

Sandra Cristina da Silva Ferreira

*Colite pseudomembranosa associada aos
antibacterianos*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Sandra Cristina da Silva Ferreira

*Colite pseudomembranosa associada aos
antibacterianos*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Sandra Cristina da Silva Ferreira

Colite pseudomembranosa associada aos antibacterianos

(Sandra Cristina da Silva Ferreira)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando

Pessoa como parte dos requisitos para obtenção

do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

Os antibióticos antibacterianos têm um tropismo para as células procariotas, exercendo a sua ação bactericida ou bacteriostática sobre estas. No entanto, apesar da sua especificidade, os antibióticos podem ter efeitos tóxicos nas células humanas, dando origem às reações adversas. A colite pseudomembranosa foi descrita pela primeira vez em 1893 por Finney, sendo uma doença infecciosa que surge geralmente na sequência de antibioterapia prévia, tendo como principal agente etiológico o *Clostridium difficile*. Esta trata-se de uma entidade com taxa de mortalidade elevada, rondando os 20 a 30% e onde as recorrências são comuns. A infeção por *C.difficile* é das mais incidentes adquiridas em indivíduos hospitalizados.

Os antibióticos provocam a alteração da flora intestinal normal permitindo a colonização pelo *C.difficile*, que em condições apropriadas leva à ocorrência de sintomatologia. Os antibióticos mais implicados são os de largo espetro, tendo-se como exemplo as penicilinas associadas a beta lactamases e a clindamicina, possuindo estes um largo impacto na microbiota intestinal.

Existem vários métodos de diagnóstico laboratorial para testar amostras fecais à procura dos bacilos e/ou suas toxinas para confirmação deste tipo de infeção, bem como métodos de visualização direta e estudos de imagem abdominal (diagnóstico clínico). No que respeita ao tratamento, a vancomicina e o metronidazol são os fármacos mais utilizados na infeção por *C.difficile*, havendo variações conforme a gravidade da doença.

Embora a maioria das infeções respondam à terapêutica disponível, a infeção pode aumentar a morbilidade, prolongar a hospitalização, e mesmo colocar a vida do doente em risco, pelo que o uso racional dos antibacterianos é de extrema importância, bem como as restantes medidas de prevenção.

Palavras-chave: colite pseudomembranosa, antibiótico antibacteriano, *Clostridium difficile*, métodos de diagnóstico, tratamento.

Abstract

Antibacterial antibiotics have a tropism for prokaryotic cells, exerting its bactericidal or bacteriostatic on these. However, despite of their specificity, antibiotics can have toxic effects on human cells, giving rise to adverse reactions. Pseudomembranous colitis was described in 1893 by Finney, being an infectious disease that usually appears as a result of antibiotic treatment, the main etiological agent *Clostridium difficile*. This is an illness with a high mortality rate, around 20-30% and where recurrences are common. Infection with *C. difficile* is the most incident acquired in hospitalized individuals.

Antibiotics cause alteration of the normal intestinal flora allowing colonization by *C. difficile*, which under appropriate conditions leads to the occurrence of symptoms. The antibiotics most commonly involved are broad spectrum, for example penicillins associated with beta lactamases and clindamycin, possessing such a large impact on the intestinal microbiota.

There are several methods of laboratory diagnosis to test fecal samples in search of bacilli and / or their toxins to confirm this type of infection, as well as methods of direct visualization and abdominal imaging studies (clinical diagnosis). With regard to treatment, vancomycin and metronidazole are the most commonly drugs used for the *C. difficile* infection, with variations depending on the severity of the disease.

Although the majority of infections respond to therapy available, the infection can increase morbidity, prolonged hospitalization, and even life-threatening patient, whereby the rational use of antibacterial agents is extremely important as well as preventive measures remaining.

Keywords: pseudomembranous colitis, antibacterial antibiotics, *Clostridium difficile*, diagnostic methods, treatment.

Agradecimentos

Agradeço ao professor João Carlos Sousa por toda a sua disponibilidade, empenho, incentivo, apoio e partilha de ideias ao longo destes meses de trabalho.

Aos meus amigos e família, pelo apoio e motivação dados ao longo do curso e em especial destes últimos meses.

Índice geral

| | |
|--|------|
| Resumo..... | i |
| Palavras-chave..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Keywords..... | ii |
| Índice de figuras..... | vi |
| Índice de tabelas..... | vii |
| Lista de abreviaturas..... | viii |
| I – Introdução..... | 1 |
| II- Importância da microbiota intestinal na infecção por <i>C.difficile</i> | 6 |
| 2.1. Composição da microbiota intestinal humana..... | 7 |
| III- Clostridium difficile..... | 10 |
| 3.1. Epidemiologia..... | 11 |
| 3.2. Patogênese do <i>C.difficile</i> | 14 |
| 3.2.1. Clostridium difficile O27..... | 18 |
| 3.2.2. Fatores de virulência não toxigênicos do <i>Clostridium difficile</i> | 21 |
| IV- Colite pseudomembranosa..... | 24 |
| 4.1. Fatores de risco..... | 25 |
| 4.2. Principais antibacterianos associados à infecção por <i>Clostridium difficile</i> | 27 |
| 4.2.1. Resistência do <i>C.difficile</i> aos antibacterianos..... | 29 |
| 4.3. Métodos de diagnóstico..... | 32 |
| 4.3.1. Visualização direta (diagnóstico clínico)..... | 33 |
| 4.3.2. Cultura..... | 34 |
| 4.3.3. Ensaio de citotoxicidade..... | 35 |
| 4.3.4. Detecção de toxinas por ensaio imunoenzimático (EIA)..... | 35 |
| 4.3.5. Teste de aglutinação do látex..... | 36 |
| 4.3.6. Ensaio de ligação imunológica de partículas..... | 36 |
| 4.3.7. PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)..... | 36 |
| 4.3.8. Ensaio imunocromatográfico..... | 37 |
| 4.3.9. Detecção da glutamato desidrogenase (GDH)..... | 37 |
| 4.3.10. LAMP (<i>Loop mediated isothermal amplification</i>)..... | 37 |
| 4.4. Tratamento..... | 39 |
| 4.4.1. Metronidazol e Vancomicina..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 4.4.2. Teicoplanina | 41 |
| 4.4.4. Rifaximina..... | 41 |
| 4.4.5. Nitazoxanida..... | 41 |
| 4.4.6. Fidaxomicina | 42 |
| 4.4.7. Resinas de permuta aniônica | 42 |
| 4.4.8. Probióticos | 42 |
| 4.4.9. Transplante fecal | 43 |
| 4.4.10. Tratamento cirúrgico | 43 |
| 4.4.11. Imunoterapia..... | 44 |
| 4.3. Medidas de prevenção | 48 |
| V- Considerações finais | 51 |
| VI- Referências bibliográficas | 53 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Colite pseudomembranosa: aspeto endoscópico | 4 |
| Figura 2: Infecção por <i>C.difficile</i> .Esporos, células vegetativas, fatores bacterianos e fatores do hospedeiro que influenciam a doença..... | 15 |
| Figura 3: Ações das toxinas A e B do <i>Clostridium difficile</i> no epitélio intestinal | 18 |
| Figura 4: Patogénese do <i>C.difficile</i> | 20 |
| Figura 5: Micrografia eletrónica de varredura de um <i>C.difficile</i> ribótipo 001 | 22 |
| Figura 6: Características da colite por <i>C.difficile</i> | 33 |
| Figura 7: Diagnóstico e tratamento da infecção por <i>C.difficile</i> | 46 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela I: Principais grupos de antibióticos usados na terapêutica | 3 |
| Tabela II: Fatores de risco da infecção por <i>C. difficile</i> | 26 |
| Tabela III: Principais antibacterianos associados à infecção por <i>Clostridium difficile</i> ... | 28 |
| Tabela IV: Métodos laboratoriais de diagnóstico de infecção por <i>Clostridium difficile</i> . | 38 |
| Tabela V: Tratamento da infecção por <i>Clostridium difficile</i> | 47 |

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

B.subtilis: *Bacillus subtilis*

CCFA: Cicloserina-Cefoxitina-Frutose Ágar

C.difficile: *Clostridium difficile*

CDC: Centros de Controlo e Prevenção de Doenças

CDI: infeção por *Clostridium difficile*

CDT: *Clostridium difficile* transferase

CMI: Concentração mínima inibitória

CPM. Colite Pseudomembranosa

DACD: Doença Associada ao *Clostridium difficile*

EIA: enzimaímunoensaio

EUA: Estados Unidos da América

GDH: Glutamato Desidrogenase

GTPases: Guanosina trifosfatases

IL: Interleucinas Inflamatórias

IV: Intravenoso

LAMP: *Loop Mediated Isothermal Amplification*

MLS_B: Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B

NG: Nasogástrica

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

TNF: Fator de Necrose Tumoral

I – Introdução

Desde há longos anos que a relação entre os microrganismos e determinadas doenças é reconhecida.

Em 1928, um acontecimento revolucionou os esquemas no tratamento das doenças infecciosas. Alexander Fleming descobre a penicilina. Estava assim descoberto o 1º antibiótico. Seguiram-se outras moléculas de antibióticos como a gramicidina e a estreptomicina em 1944, a bacitracina em 1945, o cloranfenicol e a polimixina em 1947, as cefalosporinas em 1948, a eritromicina em 1952, a tetraciclina em 1953, a vancomicina em 1956, a rifampicina em 1957, o ácido fusídico em 1962 e a gentamicina em 1963 (Sousa, 2006).

Com a evolução técnica, dos processos de fermentação e da química de síntese, criam-se e desenvolvem-se novas moléculas até à atualidade.

As células do Homem, fungos, algas e dos protozoários têm uma estrutura celular eucariota e somente as bactérias são procariotas. Assim, os antibióticos antibacterianos têm um tropismo para as células procariotas, exercendo a sua ação bactericida ou bacteriostática sobre estas. Os antibacterianos devem então explorar as diferenças bioquímicas entre as células procariotas e as células humanas (eucariotas), sendo estas células muito diferentes entre si (Sousa, 2006).

As células eucariotas animais são mais complexas e maiores, têm membrana celular constituída por fosfolípidos, proteínas e esteróis (colesterol), mas não possuem parede celular (Sousa *et al*, 1998). O núcleo, que contém o património genético, é delimitado pelo invólucro nuclear que é constituído por duas membranas, contendo estas poros que permitem o fluxo entre o nucleoplasma e o citoplasma celular (Sousa *et al*, 1998). No seu citoplasma há vários organelos essenciais para o bom funcionamento celular (mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomas) (Sousa, 2006). Possuem ainda um citoesqueleto, sendo este redes filamentosas que apoiam a célula estruturalmente e desempenham funções no movimento de vários organelos e da própria célula (Sousa *et al*, 1998). As células eucariotas têm ribossomas do tipo 90S (50S+70S), exceto os ribossomas mitocondriais, que são do tipo 70S (30S+50S) (Sousa *et al*, 1998).

As células procariotas, por sua vez, têm uma organização celular muito simples. Têm uma parede celular rígida responsável pela morfologia e pelo duplo comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram (Sousa *et al*, 1998). Contém um nucleóide com um único cromossoma, sem membrana nuclear e em contato com o citoplasma, possuindo também ADN extracromossômico em plasmídeos (Sousa, 2006). Quanto aos ribossomas, são do tipo 70S, sendo constituídos por duas subunidades: 30S e 50S. Finalmente, o citoplasma dos procariotas não contém organelos (Sousa *et al*, 1998).

O termo antibiótico foi criado por Waksman em 1942, para denominar todos os compostos naturais produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou que têm efeito microbicida. Estes não devem ter efeitos deletérios significativos sobre o hospedeiro infetado, para que possam ser usados na terapêutica (Sousa, 2006).

Cada antibacteriano tem um alvo específico na célula bacteriana de modo a exercer os seus efeitos bactericidas ou bacteriostáticos. Assim, tendo em conta o seu mecanismo de ação, pode-se classificar os antibióticos em: antibióticos antiparietais (inibidores da síntese do peptidoglicano), antibióticos antimembranares (afetam a permeabilidade da membrana celular), antibióticos inibidores da síntese proteica, antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos, antibióticos antimetabolitos, nitrofuranos, e antituberculosos e antilepra (tabela I) (Sousa, 2006).

Tabela I: Principais grupos de antibióticos usados na terapêutica (Sousa, 2006)

| | |
|--|--|
| Antibióticos antiparietais | Fosfomicina, D-cicloserina, bacitracina, vancomicina, teicoplanina, B-lactâmicos |
| Antibióticos antimembranares | Polimixinas, tirotricina, gramicidina, daptomicina |
| Antibióticos inibidores da síntese proteica | Aminoglicosídeos-aminociclitolis, espectinomicina, tetraciclina, glicilciclina, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, mupirocina, ácido fusídico, oxazolidonas, cetolidos, evernomicina |
| Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos | Rifampicina, metronidazol, quinolonas |
| Antibióticos antimetabolitos | Sulfonamidas, trimetoprim, PAS |
| Nitrofuranos | Nitrofurantoína |
| Antituberculosos e antilepra (exceto rifampicina, estreptomicina, D-cicloserina, PAS, sulfonamidas e quinolonas) | Isoniazida, pirazinamida, etambutol, etionamida, tiacetazona, capreomicina, viomicina, dapsone, acedapsone, clofazimina |

Assim, os antibacterianos apenas se destinam a impedir o crescimento ou a provocar a morte da bactéria infetante. Qualquer atividade biológica do organismo humano afetada será considerada como efeito adverso, sendo definido como “qualquer reação nociva e involuntária a um medicamento que ocorra com doses geralmente utilizadas no ser humano para profilaxia, diagnóstico ou tratamento de doenças ou recuperação, correção ou modificação de funções fisiológicas” (Decreto-Lei n.º 176/2006).

As reações adversas aos antibacterianos, podem envolver um ou mais sistemas de órgãos, podendo surgir efeitos: gastrintestinais, de hipersensibilidade, hematológicos,

hepáticos, neurológicos, pulmonares, metabólicos, cardíacos... (Cunha, 2001; Sousa, 2006).

A colite pseudomembranosa (CPM) foi descrita pela primeira vez em 1893 por Finney, sendo uma doença infecciosa que surge geralmente na sequência de antibioterapia prévia, tendo como agente etiológico o *C. difficile* (Ferreira *et al*, 1999). A incidência de CPM está a aumentar (Archibald *et al*, 2004; Morris *et al*, 2001), o que parece dever-se ao uso crescente de antibióticos, ao aumento da faixa etária dos doentes hospitalizados e hospitalizações mais prolongadas (Jobe, 1995).

A CPM caracteriza-se pela presença, na mucosa do cólon com severa inflamação, de placas amarelas/esbranquiçadas ou pseudomembranas formadas por exsudado inflamatório, constituído por fibrina, muco, neutrófilos e células epiteliais necrosadas (figura 1) (Rocha *et al*, 1999). No estado de doença ativa, o epitélio do cólon é o maior alvo das toxinas do *Clostridium difficile*. Para causar colite pseudomembranosa, ambas as toxinas são normalmente necessárias (Silva e Salvino, 2003).

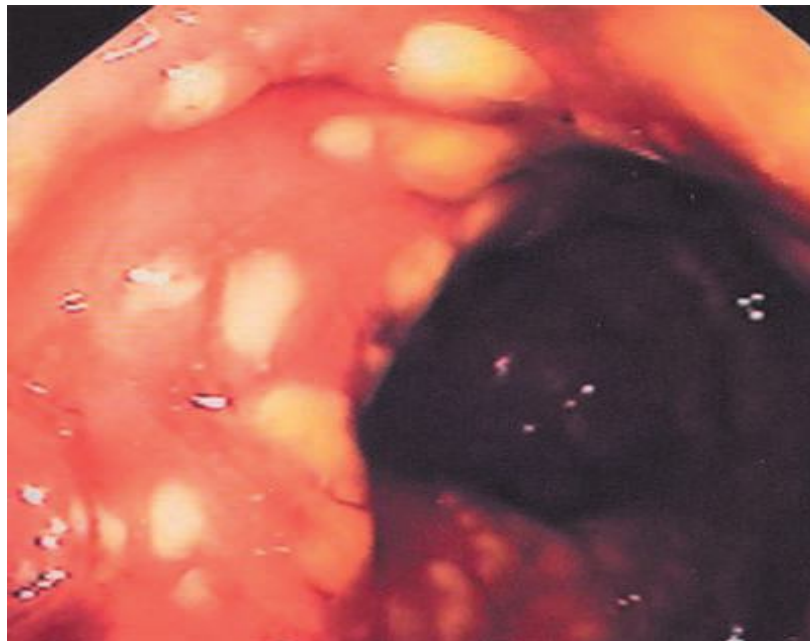


Figura 1: Colite pseudomembranosa: aspeto endoscópico (Beaugerie *et al*, 2003)

Esta revisão bibliográfica realizada no âmbito da disciplina de projeto, do 5º ano do Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, tem como objetivo aprofundar conhecimentos acerca da colite pseudomembranosa associada a antibacterianos, vastamente associada a doentes internados a nível hospitalar, sendo abordados o agente causador *Clostridium difficile*, bem como os fatores de risco, os mecanismos de toxicidade e as medidas de prevenção. Assim, procedeu-se à pesquisa bibliográfica em livros e em bases de dados científicas como o Pubmed e o Science Direct, selecionando-se os mais relevantes.

II- Importância da microbiota intestinal na infecção por *C.difficile*

Estima-se que o intestino humano adulto contém cerca de 10^{14} células bacterianas e mais de 1000 espécies diferentes de bactérias (Eckburg *et al*, 2005). No entanto, estas proporções podem variar muito entre indivíduos, sendo que as principais mudanças na microbiota intestinal são baseadas na idade do hospedeiro, na dieta e no seu estado de saúde (Hooper *et al*, 2002). Sabe-se que as células bacterianas no lúmen intestinal têm uma comunicação contínua com as células hospedeiras formando-se associações interativas e duradouras com o hospedeiro, sendo estas cruciais para a manutenção da imunidade da mucosa, para a integridade da barreira epitelial e da motilidade, bem como para a absorção de nutrientes (Backhed *et al*, 2005; Ley *et al*, 2008; Mazmanian *et al*, 2005; Zoetendal *et al*, 2008).

A microflora intestinal funciona como um importante mecanismo de defesa da mucosa, havendo evidências de que alterações nesta, tornam o intestino mais vulnerável ao desenvolvimento de patogenicidade (Darfeuille-Michaud *et al*, 2004; Manichanh *et al*, 2006; Swidsinski *et al*, 2002). Assim, estas alterações, designadas de disbiose, podem ser prejudiciais para o hospedeiro, conduzindo à inflamação e danos nos tecidos da mucosa que predis põem para condições patológicas tais como a infecção por *C.difficile*, ou doença inflamatória do intestino (Lepage *et al*, 2008; Tamboli *et al*, 2004).

O *C.difficile* é um bacilo Gram-positivo, formador de esporos, cujas toxinas causam doença gastrointestinal com um largo espectro de gravidade, que vai desde diarreia ligeira a colite pseudomembranosa, mégacolon tóxico, perfuração colónica, sépticemia e mesmo morte (Dobson *et al*, 2003; Mylonakis *et al*, 2001). É considerado como um membro da microflora intestinal normal, contudo, o seu crescimento é suprimido pelos organismos anaeróbios mais dominantes. Assim, a taxa de colonização do intestino humano por *C.difficile* é diferente consoante a idade, sendo que é mais alta na infância e diminui com a idade (Tullus *et al*, 1989).

A suscetibilidade à infecção por *C.difficile* e recorrências, resulta em parte, da incapacidade da microbiota intestinal para resistir à colonização. A colonização das células intestinais por *C.difficile* é um passo crítico no processo patogénico que depende de fatores de colonização deste bacilo e da resistência da microbiota intestinal à colonização (efeito de barreira) (Pechine *et al*, 2007). A perda do efeito de barreira da

microbiota comensal e a perda de microrganismos disponíveis anteriormente, por exemplo por terapias antimicrobianas, permitem ao *C.difficile* colonizar o intestino (Chang *et al*, 2008). A interação direta do *C.difficile* com as células epiteliais intestinais começa uma cascata de processos inflamatórios que contribuem para as doenças intestinais tais como diarreia e colite pseudomembranosa. A microbiota intestinal saudável está envolvida numa interação dinâmica com o hospedeiro e promove a sua saúde e bem-estar (Ley *et al*, 2006).

A microflora intestinal é uma importante linha de resistência à colonização por microrganismos exógenos e, portanto desempenha um papel vital na potencial invasão por patogénos. Este mecanismo de defesa contra as bactérias patogénicas é conhecido como efeito de barreira ou resistência à colonização. A flora intestinal também tem um papel importante na função imunológica e no metabolismo energético do hospedeiro (Cash *et al*, 2006).

2.1. Composição da microbiota intestinal humana

O intestino é um sistema ecológico que é imediatamente colonizado após o nascimento por população microbiana. Estima-se que a microbiota humana contém 10^{14} células bacterianas. A composição da flora intestinal muda com a idade e as mudanças graduais são observadas na infância, com uma redução gradual do número de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos e um aumento nas espécies anaeróbias obrigatórias (Hopkins *et al*, 2005). Estudos mostraram que a flora intestinal normal contém várias das principais divisões de bactérias, ou seja, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Spirocheates* (Eckburg *et al*, 2005; Rajilic-Stojanovic *et al*, 2007; Wang *et al*, 2005). Os mesmos estudos descrevem uma grande variedade de espécies bacterianas e identificam os grupos de bactérias dominantes como sendo *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.

A composição de espécies microbianas do intestino varia muito entre os indivíduos. Cada indivíduo tem uma “coleção” única de espécies de bactérias. Além disso, deve notar-se que os fatores genéticos desempenham um papel importante no desenvolvimento da flora intestinal humana embora o meio ambiente também conduza a aquisição de espécies. Sabe-se que a microflora intestinal do humano adulto é dominada pelo filo *Firmicutes*. O *Clostridium* é um género de bactérias Gram-positivas

pertencente à família de *Firmicutes*, sendo conhecido como um colonizador do intestino, encontrado significativamente em crianças e adultos (Eckburg *et al*, 2005; Wang *et al*, 2005). *Clostridium* é geneticamente um grupo muito heterogêneo, e é o maior entre os gêneros de bactérias anaeróbias formadoras de esporos. Possui mais de 120 espécies que são divididas em 19 grupos. Contém espécies benéficas que estão envolvidas em vias metabólicas e espécies patogênicas, responsáveis por uma ampla gama de doenças, sendo o *C.difficile* um dos agentes patogênicos (Bruggemann e Gottschalk, 2008).

Durante a infância é muito comum a existência de portadores assintomáticos de *C.difficile*. Muitos bebês são colonizados durante os primeiros 2 anos de vida, sendo esta colonização raramente associada à infecção por *C.difficile*, apesar de níveis elevados de toxinas A e B poderem estar presentes. De acordo com estudos anteriores, a taxa de prevalência de *C.difficile* na microbiota intestinal de humanos adultos saudáveis pode rondar os 0-17% (George, 1986). No entanto, outros estudos sugerem que o *C.difficile* toxigênico pode estar presente na flora intestinal de adultos saudáveis mais frequentemente (53,3%) do que anteriormente se pensava (Iizuka *et al*, 2004).

O *C.difficile* não causa nenhuma doença significativa quando está presente em pequenas quantidades. No entanto, aquando de distúrbios na flora intestinal normal, por vários potenciais fatores causais pode resultar na expansão ilimitada do *C.difficile*, levando à inflamação e danos na mucosa do intestino (Wilson, 1993).

Muitos fatores como antibióticos, *stress* psicológico e físico, dieta moderna e higiene podem prejudicar a estabilidade microbiana, e assim, contribuir para a disbiose intestinal (Bernstein e Shanchan, 2008).

O uso de antibióticos é a causa mais comum e importante para a grande mudança na microbiota intestinal normal. Terapias antibióticas eliminam microrganismos da microbiota intestinal, destruindo-os direta ou indiretamente por quebrar as interações mutualistas necessárias (Jernberg *et al*, 2007; Sullivan *et al*, 2001). Assim, a perda de equilíbrio microbiano intestinal, cria um ambiente suscetível aos agentes patogênicos, como o *C.difficile* e subsequente doença associada ao *C.difficile* (Kelly e Lamont, 1998).

Outros fatores responsáveis pelo desenvolvimento da patogénese por *C.difficile* são os antagonistas dos recetores H2 e os inibidores da bomba de prótons que estão associados à supressão do ácido gástrico, levando a um aumento das contagens bacterianas intragástricas e colonização do intestino (Aldeyab *et al*, 2009; Dial *et al*, 2005).

III- *Clostridium difficile*

O *C.difficile*, principal agente etiológico da CPM é uma bactéria Gram-positiva pertencente ao filo *Firmicutes*, anaeróbia obrigatória, formadora de esporos, com forma de bacilo e produtora de toxinas que resultam em milhões de mortes todos os anos um pouco por todo o mundo (Buffet-Bataillon *et al*, 2012; Lamont, 2004; McFee e Abdelsayed, 2009). Este foi descoberto como um suposto organismo comensal na flora fecal de recém-nascidos saudáveis, em 1935 por Hall e O`Toole (Almeida *et al*, 2006; Lamont, 2004).

O organismo foi chamado de “difficile”, porque cresceu muito lentamente na cultura e levou um ano para ser isolado. O organismo então mantido em obscuridade até 1978, quando Bartlett o identificou como a fonte da citotoxina encontrada nas fezes de pacientes com colite pseudomembranosa associada a antibióticos (Lamont, 2004).

Trata-se de uma entidade com uma taxa de mortalidade elevada, rondando os 20 a 30 % e onde as recorrências são comuns (Dharmajaran *et al*, 2000; Rubin *et al*, 1995). As manifestações clínicas causadas pelo *C.difficile* variam de uma leve diarreia à colite pseudomembranosa, com surgimento de megacólon e possível perfuração intestinal (Silva e Salvino, 2003).

Ambas as estirpes toxigénica e não toxigénica existem naturalmente e ambas podem colonizar o seu hospedeiro. A infecção causada por uma estirpe de *C.difficile* produtora de toxinas é essencial para que ocorra doença associada ao *C.difficile*, mas não é suficiente, já que o indivíduo pode estar colonizado e permanecer assintomático por tempo indeterminado (Calfee, 2008; Cloud e Kelly, 2007; Hurley e Ngyen, 2002).

Este microrganismo existe tanto na forma vegetativa, a mais comum, como na forma de esporo. O esporo é resistente à temperatura e a ambientes adversos tais como o ácido gástrico e alguns desinfetantes comerciais, sobrevivendo este em hospitais, em ambiente doméstico e em solo (McFee e Abdelsayed, 2009).

Atualmente, o *C.difficile* é reconhecido como um importante patógeno nosocomial com morbidade substancial em pacientes idosos hospitalizados. No entanto, nem todas as estirpes do *C.difficile* são toxigênicas. Durante surtos hospitalares, alguns pacientes podem ser colonizados por estirpes não toxigênicas. Estirpes de *C.difficile* variam muito na sua capacidade de produção de toxinas, mas a gravidade da doença não se correlaciona com a concentração de toxinas nas fezes (Lamont, 2004).

O *C.difficile* tem transmissão fecal-oral através de esporos depositados em superfícies com as quais os indivíduos podem contatar direta ou indiretamente (Hookman *et al*, 2009). Os esporos uma vez ingeridos germinam no intestino delgado (germinação dependente dos sais biliares específicos produzidos no intestino delgado), transformam-se na sua forma vegetativa e multiplicam-se. A partir deste momento colonizam assintomaticamente o indivíduo, ficando em equilíbrio com a restante flora intestinal, ou causam a chamada doença associada ao *C.difficile*, que varia desde diarreia e colite pseudomembranosa até condições tais como o megacólon tóxico (Calfee, 2008; Sorg e Sonenshein, 2009).

3.1. Epidemiologia

O *C.difficile* faz parte da flora fecal normal de 1 a 3 % da comunidade e de mais de 20% dos adultos hospitalizados. Pode-se encontrar tanto nas fezes de pacientes sintomáticos como assintomáticos, sendo que o contágio é feito essencialmente em ambiente hospitalar contaminado por esporos, pelo que o risco aumenta em proporção com o tempo de internamento. É comum que recém nascidos sejam portadores assintomáticos de *C.difficile*, com taxas que ultrapassam os 50% nos 6 primeiros meses de vida, no entanto, é rara a doença nesta população, provavelmente porque o seu intestino não expressa os recetores para as toxinas (Sunenshine e McDonald, 2006).

O *C.difficile* afeta frequentemente pacientes com idade superior a 65 anos, com taxas de incidência até 22,8 casos por 10.000 habitantes, internados em hospitais e centros geriátricos, pois há a existência de comorbilidades e um consumo elevado de antibióticos. Também são descritos surtos em grupos considerados de risco baixo como jovens e crianças com idade superior a 2 anos (Freeman *et al*, 2010; Shannon-Lowe *et al*, 2010; Sunenshine e McDonald, 2006).

Vários estudos epidemiológicos, realizados na última década, documentam um aumento preocupante da incidência, da gravidade e das taxas de recorrência da doença associada ao *C.difficile* (DACD), em várias áreas do globo (Kelly e Lamont, 2008; Warry *et al*, 2005; McDonald *et al*, 2006). Este aumento da incidência da DACD tem sido explicado pela melhoria significativa dos métodos de detecção do *C.difficile* (nomeadamente, a disponibilização dos ensaios imunoenzimáticos simples de executar, mais sensíveis e específicos), por fatores atribuíveis ao agente (salientando-se a emergência da estirpe virulenta B1/NAP1/027) e pelo aumento de outros fatores de risco associados à infeção, particularmente o crescente uso de antibióticos, de imunossupressores e de inibidores da bomba de prótons (Kelly e Lamont, 2008; Loo *et al*, 2011; Voth e Ballard, 2005; Warry *et al*, 2005).

Os surtos descritos em vários pontos do mundo associaram-se à estirpe hipervirulenta B1/NAP1/027, sendo esta capaz de produzir a toxina binária e produtora de 16 e 20 vezes mais toxina A e B, respetivamente, devido à deleção do par de bases 18 do gene regulador *tcdC* e resistente às fluoroquinolonas (Aslam e Musher, 2006; Kelly e Lamont, 2008; McDonald *et al*, 2005). No entanto, o aumento das infeções por *C.difficile* não pode atribuir-se apenas a esta estirpe, uma vez que na Europa, dependendo do país, têm-se descrito outros ribótipos 001, 053, 106 e 078, que possuem um mecanismo semelhante de hiperprodução de toxinas (Bauer *et al*, 2011; Rupnik *et al*, 2009).

O *C.difficile* é classicamente considerado um agente de infeção nosocomial capaz de provocar ocasionalmente pequenos surtos em ambiente hospitalar ou noutras instituições de prestação de cuidados de saúde (Calfee, 2008).

Os primeiros dados da incidência de DACD na Europa foram obtidos de um estudo de 212 hospitais realizado em 2002 por um grupo Europeu, encontrando-se uma incidência média de 2,45 casos por 10.000 internamentos (Barbut *et al*, 2003). Durante os anos de 2003-2004, teve lugar o primeiro grande surto conhecido no Reino Unido, causado pelo ribótipo 027, sendo este associado a uma mortalidade 1,9 vezes superior aos outros (Asensio e Monge, 2012).

No período compreendido entre 2003 e 2006 assistiu-se a uma mudança no padrão epidemiológico de DACD traduzido por um aumento de incidência, maior gravidade e

morbilidade, mais casos de resistência ao tratamento convencional e maior número de casos de recorrência do que até então. Este padrão foi observado nos EUA, Canadá, 11 países da União Europeia e Suíça, sendo atribuído por muitos investigadores à estirpe de ribótipo 027 (Dubberke *et al*, 2007; Hookman *et al*, 2009; Pépin *et al*, 2004; Kuijper *et al*, 2006). Em 2008, este mesmo ribótipo, já se tinha estendido a 16 países Europeus (Freeman *et al*, 2010).

Em 2008, o centro de controlo de doenças da Europa patrocinou um estudo prospetivo da incidência da DACD em pacientes hospitalizados. A incidência média por hospital tinha aumentado desde 2005 até 5,5 casos por 10.000 internamentos. Identificaram-se 64 serótipos diferentes, entre os quais os mais frequentes foram 014/020 (15%), 001 (10%), 078 (8%) e 027 (5%) (Asensio e Monge, 2012).

A incidência de DACD nos Estados Unidos da América (EUA) é, segundo a *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), de 250 000 casos por ano e é responsável por 15 a 20% dos casos de diarreia relacionada com a antibioterapia e por praticamente todos os casos de CPM. A taxa de mortalidade nos EUA passou de 5,7 por milhão de habitantes em 1999 para 23,7 por milhão de habitantes em 2004 (Medelings *et al*, 2007).

Em Portugal, os dados epidemiológicos referentes à infeção por *C.difficile* são limitados. Numa análise dos casos de DACD, realizada no Hospital Central de Santa Maria entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2007 (n=93), verificou-se uma incidência anual média de 3,71/10 000 internamentos. Salienta-se neste estudo uma incidência não igual em cada ano, havendo uma tendência para o aumento exponencial da incidência de DACD, observando-se no ano de 2007 uma incidência anual de 15,4/10 000 internamentos, sendo este um aumento superior a 7 vezes comparativamente ao ano de 2000. Documentou-se ainda que 64% dos doentes tinha mais de 65 anos e que a DACD foi adquirida durante o internamento em 55% dos doentes, sendo considerada nosocomial (Vieira *et al* 2010).

Resultados semelhantes foram apresentados em Espanha, com um aumento da incidência anual de 3,9 para 12,2 casos por 10 000 internamentos, entre 1999 e 2007. Neste estudo, há uma correlação entre a DACD e o aumento da proporção de doentes internados a quem foram prescritos antibióticos (Asensio *et al*, 2008). A mortalidade em

Espanha por DACD no período de 1999 a 2006 baseada em dados do Instituto Nacional de Estatística, aumentou de 0,1 para 0,69 por milhão de habitantes, e observou-se que nos indivíduos com idade superior a 65 anos, a mortalidade foi 5 vezes superior à média. Em pacientes hospitalizados, no período de 1997 a 2005, estimou-se uma mortalidade de 12,3% (Asensio e Monge, 2012).

As consequências a nível hospitalar da DACD incluem, entre outras, maior tempo de internamento (3,6 a 6,7 dias a mais por internamento), maiores taxas de readmissão (19-20% dos doentes que recebem alta após DACD são readmitidos com recidiva da doença), maiores custos nos cuidados de saúde (entre 1126 a 7024 dólares a mais por caso) e uma taxa de mortalidade atribuível que pode ascender a 16,0% ao fim de 30 dias após o diagnóstico e de 16,7% ao fim de um ano (Pepin *et al*, 2005; Kyne *et al*, 2002).

A mortalidade atribuída anteriormente à DACD entre 0,6 e 1,5% dos pacientes, alcançou os 6,9% em surtos epidémicos recentes e aumenta de forma progressiva com a idade. A mortalidade é quase nula nos pacientes com sintomatologia leve, sendo que a maioria se recupera. No entanto, as recorrências são comuns. Entre 0,4 e 3,6% dos pacientes com infeção por *C.difficile* necessitam de cirurgia, e a mortalidade neste grupo aumenta até aos 30 a 50% (Freeman, 2010).

3.2. Patogénese do *C.difficile*

As manifestações clínicas da infeção por *C.difficile* são muito variáveis, podendo passar por uma diarreia leve auto-limitada a uma colite pseudomembranosa grave. A colonização epitelial por bactérias e toxinas, e a indução de citocinas aumenta a permeabilidade da mucosa. Se a barreira da mucosa é quebrada, um influxo luminal de antígenos pode resultar na evolução da inflamação intestinal por estimulação crónica e células imunes provenientes da lâmina própria (Stallmach e Carstens, 2002).

A infeção associada ao *C.difficile* inicia-se pela perturbação da microflora normal do cólon, sendo esta geralmente causada por antibioterapia (Elliott *et al*, 2007; Janoir *et al*, 2007; Wistrom *et al*, 2001). Os antibióticos agem destabilizando a microflora normal do cólon, permitindo o estabelecimento e proliferação do *C.difficile*, de origem endógena ou exógena, sendo que a patogénese da infeção, começa claramente com a ingestão do organismo geralmente na forma de esporos resistentes (formas não vegetativas que

persistem no ambiente por longos períodos e são difíceis de erradicar). Os esporos sobrevivem à acidez gástrica, germinam no intestino delgado (dependente de sais biliares específicos produzidos) para a forma vegetativa e colonizam o cólon, onde produzem toxinas que iniciam uma série de fenômenos que culminam com a perda da função de barreira das células epiteliais, o aparecimento de diarreia e a formação de pseudomembranas (figura 2) (Poutanen e Simor, 2004; Sunenshine e McDonald, 2006; Yam e Smith, 2005).

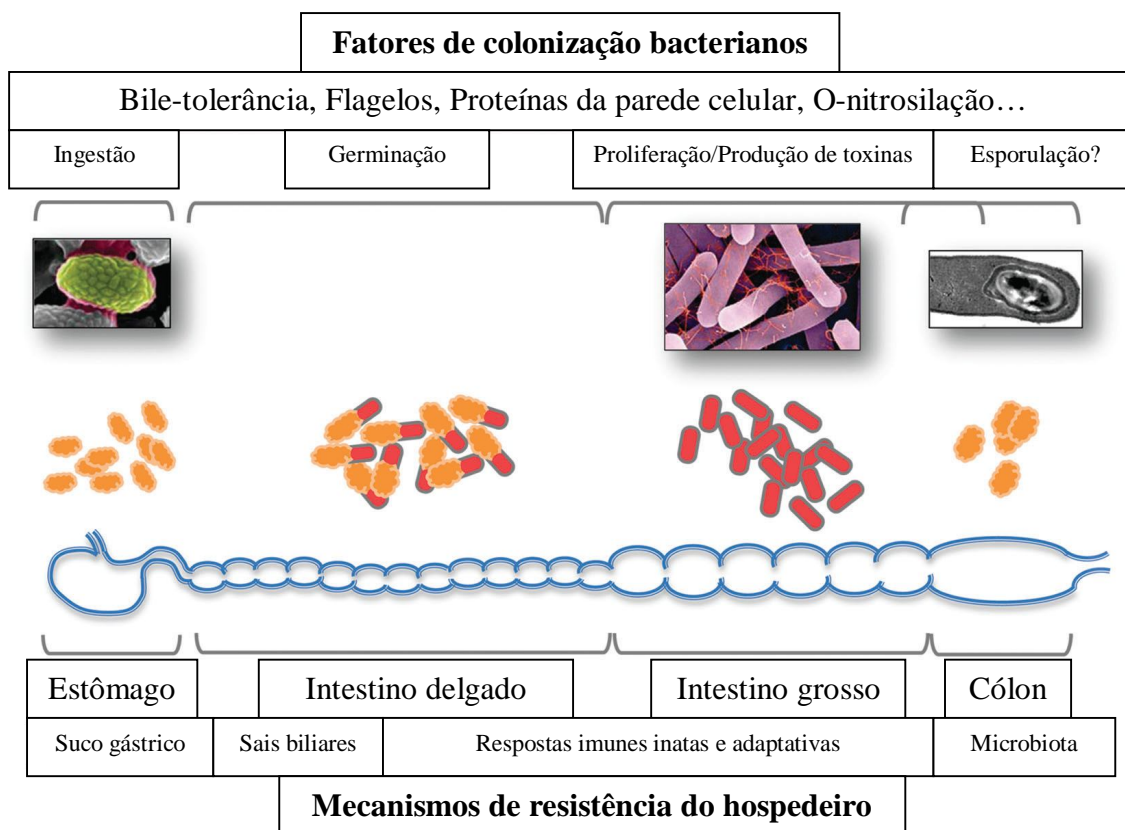


Figura 2: Infecção por *C.difficile*. Esporos, células vegetativas, fatores bacterianos e fatores do hospedeiro que influenciam a doença (Gayatri *et al*, 2012).

Todas as estirpes de *C.difficile* toxigénico apresentam um *locus* de patogenicidade (PaLoc) que mede 19,6 Kb. Este *locus* é constituído por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE*, *tcdR*). As toxinas TcdA e TcdB são codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*, sendo estas toxinas A e B, as responsáveis pela patogenicidade do *C.difficile*. O gene *tcdC* atua como regulador negativo, evitando a expressão do *locus* PaLoc, enquanto que o gene *tcdR* atua como um regulador positivo da expressão de *tcdA* e *tcdB*. Quanto ao gene

tcdE, este codifica uma porina com a função de fazer poros na membrana citoplasmática que permite a libertação das toxinas (Carroll e Bartlett, 2011).

Ambas as toxinas, A e B, têm atividade glicosiltransferase, causando a quebra das fibras de actina do citoesqueleto, resultando na diminuição da resistência transepitelial, a acumulação de líquido e a destruição do epitélio intestinal. As toxinas, após ligadas aos recetores das células epiteliais colónicas, e introduzidas nas células alvo por endocitose, iniciam o seu processo, afetando o citoesqueleto de actina e levando á morte celular. Dentro destes endossomas, em ambiente ácido, ocorre a digestão autoproteolítica para que a região N-terminal (com o domínio catalítico) se separe do resto da toxina. Aparentemente, só esta região catalítica é que é libertada no citosol exercendo a sua função incorporando glucose a determinadas guanosinas-trifosfatases (GTPases) como as proteínas Rho e Rac, entre outras. Estas GTPases, entre outras funções, regulam processos implicados na manutenção da barreira epitelial e interações intercelulares (formação do citoesqueleto), intervindo também na fagocitose, produção de citocinas, etc (Rodriguez-Pardo *et al*, 2013). Assim, a glicosilação das GTPases leva à degradação do citoesqueleto de actina, um aumento da permeabilidade da membrana, perda da função de barreira, citotoxicidade e morte da célula. Além disso, as toxinas do *C.difficile*, estão envolvidas em processos inflamatórios que danificam os tecidos por iniciação de respostas celulares imunes maciças, ou seja, a infiltração de neutrófilos com a regulação positiva e libertação de citocinas tais como IL-8, IL-6, IL-1 β , leucotrienos B4 e interferão γ (Voth e Ballard, 2005).

A toxina A liga-se às estruturas glicídicas presentes na superfície das células epiteliais, enquanto que a toxina B se liga às células que não são cobertas por uma matriz glicídica (Barbut *et al*, 2000).

A toxina A causa necrose, inibição da síntese de proteínas e ativa os macrófagos e os mastócitos. A ativação destas células leva à produção de mediadores inflamatórios, o que leva à secreção de fluidos e uma maior permeabilidade da mucosa. Esta causa dano nas microvilosidades intestinais podendo ocorrer completa erosão da mucosa, sendo então produzido um fluido viscoso e sanguinolento como resposta ao dano tecidual. A toxina B tem pouca atividade enterotóxica, mas é extremamente citotóxica *in vitro* (Hurley e Nguyen,2002; Kyne *et al*, 2000; Mayfield *et al*, 2000;).Tem sido

demonstrado, que tal como a toxina A, a toxina B induz danos no epitélio intestinal, aumenta a permeabilidade da mucosa, estimula a síntese de IL-8 e induz a resposta inflamatória aguda caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos (Lyras *et al*, 2009; Na *et al*. 2005).

Aquando de doença ativa, o epitélio do cólon é o principal alvo das toxinas do *C.difficile*, causando estas a rutura da barreira celular abrindo as junções intercelulares e, conseqüentemente um aumento da permeabilidade do cólon e diarreia aquosa (Silva e Salvino, 2003).

Geralmente, ambas as toxinas são necessárias para causar a colite pseudomembranosa. Estas agridem as linhagens de culturas celulares pelo mesmo mecanismo, no entanto, a toxina B é cerca de 1000 vezes mais potente que a toxina A (Alfa *et al*, 2000; Barbut *et al*, 2000).

Um grande influxo de neutrófilos dentro da mucosa do cólon é característico da colite, sendo que na colite pseudomembranosa há um infiltrado inflamatório agudo com microabcessos e pseudomembranas ricas em neutrófilos. Os neutrófilos da circulação sanguínea, movimentam-se para o local da lesão durante o processo inflamatório (Silva e Salvino, 2003). A libertação de TNF- α pelos monócitos é estimulada por ambas as toxinas bem como a ativação dos monócitos e macrófagos na lâmina própria, para a libertação de IL. Este acontecimento leva ao extravasamento de neutrófilos e a inflamação tecidual devido a geração de um gradiente quimiotático que induz a migração de neutrófilos para o local da inflamação na mucosa (figura 3) (Bentley *et al*. 1998; Kyne *et al*, 2000; Poutanen e Simor, 2004; Yam e Smith, 2005).

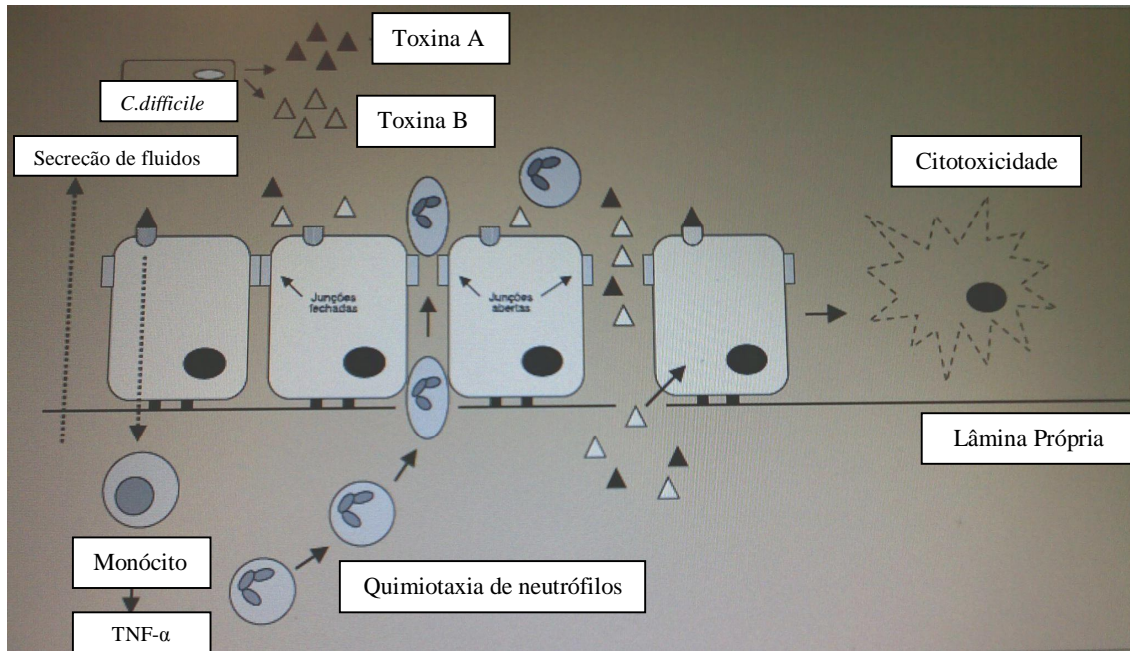


Figura 3: Ações das toxinas A e B do *Clostridium difficile* no epitélio intestinal (Silva e Salvino, 2003)

Fatores relacionados com o hospedeiro, nomeadamente parâmetros imunes, grau de perturbação da flora normal do hospedeiro e grau de virulência do organismo também estão envolvidos na patogénese desta infeção (Blondeau, 2009). Estudos demonstram que é de extrema importância o nível de resposta imune em termos de circulação de anticorpos IgG (séricos) ou IgA (local) contra a toxina A. Níveis significativamente mais baixos de anticorpos séricos e nas fezes, relacionam-se com pacientes com sintomas severos, ao passo que níveis mais elevados se relacionam com pacientes com sintomas leves ou moderados. Além disso, uma resposta de anticorpo sérico contra a toxina A durante um episódio inicial de diarreia associada ao *C.difficile* está relacionada com a proteção contra recorrências. Sugere-se assim, que anticorpos IgG são mais frequentes em portadores assintomáticos do que aqueles com DACD (Kyne *et al*, 2000; Kyne *et al*, 2001).

3.2.1. *Clostridium difficile* O27

As características clínicas da infeção por *C.difficile*, devem-se à produção de toxinas extracelulares, secretadas no cólon durante o crescimento bacteriano. A maioria das estirpes toxigénicas produzem duas toxinas: uma enterotoxina A e uma citotoxina B.

Uma pequena parte das estirpes toxigênicas, produz uma TcdA não funcional, juntamente com uma TcdB normal (TcdA⁻ TcdB⁺). Os genes que codificam para a produção destas toxinas encontram-se no *locus* genômico de patogenicidade PanLoc (Gonçalves *et al*, 2004; Rupnik *et al*, 2005).

Também se identificou uma terceira toxina, a toxina binária do *C.difficile*, que pode estar presente em cerca de 6 a 10% das estirpes, cuja função é independente dos elementos regulatórios associados ao PaLoc (Arteaga *et al*, 2009; Barbut *et al*, 2005). A estirpe hipervirulenta que tem aparecido nos surtos notificados na América e Europa, tem a toxina binária e é caracterizada como toxinotipo III, ribotipo por PCR 027, NAP1, REA B1 e resistente a algumas fluoroquinolonas. NAP (tipo de eletroforese em campos pulsados) e REA (análise de restrição enzimática) são os métodos mais utilizados na América para a caracterização de estirpes de *C.difficile* (Arteaga *et al*, 2009). Esta estirpe, tem sido em grande parte responsável pelo aumento da incidência e da gravidade da infecção por *C.difficile*. Esta tem um aumento na produção das toxinas A e B de 16 a 20 vezes superior às outras, isto devido a nesta se encontrar uma deleção no gene regulador de toxinas *tcdC*. Uma outra diferença é esta estirpe libertar as toxinas fundamentalmente na fase de crescimento logarítmica, enquanto que as estirpes sem esta deleção, libertam as toxinas na fase estacionária (Barbut *et al*, 2007; Spigaglia e Mastrantonio, 2002).

Assim sendo, várias características encontradas nesta estirpe podem contribuir para a sua hipervirulência, incluindo, polimorfismos no gene regulador de toxinas *tcdC*; aumento da produção de toxinas; presença do gene que codifica a toxina binária (*ctdA* e *ctdB*); elevada resistência às fluoroquinolonas (o que leva a serem selecionadas em relação a outras estirpes em ambientes de elevada utilização de fluoroquinolonas); e polimorfismos em *tcdB* que podem resultar numa melhor ligação da toxina (Stabler *et al*, 2008). Além disto, análises comparativas demonstram um certo número de rearranjos genéticos que o ribótipo 027 sofreu nos últimos anos. A análise genómica e fenotípica mostrou que o genoma da estirpe epidémica B1/NAP1/027 tem cinco regiões genéticas adicionais em comparação com o seu homólogo não epidémico. Estes genes adicionais podem ter contribuído para as diferenças fenotípicas entre estas estirpes, relacionados com a motilidade, sobrevivência, resistência antimicrobiana e toxicidade (Hensgens *et al*, 2009; Bauer *et al*, 2011). É provável que outras estirpes epidémicas

surjam no futuro. A epidemiologia molecular do *C.difficile* é diversa e dinâmica, com algumas estirpes causando grandes aglomerados durante certos períodos e depois tornando-se endêmicas (Belmares *et al*, 2009).

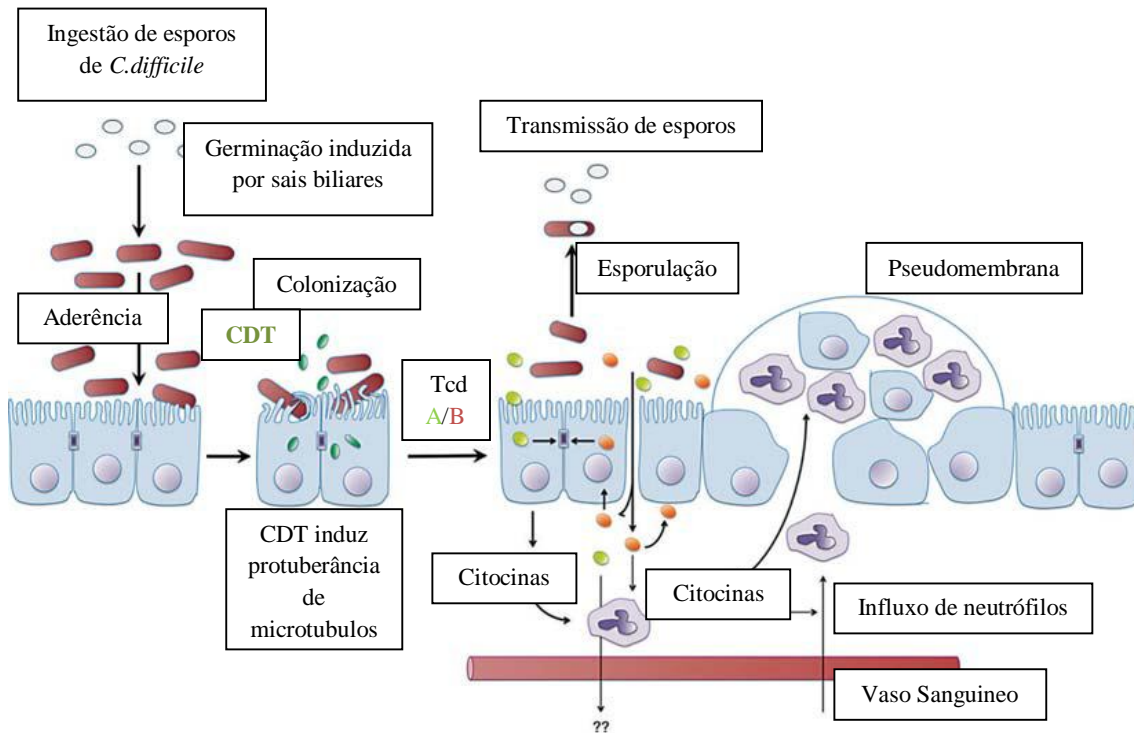


Figura 4: Patogênese do *C.difficile*.

Quando os esporos do *C.difficile* são ingeridos, são estimulados para germinar por sais biliares (por exemplo o taurocolato) no intestino delgado. Posteriormente o cólon é colonizado. Nas estirpes produtoras de toxina binária ou *Clostridium difficile* transferase (CDT), pode aumentar a sua aderência às células epiteliais do intestino. As toxinas estimulam a inflamação da mucosa do cólon, induzindo alterações do citoesqueleto que comprometem a barreira epitelial e a produção de citocinas inflamatórias. A ruptura das junções celulares permite que as toxinas atravessem o epitélio, pelo que podem induzir ainda mais a produção de citocinas inflamatórias em linfócitos e mastócitos. Isto leva a uma escalada de resposta inflamatória devida a influxo de neutrófilos e linfócitos, o que pode levar à formação de pseudomembranas (Shen, 2012).

3.2.2. Fatores de virulência não toxigênicos do *Clostridium difficile*

A maior importância tem sido dada aos mecanismos de intoxicação, pois as toxinas causam profundas alterações na biologia da célula hospedeira sendo responsáveis pelo fenótipo diarreico da infecção por *C.difficile*. No entanto, fala-se cada vez mais nos fatores de virulência não toxigênicos que provavelmente desempenham um papel igualmente importante na colonização do *C.difficile*, proliferação e manutenção no trato gastrointestinal do hospedeiro (Viswanathan *et al*, 2010).

3.2.2.1. Esporulação e germinação

Os esporos, agentes etiológicos da infecção por *C.difficile*, são facilmente disseminados entre os profissionais de saúde e pacientes. Além disso, os esporos são metabolicamente dormentes e altamente resistentes a procedimentos padrão de desinfecção, permitindo que estes persistam por longos períodos no ambiente. Os esporos ingeridos por hospedeiros suscetíveis podem germinar em resposta aos ácidos biliares específicos no intestino delgado e voltar a uma vida ativa com produção de toxinas e causar doença (Viswanathan *et al*, 2010). Por conseguinte, a capacidade de formar esporos no hospedeiro ou a capacidade de formação de esporos mais resistentes podem ser responsáveis pela alteração na capacidade do *C.difficile* se disseminar mais facilmente (Akerlund *et al*, 2008; Merrigan, 2010).

3.2.2.2. Fatores de colonização do *C.difficile*

Proteínas de fibronectina: muitas espécies bacterianas usam proteínas de superfície, normalmente ligadas à parede celular, para reconhecer moléculas adesivas das células hospedeiras. Os recetores incluem as proteínas de superfície de células hospedeiras, tais como a fibronectina, a laminina, o colagénio e o fibrinogénio (Vengadesan e Narayana, 2011). O terminal C da proteína Fbp68 do *C.difficile* interage com a fibronectina (Hennequin *et al*, 2003).

Num outro estudo, uma outra proteína de ligação à fibronectina FbpA, está envolvida na adesão e colonização do *C.difficile* (Barketi-Klai, 2011).

Proteínas de superfície e da parede celular (SLPs e CWPs): alguns organismos Gram-positivos, incluindo o *C.difficile*, possuem uma camada proteica na superfície celular, que tem sido implicada na adesão bacteriana aos tecidos do hospedeiro. Esta

camada é composta por várias proteínas numa rede cristalina, com a predominância da proteína de superfície celular A (SlpA). A SlpA e outras proteínas de superfície (Slps) são também um subconjunto de uma classe maior de moléculas referidas como proteínas da parede celular (CWPs). A SlpA tem sido implicada na aderência do *C.difficile*, quer direta ou indiretamente, auxiliando na fixação bacteriana às células epiteliais intestinais (Calabi *et al*, 2002; ChapetónMontes *et al*, 2011).

Flagelos: os flagelos são fatores de colonização importantes. Estirpes de *C.difficile* expressam flagelos peritricosos (Figura 5), embora a sua expressão flagelar e o seu fenótipo de motilidade associado seja variável entre as diferentes estirpes (Pituch *et al*, 2002). Foram identificados no *Locus* flagelar genes que codificam o monómero flagelina (FliC) e a proteína flagelar (FliD) implicadas na ligação aos tecidos (Tasteyre *et al*, 2001).

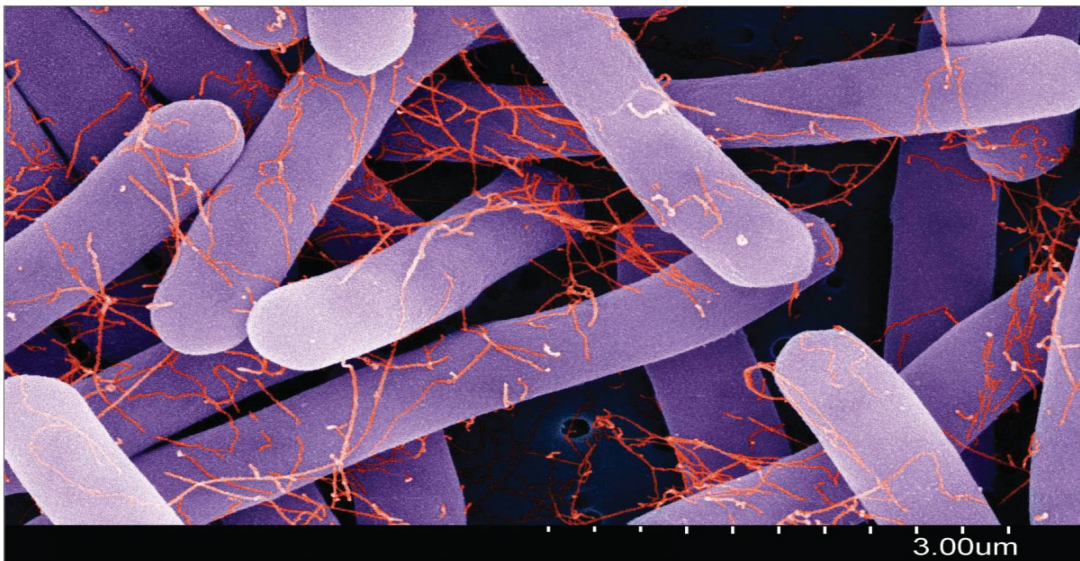


Figura 5: Micrografia eletrônica de varredura de um *C.difficile* ribótipo 001. Os flagelos (vermelho) são bem visíveis nas células vegetativas (roxo) (Gayatri *et al*, 2012).

Enzimas hidrolíticas: estudos demonstram a existência de enzimas hidrolíticas como a hialuronidase, a condroitina-4-sulfatase e atividade da heparinase, estando estas envolvidas na destruição do tecido conjuntivo. A atividade da colagenase é mais restrita às estirpes altamente virulentas. Estas enzimas contribuem para a patologia observada e

também para a nutrição do *C.difficile*. Por exemplo, sabe-se que o *C.difficile* utiliza a N-acetilglucosamina, mas que não é possível obter este sacárido por clivagem das glicoproteínas do muco. No entanto, é o produto final da hidrólise do ácido hialurônico, o que indica que este produto é utilizado da atividade da hialuronidase do *C.difficile* (Borrielo, 1998).

Polissacarídeos de superfície celular: dois polissacarídeos de superfície celular, o PS-I e o PS-II, têm sido caracterizados nos *C.difficile*. Das estirpes estudadas, o PS-I foi encontrado apenas no ribótipo 027 e o PS-II em todas, sugerindo isto que o PS-II é um antígeno conservado entre os diferentes subtipos de *C.difficile*. Recentemente, tanto o PS-I como o PS-II, foram sintetizados quimicamente e ambos servem como potenciais candidatos para a vacinação contra a CDI (Weidenmaier e Peschel 2008). Outro polissacárido importante é o peptidoglicano. As variações na estrutura do peptidoglicano podem levar à resistência a antibióticos β -lactâmicos e lisozimas (Vollmer, 2008). O *C.difficile* é conhecido por ser altamente resistente à lisozima e a análise estrutural do seu peptidoglicano revelou um alto nível de resíduos N-desacetilados (Peltier *et al*, 2011).

IV- Colite pseudomembranosa

A colite pseudomembranosa é bem definida histopatologicamente, e é quase invariavelmente restrita ao cólon e reto. Com o progresso da doença, a mucosa torna-se necrótica com a formação, em casos fulminantes, de uma membrana exsudativa. Quanto ao aspeto endoscópico da colite por *C.difficile*, a mucosa do cólon contém múltiplas placas esbranquiçadas, medindo de alguns mm a 1 a 2 cm, que aderem à superfície da mucosa. Entre estas placas, a mucosa pode parecer normal ou edemaciada, granular. Microscopicamente, a pseudomembrana é vista como um exsudado fibrinoso contendo fibrina, leucócitos necróticos, muco e restos celulares epiteliais. A submucosa intestinal subjacente mostra um grau variável de necrose e de reação inflamatória, encontrando-se infiltrada por neutrófilos. Nos primeiros estágios da doença, pequenas erosões superficiais podem ser encontradas (Borriello, 1998; Rodriguez-Pardo *et al*, 2013).

Além da diarreia (90 a 95%) e sinais de desidratação, os principais sinais e sintomas da CPM são: febre (até 80 % dos casos), leucocitose (até 80 % dos casos), e dor abdominal (80 a 90% dos casos) (Trudel, 2007). Mais raramente, o paciente pode evoluir com quadros de colite sem diarreia, com apresentação da síndrome do abdómen agudo ou megacólon tóxico (Silva e Salvino, 2003). Recorrências podem ocorrer em até 50% dos casos. Perfuração colónica e enteropatia com grande perda de proteínas são duas das complicações que podem ocorrer. Raramente surgem lesões fora do intestino, já tendo sido descritos casos de bacteremias concomitantes (por outras bactérias da microbiota intestinal), abscesso esplénico e osteomielite (ou mesmo artrite e/ou tenossinovite reacional) pelo *Clostridium difficile* (Beaugerie *et al*, 2003; McFarland, 2009; Silva e Salvino, 2003).

4.1. Fatores de risco

A causa principal da colite associada aos antibióticos é a infecção por *C.difficile*, sendo atualmente das infecções mais incidentes adquiridas no hospital, com morbidade e mortalidade significativas, sobretudo entre os indivíduos idosos hospitalizados (tabela II). Na última década, a colite por *C.difficile* tem sido registrada em todo o mundo, com uma maior gravidade, incidência, maior refratariedade à terapêutica e maior probabilidade de recorrência, devido a uma emergência de estirpes mais “virulentas” (Cardoso *et al*, 2011).

Tabela II: Fatores de risco da infecção por *Clostridium difficile* (Bartlett, 2002; Cardoso *et al*, 2011; Cunningham *et al*, 2003; Kyne *et al*, 2001; Resnik e Lefevre, 2001; Vieira *et al*, 2010; Vaishnavi, 2010).

- Exposição a antibióticos, longa duração da terapia, antibioterapia múltipla;
- Medicação antiácida;
- Uso de enemas e estimulantes gastrintestinais;
- Uso de inibidores da bomba de prótons;
- Terapia imunossupressora;
- Terapia antineoplásica;
- Idade avançada (> 65 anos);
- Gravidade e multiplicidade de doenças subjacentes;
- Cirurgia gastrintestinal;
- Presença de sonda nasogástrica;
- Duração da estadia hospitalar; Imobilização prolongada;
- Alterações de motilidade intestinal;
- Colonização mais frequente em unidades de cuidados intensivos e em unidades de oncologia;
- Internamento em quarto com um paciente infetado com *Clostridium difficile*.

4.2. Principais antibacterianos associados à infecção por *Clostridium difficile*

Teoricamente, qualquer agente antibacteriano pode estar envolvido nas patologias associadas ao *C.difficile*, incluindo mesmo a vancomicina e o metronidazol que são frequentemente utilizados no tratamento destas patologias. Os sintomas podem surgir até oito a dez semanas após a suspensão da terapêutica antibiótica. Uma dose única de antibiótico pode ser suficiente para despoletar a infecção (Bartlett, 2006; Hurley e Nguyen, 2002; Surawicz, 2007).

Os antibióticos mais implicados são os de largo espectro, que possuem um largo impacto na microbiota intestinal (Silva e Salvino, 2003).

A longa duração da terapia e/ou a combinação de antibióticos, aumentam o risco de desenvolvimento de patologia associada ao *C.difficile*. Estas patologias, também podem ser induzidas por antibióticos, aos quais o *C.difficile* é suscetível *in vitro*. Este paradoxo continua incerto, mas pode ser parcialmente explicado pelo supercrescimento do *C.difficile* a partir de esporos persistentes ser mais rápido do que a flora normal do cólon (Silva e Salvino, 2003; wilcox *et al*, 2000).

De acordo com vários autores, a tabela III representa os antibacterianos mais comumente associados à infecção por *C.difficile*, descritos em vários estudos (Bartlett, 2002; Bartlett, 2010; Blondeau, 2009; Buffet-Bataillon, 2012; Dial *et al*, 2008; Ferreira *et al*, 1999; Fred *et al*, 2012; Hensgens *et al*, 2012; Mamoon *et al*, 2012; O'Conner *et al*, 2004; Rocha *et al*, 1999; Silva e Salvino, 2003; Stevens *et al*, 2011; Talpaerte *et al*, 2011).

Tabela III: Principais antibacterianos associados à infecção por *Clostridium difficile*

| Antibacterianos | | |
|--|--|---|
| Mais comuns | Comuns | Raros |
| <ul style="list-style-type: none"> • Clindamicina; • Cefalosporinas (de 2^a geração: cefoxitina; de 3^a geração: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxone); • Fluoroquinolonas (moxifloxacina, levofloxacina, ciprofloxacina); • Carbapenemos. | <ul style="list-style-type: none"> • Macrólidos; • Tetraciclina; • Penicilinas associadas a inibidores das β-lactamases. | <ul style="list-style-type: none"> • Metronidazol; • Vancomicina; • Trimetoprim-sulfametoxazol; • Aminoglicosídeos; • Rifampicina. |

Contudo, deve-se ter em conta que a doença associada ao *C.difficile* envolve uma tríade de fatores, tendo-se em atenção o desequilíbrio da flora intestinal normal (habitualmente causada pelo uso de antibacterianos de largo espectro), a exposição ao *C.difficile* toxigénico (habitualmente em ambiente hospitalar), bem como os fatores de risco dependentes do hospedeiro.

É importante salientar, que nem todos os casos de diarreia associada à antibioterapia estão relacionados com o *C.difficile*, já que os próprios antibióticos podem causar efeitos colaterais relacionados com a dose e tipo de antibiótico, tais como diarreia e dor abdominal, não estando relacionados com a infecção por *C.difficile* (McDonald *et al*, 2006; McFee e Abdelsayed, 2009).

4.2.1. Resistência do *C.difficile* aos antibacterianos

A terapia antimicrobiana tem um papel central no desenvolvimento da infecção por *C.difficile*. Alguns estudos indicam que a percentagem de estirpes multirresistentes varia entre os 2,5 e os 66% (Ackermann *et al*, 2003; Spigaglia e Mostrantonio, 2004).

O *C.difficile* é sensível *in vitro* ao metronidazol e à vancomicina, sendo estes os antibióticos de eleição no tratamento da DACD, e apresenta uma sensibilidade variável a outros antimicrobianos (Freeman *et al*, 2010). Destaca-se o aumento da resistência do *C.difficile* às fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina), de forma geral tanto nas estirpes hipervirulentas epidémicas (B1/NAP1/027) como nas não epidémicas de outros ribótipos (Rodríguez-Pardo *et al*, 2013).

Apenas algumas estirpes de *C.difficile* resistentes ao metronidazol foram descritas no mundo, tendo sido observado um aumento de CMI e de heteroresistência (Baines *et al*, 2008; Peláez *et al*, 2002).

Uma estirpe de *C.difficile* resistente à vancomicina tem sido descrita, e esta diminuição de sensibilidade ao antibiótico foi avaliada em alguns estudos. Os mecanismos de redução de sensibilidade ao metronidazol e à vancomicina nesta bactéria ainda são desconhecidos (Ackermann *et al*, 2003; Peláez *et al*, 2008; Spigaglia *et al*, 2011).

A multirresistência pode ser gerada por diferentes mecanismos, como a acumulação de genes que codificam a resistência a diferentes antibióticos ou mutações genómicas que alteram o local alvo de atuação do antibiótico. No *C.difficile*, transposões conjugativos estão envolvidos na resistência aos grupos de antibióticos macrólidos/lincosamidas/estreptograminas B (MLS_B), à tetraciclina e ao cloranfenicol. Tradicionalmente, a maioria dos *C.difficile* prevalentes em seres humanos eram resistentes à clindamicina e/ou eritromicina, dois antibióticos pertencentes ao grupo MLS_B (Ackermann *et al*, 2003; Soloman *et al*, 2011; Spigaglia *et al*, 2011).

Isolados clínicos de *C.difficile* resistentes à clindamicina têm sido associados a um risco aumentado de doença em todo o mundo e têm sido associados a surtos envolvidos com o ribótipo 027 (Drudy *et al*, 2008; Soloman *et al*, 2011).

A metilação pós-transcricional do rRNA ribossomal 23S confere a resistência MLS_B. A modificação do local alvo ocorre a nível dos ribossomas através da Erm N-

metiltransferase que é codificada pelo gene da resistência à eritromicina (*erm*). Várias classes do gene *erm* foram descritas, sendo que o *erm(B)*- gene B da metilase ribossômica da eritromicina- é o mais vulgarmente identificado nos isolados de *C.difficile*. O gene *erm(B)* está localizado sobre um elemento não conjugativo mobilizável, Tn5398 (Ackermann *et al*, 2003; Bendle *et al*, 2004; Spigaglia e Mastrantonio, 2002). Mutações no domínio V do rRNA 23S também alteram o alvo e conferem resistência antimicrobiana MLS_B. A resistência à clindamicina, eritromicina e tetraciclina foi identificada pela transferência de ADN plasmídico (Ackermann *et al*, 2003).

A resistência à tetraciclina é geralmente conferida pelo gene *tet(M)* transportado pelo transposição Tn5397, no entanto, algumas estirpes podem ter elementos pertencentes à família Tn916, que é amplamente dispersa em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Roberts *et al*, 2001; Spigaglia *et al*, 2005).

Uma outra família de transposições, a família Tn4451/Tn4453, é responsável pela resistência do *C.difficile* ao cloranfenicol. Estes elementos têm um gene *cat(D)*, que codifica para uma cloranfenicol-acetiltransferase, que inativa o antibiótico. Mutações genéticas estão envolvidas na resistência às fluoroquinolonas e à rifampicina, sendo esta última proposta para o tratamento de recidivas da infecção por *C.difficile* (Garey *et al*, 2008; Spigaglia *et al*, 2011).

A resistência às fluroquinolonas, em especial à moxifloxacina, é comum na Europa, e tem sido associada com a infecção por *C.difficile* e a surtos em serviços de saúde. Esta resistência é caracterizada por mutações nas enzimas alvo das quinolonas, girase A (codificada pelo gene *gyrA*) e girase B (codificada pelo gene *gyrB*) (Spigaglia *et al*, 2009). A substituição de aminoácidos mais comum identificada na GyrA é Thr-82→Ile, embora outras substituições tenham sido observadas. Substituições de aminoácidos identificadas na GyrB incluem: Arg-447→Lys, Arg-447→Leu, Asp-426→Asn e Asp-426→Val (Ackermann *et al*, 2003; Dridi *et al*, 2002; Drudy *et al*, 2006; Huang *et al*, 2010; Walkty *et al*, 2010).

Num estudo, foram colhidos isolados em 38 hospitais diferentes, de 14 países europeus, de pacientes sintomáticos. Das estirpes analisadas, 47% eram resistentes a pelo menos um antibiótico sendo que 55% destas eram multirresistentes, mostrando resistência a pelo menos três antibióticos diferentes (Spigaglia *et al*, 2011).

Todas as estirpes resistentes à moxifloxacina também o eram à gatifloxacina, levofloxacina e ciprofloxacina. Neste estudo, todas as estirpes analisadas foram sensíveis ao metronidazol e à vancomicina. As estirpes multirresistentes pertenciam a 11 ribótipos de PCR diferentes, maioritariamente 001 (39%), 017 (18%) e 012 (12%), sendo que 48% destas estirpes eram resistentes a quatro classes diferentes de antibióticos (eritromicina, clindamicina, rifampicina e moxifloxacina (Spigaglia *et al*, 2011).

Das estirpes *erm*(B)-positivo, 83% eram resistentes à eritromicina e clindamicina e eram multirresistentes. Os resultados indicam que o gene *erm*(B) é ainda o determinante mais comum da resistência a antibióticos MLS_B em *C.difficile*. Todas as estirpes resistentes à tetraciclina, devido geralmente à presença do gene *tet*(M), eram multirresistentes e continham o transposição conjugativo Tn5397, sendo do ribótipo 012 ou 048 (Spigaglia *et al*, 2011).

Tal como observado para a tetraciclina, todas as 11 estirpes resistentes ao cloranfenicol, eram resistentes a múltiplos fármacos. Estas tinham um elemento pertencente à família Tn4451/Tn4453 e foram tipificadas como 012 ou 048 (Spigaglia *et al*, 2011).

A análise também mostrou que a maioria dos isolados resistentes à moxifloxacina tinha a substituição de aminoácidos em GyrA, sendo que os ribótipos 014 e 071 apresentavam a substituição na posição 426 de GyrB. Todas as estirpes resistentes à rifampicina tinham uma ou duas substituições de aminoácidos. Também nas estirpes multirresistentes se encontraram substituições de aminoácidos. A maioria das estirpes multirresistentes, foram resistentes tanto à moxifloxacina como à rifampicina. A substituição de aminoácidos Thr-82→Ile em GyrA e a presença concomitante de duas alterações de aminoácidos His-502→Asn e Arg-505→Lys, foram encontradas sendo responsáveis pela resistência à moxifloxacina e rifampicina, respetivamente (Spigaglia *et al*, 2011).

A resistência do *C.difficile* aos antibióticos encontra-se em evolução. A capacidade de adquirir e disseminar determinantes de resistência para outras espécies e para manter as mutações genéticas que conferem resistência a novas classes de antibióticos, fornecem ao *C.difficile* potenciais vantagens sobre os co-residentes da flora intestinal. A monitorização da resistência e emergência de clones altamente virulentos e uma melhor

gestão do uso de antibióticos são necessários para um controlo eficaz das infeções por *C.difficile* (Spigaglia *et al*, 2011).

Num outro estudo, identificou-se a prevalência dos ribótipos 027, 108 e 001 em instituições de saúde irlandesas. Isto pode ser explicado em parte pela presença de mecanismos de resistência a antimicrobianos específicos que conferem uma vantagem seletiva, embora outras características vantajosas, incluindo a citotoxicidade e eficácia de esporulação, possam prolongar a infeção e/ou aumentar a prevalência destes ribótipos (Soloman *et al*, 2011).

4.3. Métodos de diagnóstico

Deve-se suspeitar de uma infeção por *C.difficile*, em indivíduos com diarreia associada a antibióticos (que ocorre entre oito a dez semanas de uso de antimicrobianos), especialmente se a febre também está presente (Andrew e Simor, 2010).

Vários autores descrevem a necessidade de se testar amostras fecais à procura dos bacilos e/ou suas toxinas em casos de diarreias com mais de três dias em pacientes hospitalizados (Silva e Salvino, 2003). Não há motivo para testar as fezes de indivíduos assintomáticos, a não ser como parte de uma investigação de surto (Andrew e Simor, 2010).

Para um bom diagnóstico laboratorial, apenas as fezes líquidas devem ser aceites, com a exceção dos casos sob investigação epidemiológica. Somente amostras frescas devem ser processadas e, estas devem ser armazenados a temperaturas menores ou iguais a 4°C, nos casos em que os testes não podem ser realizados rapidamente, pois a citotoxina perde rapidamente a sua atividade (Andrew e Simor, 2010; Silva e Salvino, 2003). O teste deve ser realizado dentro de 24 horas desde a recolha da amostra (Andrew e Simor, 2010).

Estudos de imagem abdominal, como uma tomografia computadorizada, podem mostrar sinais de um íleo com segmentos colónicos dilatados ou revelar a presença de edema ou inflamação da parede intestinal (figura 6). Estas mudanças são coerentes, mas não específicas de CPM. A visualização direta do cólon, através de sigmóscopia ou colonoscopia, é necessária para determinar a presença de CPM (Andrew e Simor, 2010).

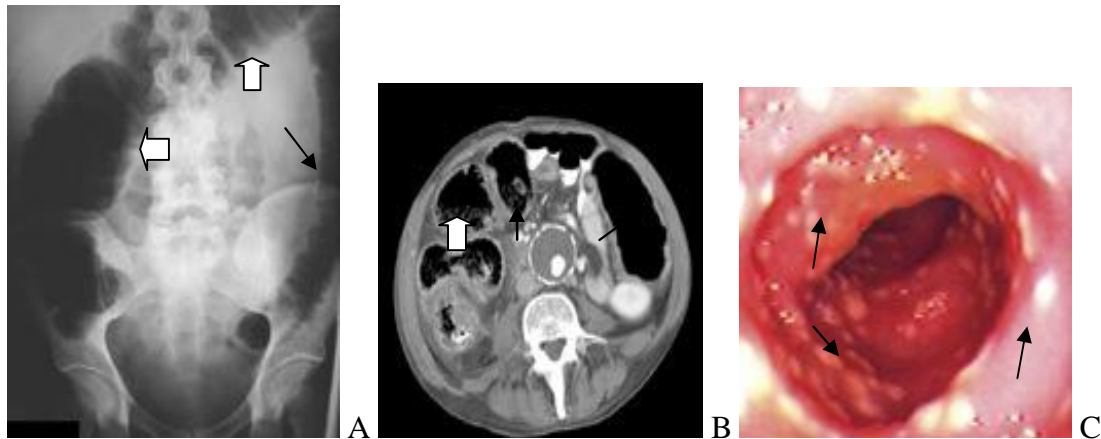


Figura 6: Caraterísticas da colite por *C.difficile*.

A: Planície do abdómen mostrando espessamento da parede intestinal, perda de marcações haustrais (seta fina) e dilatação do cólon ascendente e transversal (setas grossas); B: tomografia computadorizada mostrando dilatação do cólon (setas finas) e espessamento da parede intestinal (seta grossa); C: Visão endoscópica do clássico *C.difficile* associado à colite pseudomembranosa (setas marcam pseudomembranas), (Hull e Beck, 2004).

4.3.1. Visualização direta (diagnóstico clínico)

O diagnóstico clínico da diarreia associada à infecção por *C.difficile*, pode ser feito por colonoscopia ou retoscopia. A CPM também pode ser diagnosticada através da biópsia das pseudomembranas por sigmóscopia ou colonoscopia. As lesões apresentam como principais caraterísticas uma cor esbranquiçada, com até 2 cm e, são elevadas, com áreas subjacentes de mucosa intestinal evidenciando mais frequentemente aspeto inteiramente normal. A doença pode ocorrer em todo o cólon, mas na maioria dos casos é mais evidenciada no retossigmóide. No entanto, este tipo de procedimentos, pode apenas revelar a presença de uma colite inespecífica sem pseudomembranas, levando a que o diagnóstico por *C.difficile*, seja habitualmente feito por testes laboratoriais para detetar o organismo ou as suas toxinas em amostras fecais diarreicas. As pseudomembranas, estão presentes em apenas aproximadamente 50% dos pacientes. Além disso, a distribuição das pseudomembranas é irregular, com até 70% dos

pacientes com preservação retal e com muitos dos pacientes (cerca de 10%) com pseudomembranas típicas acima do alcance do sigmóscopio flexível. Retoscopia é, portanto, pouco fiável para o diagnóstico. No mínimo a sigmóscopia flexível deve ser realizada em casos suspeitos. Contudo, em casos suspeitos onde a sigmóscopia é normal, deve considerar-se a colonoscopia (Trudel, 2007). Aquando da suspeita de CPM, deverá haver uma confirmação laboratorial, através de um ou mais dos ensaios abaixo descritos (Andrew e Simor, 2010; Beaugerie *et al*, 2003; Kyne, 2001; Vanpoucke, 2001).

Uma variedade de métodos laboratoriais estão disponíveis, não havendo no entanto a certeza de qual o teste ideal para o diagnóstico de doenças associadas ao *C.difficile* (Andrew e Simor, 2010).

4.3.2. Cultura

Um dos meios propostos para o isolamento do *C.difficile* é o meio de cultura seletivo CCFA (agár cicloserina-cefoxitina-frutose) ou CCEY (agár gema de ovo-cicloserina-cefoxitina). Os *swabs* retais não são adequados para este método, devendo sempre ser colhidas as fezes líquidas, uma vez que há uma diminuição de sensibilidade no uso de fezes sólidas e porque existem portadores assintomáticos de *C.difficile* toxigénico. A amostra fecal é inoculada diretamente e as placas incubadas em anaerobiose por 48 horas (Alcalá *et al*,2004; Silva e Salvino, 2003).

A cultura é o método mais sensível, mas não é muito específica devido à possibilidade de isolamento de estirpes não toxigénicas. As estirpes isoladas devem ser testadas quanto à toxigenicidade (Andrew e Simor, 2010). As colónias de *C.difficile* são facilmente reconhecidas no meio de cultura devido à sua morfologia caraterística (“vidro quebrado”, “mosaico de cristais”), principalmente quando observadas com lupa ou microscópio estereoscópico. Outra caraterística destas colónias é a fluorescência amarelo-esverdeada na presença de luz ultra-violeta, podendo no entanto variar com o meio de cultura utilizado. O odor típico destas colónias a “estrume de cavalo”, devido à produção de p-cresol, é também uma caraterística importante na sua identificação (Alcalá *et al*,2004; Kyne *et al*, 2000; Vanpoucke *et al*, 2001; Silva e Salvino, 2003).

4.3.3. Ensaio de citotoxicidade

Este método consiste na inoculação de filtrado de uma suspensão de fezes em cultura de células e pela observação do efeito citopático como uma consequência da rutura do citoesqueleto celular, resultando na deformação das linhagens celulares usadas. Quase todas as linhagens celulares usadas em laboratórios de microbiologia clínica podem ser usadas, incluindo Vero, Hep2, Hela, MRC-5, fibroblastos, CHO...(Alfa *et al*, 2000; Vaishnavi, 2010; Wilkins e Lysterly, 2003).

O filtrado é inoculado na monocamada celular e é observado dentro de 24 a 48 horas, a presença ou ausência de efeito citotóxico, sendo que nos casos mais severos, estes efeitos podem surgir após 4 a 6 horas. A confirmação da especificidade é obtida pela repetição do teste com a adição de um antisoro específico direcionado contra *C.difficile* (Alfa *et al*, 2000; Wilcox *et al*, 2000; Vaishnavi, 2010).

O método é específico e relativamente sensível, podendo detetar outras toxinas. No entanto, em comparação com o teste imunoenzimático, é relativamente mais demorado. Como desvantagens, tem-se a possibilidade de observação em cerca de 2% dos casos, de efeitos citopáticos não específicos (não neutralizados pelo soro), o que leva à impossibilidade de obter conclusões. Outra desvantagem é a necessidade de manutenção das linhagens celulares, a qual consome tempo e acarreta custos. A adição de demasiado material fecal no tecido da cultura, pode levar a falsos positivos. Falsos negativos também podem ocorrer devido a fatores como a toxina ser degradada pelas enzimas, atraso no transporte da amostra, medicação que o paciente toma e, devido a algumas linhas celulares serem menos sensíveis que outras no que respeita ao efeito citopático da toxina (Alfa *et al*, 2000; Wilcox *et al*, 2000; Wilkins e Lysterly, 2003; Vaishnavi, 2010).

4.3.4. Deteção de toxinas por enzimaensaio (EIA)

Encontra-se comercialmente disponível para detetar a toxina-A, a toxina-B ou ambas as toxinas A e B no mesmo teste. Alguns testes são apresentados individualmente, outros em microplacas com 96 orifícios. Uma das maiores vantagens desta metodologia é a obtenção de resultados em cerca de 20 minutos em média. Este teste tem uma sensibilidade de 70 a 85% e uma especificidade de aproximadamente 95%, sendo que

quando comparado com a detecção de citotoxinas em cultura de células, são apenas pouco menos sensíveis (Alfa *et al*, 2000; Bartlett, 2010; Vaishnavi, 2010).

A principal vantagem deste teste é a possibilidade de realizar um *screening* rápido das amostras suspeitas. Contudo, devem ser sempre realizados paralelamente à cultura e, quando o ensaio imunoenzimático for negativo e a cultura positiva, o teste deve ser repetido, testando-se as colônias isoladas no meio de cultura (Alfa *et al*, 2000; Silva e Salvino, 2003; Vaishnavi, 2010).

4.3.5. Teste de aglutinação do látex

É um teste rápido e simples, no entanto, inviável para uso rotineiro, devido ao elevado custo por teste. Além disso, é conhecido por detetar um marcador de antígeno não tóxico para *C.difficile*, resultando frequentemente em falsos positivos. Atualmente, este teste é pouco usado e tem sido substituído pelos EIAs (Vaishnavi, 2010).

4.3.6. Ensaio de ligação imunológica de partículas

O ensaio é efetuado na superfície de membranas individuais empregando o princípio do ensaio imunoenzimático. O sobrenadante das fezes é passado através de um filtro para a membrana reagindo com o anticorpo monoclonal de rato para a toxina do *C.difficile*. Um conjugado apropriado de enzima e substrato é adicionado para visualizar a partícula com coloração azul. Por vezes, a presença de uma quantidade excessiva de partículas podem causar dificuldades na interpretação dos resultados (Vaishnavi, 2010).

4.3.7. PCR (*Polymerase chain reaction*)

A reação da polimerase em cadeia é usada para detetar o gene *tcdB* em isolados de fezes, tendo uma sensibilidade similar ao teste da detecção de toxinas em cultura. A vantagem do PCR é a rapidez do teste. Mas, o PCR necessita de infraestruturas apropriadas e conhecimento técnico. A maioria dos ensaios tem como alvo apenas um dos dois genes. As fezes podem conter compostos inibidores da polimerase, podendo causar dificuldades na realização do ensaio. Além disso, o PCR deteta o mesmo número

de cópias por minuto do genoma de *C.difficile* presente mesmo em indivíduos saudáveis, enfatizando assim a etiologia (Barbut *et al*, 2009; Vaishnavi, 2010).

4.3.8. Ensaio imunocromatográfico

Esta técnica consiste num teste imunoenzimático único para a detecção de toxinas A e B em amostras de fezes. Pode ser feito em 20 minutos e sem qualquer exigência de pré-tratamento da amostra (Vaishnavi, 2010).

4.3.9. Detecção da glutamato desidrogenase (GDH)

Alguns imunoenaios enzimáticos permitem a detecção nas fezes de uma enzima específica do *C.difficile*, a glutamato desidrogenase ou GDH, tendo no entanto o inconveniente de estar presente tanto em estirpes toxigénicas como não toxigénicas. Estes testes têm uma boa sensibilidade e um valor preditivo negativo geralmente superior a 99%, o que permite descartar o diagnóstico de infeções associadas ao *C-difficile* em caso de resultado negativo. Em contraste, com um resultado positivo, não é possível prever a natureza da estirpe toxigénica e o resultado deve ser confirmado por um teste para as toxinas (Eckert e Barbut, 2010).

4.3.10. LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*)

LAMP é um ensaio de reações de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos que não exige instrumentação dispendiosa para o executar. A detecção da toxina-B por LAMP da noite para o dia, em culturas em meio de carne cozida, pode ser um método alternativo de testes de diagnóstico em laboratórios clínicos sem aparelhos especiais. O primeiro teste LAMP para *C.difficile* foi descrito por Kato *et al*, tendo como alvo o gene *tcdB* (toxina B). É um método rápido e simples para detetar o gene da toxina-B em amostras de fezes, bem como em isolados (Kato *et al*, 2005). Mais recentemente, foi descrito um ensaio LAMP comercial tendo como alvo o gene *tcdA* (toxina A) de *C.difficile*. Relatam-se valores de sensibilidade e especificidade de 98% nestes ensaios (Norén *et al*, 2011).

Tabela IV: Métodos laboratoriais de diagnóstico de infecção por *Clostridium difficile* (Bartlett, 2010; Eckert e Barbut, 2010; Eastwood *et al*, 2009; Vaishnavi, 2010).

| Método | Deteção | Tempo | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------------|---|----------|-------------------|--------------------|---|--|
| Cultura | <i>C.difficile</i> Toxigénico | 2-5 dias | > 90 | 80-90 | Sensível; método de referência; Permite tipagem da estirpe molecular. | Demorado; possível despiste de portadores de estirpes de <i>C.difficile</i> não toxigénicas. |
| GDH | <i>C.difficile</i> ; Gluconato desidrogenase. | Horas | 60-85 | 85-95 | Rápido; simples. | Pouco específico; custo. |
| Citotoxidade | Toxina B | 1-2 dias | 75-85 | > 97 | Método de referência; relativamente sensível e específico | Demorado; não estandardizado; infraestruturas adequadas e perícia nos procedimentos |
| Imuno-enzimáticos | Toxinas A e B | Horas | 70-85 | ~95 | Rápidos; simples. | Sensibilidade; custo. |
| PCR | Géne <i>tcdB</i> | Horas | > 90 | > 97 | Rápido; sensível; específico. | Custo; despiste possível de portadores assintomáticos |

4.4. Tratamento

O tratamento de todos os pacientes com infecção por *C.difficile* deve incluir a garantia da reposição adequada de líquidos e eletrólitos. Fármacos antiperistálticos/antidiarreicos e opiáceos devem ser evitados, pois podem precipitar o megacólon tóxico. O antibiótico que o paciente se encontra a fazer, deve ser interrompido sempre que possível (Eckert e Barbut, 2010; Gerding *et al*, 2008).

Estas medidas simples, podem ser suficientes para a resolução de uma infecção ligeira mas, na presença de sintomas mais significativos ou persistentes, ou se o antibiótico não pode ser interrompido, a terapêutica antimicrobiana para o *C.difficile* será necessária (Eckert e Barbut, 2010; Gerding *et al*, 2008; Zar *et al*, 2007).

4.4.1. Metronidazol e Vancomicina

As diretrizes de tratamento recomendam o uso de metronidazol oral ou vancomicina oral para o tratamento de um episódio inicial de infecção por *C.difficile*. Ambos os fármacos são demonstrados como igualmente eficazes em vários estudos (Andrew e Simor, 2010; Bartlett, 2010). No entanto, o metronidazol é muitas vezes preferido, pois é menos dispendioso e reduzem-se as probabilidades de enterococos vancomicina resistentes e estafilococos (Cohen *et al*, 2010; Silva e Salvino, 2003; Zar *et al*, 2007). No entanto, vários estudos têm demonstrado que, apesar da vancomicina e do metronidazol parecerem ser igualmente eficazes para o tratamento da infecção leve por *C.difficile*, a vancomicina é superior farmacologicamente para o tratamento de pacientes com doença grave (Cohen *et al*, 2010; Gerding *et al*, 2008; Huang *et al*, 2009; Zan *et al*, 2007).

Os critérios para a infecção por *C.difficile* grave incluem a presença de CPM, o tratamento numa unidade de cuidados intensivos, ou dois de: 60 anos ou mais; febre superior a 38°C; leucocitose periférica (415000 células/mm³); hipoalbuminémia (menos que 2,5 mg/dL). Assim, a vancomicina oral deve ser considerada como o agente de primeira linha para o tratamento de pacientes com infecção grave, e o metronidazol deve ser reservado para formas mais suaves da doença (Cohen *et al*, 2010; Gerding *et al*, 2008).

Porque a infecção por *C.difficile* é causada no lúmen colónico, o objetivo da terapia farmacológica é que o antibiótico atue nesta zona. A vancomicina administrada oralmente quase não tem absorção, o que produz níveis colónicos de fármaco centenas de vezes mais elevados que a concentração mínima inibitória (Bartlett, 2008; Hung *et al*, 2009). Em contraste, a absorção oral do metronidazol aproxima-se de 100%, de modo a que os níveis no lúmen colónico são baixos devido à passagem do fármaco através da mucosa do intestino por causa da inflamação, ou possivelmente, por o fármaco não ser absorvido, como consequência de diarreia severa (Baines *et al*, 2008; Bartlett, 2010).

Para pacientes gravemente doentes, a vancomicina oral pode não ser viável. As recomendações para estes doentes são a vancomicina por via oral em doses elevadas (500 mg, 4 vezes/dia), com a hipótese de que parte do fármaco atinja o cólon. Uma estratégia alternativa é o enema de vancomicina, com o cuidado de manipulação e volume corretos, de modo a garantir que o fármaco atinge o cólon (Bartlett, 2010). O metronidazol é também recomendado, mas por via intravenosa, havendo a hipótese da presença de algum fármaco no cólon por passagem através do intestino inflamado. Há ainda recomendações da administração de imunoglobulina intravenosa que foi utilizada com sucesso com o metronidazol ou a vancomicina num pequeno número de pacientes, mas que em outros estudos parece não ser eficaz (Abougergi *et al*, 2010; Gerding *et al*, 2008).

Um estudo clínico recente revelou que o tratamento com anticorpos monoclonais humanos contra as toxinas do *C.difficile*, administrados juntamente com a terapia padrão de vancomicina ou metronidazol, tem benefícios no tratamento da infecção, bem como na redução do risco de recidivas da doença em 72% dos casos (Lowy *et al*, 2010).

Uma complicação importante é a recidiva, que ocorre em aproximadamente 20% de todos os doentes tratados com metronidazol ou vancomicina (Bartlett, 2010; Kelly, 2009; Lowy *et al*, 2010). A recidiva caracteriza-se pela recorrência dos sintomas no paciente, idênticos aos sintomas anteriores, embora estes possam ser mais ou menos severos (Bartlett, 2010).

Para o tratamento da doença recorrente, uma primeira recorrência pode ser geralmente tratada com o mesmo agente usado para tratar o episódio inicial, embora uma pequena percentagem de doentes venha a sofrer de mais do que uma recidiva (Gerding *et al*, 2008; Johnson, 2009). A recomendação padrão de vancomicina oral é de 125 mg, 4 vezes/dia, 10 a 14 dias, com posterior diminuição gradual da dose (Bartlett, 2006; McFarland *et al*, 2002).

4.4.2. Teicoplanina

É um antibiótico glicopeptídeo, mostrando ter atividade contra anaeróbios Gram-positivos incluindo o *C.difficile*. Num estudo prospetivo com teicoplanina e vancomicina, a cura clínica e as taxas de recorrência foram semelhantes em ambos os grupos (Lalla *et al*, 1992). Num estudo subsequente, a cura usando teicoplanina, em pacientes com colite pseudomembranosa confirmada por endoscopia, foi de 100% (Wenisch *et al*, 1996).

4.4.4. Rifaximina

É um antibiótico não absorvido que parece ser útil na manutenção da flora intestinal. Embora altamente ativa contra a maioria das estirpes de *C.difficile*, a rifaximina é sujeita a problemas de outras rifamicinas, em que a substituição de um aminoácido bacteriano, conduz a uma elevada resistência a este antibiótico (Curry *et al*, 2009; O'Connor *et al*, 2008). A rifaximina tem sido usada no tratamento pós-vancomicina para pacientes com recorrências múltiplas para os quais estratégias terapêuticas anteriores falharam (Garey *et al*, 2009; Johnson *et al*, 2007; Johnson *et al*, 2009; Patrick *et al*, 2012).

4.4.5. Nitazoxanida

É uma tiazolida que tem atividade antiparasitária *in vivo* e atividade contra diversas bactérias anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas *in-vitro* (Fox e Saravolatz, 2005). Existem estudos acerca da eficácia deste composto, no entanto, não permitem conclusões acerca da superioridade ou inferioridade deste relativamente ao metronidazol e à vancomicina (Musher *et al*, 2006; Musher *et al*, 2007; Musher *et al*, 2009). São necessários estudos maiores para comparar a eficácia da nitazoxanida com a

de terapias convencionais, para ajudar a definir a sua atividade contra a infecção por *C.difficile*.

4.4.6. Fidaxomicina

A fidaxomicina é um novo antibiótico macrocíclico aprovado para o tratamento da infecção por *C.difficile* em 2011 que atua inibindo a RNA polimerase bacteriana (Mullane e Gorbach, 2011). Este fármaco parece ser mais ativo do que a vancomicina contra isolados clínicos de ribótipo 027/NAP1 *in vitro* (Louie *et al*, 2011). Tem um espectro de atividade estreito contra o *C.difficile* e não é eficaz contra bactérias Gram-negativas, fungos ou protozoários e pode, portanto, ajudar a preservar a normalidade da microbiota (Mullane e Gorbach, 2011; Tannock *et al*, 2010). A fidaxomicina também pode ser mais eficaz uma vez que é bactericida, enquanto que a vancomicina é bacteriostática. Foi também observada uma redução significativa da taxa de recorrência em pacientes tratados com fidaxomicina (15,4%), comparados com os da vancomicina (25,3%). A fidaxomicina pode ser mais eficaz do que a vancomicina no tratamento de pacientes com infecção por *C.difficile* que também estão a tomar outros antibióticos para infecções concomitantes (90% dos pacientes que receberam fidaxomicina tiveram uma resolução da diarreia *versus* 79,4% para os que receberam vancomicina) (Mullane *et al*, 2011).

4.4.7. Resinas de permuta aniónica

Resinas de permuta aniónica, tal como a colestiramina, ligam-se às toxinas do *C.difficile*, contudo, não são tão eficazes como os antibióticos padrão e quando administrados em conjunto, ligam-se à vancomicina administrada oralmente. Têm sido usadas em pacientes nos quais a terapia antibiótica falhou (Trudel, 2007).

4.4.8. Probióticos

Quanto aos probióticos, o seu papel na infecção por *C.difficile* permanece incerto. Estes podem ser definidos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (Miller, 2009). Os probióticos mais estudados incluem várias espécies de *Lactobacillus* e uma levedura, *Saccharomyces boulardii*. Estudos referem vantagens em utilizar probióticos como adjuvantes da terapia padrão para o tratamento de pacientes graves ou recorrentes na

infecção, ou para prevenir a infecção por *C.difficile* (McFarland, 2006). Outras revisões recentes, concluíram que os dados existentes eram insuficientes para sustentar o uso de probióticos em pacientes com infecção por *C.difficile*, podendo ainda haver o risco de fungemia ou bacteremia devido ao organismo probiótico, especialmente em imunocomprometidos (Miller, 2010; Pillai e Nelson, 2008).

4.4.9. Transplante fecal

O transplante fecal, tem sido um dos tratamentos para a infecção grave ou recorrente (de um doador saudável para o paciente que já teve recaídas múltiplas e é refratário a todas as formas de terapia). A administração (de bactérias fecais) é realizada através de sonda nasogástrica, colonoscópio, ou enema, com o principal objetivo de reconstituir a microbiota intestinal dos pacientes. Esta abordagem, tem sido notavelmente eficaz em várias séries de estudos (Aas *et al*, 2003; Bakken, 2009; MacConnachie *et al*, 2009).

4.4.10. Tratamento cirúrgico

A cirurgia é raramente indicada sendo necessária em apenas 0,4 a 5 % dos casos. A cirurgia é reservada para complicações da doença, tais como a colite fulminante, a não resposta ao tratamento médico, megacólon tóxico e perfuração. Cerca de 3 a 20 % dos pacientes com CPM desenvolvem sintomas sistêmicos de sépsis com febre, taquicardia e leucocitose. Um tratamento médico agressivo deve ser prontamente instituído, de preferência numa unidade de cuidados intensivos. Em geral, de 65 a 100% dos doentes com colite fulminante requer cirurgia. Em pacientes tóxicos, a resolução da diarreia pode representar um sintoma de deterioração em vez de melhorar. A diarreia irá parar por causa da dismotilidade colónica, com perfuração iminente. A intervenção cirúrgica é indicada por causa do alto risco de perfuração e a alta taxa de mortalidade associada a esta apresentação (Trudel, 2007).

A cirurgia é uma decisão crítica porque pode salvar vidas, mas também está associada a uma mortalidade de 25 a 75 % (Jaber *et al*, 2008). As taxas de mortalidade aumentaram sobretudo em pacientes imunocomprometidos, pacientes idosos e pacientes com doenças malignas. Em geral, a condição médica subjacente, a gravidade da doença, e atrasos no diagnóstico e intervenção cirúrgica, afetam diretamente as elevadas taxas de mortalidade. A operação de escolha é a colectomia subtotal com ileostomia final. Procedimentos menores como colectomia segmentar, laparotomia não terapêutica ou

cecostomia para instilação de vancomicina estão associadas com uma taxa de mortalidade proibitiva. Os achados endoscópicos não são preditivos da gravidade da doença, e a identificação endoscópica de pseudomembranas num segmento limitado do cólon não exclui a doença em outros locais do cólon (Trudel, 2007).

4.4.11. Imunoterapia

Vacinação dirigida às toxinas: o principal objetivo para impedir a infecção por *C.difficile* recorrente é o desenvolvimento de uma vacina que irá estimular uma resposta imunitária das mucosas e proteger contra a colonização pelo mesmo. Uma grande variedade de estratégias para vacinas encontra-se em investigação.

Recentemente, Pempoonpattana *et al* avaliaram os domínios de repetição C-terminal das TcdA e TcdB (associados com a ligação à célula hospedeira), utilizando esporos de *B.subtilis* como veículo de entrega de antígenos possivelmente protetores. Hamsters imunizados com esporos de *B.subtilis* que expressam o domínio de repetição TcdA foram protegidos da infecção. Os hamsters imunizados com esporos que expressam os domínios de repetição de ambas as toxinas, TcdA e TcdB, do *C.difficile*, produziram concentrações elevadas de anticorpos IgA e IgG, e estes anticorpos neutralizaram as TcdA e TcdB *in vitro*. Curiosamente, hamsters sobreviventes imunizados com esporos de *B.subtilis* que expressam o domínio TcdA, foram totalmente protegidos contra a reinfecção por *C.difficile* (Permponpattana *et al*, 2011).

Um outro estudo, explorou a eficácia e segurança de um anticorpo monoclonal contra o *C.difficile* TcdA. Neste estudo concluiu-se que um nível sérico baixo de anticorpos anti-TcdB está associado e pode ser indicativo de recorrência de infecção por *C.difficile*. então, os anticorpos contra ambas as toxinas, provavelmente, previnem a recorrência de infecção por *C.difficile*. Uma combinação de anticorpos monoclonais humanos, foi recentemente licenciada pela Merck, tendo como alvo as toxinas A e B neutralizando-as. Num ensaio clínico de fase II, um tratamento intravenoso com esta combinação de anticorpos reduziu a recorrência de CDI em 70% (Lowy *et al*, 2010).

Vacinação dirigida a outras moléculas do *C.difficile*: a protéase Cwp84 pode representar um candidato para o desenvolvimento de uma vacina para o *C.difficile*.

Hamsters imunizados foram tratados com clindamicina e depois testados com esporos de *C.difficile*. Os hamsters imunizados com Cwp84 sobreviveram mais tempo, sendo que 90% dos hamsters morreu no grupo de controlo, enquanto que 33% dos imunizados com Cwp84 sobreviveram ao desafio. Assim, Pechine *et al* demonstrou que a vacinação com Cwp84 no cólon proporciona um nível mais elevado de proteção contra infeção por *C.difficile* (Péchiné *et al*, 2011). O uso do Cwp84 para vacina continua em exploração. O polissacarídeo de superfície PS-II é outro possível candidato para a vacinação contra o *C.difficile* (Oberli *et al*, 2011).

Paciente suspeito de diarreia associada ao *Clostridium difficile*

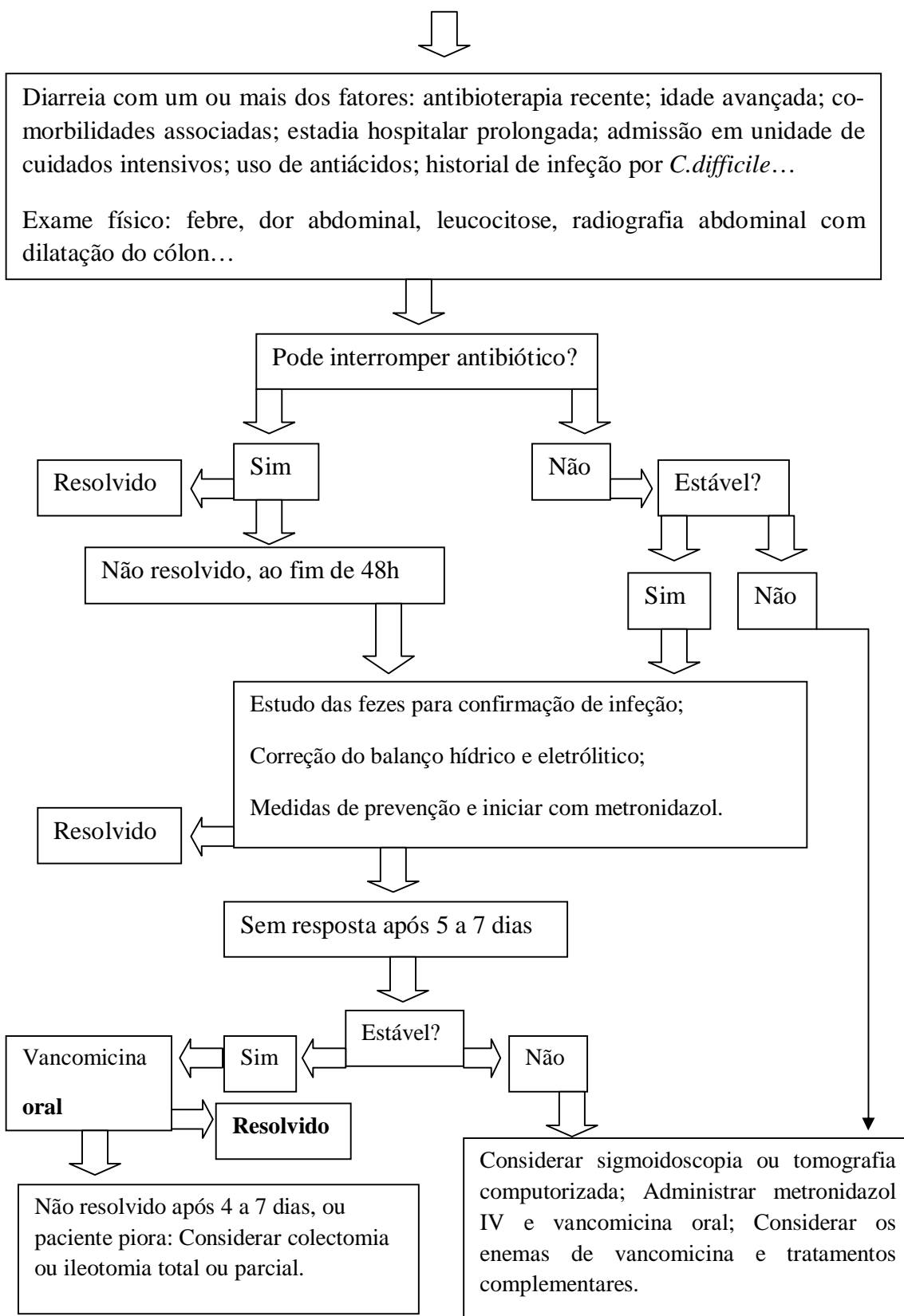


Figura 7: Diagnóstico e tratamento da infeção por *C.difficile* (algoritmo adaptado de Schroeder, 2005).

Tabela V: Tratamento da infecção por *Clostridium difficile* (Andrew e Simor 2010; Lamont, 2004; Bartlett, 2010)

| Categoria | Caraterísticas | Tratamento |
|-------------------------|---|---|
| Leve a moderada | Diarréia, alguma dor abdominal, anorexia, náuseas, ausência de febre ou baixa, sem evidências de leucocitose e desidratação; Sigmoidoscopia: sem pseudomembranas. | Suspender antibiótico causador, se possível; Metronidazol oral (500 mg, 3x/dia, 10-14 dias). |
| Severa | Presença de CPM; diarreia persistente (15 a 30 vezes por dia), náuseas, anorexia, dores abdominais, febre; Leucocitose, hipoalbuminemia, edema ou ascite. | Suspender antibiótico causador, se possível; Vancomicina oral (125 mg, 4x/dia, 10-14 dias). |
| Infeção fulminante | Diarréia, febre alta, dor abdominal difusa; Hipotensão, choque, acidose, leucocitose, hipoalbuminemia, ascite, edema, presença de pseudomembranas; Íleo ou megacólon tóxico, perfuração do cólon. | Metronidazol IV (500 mg, 4x/dia, 10-14 dias); considerar vancomicina via entérica (Sonda NG) ou por enema (500 mg, 4x/dia) e consulta de cirurgia. |
| 1ª Recorrência | | Metronidazol ou vancomicina, como no episódio inicial, dependendo da severidade da doença. |
| Recorrências sucessivas | Semelhante ao 1º episódio, podendo apresentar maior ou menor severidade. | Vancomicina oral (tratamento prolongado e com diminuição progressiva da dose): 125 mg cada 6h, 14 dias; 125 mg cada 12h, 7 dias; 125 mg/dia, 7 dias; 125 mg dias alternados, 8 dias; 125 mg cada 3 dias, 15 dias. Outros tratamentos: probióticos, colestiramina, imunoglobulina IV... |

4.3. Medidas de prevenção

As medidas de prevenção englobam a prevenção da ingestão do microrganismo e dos seus esporos através da aplicação de medidas de controlo ambiental, higiene pessoal e métodos de barreira, e a redução das hipóteses de doença após o contágio pela minimização de exposição a antibióticos.

A rápida identificação de doentes com sintomatologia compatível com a DACD é essencial, de modo a que medidas de isolamento possam ser rapidamente instituídas e o tratamento prontamente iniciado atenuando assim a contaminação do meio (Dubberk *et al*, 2008). Quanto a portadores assintomáticos, não existe evidências que defendam o isolamento destes e há estudos que comprovam a ineficácia do tratamento destes pacientes (Gerding *et al*, 2008; Mayfield *et al*, 2000).

As medidas de isolamento de contato devem ser instituídas no tratamento de doentes suspeitos ou com a confirmação de infeção por *C.difficile*. O CDC recomenda que as medidas de isolamento de contato se mantenham apenas durante o período de doença (Centers for Disease Control and Prevention, 2005), já outros peritos consideram que estas medidas devem ser mantidas até pelo menos 48 horas após a resolução da sintomatologia do doente (Department of Health and Health Protection Agency). É importante salientar que quando possível, doentes suspeitos ou com diagnóstico de DACD devem ser internados em quartos individuais.

Qualquer superfície ou instrumento que seja contaminado com fezes pode servir de reservatório para os esporos. A higienização da unidade onde o doente se encontra deve ser realizada de acordo com as normas da instituição referentes a situações de isolamento de contato. O material de higienização utilizado deve ser exclusivo só para o quarto onde se encontra o doente. Apesar de uma grande variedade de produtos de limpeza poderem ser eficazes na destruição das formas vegetativas do *C.difficile* (Fawley *et al*, 2007), alguns estudos revelam que apenas os desinfetantes derivados do cloro e do peróxido de hidrogénio vaporizado em altas concentrações são esporicidas ou inibem a esporulação (Otter *et al*, 2006; Rutala e Weber, 1997). Em casos de surtos ou hiperendemicidade alguns dados recomendam a aplicação de soluções contendo concentrações de hipoclorito de sódio de 500 a 1600 ppm (Rutala e Weber, 1997).

No que respeita à higiene pessoal, uma correta higiene das mãos é a principal ação capaz de reduzir a transmissão cruzada de infeções associadas à prestação de cuidados, já que os profissionais de saúde em contato permanente com estes ambientes são um importante vetor de transmissão do *C.difficile* (Pittet *et al*, 2006).

Nenhum dos produtos anti-sépticos mais usados na higienização das mãos (álcool, clorhexidina, hexaclorofeno, iodoforos, cloroxinde ou triclosan) é garantidamente eficaz contra os esporos do *C.difficile* (WHO guidelines on hand hygiene in health care). Estes esporos podem ser removidos através da ação física ao esfregar as mãos e passá-las por água (Boyce e Pittet, 2002).

No caso de profissionais de saúde que cuidam de doentes infetados por *C.difficile*, deve ser preferida a lavagem das mãos com água e sabão com uma técnica correta, ao uso de soluções alcoólicas (Dubberke *et al*, 2008). Mesmo com a utilização de luvas, estas devem ser removidas logo após a sua utilização, eliminadas no interior do quarto e as mãos imediatamente lavadas segundo técnica asséptica ou alternativamente com lavagem higiénica das mãos complementada pela aplicação de uma solução alcoólica (Dubberk *et al*, 2008; WHO guidelines on hand hygiene in health care).

Como proteção barreira, são usadas habitualmente luvas, bata, máscara e proteção ocular (óculos, máscara com viseira). Estas têm o objetivo de proteger a pele descoberta, o vestuário e as mucosas de eventuais salpicos de sangue, fluidos corporais, secreções e excreções. Devem ser removidas e trocadas de imediato após o tratamento de cada doente e antes de cuidar de outro (Dubberke *et al*, 2008).

Quanto à terapia antibiótica, esta constitui o principal fator predisponente para a DACD. As intervenções no âmbito da redução de prescrições inadequadas de antibióticos de largo espetro alcançam, em muitos estudos, êxito na redução da taxa de DACD (Climo *et al*, 1998; Davey *et al*, 2005; Khan e Cheesbrough, 2003; O`Conner *et al*, 2004). Regular a utilização de antibióticos de largo espetro, prevenir a terapia a longo prazo, reduzir a polimedicação e evitar a prescrição incorreta são medidas importantes na prevenção de surtos e na redução da incidência da DACD (Vonberg *et al*, 2008).

Em Portugal a infeção por *C.difficile* não é uma doença de declaração obrigatória ao contrário do Reino Unido em que a DACD é de declaração obrigatória em todos os doentes com idade superior a 65 anos desde 2004 e em todos os doentes acima dos 2 anos de idade desde 2007. A vigilância epidemiológica da DACD é uma medida útil para determinar a incidência e prevalência em cada unidade de prestação de cuidados de saúde. Uma boa comunicação entre médico, laboratório e entidades responsáveis pela vigilância epidemiológica pode ser efetuada mediante alertas por fax, chamada telefónica, ou sistemas eletrónicos automáticos, e estes dados auxiliam na determinação se existe a necessidade de implementar intervenções mais agressivas no controlo da infeção por *C.difficile* em determinado momento (Dubberke *et al*, 2008).

V- Considerações finais

O *C.difficile* é considerado uma fonte significativa de morbidade e mortalidade associada à prestação de cuidados de saúde, principalmente entre os mais idosos. Nos últimos anos, vários estudos epidemiológicos demonstram um aumento preocupante da incidência, da gravidade e das taxas de recorrência das infecções por *C.difficile*. Este aumento de incidência pode ser explicado pela melhoria dos métodos de detecção utilizados, mas também por fatores inerentes ao *C.difficile* (salientando-se a virulência da estirpe B1/NAP1/027), bem como pelo aumento de outros fatores de risco associados, focando-se o uso crescente de antibióticos. Existe uma necessidade de um uso racional dos antibióticos, principalmente os de largo espectro.

Em Portugal, os dados epidemiológicos relativos a este tipo de infeção são escassos, o que dificulta uma real análise desta realidade no país. É importante a realização de estudos prospetivos controlados, de modo a definir a real incidência da DACD em Portugal e quais os fatores preponderantes na evolução epidemiológica da doença, tendo a especial atenção à emergência de estirpes virulentas.

Todos os prestadores de saúde devem estar sensibilizados para as formas de transmissão, de infeção e de prevenção do *C.difficile*, tornando-se participantes ativos na redução da transmissão de infeções e no aperfeiçoamento da qualidade dos serviços prestados. Deve investir-se em estratégias de otimização e vigilância da prescrição antibiótica assim como manter ações de controlo ambiental e de higiene pessoal, havendo cooperação entre médico, farmacêutico, microbiologista, enfermeiro e restantes prestadores de cuidados.

A devida sensibilização e formação sobre este problema, bem como a implementação de sistemas de alerta a nível hospitalar que permitam controlar a infeção cruzada e detetar ou evitar atempadamente a ocorrência de surtos, serão as linhas a seguir para uma redução da infeção nosocomial por *C.difficile*. Isto será importante, pois na prevenção é que estará o ganho, tanto para o sistema nacional de saúde (diminuição do tempo de internamento), como para os pacientes a nível de qualidade dos cuidados de saúde que lhe são prestados, bem como para os próprios prestadores de cuidados de saúde que serão reconhecidos pela qualidade dos serviços prestados e toda a unidade hospitalar terá maior segurança no que respeita a infeções cruzadas, neste caso especificamente a nível de ocorrência de infeções por *C.difficile*. Será este o caminho para o controlo, prevenção e posterior diminuição da incidência das infeções por *C.difficile*.

VI- Referências bibliográficas

Aas, J., Gessert, C.E. e Bakken, J.S. (2003). Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via nasogastric tube. *Clin Infect Dis*, 36, pp 580-585.

Abangergi, M.S. *et al* (2010). Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe *Clostridium difficile* colitis: an observational study and review of literature. *J Hosp Med*, 5, pp 1-9.

Ackermann, G. *et al* (2003). Prevalence and association of macrolid-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*, 51, pp 599-603.

Akerlund, T. *et al* (2008). Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. *J Clin Microbiol*, 46, pp 1530-1533.

Alcalá, L. *et al* (2004). Recomendaciones de la Sociedade Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Bacterias Anaerobias*, 16, pp 1-22.

Aldeyab, M. *et al* (2009). Quasiexperimental study of the effects of antibiotic use, gastric acid-suppressive agents, and infection control practices on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp 2082-2088.

Alfa, M.J. *et al* (2000). Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, 38, pp 2706-2714.

Almeida, N. *et al* (2006). Colite pseudomembranosa – uma casuística de internamentos. *J Port Gastrenterol*, 13, pp 6-13.

- Andrew, E. e Simor, M.D. (2010). Diagnosis, management and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: A review. *JAGS*, 58(8), pp 1556-1564.
- Archibald, K., Banerjee, N. e Jarvis, R. (2004). Secular Trends in Hospital-Acquired *Clostridium difficile* disease in the United States, 1987-2001. *J Inf Diseases*, 189, pp 1585-1589.
- Arteaga, A. *et al* (2009). Riesgo epidémico de la enfermedad asociada a una nueva estirpe de *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(5), pp 278-284.
- Asensio, A. *et al* (2008). Increasing rates in *Clostridium difficile* infection (CDI) among hospitalized patients, Spain, 1999-2007. *Euro Surveill*, 13, pp 350-353.
- Asensio, A. e Monge, D. (2012). Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30(6), pp 333-337.
- Aslam, S. e Musher, D.M. (2006). Na update on diagnosis, treatment and prevention of *C.difficile*-associated disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 35, pp 315-335.
- Backhed, F. *et al* (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, pp 1915-1920.
- Baines, S.D. *et al* (2008). Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*, 62, pp 1046-1052.
- Bakken, J.S. (2009). Faecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 15, pp 295-299.
- Barbut, F. *et al* (2000). Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19, pp481-484.

Barbut, F. *et al* (2003). A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *C.difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 9, pp 989-996.

Barbut, F. *et al* (2005). Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhea due to binary toxin (actin-specific-ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol*, 54, pp 181-185.

Barbut, F. *et al* (2007). Clinical features of *C.difficile*-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 28, pp 131-139.

Barbut, F. *et al* (2009). Rapid diagnosis of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools by real time PCR. *J Clin Microbiol*, 47, pp 1276-1277.

Barketi-Klai, A.*et al* (2011). Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *J Med Microbiol*, 60, pp 1155-1161;

Bartlett, J.G. (2002). Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*, 346(5), pp 334-339.

Bartlett, J.G. (2006). The new epidemic of *C. difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med*, 145, pp 758-764.

Bartlett, J.G. (2008). The case for vancomycin as the preferred drug for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, 46, pp 1489-1492.

Bartlett, J.G. (2010). *Clostridium difficile*: progress and challenges. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, pp 62-69.

Bauer, M.P. *et al* (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*, 377, pp 63-73.

Beaugerie, L. *et al* (2003). Antibiotic – associated diarrhea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther*, 17, pp 905-912.

- Belmares, J. *et al* (2009). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* over the course of 10 years in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis*, 49, pp 1141-1147.
- Bentley, A.H. *et al* (1998). Multicentre evaluation of a commercial test for the rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-mediated antibiotic-associated diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17, pp 788-790.
- Bernstein, C. e Shanahan, F. (2008). Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*, 57, pp 1185-1191.
- Blondeau, J.M. (2009). What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile*-associated diarrhea? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp 238-242.
- Boyce, J.M. e Pittet, D. (2002). Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/ Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*, 51, pp 1-45.
- Bruggmann, H. e Gottschalk, G. (2008). Comparative genomics of clostridia link between the ecological niche and cell surface properties. *Ann N Y Acad Sci*, 1125, pp 73-81.
- Borriello, S. P. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, pp 13-19.
- Buffet-Bataillon, S. (2012). *Clostridium difficile* O27 colitis: Hospital-onset but community-acquired. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, pp 2263-2267.
- Calabi, E. *et al* (2002). Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun*, 70, pp 5770-5778.

Calfee, D. (2008). *Clostridium difficile*: a reemerging pathogen. *Geriatrics*, 63(9), pp 10-21.

Cardoso, F., Miranda, J. e Araújo, J. (2011). Colite por *Clostridium difficile* numa enfermaria em medicina interna. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*, 18 (2), pp 67-70.

Carroll, K.C. e Bartlett, J.G. (2011). Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol*, 65, pp 501-521.

Cash, H. *et al* (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313, pp 1126-1130.

Centers of Disease Control and Prevencion. Information for healthcare providers (2005). [em linha]. Disponível em http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/id_CdiffFAQ_HCP.html [consultado em 18/12/2012].

Chang, J. *et al* (2008). Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis*, 197, pp 435-438.

ChapetónMontes, D. *et al* (2011). Localization of the *Clostridium difficile* cysteine protease Cwp84 and insights into its maturation process. *J Bacteriol*, 193, pp 5314-5321.

Climo, M.W. *et al* (1998). Hospital-wide restriction of clindamycin: Effect on the incidence of *Clostridium dificile*-associated diarrhea and cost. *Ann Intern Med*, 128, pp 989-995.

Cloud, J. e Kelly, C. (2007). Update on *Clostridium difficile* associated disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 23(1), pp 4-9.

Cohen, D.N. *et al* (2010). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and

the Infections Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31, pp 431-455.

Cunha, A. (2001). Antibiotics side effects. *Medical Clinics of North America*, 85(1), pp 149-185.

Cunningham, R. *et al* (2003). Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhea. *J Hosp Infect*, 54, pp 243-245.

Curry, S.R. *et al* (2009). High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. *Clin Infect Dis*, 48, pp 425-429.

Darfeuille-Michaud, A. *et al* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn`s disease. *Gastroenterology*, 127, pp 412-421.

Davey, P. *et al* (2005). Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, pp 35-43.

Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de Agosto: Estatuto do Medicamento. [em linha].

Disponível em

<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/LEGISLACAO/LEGISLACA_O_FARMACEUTICA_COMPILADA/TITULO_III/TITULO_III_CAPITULO_I/035-E_DL_176_2006_VF.pdf> [consultado em 18/12/2012].

Department of Health and Health Protection Agency. *Clostridium difficile* infection: how to deal with the problem.[em linha]. Disponível em

<http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_093220> [consultado em 18/12/2012].

Dharmajaran, T. *et al* (2000). Co-morbidity, not age predicts outcome in *Clostridium difficile* colitis. *World J Gastroenterol*, 6, pp 189-201.

Dial, S. *et al* (2005). Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA*, 294, pp 2989-2995.

Dial, S. *et al* (2008). Patterns of antibiotic use and risk of hospital admission because of *Clostridium difficile* infection. *CMAJ*, 179(8), pp 767-772.

Dobson, G., Hickey, C. e Trinde, J. (2003). *Clostridium difficile* colitis causing toxic megacolon, severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*, 29, pp 1030.

Dridi, L. *et al* (2002). *gyrA* and *gyrB* mutations are implicated in cross-resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, pp 3418-3421.

Drudy, D. *et al* (2006). High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*, 58, pp 1264-1267.

Drudy, D. *et al* (2008). Clindamycin-resistant clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14, pp 1485-1487.

Dubberk, E.R. *et al* (2007). Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *Am J Infect Control*, 35, pp 315-318.

Dubberk, E.R. *et al* (2008). Strategies to prevent *Clostridium difficile* infections in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29, pp 81-92.

Eastwood, K. *et al* (2009). Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C.difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J Clin Microbiol*, 47, pp 3211-3217.

- Eckert, A. e Barbut, F. (2010). Infections à *Clostridium difficile*. *Medicine/Sciences*, 26(2), pp 153-158.
- Eckburg, P. *et al* (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, pp 1635-1638.
- Elliot, B. *et al* (2007). *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Intern Med J*, 37, pp 561-568.
- Fawley, W.N. *et al* (2007). Efficacy of hospital clean agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 28, pp 920-925.
- Ferreira, C., Pires, A. e Cruz, J. (1999). Colite pseudomembranosa. *Jornal de Pediatria*, 75(6), pp 463-466.
- Fox, L.M. e Saravolatz, L.D. (2005). Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis*, 40, pp 1173-1180.
- Fred, C. *et al* (2012). Antimicrobial-Resistance Strains of *Clostridium difficile* from North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), pp 2929-2932.
- Freeman, J. *et al* (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol*, 23, pp 529-549.
- Garey, K.W. *et al* (2009). Rifaximin in treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an uncontrolled pilot study. *J Clin Gastroenterol*, 43, pp 91-93.
- Gayatri, V. *et al* (2012). *Clostridium difficile* infection. Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes*, 3(2), pp 121-134.
- George, R. (1986). The carrier state: *Clostridium difficile*. *Antimicrob Chemother*, 18 (Suppl. A), pp 47-58.

Gerding, D.N., Muto, C.A. e Owens, R.C. (2008). Treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, 46, pp 32-42.

Gonçalves, C. *et al* (2004). Prevalence and characterization of a binary toxin (Actin-specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 42, pp 1933-1939.

Hawrelak, J. e Myers, S. (2004). The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*, 9, pp 180-197.

Hennequin, C. *et al* (2003). Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 149, pp 2779-2787.

Hensgens, M.P. *et al* (2009). Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. *Euro Surveill*, 14, pp 19402.

Hensgens, M.P. *et al* (2012). Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 67, pp 742-748.

Hookman, P. *et al* (2009). *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol*, 15(13), pp 1554-1580.

Hooper, L., Midwedt, T. e Gordon, J. (2002). How host microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, 22, pp 283-307.

Hopkins, M. *et al* (2005). Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridization analyses. *FEMS Microbiol Ecol*, 54, pp 77-85.

Huang, H. *et al* (2009). Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents*, 34, pp 516-522.

Huang, H. *et al* (2010). Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe*, 16, pp 633-635.

- Hull, M.W. e Beck, P.L. (2004). *Clostridium difficile*-associated colitis. *Can Fam Physician*, 50, pp 1536-1545.
- Hurley, W. e Nguyen, C. (2002). The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Arch Intern Med*, 162, pp 2177-2184.
- Iizuka, M. *et al* (2004). Elemental diet modulates the growth of *Clostridium difficile* in the gut flora. *Aliment Pharmacol Ther*, 20, pp 151-157.
- Jaber, M.R. *et al* (2008). Clinical review of the management of fulminant *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol*, 103, pp 3195-3203.
- Janoir, C. *et al* (2007). Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity an extracellular matrix proteins. *J Bacteriol*, 189, pp 7174-7180.
- Jernberg, C. *et al* (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J*, 1, pp 56-66.
- Jobe, A. (1995). *Clostridium difficile* colitis: an increasing hospital-aquired illness. *Am J Surg*, 169, pp 480-483.
- Johnson, S. *et al* (2007). Interruption of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. *Clin Infect Dis*, 44, pp 846-848.
- Johnson,S. *et al* (2009). Rifaximin redux: treatment of recurrent *Clostridium difficile* infections with rifaximin immediately post-vancomycin treatment. *Anaerobe*, 15, pp 290-291.
- Johnson, S. (2009). Recurrent *Clostridium difficile* infection: A review of risk factors, treatment, and outcomes. *J Infect*, 58, pp 403-410.

- Kato, H. *et al* (2005). Rapid and simple method for detecting toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 43, pp 6108-6112.
- Kelly, C.P. (2009). A 76-year-old man with recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *JAMA*, 301, pp 954-962.
- Kelly, C. e LaMont, J. (1998). *Clostridium difficile* infection. *Annu Rev Med*, 49, pp 375-390.
- Kelly, C.P. e Lamont, J.T. (2008). *Clostridiunn difficile*-more difficult then ever. *N Engl J Med*, 359, pp 1932-1940.
- Khan, R. e Cheesbrough, J. (2003). Impact of changes in antibiotic policy on *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) over a five year period in a district general hospital. *J Hosp Infect*, 54, pp 104-108.
- Kuijper, E.J., Coignard, B. e Tull, P. (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 12(6), pp 2-18.
- Kyne, L. *et al* (2000). Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*, 342. Pp 390-397.
- Kyne, L. *et al* (2001). Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. *Lancet*, 357, pp 189-193.
- Kyne, L. *et al* (2002). Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 34, pp 346-353.
- Lalla, F. *et al* (1992). Prospective study of oral teicoplanin *versus* oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, pp 2192-2196.
- Lamont, J.T. (2004). *Clostridium difficile* colitis. *European Surgery*, 36(3), pp 161-165.

- Lepage, P. *et al* (2008). Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut*, 57, pp 424-425.
- Leav, B.A. *et al* (2010). Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). *Vaccine*, 28, pp 965-969.
- Ley, R. *et al* (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, pp 1647-1651.
- Ley, R., Peterson, D. e Gordon, J. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124, pp 837-848.
- Loo, V.G. *et al* (2011). Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med*, 365, pp 1693-1703.
- Louie, T.J. *et al* (2011). OPT-80-003 Clinical Study Group. Fidaxomicin *versus* vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*, 364, pp 422-431.
- Lowy, I. *et al* (2010). Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med*, 362, pp 197-205.
- Lyras, D. *et al* (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458, pp 1176-1179.
- MacConnachie, A. *et al* (2009). Faecal transplant for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea: A UK case series. *Q J Med*, 102, pp 781-784.
- Mamoon, A. *et al* (2012). An evaluation of the impact of antibiotic stewardship on reducing the use of high-risk antibiotics and its effect on the incidence of *Clostridium difficile* infection in hospital settings. *J Antimicrob Chemother*, 67, pp 2988-2996.
- Manichanh, C. *et al* (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn`s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55, pp 205-211.

- Mayfield, J.M.I. *et al* (2000). Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Infect Control Hospital Epidemiol*, 31, pp 995-1000.
- Mazmanian, S. *et al* (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, pp 107-118.
- McDonald, L. *et al* (2005). An epidemic, toxin gene-variant strain of *C.difficile*. *N Engl J Med*, 353, pp 2433-2441.
- McDonald, L., Owings, M. e Jernigan, D. (2006). *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*, 12, pp 409-415.
- McFarland, L.V., Elmer, G.W. e Surawicz, C.M. (2002). Breaking the cycle: treatment strategies for 136 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol*, 97, pp 1769-1775.
- McFarland, L.V. (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol*, 101, pp 812-822.
- McFarland, L.V. (2009). Renewed interest in a difficult disease. *Clostridium difficile* infections: epidemiology and current treatment strategies. *Curr Opin Gastroenterol*, 25, pp 24-35.
- McFee, R.B. e Abdelsayed, G.G. (2009). *Clostridium difficile*. *Dis Mon*, 55, pp 4439-470.
- Medelings, M.D., Sorvillo, F. e Mascola, L. (2007). Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg Infect Dis*, 9, pp 13.
- Merrigan, M. (2010). Hypervirulent *Clostridium difficile* strains: Adherence, toxin production and sporulation. *Microbiology and Immunology*, 178.

Miller, M. (2009). The fascination with probiotics for *Clostridium difficile* infection: lack of evidence for prophylactic or therapeutic efficacy. *Anaerobe*, 15, pp 281-284.

Miller, M. (2010). Fidaxomicin (OPT-80) for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Expert Opin Pharmacother*, 11, pp 1569-1578.

Morris, A. et al (2001). *Clostridium difficile* colitis: an increasingly aggressive iatrogenic disease. *Dis Colon Rectum*, 44, pp 5-26.

Mullane, K.M. et al (2011). Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. *Clin Infect Dis*, 53, 440-447.

Mullane, K.M. e Gorbach, S. (2011). Fidaxomicin: first-in-class macrocyclic antibiotic. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, pp 767-777.

Musher, D.M. et al (2006). Nitazoxanide for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Clin Infect Dis*, 43, pp 421-427.

Musher, D.M. et al (2007). *Clostridium difficile* colitis that fails conventional metronidazole therapy: response to nitazoxanide. *J Antimicrob Chemother*, 59, pp 705-710.

Musher, D.M. et al (2009). Nitazoxanide versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection: a randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis*, 48, pp 41-46.

Mylonakis, E., Ryan, E. e Calderwood, S. (2001). *Clostridium difficile*-associate diarrhea. *Arch Intern Med*, 161, pp 525- 533.

Na, X. et al (2005). *Clostridium difficile* toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP Kinase pathway in human colonocytes. *Gastroenterology*, 128, pp 1002-1011.

Norén, T. *et al* (2011). Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for *Clostridium difficile* detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard. *J Clin Microbiol*, 49, pp 710-711.

Oberli, M.A. *et al* (2011). A possible oligosaccharideconjugate vaccine candidate for *Clostridium difficile* is antigenic and immunogenic. *Chem Biol*, 18, pp 580-588.

O'Conner, K.A. *et al* (2004). Antibiotic prescribing policy and *Clostridium difficile* diarrhea. *Q J Med*, 97(7), pp 423-429.

O'Connor. J.R. *et al* (2008). Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, pp 2813-2817.

Otter, J.A. *et al* (2006). Hydrogen peroxide vapour decontamination in an overcrowded tertiary care referral centre: some practical answers. *J Hosp Infect*, 62, pp 384-385.

Patrick, B.P. *et al* (2010). Rifaximin therapy for metronidazole-unresponsive *Clostridium difficile* infection: a prospective pilot trial. *Ther Adv Gastroenterol*, 3, pp 221-225.

Pechine, S. *et al* (2007). Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. *Vaccine*, 25, pp 3946-3954.

Péchiné, S. *et al* (2011). Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63, pp 73-81.

Peláez, T. *et al* (2002). Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, pp 1647-1650.

Peláez, T. *et al* (2008). Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogenous. *J Clin Microbiol*, 46, pp 3028-3032.

Peltier, J. *et al* (2011). *Clostridium difficile* as an original peptidoglycan structure with a high level of N-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links. *J Biol Chem*, 286, pp 29053-29062.

Pépin, J. *et al* (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMJA*, 171(5), pp 466-472.

Pépin, J., Valiquette, L. e Cossette, B. (2005). Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMJA*, 173, pp 1037-1042.

Permpoonpattana, P. *et al* (2011). Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun*, 79, pp 2295-2302.

Pillar, A. e Nelson, R. (2008). Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 2, pp 1556-1564.

Pittet, D. *et al* (2006). Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis*, 6, pp 641-652.

Pituch, H. *et al* (2002). Variable flagella expression among clonal toxin A-/B+ *Clostridium difficile* strains with highly homogeneous flagellin genes. *Clin Microbiol Infect*, 8, pp 187-188.

Poutanen, S.M. e Simor, A.E. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 171, pp 51-58.

Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H. e Vos, W. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol*, 9, pp 2125-2136.

Resmik, E. e Lefevre, A. (2001). Fulminant *Clostridium difficile* colitis associated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy. *Internal J Gynecol Cancer*, 9, pp 512-514.

Roberts, A.P. *et al* (2001). Comparison of Tn5397 from *Clostridium difficile*, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW459 *tet*(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. *Microbiology*, 147, pp 1243-1251.

Rocha, M., Sidrim, J. e Lima, A. (1999). O *Clostridium difficile* como agente indutor da diarreia inflamatória. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(1), pp 47-52.

Rodriguez-Pardo, D., Mirelis, B. e Navarro, F. (2013). Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(4), pp 254-263.

Rubin, S., Bodenstein, E. e Kent, C. (1995). Severe *Clostridium difficile* colitis. *Dis Colon Rectum*, 38, pp 198-201.

Rupnik, M. *et al* (2005). Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol*, 54, pp 113-117.

Rupnik, M., Wilcox, M.H. e Gerding, D.N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 7, pp 526-536.

Rutala, W.A. e Weber, D.J. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev*, 10, pp 597-610.

Schroeder, M. (2005). *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *American Family Physician*, 71(5), pp 921-928.

Shannon-Lowe, J. *et al* (2010). Prevention and medical management of *Clostridium difficile* infection. *BMJ*, 340, pp 1296.

Shen, A. (2012). *Clostridium difficile* toxins: Mediators of inflammation. *Journal of Innate Immunity*, 4, pp 149-158.

- Silva, C. e Salvino, C. (2003). Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções por *Clostridium difficile*. *RBAC*, 35(2), pp 65-71.
- Solomon, K. *et al* (2011). PCR ribotype prevalence and molecular basis of macrolide-lincosamide-streptogramin (B) (MLS_B) and fluoroquinolone resistance in Irish clinical *Clostridium difficile* isolates. *J Antimicrob Chemother*, 66, pp 1976-1982.
- Sorg, J.A. e Sonenshein, A.L. (2009). Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol*, 191, pp 1115-7.
- Sousa, J.C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Edições Fernando Pessoa, 2º Edição.
- Sousa, J.C. *et al* (1998). *Microbiologia*. Vol. 1, Lidel.
- Spigaglia, P. *et al* (2005). ErmB determinants and Tn916-like elements from clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, pp 2550-2553.
- Spigaglia, P. *et al* (2009). Molecular analysis of the *gyrA* and *gyrB* quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistance *Clostridium difficile* mutants selected *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp 2463-2468.
- Spigaglia, P., Barbanti, F. e Mastrantonio, P. (2011). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 66, pp 2227-2234.
- Spigaglia, P. e Mastrantonio, P. (2002). Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 40, pp 3470-3475.
- Spigaglia, P. e Mastrantonio, P. (2004). Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *J Med Microbiol*, 53, pp 1129-1136.

Stabler, R.A. *et al* (2008). Comparative analysis of BI/NAP1/027 hypervirulent strains reveals novel toxin B-encoding gene (*tcdB*) sequences. *J Med Microbiol*, 57, pp 771–775.

Stevens, V. *et al* (2011). Cumulative antibiotic exposures over time and the risk of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Infectious Diseases*, 53(1), pp 42-48.

Stallmach, A. e Carstens, O. (2002). Role of infections in the manifestation of reactivation of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 8, pp 213-218.

Sullivan, A., Edlund, C. e Nord, C. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis*, 1, pp 101-114.

Sunenshine, R.H. e McDonald, L.C. (2006). *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med*, 73, pp 187-197.

Surawicz, M. (2007). Antibiotics and *C. difficile*: cause and cure. *J Clin Gastroenterol*, 41, pp 1-2.

Swidsinski, S. *et al* (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122, pp 44-54.

Talpaert, M.J. *et al* (2011). Impact of guidelines and enhanced antibiotic stewardship on reducing broad-spectrum antibiotic usage and its effect on incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother*, 66, pp 2168-2174.

Tamboli, C. *et al* (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, 53, pp 1-4.

Tannock, G.W. *et al* (2010). A new macrocyclic antibiotic fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of *Clostridium difficile*-infected patients than does vancomycin. *Microbiology*, 156, pp 3354-3359.

Tasteyere, A. *et al* (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun*, 69, pp 7937-7940.

Tasteyre, A. *et al* (2001). Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol*, 39, pp 1178-1183.

Trudel, J.L. (2007). *Clostridium difficile* colitis. *Clin Colon Rectal Surg*, 20, pp 13-17.

Tullus, K. *et al* (1989). Intestinal colonization with *Clostridium difficile* in infants up to 18 months of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 8, pp 390-393.

Vaishnavi, C. (2010). Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res*, 131, pp 487-499.

Vanpoucke, H. *et al* (2001). Evaluation of six comercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect*, 7, pp 55-64.

Vengadesan, K. e Narayana, S.V. (2011). Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. *Protein Sci*, 20, pp 759-772.

Vieira, A. *et al* (2010). Diarreia associada a *Clostridium difficile* num Hospital Central. *Jornal Português de Gastreenterologia*, 17, pp 10-17.

Viswanathan, V.K., Mallozzi, M.J. e Vedantam, G. (2010). *Clostridium difficile* infection: An overview of the disease and its pathogenesis, epidemiology and interventions. *Gut Microbes*, 1, pp 234-42.

Vonberg, R.P. *et al* (2008). Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 14(5), pp 2-20.

Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev*, 32, pp 287-306.

Voth, D. e Ballard, J. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 18, pp 247-263.

- Wang, M. *et al* (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 54, pp 219-231.
- Walkty, A. *et al* (2010). Molecular characterization of moxifloxacin resistance from Canadian *Clostridium difficile* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66, pp 419-424.
- Warry, M. *et al* (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile*, associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*, 366, pp 1079-1084.
- Weidenmaier, C. e Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 6, pp 276-287.
- Wenisch, C. *et al* (1996). Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*, 22, pp 813-818.
- WHO guidelines on hand hygiene in health care. [em linha]. Disponível em <http://www.who.int/patientsafety/information_centre/ghhad_download/en/index.html> [consultado em 22/12/2012].
- Wilcox *et al* (2000). Financial burden of hospital acquired *Clostridium difficile* infection. *J Hospital Infect*, 34, pp 23-30.
- Wilkins, T.D. e Lysterly, D.M. (2003). *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still Challenging. *J Clin Microbiol*, 41, pp 531-534.
- Wilson, K. (1993). The microecology of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 16, pp 214-218.

Wistrom, J. *et al* (2001). Frequency of antibiotic-associated diarrhea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother*, 47, pp 43-50.

Yam, F.K. e Smith, K.M. (2005). “Collateral damage”: antibiotics and the risk of *Clostridium difficile* infection. *Orthopedics*, 28, pp 275-279.

Zar, F.A. *et al* (2007). A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis*, 45, pp 302-330.

Zoetendal, E., Rajilic-Stojanovic, M. e Vos, W. (2008). High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57, pp 1605-1615.

