positive	<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺	NR	NR

Abbreviations: CA: cancer; qRT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction; *tpi*: triose phosphate isomerase; *tcdA*: toxin A gene; *tcdB*: toxin B gene; CDBA: *Clostridioides difficile* brucella agar; y: years; AML: acute myeloid leukemia; ALL: acute lymphoblastic leukemia; NR: not realized
 CDI: mild, moderate or severe

Figure 1 - PCR-ribotyping of *Clostridioides difficile* strains isolated in two Oncology Reference Hospitals in Pernambuco, Brazil



Source: Paulo Góes Institute of Microbiology - UFRJ, 2020.

Discussion

Brazilian research conducted in hospitals in Rio de Janeiro [23,24], Porto Alegre [25] and Ceará [26] involving patients with nosocomial diarrhea and in a hospital setting reported toxigenic strains, all positive for TcdA⁺/TcdB⁺. This is the first study in Latin America to describe a high prevalence, 54,5% (6/11) of *C. difficile* *tcdA*⁺/*tcdB*⁻ variant strains in immunocompromised patients. The genetic variability of genes *tcdA* and *tcdB* raised some

questions about the role of each toxin in CDI – some studies on the relative contribution of these toxins to CDI virulence have been contradictory.

Lyras et al, (2009) [27] and Carter et al, (2015) [5] analyzed toxins from two different *C. difficile* strains (including JIR8094) and demonstrated that mutant TcdA⁺/TcdB⁻ was less virulent than the TcdA⁺/TcdB⁺ and TcdA⁻/TcdB⁺ toxin-producing strains. Our findings corroborate this, as most patients with TcdA⁺/TcdB⁻ strains presented mild CDI, with favorable evolution and no indication for antimicrobial treatment. No complications, including toxic megacolon and death were found in our patients; however, cecal histological damage was found with the variant producing only toxin A [28]. In fact, strains that produce only toxin B have caused epidemics in several Asian countries [29].

Furthermore, Kuehne et al, (2010) [6] observed in a hamster model that the mutant strain was almost as virulent as the strains that produce the TcdA⁺/TcdB⁺ and TcdA⁻/TcdB⁺ toxins. Carter et al, (2015) [5] also demonstrated lethality for a TcdA⁺/TcdB⁻ mutant of a Canadian epidemic strain (Strain M7404). Other genetic factors may possibly modulate the virulence of this strain in addition to the production of toxins, and thus the analysis using animal models should be careful [28].

Despite the clinical importance of CDI in many countries and the discovery of new ribotypes every year, information on the strains circulating in Brazil is scarce. PCR ribotyping is commonly used in Europe in identifying *C. difficile* ribotypes, allowing homology between laboratories [30]. Balassiano et al, (2009) demonstrated for the first time the isolation of ribotype 106 strains outside the United Kingdom, highlighting this microorganism's potential for dissemination [23]. While the prevalence of epidemic ribotype 027 is decreasing globally, ribotype 106 has become one of the main CDI-causing ribotypes in the European community [31].

A review of *C. difficile* epidemiology in Brazil stressed the importance of CDI notification evidencing the main ribotypes circulating in Brazilian states (014, 043, 046, **106**, 132, 133, 134, 135, 136, 142, **143** and 233) [19]. However, most of the results (66.7%) found in our research did not identify any of the aforementioned ribotypes circulating in Brazil, i.e., without homology in the database used in the study and awaiting denomination.

In conclusion, despite the reduced number of patients in our case study, we describe for the first time in Latin America the presence of toxin A-producing *C. difficile* variant strains in cancer patients. Although CDI cases have been mild even in immunosuppressed patients, epidemiological studies are important to show that CDI occurs in Brazilian hospitals, and that it can be caused ribotypes that circulate worldwide or that are prevalent in our country.

References

1. K.A. Davies, et al., Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013, Euro. Surveill. 21 (2016) 1-11, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294>.
2. T. Chopra, G.J. Alangaden, P. Chandrasekar, *Clostridium difficile* infection in cancer patients and hematopoietic stem cell transplant recipients, Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 8 (2010) 1113–1119, <https://doi.org/10.1586/eri.10.95>.
3. I. Tonna, P.D. Welsby, Pathogenesis and treatment of *Clostridium difficile* infection, Postgrad. Med. J. 81 (2005) 367–369, doi: 10.1136/pgmj.2004.028480.
4. M. Rupnik, M.H. Wilcox, D.N. Gerding, *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis, Nature Reviews Microbiology 7 (2009) 526-36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>.
5. G.P. Carter, et al., Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections, MBio 6 (2015) e00551, <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15>.
6. S.A. Kuehne, et al., The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection, Nature 467 (2010) 711-73, <https://doi.org/10.1038/nature09397>.
7. V.G. Loo, et al., A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N. Engl. J. Med. 353 (2005) 2442–2449, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051639>.
8. M. Merrigan, et al., Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production, J. Bacteriol. 192 (2010) 4904–4911, <https://doi.org/10.1128/JB.00445-10>.
9. R. Van Den Berg, et al., Characterization of toxin A negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping, Journal Clinical of Microbiology 42 (2004) 1035–1041, <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1035-1041>.
10. S.P. Sambol, et al., Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease, Infect. Immun. 68 (2000) 5480-5487, <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5480-5487>.
11. M. Rupnik, et al., New types of toxin A negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia, J. Clin. Microbiol. 41 (2003) 1118-1125, <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1118-1125>.
12. M. Monot et al., *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus, Scientific Reports 5 (2015) 1-13, <https://doi.org/10.1038/srep15023>.

13. S. Perelle, et al., Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196, *Infect. Immun.* 65 (1997) 1402–1407, <https://doi.org/10.1128/IAI.65.4.1402-1407>
14. P. Bidet, et al., Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing, *FEMS. Microbiol. Lett.* 175 (1999) 261-6, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13629.x>.
15. E.J. Kuijper, et al., Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, *Euro. Surveillance* 13 (2008) 1-7, PMID: 18761903.
16. M.P. Bauer, et al., *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey, *Lancet* 377 (2011) 63-73, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(2011\)61266-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(2011)61266-4).
17. D. Lopez-Urena, et al., Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: Case reports in Panamá, *J. Med. Microbiol.* 63 (2014) 322-324, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.066399-0>.
18. A. Plaza-Garrido, et al., Predominance of *Clostridium difficile* ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, *Epidemiol. Infect.* 144 (2012) 976-979, <https://doi.org/10.1017/S0950268815002459>.
19. C.N.R. Trindade, R.M.C.P. Domingues, E.O. Ferreira, The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty Years, *Anaerobe* 58 (2019) 13-21, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe>.
20. C.W. Knetsch, et al., Comparison of Real-Time PCR Techniques to Cytotoxigenic Culture Methods for Diagnosing *Clostridium difficile* Infection, *Journal of Clinical Microbiology* 49 (2011) 227–231, <https://doi.org/10.1128/JCM.01743-10>.
21. A. Kilic, et al., Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples, *Annals of laboratory medicine* 35 (2015) 306-313, <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.3.306>.
22. M.M. Nerandizc, C.J. Donskey, Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009) 397-400, <https://doi.org/10.1128/JCM.01591-08>.
23. I.T. Balassiano, et al., Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil, *Anaerobe* 3 (2009) 61e64, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.12.007>.
24. I.T. Balassiano, et al., An outbreak case of *Clostridium difficile* associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68 (2010) 449e455, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017>.
25. A. de A. Monteiro, et al., A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil, *Braz. J. Infect. Dis.* 18 (2014) 672e674, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.004>.

26. C.L. Costa, et al., Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in a Brazilian Cancer Hospital, vol. 48, 2017, pp. 232e236, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.001>.
27. D. Lyras, et al., Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*, Nature 458 (2009) 1176e1179, <https://doi.org/10.1038/nature07822>.
28. J.C. Marvaud, et al., Virulence of new variant strains of *Clostridium difficile* producing Only toxin A or binary toxin in the hamster model, New Microbe. and New Infect. 32 (2019) 100590, <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100590>.
29. D.A. Collins et al., Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2 (2013) 21, <https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-21>.
30. A. Indra, et al., Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping, J. Med. Microbiol. 57 (2008) 1377-82, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47714-0>.
31. A.J. Gonzales-Luna, et al., PCR ribotypes of *Clostridium difficile* across Texas from 2011 to 2018 including emergence of ribotype 255, Emerging Microbes & Infections 9 (2020) 341–347, <https://doi.org/10.1080/22221751.20>.

APÊNDICE E – RESULTADOS DA PESQUISA

Tabela 4 – Características da amostra e fatores de risco, segundo os resultados de CDI

Variável	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		n	%	
	n	%	N	%			
Sexo							p ⁽¹⁾ = 0,201
Masculino	2	18,2	61	42,1	63	40,4	
Feminino	9	81,8	84	57,9	93	59,6	
Idade avançada							p ⁽¹⁾ = 0,509
Sim	2	18,2	44	30,3	46	29,5	
Não	9	81,8	101	69,7	110	70,5	
Sinais e sintomas durante a diarreia							p ⁽¹⁾ = 0,731
Sim	4	36,4	41	28,3	45	28,8	
Não	7	63,6	104	71,7	111	71,2	
Comorbidades							p ⁽²⁾ = 0,016*
Sim	2	18,2	81	55,9	83	53,2	
Não	9	81,8	64	44,1	73	46,8	
Diabetes Mellitus ⁽³⁾							p ⁽¹⁾ = 0,531
Sim	1	50,0	25	30,9	26	31,3	
Não	1	50,0	56	69,1	57	68,7	
Insuficiência cardíaca ⁽³⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	8	9,9	8	9,6	
Não	2	100,0	73	90,1	75	90,4	
Doença pulmonar obstrutiva crônica ⁽³⁾							p ⁽¹⁾ = 0,048*
Sim	1	50,0	1	1,2	2	2,4	
Não	1	50,0	80	98,8	81	97,6	
Doença renal crônica ⁽³⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	9	11,1	9	10,8	
Não	2	100,0	72	88,9	74	89,2	
HIV ⁽³⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	1	1,2	1	1,2	
Não	2	100,0	80	98,8	82	98,8	
Neutropenia (neutrófilos \leq 500/mm³)							p ⁽¹⁾ = 0,257
Sim	4	36,4	30	20,7	34	21,8	
Não	7	63,6	115	79,3	122	78,2	
Tempo da neutropenia ⁽⁴⁾							p ⁽¹⁾ = 0,627
Até 7 dias	3	75,0	17	56,7	20	58,8	
Mais de 7 dias	1	25,0	13	43,3	14	41,2	
Uso de protetores gástricos ⁽⁵⁾							p ⁽¹⁾ = 0,393
Ranitidina	7	70,0	117	82,4	124	81,6	
Omeprazol	3	30,0	25	17,6	28	18,4	
Cirurgia gastrintestinal							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	1	9,1	22	15,2	23	14,7	
Não	10	90,9	123	84,8	133	85,3	
Tempo internamento (antes coleta fezes)							p ⁽¹⁾ = 0,168

Até 7 dias	3	27,3	67	46,2	70	44,9
De 8-14 dias	2	18,2	41	28,3	43	27,6
Mais de 14 dias	6	54,5	37	25,5	43	27,6

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*.

(*) Diferença significativa a 5%; (1) Através do teste Exato de Fisher; (2) Através do teste Qui-quadrado de Pearson; (3) Com base nos que tinham comorbidades; (4) Com base nos que tiveram neutropenia; (5) Com base nos que utilizaram protetor gástrico.

Tabela 5 – Avaliação dos sinais e sintomas de diarreia segundo os resultados de CDI

Variável	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		N	%	
	n	%	N	%	N	%	
Sinais e sintomas durante a diarreia							p ⁽¹⁾ = 0,731
Sim	4	36,4	41	28,3	45	28,8	
Não	7	63,6	104	71,7	111	71,2	
Total	11	100,0	145	100,0	156	100,0	
Sintomas:⁽²⁾							
Febre							p ⁽¹⁾ = 0,578
Sim	2	50,0	12	29,3	14	31,1	
Não	2	50,0	29	70,7	31	68,9	
Dor abdominal							p ⁽¹⁾ = 0,326
Sim	3	75,0	18	43,9	21	46,7	
Não	1	25,0	23	56,1	24	53,3	
Hipotensão							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	6	14,6	6	13,3	
Não	4	100,0	35	85,4	39	86,7	
Uso de drogas vasoativas							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	6	14,6	6	13,3	
Não	4	100,0	35	85,4	39	86,7	
Oligúria/Anúria							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	1	25,0	15	36,6	16	35,6	
Não	3	75,0	26	63,4	29	64,4	
Total	4	100,0	41	100,0	45	100,0	

(1) Através do teste Exato de Fisher

(2) Resultados com base nos que tinham apresentado sinais e sintomas o episódio da diarreia.

Tabela 6 – Potenciais fatores de risco (antibioticoterapia) segundo os resultados de CDI

Potenciais fatores de risco	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		n	%	
	n	%	N	%	n	%	
Antibioticoterapia prévia (4 semanas antes coleta fezes)							p ⁽¹⁾ = 0,174
Sim	10	90,9	98	67,6	108	69,2	
Não	1	9,1	47	32,4	48	30,8	
Número de antibióticos prévios utilizados							p ⁽¹⁾ = 0,110
Nenhum	1	9,1	47	32,4	48	30,8	
Um	6	54,5	39	26,9	45	28,8	
Dois ou mais	4	35,4	59	40,7	63	40,4	
Antibióticos utilizados previamente ⁽²⁾							
Ceftriaxona							p ⁽¹⁾ = 0,556
Sim	2	20,0	15	15,3	17	15,7	
Não	8	80,0	83	84,7	91	84,3	
Cefepima ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	2	20,0	26	26,5	28	25,9	
Não	8	80,0	72	73,5	80	74,1	
Piperacilina + Tazobactam ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,046*
Sim	1	10,0	43	43,9	44	40,7	
Não	9	90,0	55	56,1	64	59,3	
Meropenem ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,721
Sim	2	20,0	29	29,6	31	28,7	
Não	8	80,0	69	70,4	77	71,3	
Amicacina ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	9	9,2	9	8,3	
Não	10	100,0	89	90,8	99	91,7	
Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina, Levofloxacina) ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,166
Sim	3	30,0	13	13,3	16	14,8	
Não	7	70,0	85	86,7	92	85,2	
Vancomicina ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,453
Sim	1	10,0	23	23,5	24	22,2	
Não	9	90,0	77	76,5	84	77,8	
Clindamicina ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	1	10,0	9	9,2	10	9,3	
Não	9	90,0	89	90,8	98	90,7	
Metronidazol ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	9	9,2	9	8,3	
Não	10	100,0	89	90,8	99	91,7	
Polimixina B ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,594
Sim	-	-	10	10,2	10	9,3	
Não	10	100,0	88	89,8	98	90,7	
Fluconazol ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	5	5,1	5	4,6	
Não	10	100,0	93	94,9	103	95,4	
Anfotericina B ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,326
Sim	1	10,0	3	3,1	4	3,7	
Não	9	90,0	95	96,9	104	96,3	

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*

(*) Diferença significativa a 5%

(1) Através do teste Exato de Fisher

(2) Resultados com base nos que tinham feito antibioticoterapia prévia.

Tabela 7 - Faixas de tempo de uso dos antibióticos previamente utilizados

Antibióticos utilizados previamente	Faixa de tempo de uso						Total
	1 a 3		4 a 7		8 ou mais		
	n	%	n	%	n	%	
Ceftriaxona	6	35,3	6	35,3	5	29,4	17
Cefepima	8	28,6	15	53,6	5	17,9	28
Azitromicina	1	50,0	1	50,0	-	-	2
Amoxicilina + Clavulanato	1	100,0	-	-	-	-	1
Ampicilina + Sulbactam	1	100,0	1	100,0	-	-	2
Piperacilina + Tazobactam	9	20,5	21	47,7	14	31,8	44
Meropenem	7	22,6	11	35,5	13	41,9	31
Amicacina	3	33,3	4	44,4	2	22,2	9
Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina, levofloxacina)	-	-	10	62,5	6	37,5	16
Oxacilina	-	-	1	100,0	-	-	1
Vancomicina	10	41,7	6	25,0	8	33,3	24
Teicoplanina	1	14,3	3	42,9	3	42,9	7
Daptomicina	-	-	1	100,0	1	10,00	2
Clindamicina	1	10,0	3	30,0	6	60,0	10
Metronidazol	2	22,2	4	44,4	3	33,3	9
Polimixina B	-	-	2	20,0	8	80,0	10
Fluconazol	4	80,0	1	20,0	-	-	5
Anfotericina	1	20,0	1	20,0	3	60,0	4
Equinocandinas (Caspofungina, micafungina e Anidulafungina)	2	25,0	2	25,0	4	50,0	8
Total dos antibióticos	57	24,8	93	40,4	81	35,2	230

Tabela 8 – Potenciais fatores de risco (tipo de câncer) segundo os resultados de CDI

Tipo de câncer	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI positivo		CDI negativo		n	%	
	n	%	N	%	n	%	
Colo útero	2	18,2	15	10,3	17	10,9	p ⁽¹⁾ =0,385
Bexiga	1	9,1	-	-	1	0,6	
Cabeça e pescoço	-	-	1	0,7	1	0,6	
Colorretal	-	-	15	10,3	15	9,6	
Couro cabeludo	-	-	1	0,7	1	0,6	
Endométrio	-	-	3	2,1	3	1,9	
Esôfago	-	-	6	4,1	6	3,8	
Gástrico	1	9,1	8	5,5	9	5,8	
Intestino delgado	-	-	1	0,7	1	0,6	
Laringe	-	-	3	2,1	3	1,9	
Leiomiossarcoma uterino	1	9,1	-	-	1	0,6	
Leucemia linfóide aguda (LLA)	2	18,2	7	4,8	9	5,8	
Leucemia mieloide aguda (LMA)	1	9,1	14	9,7	15	9,6	
Leucemia mieloide crônica (LMC)	-	-	1	0,7	1	0,6	
Linfoma não Hodgkin	-	-	22	15,2	22	14,1	
Linfoma de Hodgkin	-	-	3	2,1	3	1,9	
Mama	3	27,3	21	14,5	24	15,4	
Melanoma maligno	-	-	1	0,7	1	0,6	
Mucosa jugal	-	-	1	0,7	1	0,6	
Neoplasia blástica de células dendríticas							
plasmocitóide	-	-	1	0,7	1	0,6	
Orofaringe	-	-	1	0,7	1	0,6	
Osteossarcoma	-	-	1	0,7	1	0,6	
Ovário	-	-	1	0,7	1	0,6	
Palato mole	-	-	1	0,7	1	0,6	
Pâncreas	-	-	1	0,7	1	0,6	
Pele	-	-	1	0,7	1	0,6	
Pênis	-	-	1	0,7	1	0,6	
Plasmocitoma cervical	-	-	1	0,7	1	0,6	
Próstata	-	-	5	3,4	5	3,2	
Pulmão	-	-	4	2,8	4	2,6	
Sarcoma alto grau em tórax	-	-	1	0,7	1	0,6	
Sarcoma partes moles	-	-	2	1,4	2	1,3	
Tireoide	-	-	1	0,7	1	0,6	
Total	11	100,0	145	100,0	156	100,0	

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*

(1) Através do teste Exato de Fisher.

Tabela 9 – Potenciais fatores de risco (quimioterapia) segundo os resultados de CDI

Potenciais fatores de risco	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI positivo		CDI negativo				
	n	%	N	%	n	%	
Quimioterapia (30 dias anteriores do episódio diarreico)							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	7	63,6	90	62,1	97	62,2	
Não	4	36,4	55	37,9	59	37,8	
Classe dos quimioterápicos ⁽²⁾							
Agentes antimetabólitos ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,705
Sim	3	42,9	48	53,3	51	52,6	
Não	4	57,1	42	46,7	46	47,4	
Agentes alquilantes ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,423
Sim	3	42,9	26	28,9	29	29,9	
Não	4	57,1	64	71,1	68	70,1	
Agentes platinantes ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,420
Sim	1	14,3	31	34,4	32	33,0	
Não	6	85,7	59	65,6	65	67,0	
Alcalóides da vinca ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,151
Sim	3	42,9	17	18,9	20	20,6	
Não	4	57,1	73	81,1	77	79,4	
Taxanos ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,643
Sim	2	28,6	19	21,1	21	21,6	
Não	5	71,4	71	78,9	76	78,4	
Inibidores da topoisomerase (Etoposídeo, Irinotecano) ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	11	12,2	11	11,3	
Não	7	100,0	79	87,8	86	88,7	
Antraciclina (Doxorrubicina, Daunorrubicina, Idarrubicina) ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 0,451
Sim	4	57,1	37	41,1	41	42,3	
Não	3	42,9	53	58,9	56	57,7	
Rituximabe ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	8	8,9	8	8,2	
Não	7	100,0	82	91,1	89	91,8	
Imatinib ⁽²⁾							p ⁽¹⁾ = 1,000
Sim	-	-	2	2,2	2	2,1	
Não	7	100,0	88	97,8	95	97,9	

Abreviações: CDI, Infecção por *Clostridioides difficile*

(1) Através do teste Exato de Fisher

(2) Resultados com base nos que tinham realizado quimioterapia.

Tabela 10 – Resultados dos exames laboratoriais segundo os resultados de CDI

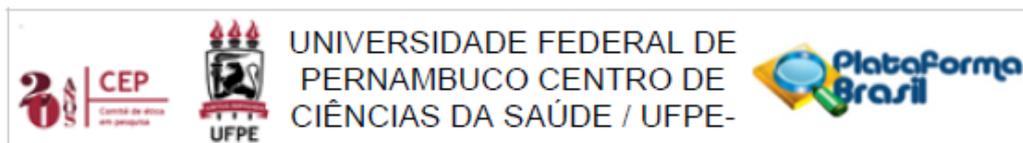
Variável	Grupo				Grupo total		Valor p
	CDI Positivo		CDI negativo		n	%	
	n	%	N	%	n	%	
Resultados dos exames laboratoriais							$p^{(1)} = 1,000$
Hemoglobina (HB)							
< 12 mg/Dl	10	90,9	130	90,3	140	90,3	
12-17 mg/Dl	1	9,1	14	9,7	15	9,7	
Total	11	100,0	144	100,0	155	100,0	
Leucócitos							$p^{(1)} = 0,127$
Menos de 4.000/mm ³	4	36,4	43	29,9	47	30,3	
4.000 - 11.999/mm ³	2	18,2	68	47,2	70	45,2	
12.000 - 15.000/mm ³	1	9,1	6	4,2	7	4,5	
Mais de 15.000/mm ³	4	36,4	27	18,8	31	20,0	
Total	11	100,0	144	100,0	155	100,0	
Plaquetas							$p^{(1)} < 0,001^*$
Menos de 150.000/mm ³	4	36,4	58	40,6	62	40,3	
De 150.000 - 450.000/mm ³	2	18,2	79	55,2	81	52,6	
Mais de 450.000/mm ³	5	45,5	6	4,2	11	7,1	
Total	11	100,0	143	100,0	154	100,0	
Albumina							$p^{(1)} = 0,372$
Menos de 3,5 g/Dl	7	70,0	68	84,0	75	82,4	
De 3,5 - 5,5 g/Dl	3	30,0	13	16,0	16	17,6	
Total	10	100,0	81	100,0	91	100,0	
INR							$p^{(1)} = 1,000$
Menos de 1,4 g/dL	10	90,9	109	92,4	119	92,2	
Maior ou igual a 1,4 g/Dl	1	9,1	9	7,6	10	7,8	
Total	11	100,0	118	100,0	129	100,0	
Ureia							$p^{(1)} = 0,732$
Menos de 19 mg/dL	4	36,4	56	38,9	60	38,7	
De 19 a 49 mg/dL	5	45,5	47	32,6	52	33,5	
Mais 49 mg/dL	2	18,2	41	28,5	43	27,7	
Total	11	100,0	144	100,0	155	100,0	
Creatinina							$p^{(1)} = 0,497$
Baixa	2	18,2	39	26,9	41	28,3	
Normal	8	72,7	74	51,0	82	52,6	
Elevada	1	9,1	32	22,1	33	21,2	
Total	11	100,0	144	100,0	156	100,0	
TGO							$p^{(1)} = 0,710$
Menos que 34 UI/L	6	75,0	67	63,8	73	64,6	
34 ou mais UI/L	2	25,0	38	36,2	40	35,4	
Total	8	100,0	144	100,0	156	100,0	
TGP							$p^{(1)} = 1,000$
Normal	6	75,0	81	77,1	87	77,0	
Elevado	2	25,0	24	22,9	26	23,0	
Total	8	100,0	144	100,0	156	100,0	

(*) Diferença significativa a 5%

(1) Através do teste Exato de Fisher.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP			
DADOS DA EMENDA			
Título da Pesquisa: DIARREIA NOSOCOMIAL POR <i>Clostridium difficile</i> : PREVALÊNCIA, RESPOSTA CLÍNICA, DESFECHO E FATORES DE RISCO EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO PERÍODO DE 2017 A 2019 EM RECIFE-PE			
Pesquisador: CATARINA TENÓRIO DE LIMA			
Área Temática:			
Versão: 5			
CAAE: 63059516.7.0000.5208			
Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE			
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio			
DADOS DO PARECER			
Número do Parecer: 2.247.043			
Apresentação do Projeto:			
Trata-se de emenda para alterar o local da pesquisa bem como a caracterização do público alvo, no intuito de torna-la mais factível. O projeto de pesquisa será desenvolvido pela pós-graduanda Catarina Tenório de Lima, para atender aos requisitos do Programa de Pós-graduação (Doutorado) em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, sob a orientação da Prof ^a . Dr ^a . Vera Magalhães da Silveira e co-orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Sobrinho Weber.			
Objetivo da Pesquisa:			
Objetivo Geral			
Determinar a prevalência, resposta clínica, desfecho e fatores de risco (idade maior que 65 anos, antibioticoterapia prévia, uso de protetores gástricos, doença subjacente grave, cirurgia gastrointestinal e tempo de internamento) dos pacientes com diarreia nosocomial por <i>C. difficile</i> em Hospital de Referência em Oncologia em Recife-PE.			
Objetivos Específicos			
- Determinar a prevalência da diarreia nosocomial associada ao <i>C. difficile</i> , nos pacientes			
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800 UF: PE Município: RECIFE Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br			
Página 01 de 05			



Continuação do Parecer: 2.247.043

internados em Hospital de Referência em Oncologia;

- Comparar as características clínicas (febre, dor abdominal, hipotensão, choque e insuficiência renal) e sociodemográficas dos pacientes com diarreia nosocomial por *C. difficile* e seus controles;
- Comparar a resposta clínica (resolução dos sintomas, resposta parcial, sem resposta ou piora) e o desfecho (alta ou óbito) dos pacientes com diarreia nosocomial por *C. difficile* e seus controles;
- Comparar os fatores de risco já definidos na literatura da diarreia nosocomial por *C. difficile* e seus controles.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

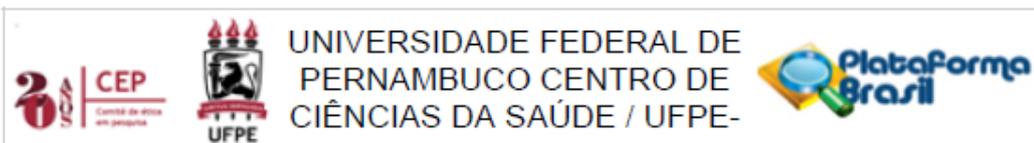
Os riscos descritos no protocolo serão mínimos, uma vez que o mesmo pretende realizar o diagnóstico da diarreia nosocomial associada ao *C. difficile*, cujas as amostras para realização do método molecular PCR, serão obtidas através da coleta de fezes. Este material será coletado em recipiente estéril e devem ser encaminhadas ao Laboratório em até 2 horas após a coleta. Em caso de demora, amostras poderão ser refrigeradas por um período de 24 horas ou congeladas por até 2 dias.

O risco de constrangimento é relativo a todo estudo feito com seres humanos, mas, para minimizar esta possibilidade, será realizado um adequado esclarecimento aos pacientes e/ou acompanhantes, feito em local reservado, explicando de que trata a pesquisa e informando sempre que a participação é voluntária, que o mesmo poderá retirar seu consentimento a qualquer momento que desejar, sem prejuízo algum ao seu tratamento, bem como, que as informações serão confidenciais e que a identidade dos participantes nunca será divulgada, ficando estes dados sob a responsabilidade e guarda da pesquisadora responsável.

Em caso de interrupção do projeto as considerações éticas já relatadas serão mantidas.

Quanto aos benefícios, evidencia-se que na prática diária, é comum a administração empírica do

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.247.043

tratamento para a diarreia nosocomial por *C. difficile* nos doentes, pela dificuldade diagnóstica. O estudo promoveria um benefício adicional, visto que o diagnóstico precoce e eficaz da diarreia nosocomial por *C. difficile* nos pacientes pode auxiliar no tratamento, reduzindo os riscos de manutenção da cadeia de transmissibilidade da doença. Os resultados do exame PCR serão fornecidos ao médico assistente dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo relevante uma vez que trará novas informações a respeito da prevalência local e do perfil dos paciente que apresentam diarreia associada ao *Clostridium difficile*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- FR: OK;
- Currículos: OK;
- Termo de Confidencialidade: OK;
- O orçamento será em torno de R\$ 19.800,00 e será de responsabilidade da pesquisadora principal;
- Cartas de Anuência: OK;
- Projeto Detalhado: OK;
- No TCLE: OK.

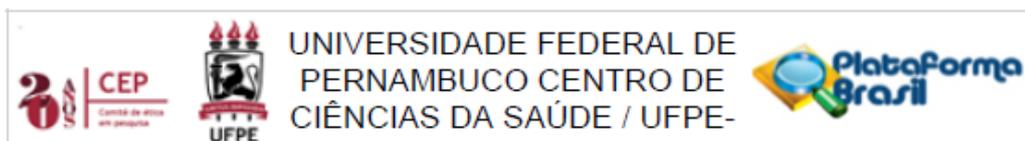
Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2128-8588 E-mail: cepecs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.247.043

Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

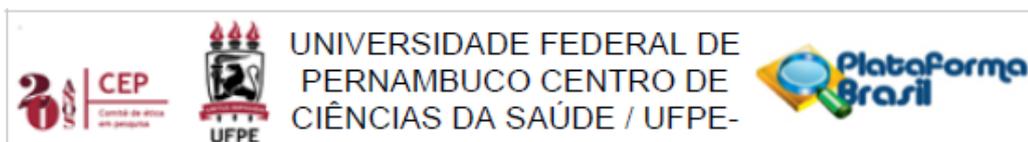
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_978376_E2.pdf	14/08/2017 14:46:04		Aceito
Outros	Carta_anuencia_oncohemato_HC.pdf	14/08/2017 14:43:09	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	Carta_anuencia_diretorHC.pdf	14/08/2017 14:42:35	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	14/08/2017 14:34:12	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	14/08/2017 14:32:08	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	JUSTIFICATIVA_DE_EMENDA.docx	14/08/2017 14:30:51	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_UTI_clinica_HC.pdf	14/08/2017 14:29:47	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	Carta_anuencia_oncologia_clinica_HC.pdf	14/08/2017 14:29:03	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_alterado_emenda.doc	14/08/2017 14:18:30	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	14/08/2017 14:16:48	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	CV_2327087430076889.pdf	10/05/2017 07:49:29	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	carta_anuencia_Laboratorio.jpg	14/02/2017 17:29:29	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	CV_0081744279222187.pdf	15/12/2016 11:32:42	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	cv_1262842713515748.pdf	15/12/2016 11:30:31	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	Historico_Catarina.pdf	15/12/2016 11:09:45	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE_C ATARINA.pdf	15/12/2016 11:01:57	CATARINA TENÓRIO DE LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.247.043

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 30 de Agosto de 2017

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B - NORMAS DAS REVISTAS

1. Artigo 1: RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/information/authors>

2. Artigo 2: JOURNAL OF INFECTION AND PUBLIC HEALTH

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-infection-and-public-health/1876-0341/guide-for-authors>