EDMIR GERALDO DE SIQUEIRA FRAGA

**Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Clostridium difficile*:
comparação de duas metodologias (disco-difusão e ágar-diluição).**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nicodemo

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fraga, Edmir Geraldo de Siqueira

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Clostridium difficile* : comparação de duas metodologias (disco-difusão e ágar-diluição) / Edmir Geraldo de Siqueira Fraga. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Antonio Carlos Nicodemo.

Descritores: 1.Clostridium difficile 2.Testes de sensibilidade microbiana 3.Resistência a medicamentos 4.Bacilos gram-positivos 5.Gastroenteropatias 6.Diarreia 7.Metronidazol 8.Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão 9.Nitazoxanida 10.Teicoplanina 11.Tigeciclina 12.Vancomicina 13.Moxifloxacino

USP/FM/DBD-215/15

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ademir e Edna, pelo apoio incondicional, sempre acreditando e investindo em meus estudos. À Deila, minha esposa, pela paciência, discernimento, estando ao meu lado durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Antonio Carlos Nicodemo**, Professor Titular do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter me concedido a honra e o privilégio de ser meu orientador acadêmico, atividade que exerceu com muito zelo e excelência, e pelos valiosos ensinamentos compartilhados, imprescindíveis ao desenvolvimento deste trabalho e ao meu crescimento intelectual e profissional. Um amigo e conselheiro! Fez-se presente mesmo com todas as dificuldades enfrentadas na realização deste projeto. Creio que para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolver em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos. Minha eterna gratidão!

Ao meu coorientador Prof. Dr. **Jorge Luiz Mello Sampaio**, liderança médica e científica do setor de Microbiologia do Fleury Medicina e Saúde, pela oportunidade, disponibilidade, dedicação e apoio ao desenvolver este projeto. Um profissional completo, além de acreditar em sua formação, confia também em sua intuição que vem através de suas experiências. Sinto-me realizado em trabalhar esses anos ao seu lado!

À **Vânia Regina Miguel**, secretária da Comissão de Cultura e Extensão do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo apoio inestimável, colaboração e dedicação durante todas as etapas de realização dessa dissertação. Tenha a certeza que sua presença em minha jornada fez toda a diferença. Obrigado pelo seu empenho e amizade desses anos!

Aos **colaboradores** dos setores de Parasitologia e Microbiologia do Laboratório Fleury, em especial aos analistas: **Marcio Alencar** e **Marino Facchin**. Pela amizade, suporte e atenção, auxiliando-me na obtenção das amostras.

Aos **colaboradores** do setor de Produção de Meios e Reativos (PMR) do Laboratório Fleury, em especial às Técnicas de Laboratório: **Zenil Queiroz** e

Rita Marcelino. Concederam-me um gentil apoio operacional. Não pouparam esforços, sendo indispensáveis para a realização e conclusão prática deste trabalho. Obrigado por me proporcionar momentos de alegria, com suas risadas!

"Deus é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei por quê. Sei que não posso desperdiçá-la."

Ayrton Senna

LISTA DE ABREVIATURAS

ABSC	- Ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril
ATCC	- American Type Culture Collection
CDI	- Infecção por <i>Clostridium difficile</i>
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>C. difficile</i>	- <i>Clostridium difficile</i>
DD	- Disco-difusão
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ECOFF	- Epidemiological cut-off values
ELISA	- Enzyme linked immunoabsorbent assay
ESBL	- Extended spectrum beta-lactamase
EUCAST	- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	- Food and Drug Administration
MALDI-TOF	- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MIC	- Concentração Inibitória Mínima
NAP1	- North America Pulsed field type 1
REA	- Restriction Endonuclease
TSA	- Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057 segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de metronizadol (5 µg).	16
Figura 02 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de moxifloxacino (5 µg)	17
Figura 03 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de nitazoxanida (5 µg).	17
Figura 04 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (5 µg).	18
Figura 05 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (30 µg).	18
Figura 06 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de tigeciclina (15 µg).	19
Figura 07 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de vancomicina (5 µg).	19
Figura 08 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de metronizadol (5 µg).	21
Figura 09 – Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para metronidazol entre os 50 isolados de <i>Clostridium difficile</i>	22
Figura 10 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de metronidazol (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL)	22
Figura 11 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de moxifloxacino (5 µg).	24
Figura 12 – Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para moxifloxacino entre os 50 isolados de <i>Clostridium difficile</i>	25

Figura 13 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de moxifloxacino (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL).....	25
Figura 14 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de nitazoxanida (5 µg).....	27
Figura 15 – Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para nitazoxanida entre os 50 isolados de <i>Clostridium difficile</i>	27
Figura 16 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de nitazoxanida (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL)	28
Figura 17 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (5 µg).....	29
Figura 18 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (30 µg).....	30
Figura 19 – Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para teicoplanina entre os 50 isolados de <i>Clostridium difficile</i>	30
Figura 20 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de teicoplanina (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL)	31
Figura 21 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de teicoplanina (30µg) e a distribuição da MIC (µg/mL)	31
Figura 22 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) utilizando disco de tigeciclina (15 µg).....	33
Figura 23 – Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para tigeciclina entre os 50 isolados de <i>Clostridium difficile</i>	33
Figura 24 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de tigeciclina (15µg) e a distribuição da MIC (µg/mL).....	34
Figura 25 – Curva de distribuição de <i>Clostridium difficile</i> segundo diâmetro do halo de inibição (mm) utilizando disco de vancomicina (5µg).....	35
Figura 26 – Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para vancomicina entre os 50 isolados de <i>Clostridium difficile</i>	35
Figura 27 – Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de vancomicina (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Antimicrobianos e potência dos discos utilizados.....	10
Tabela 02 – Antimicrobianos e intervalos de concentrações mínima e máxima utilizadas para determinação das MICs	12
Tabela 03 – Limites de sensibilidade/resistência (µg/mL) de acordo com CLSI (documento M100-S24) para: metronidazol e moxifloxacino.....	12
Tabela 04 – Limites de sensibilidade/resistência (µg/mL) de acordo com EUCAST (documento 5.16) para: metronidazol, moxifloxacino, tigeciclina e vancomicina.....	13
Tabela 05 – Interpretação do coeficiente de Pearson	13
Tabela 06 – Controle de qualidade para a cepa ATCC de <i>Clostridium difficile</i> 700057 utilizada no método de Ágar-diluição.....	20

RESUMO

Fraga, EGS. *Sensibilidade in vitro de isolados de Clostridium difficile: comparação de duas metodologias (disco-difusão e ágar-diluição)* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos, que produz toxinas que podem causar diarreia, colite pseudomembranosa, dilatação do cólon, sepse e até morte. Nos últimos anos o quadro clínico e epidemiológico das infecções por *Clostridium difficile* tem se modificado e as limitações das opções terapêuticas tornaram-se mais evidentes. **Objetivo Primário:** Comparar as metodologias de disco-difusão e ágar-diluição na detecção de sensibilidade/resistência de isolados de *Clostridium difficile*. **Objetivos Secundários:** Avaliar prospectivamente o perfil de sensibilidade/resistência de isolados clínicos hospitalares de *Clostridium difficile* provenientes de seis hospitais terciários da cidade de São Paulo e fornecer evidências para fundamentar o diagnóstico e o tratamento empírico das diarreias causadas por *Clostridium difficile*. **Métodos:** utilizamos os métodos de disco-difusão e ágar-diluição, de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI e EUCAST. **Resultados:** Os coeficientes de correlação observados entre os diâmetros dos halos de inibição e Concentração Inibitória Mínima foram abaixo do esperado tornando inviável o método de disco-difusão para determinação de sensibilidade aos antimicrobianos nitazoxanida, teicoplanina e tigeciclina. Todas as 50 cepas deste estudo foram sensíveis ao metronidazol (MIC₅₀ foi de 1 µg/mL a MIC₉₀ foi de 2 µg/mL). Para o método de disco-difusão, sugerimos que halos de inibição ≥33mm possam ser interpretados como sensíveis. Devido à moderada correlação, significância estatística e distribuição de halos de inibição das amostras próximos aos valores encontrados utilizando a cepa ATTC, sugere-se a utilização do método de disco-difusão para vancomicina, onde halos com diâmetro ≥22mm possam ser considerados como sensíveis pelo método. Para o moxifloxacino houve uma boa correlação entre as duas metodologias: disco-

difusão e de ágar-diluição (O coeficiente de Pearson foi de -0,84, e o valor de p foi menor que 0,00001), sugerindo que halos de inibição $\geq 18\text{mm}$ possam ser interpretados como sensíveis pela metodologia de disco-difusão. A nitazoxanida foi a droga que mostrou melhor atividade *in vitro* (MIC_{50} foi 0,06 $\mu\text{g/mL}$ e a MIC_{90} de 0,12 $\mu\text{g/mL}$). Por se mostrar uma droga com potente atividade *in vitro* (MIC_{50} e a MIC_{90} foi de 0,12 $\mu\text{g/mL}$), a tigeciclina poderia ser mais uma opção terapêutica em infecções por *Clostridium difficile*, dependendo de mais estudos para avaliar sua real eficácia clínica e segurança. **Conclusão:** Os resultados verificados neste estudo indicam a necessidade de mais estudos *in vitro* e clínicos para definir os limites de sensibilidade/resistência para a teicoplanina e a nitazoxanida, pois faltam critérios de interpretação tanto para disco-difusão quanto para ágar-diluição. Os resultados deste trabalho *in vitro* confirmaram a utilidade do metronidazol como uma droga eficaz no tratamento de infecção por *Clostridium difficile*. A nitazoxanida foi a droga que mostrou melhor atividade *in vitro* por método dilucional. Sugerimos a utilização do método de disco-difusão para: metronidazol, vancomicina e moxifloxacino. Os resultados desse trabalho sugerem que halos de inibição para metronidazol ($\geq 33\text{mm}$), moxifloxacino ($\geq 18\text{mm}$) e vancomicina ($\geq 22\text{mm}$) poderiam ser considerados como sensíveis pelo método de disco-difusão. O método de ágar-diluição é um método de boa acurácia, porém trabalhoso para ser executado na rotina laboratorial.

Descritores: *Clostridium difficile*; testes de sensibilidade microbiana; resistência a medicamentos; bacilos gram-positivos; gastroenteropatias; diarreia; metronidazol; testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão; nitazoxanida; teicoplanina; tigeciclina; vancomicina; moxifloxacino.

SUMMARY

Fraga, EGS. *Susceptibility in vitro of isolates of Clostridium difficile: comparison of two methodologies (disk-diffusion and agar-dilution)* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Introduction: *Clostridium difficile* is a Gram-positive bacillus, strictly anaerobic, spore-forming, which produces toxins that can cause diarrhea, colitis pseudomembranous, colon expansion, sepsis and even death. In recent years the clinical and epidemiological picture of infection by *Clostridium difficile* has been modified and limitations of therapeutic options have become more evident.

Primary Objective: Comparing the methods of disk diffusion and agar dilution in the detection sensitivity/resistance isolates of *Clostridium difficile*. **Secondary**

Objectives: Prospectively evaluate the profile of sensitivity/resistance of hospital clinical isolates of *Clostridium difficile* from six tertiary hospitals in São Paulo city and provide evidence to support the diagnosis and empirical treatment of diarrhea caused by *Clostridium difficile*. **Methods:** We use the disk diffusion method and agar dilution method, according to the established criteria by CLSI and EUCAST. **Results:** The observed correlation coefficients between the inhibitions diameter zone of the and Minimum Inhibitory Concentration were under expectations impeding the disk diffusion method for determining sensitivity to nitazoxanide antimicrobial, teicoplanin and tigecycline. All 50 strains of this study were sensitive to metronidazole (MIC₅₀ was 1 µg/ml to MIC₉₀ was 2 µg/ml). For the method disk diffusion, we suggest that inhibition zones ≥33mm can be interpreted as sensitive. Due to the moderate correlation, statistical significance and distribution of zones of inhibition on samples of the next found values using the strain ATTC, we suggest using the disk diffusion method for vancomycin where halos diameter ≥22mm can be considered as sensitive by the method. There was a good correlation to moxifloxacin between the two methodologies: disk diffusion and agar dilution (Pearson's coefficient was -0.84 , and the “p” value was less than 0.00001), suggesting that inhibition zones ≥18mm can be interpreted as sensitive by disk diffusion method. Nitazoxanide was the drug that showed a better performance *in vitro* activity

(MIC₅₀ was 0.06 µg/ml and MIC₉₀ 0.12 µg/ml). For a drug that shows potent activity *in vitro* (MIC₅₀ and MIC₉₀ was 0.12 µg/ml), the tigecycline could be a therapeutic option in infection by *Clostridium difficile*, depending on further studies to evaluate their real clinical efficacy and security. **Conclusion:** Obtained results in this study indicate the need for further studies *in vitro* and clinicians to define the limits of sensitivity/resistance to teicoplanin and nitazoxanide, so there is no interpretation criteria for both disk diffusion and for agar dilution. Results of this work *in vitro* study confirmed the utility of metronidazole as an effective drug in the treatment of infection by *Clostridium difficile*. Nitazoxanide was the drug that showed better performance *in vitro* by dilutional method. We suggest the use of disk diffusion method: metronidazole, vancomycin and moxifloxacin. This work suggest that inhibition zones for metronidazole (≥33mm), moxifloxacin (≥18mm) and vancomycin (≥22mm) could be considered as sensitive by disk diffusion method. The agar dilution method is a method to be accurate, but laborious to run in the laboratory routine.

Descriptors: *Clostridium difficile*; microbial sensitivity tests; drug resistance; gram-positive rods; gastrointestinal diseases; diarrhea; metronidazole; disk diffusion antimicrobial tests; nitazoxanide; teicoplanin; tigecycline; vancomycin; moxifloxacin.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	07
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	08
4 RESULTADOS	15
4.1 Controle de qualidade	16
4.1.1 Disco-difusão.....	16
4.1.2 Ágar-diluição	20
4.2 Avaliações da sensibilidade <i>in vitro</i> das amostras de <i>C. difficile</i>	21
4.2.1 Metronidazol.....	21
4.2.2 Moxifloxacino.....	24
4.2.3 Nitazoxanida.....	27
4.2.4 Teicoplanina	29
4.2.3 Tigeciclina	33
4.2.3 Vancomicina.....	35
6 CONCLUSÃO.....	42
7 ANEXOS	44
8 REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm estudado a microbiota intestinal e a maneira como estes microrganismos causam doenças (Kaper et al., 2004).

O trato gastrointestinal é um órgão densamente colonizado por bactérias. Estima-se que apenas os cólons contenham cerca de 70% de todos os microrganismos presentes no corpo humano (Falcão, 2010).

Entre os microrganismos potencialmente patogênicos da microbiota intestinal destaca-se o *Clostridium difficile*. O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos. Assim como a maioria das espécies do gênero *Clostridium*, pode ser parte da microbiota intestinal humana (O'Connor et al., 2008). O *Clostridium difficile* produz toxinas que podem causar diarreia, colite pseudomembranosa, dilatação do cólon, sepse e até a morte (Carrico, 2008).

A transmissão do *Clostridium difficile* pode ocorrer por via fecal-oral, pessoa-pessoa, fômites, por instrumentos e no ambiente hospitalar. Os esporos sobrevivem na acidez gástrica, germinam no cólon, iniciando a produção de toxinas. A colonização e a ligação à mucosa intestinal são facilitadas pelo uso de antibioticoterapia com alteração do equilíbrio da microbiota intestinal (Kim et al., 2010).

Este microrganismo produz duas toxinas principais: a enterotoxina A (tcdA) e citotoxina B (tcdB) (O'Connor et al., 2008). A toxina A ativa macrófagos e mastócitos que estimulam a expressão epitelial de interleucina 8 (IL-8) e de molécula de adesão intercelular (ICAM-1) que são mediadores de inflamação, promovendo perda de proteínas, inflamação do epitélio intestinal, secreção de fluídos, aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e diarreia. O efeito da citotoxina B depende do dano tecidual causado pela toxina A, o que sugere que ambas as toxinas funcionam sinergicamente (Durai, 2007).

Além dos genes que codificam as toxinas A e B, a proteína TcdC (proteína responsável pelo fenótipo hipertoxigênico) desempenha um papel fundamental, pois cepas hipervirulentas apresentam deleção parcial do gene

tcdC, e estão associadas a ocorrências das formas mais graves da doença (Reineke et al., 2007; Dupuy et al. 2008).

Até a metade da década de 70, a importância clínica de *C. difficile* não era valorizada. Este organismo era raramente isolado em culturas de fezes e seu papel em doenças humanas era pouco conhecido. Entretanto, estudos atuais demonstram claramente que o *C. difficile* produtor de toxinas é responsável por doenças gastrointestinais associadas a antibióticos, desde uma diarreia relativamente benigna e autolimitada até colite pseudomembranosa grave, com risco de morte (Murray et al., 2006).

A epidemiologia das infecções por *C. difficile* tem se tornado complexa, pois no passado este agente era caracterizado como um patógeno exclusivamente associado a diarreias em ambiente hospitalar, onde o principal fator de risco era o uso de antibióticos. Atualmente tem sido descrito como agente de diarreia grave em gestantes e imunocomprometidos (Rouphael et al., 2008).

A incidência e severidade da infecção pelo *C. difficile* está aumentando, em parte devido ao aparecimento de cepas hipervirulentas conhecidas como *North American Pulsed Field type 1* (NAP1), *Restriction Endonuclease* (REA) *type BI*, ou *polymerase-chain-reaction ribotype 027* (referida como cepa NAP1/BI/027). Desde o surgimento destas cepas, tem se observado um aumento na gravidade da infecção, altas taxas de recorrência sintomática e aumento significativo nas taxas de mortalidade, ocorrendo em populações antes consideradas de baixo risco, como pacientes jovens sem doença prévia e mulheres peri-parto (Freeman et al., 2010; Golan et al., 2011).

Até a década de 80 havia pouco interesse em desenvolver novos tratamentos para o *Clostridium difficile*, porque a maioria dos pacientes geralmente respondia bem ao tratamento com metronidazol ou vancomicina. Porém, nos últimos anos o quadro clínico e epidemiológico das infecções por *Clostridium difficile* mudou e as limitadas opções terapêuticas tornaram-se mais evidentes (Venugopal e Johnson, 2012).

Como já mencionado, os dois principais antibióticos utilizados para tratamento de infecção por *Clostridium difficile* são o metronidazol e a vancomicina (Golan et al., 2011). Mais recentemente, foram evidenciadas

cepas com sensibilidade reduzida a esses medicamentos (Pinto et al., 2003; Bujanda e Cosme, 2009).

Atualmente existem outras drogas que estão sendo avaliadas e utilizadas para o tratamento de infecções de *Clostridium difficile*, considerando que a escolha terapêutica deve levar em conta a gravidade das manifestações clínicas e as alterações laboratoriais e os aspectos microbiológicos (Spadão, 2012).

O metronidazol (5-nitro-imidazol) ainda hoje é recomendado como droga de primeira escolha para o tratamento dos casos não graves da colite pseudomembranosa e a vancomicina é indicada como primeira opção para o tratamento inicial nos casos graves. O metronidazol é um antibiótico altamente ativo contra anaeróbios, incluindo o *Clostridium difficile*. Embora este agente seja ainda eficaz para o tratamento de infecções causadas por *C. difficile*, estudos recentes mostram altas taxas de falhas terapêuticas, além da necessidade, algumas vezes, de prolongar a terapêutica com um maior tempo de administração para a resolução dos sintomas (Golan et al., 2011).

Embora a vancomicina seja bastante eficaz no tratamento da colite pseudomembranosa, as recorrências não são raras, atingindo até 20% dos casos. Talvez por esta razão, alguns pesquisadores recomendam o aumento da dose diária e/ou prolongar a duração do tratamento. Outras limitações da vancomicina estão relacionadas com a falta de padronização de um preparado por administração por via oral, além de promover colonização ou crescimento excessivo de outros agentes patogênicos clinicamente importantes que residem no intestino, como por exemplo, *Enterococcus* spp e *Staphylococcus* spp resistentes à vancomicina (Golan et al., 2011).

A teicoplanina é um antibiótico glicopeptídeo com boa atividade contra anaeróbios gram-positivos, incluindo o *C. difficile*. Alguns estudos mostraram que esta droga é bastante eficaz no tratamento de infecções por *C. difficile*, com cura clínica de 96% a 100% e com taxa de recorrência de 7% (Hedge et al., 2008; Venugopal e Johnson, 2012).

A tigeciclina é o primeiro antibiótico da classe das glicilciclinas, derivado da minociclina, com amplo espectro de atividade contra microrganismos que incluem os *Staphylococcus* spp meticilino resistente, *Acinetobacter* spp

multirresistentes e Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) incluindo cepas produtoras de carbapenemases (Babinchak et al., 2005). Alguns estudos recentes sugerem que a tigeciclina inibe o crescimento de *Clostridium difficile* assim como a produção de toxinas. Esta opção deve ser reservada para pacientes nos quais outras opções terapêuticas como o metronidazol e a vancomicina falharam (Larson et al., 2011).

Mais recentemente, tem sido utilizado a fidaxomicina um antibiótico macrocíclico, a qual mostra atividade *in vitro* maior que a vancomicina contra isolados clínicos de *C. difficile* (Venugopal e Johnson, 2012). Seu mecanismo de ação é a inibição da transcrição do RNA, através da produção do metabólito OP-1118. Esta droga também é ativa contra formas virulentas de *C. difficile*, incluindo BI/NAP1/027, com menor probabilidade de recidivas (Louie et al., 2011).

O moxifloxacino é uma metoxi-fluoroquinolona, possui atividade bactericida como as quinolonas de modo geral e amplo espectro de ação, que inclui também algumas bactérias anaeróbias. A resistência de *C. difficile* ao moxifloxacino aumentou nos últimos anos, estando associada à resistência a outras fluoroquinolonas, em particular ao levofloxacino. Deve-se considerar a possibilidade que o uso de fluoroquinolonas mais antigas possam permitir o surgimento de cepas de *Clostridium difficile* também resistentes às fluoroquinolonas mais recentes. (Mena et al., 2012).

A nitazoxanida é um derivado do nitrothiazol (5-nitrothiazol). Esta molécula possui maior espectro de ação, que inclui protozoários, helmintos e algumas bactérias, sendo considerada uma boa opção no tratamento de algumas parasitoses intestinais e também uma opção para o tratamento da colite pseudomembranosa (Broekhuysen et al., 2000). Recentes estudos com bactérias anaeróbias ou microaerófilas (*Clostridium* spp e *Helicobacter pylori*) tem demonstrado que a nitazoxanida inibe a enzima piruvatoferrodoxina oxiredutase, a qual é fundamental no metabolismo energético destes microrganismos. Diferente de outros compostos nitroimidazólicos quimicamente semelhantes, a nitazoxanida independe da ferrodoxina reduzida, isto é, interage diretamente com a piruvatoferrodoxina oxiredutase. Este mecanismo

de ação específico pode explicar a eficácia terapêutica da nitazoxanida contra organismos resistentes a 5-nitroimidazóis (Gilles e Hoffman, 2002).

Um estudo prospectivo, duplo-cego, controlado e randomizado sugere que a nitazoxanida pode ser tão eficaz quanto à vancomicina no tratamento da colite pseudomembranosa (Baines et al., 2008). A nitazoxanida mostrou uma boa atividade contra isolados de *Clostridium difficile*, sendo considerada mais uma opção para o tratamento da colite pseudomembranosa (Aslam e Musher, 2007).

A resistência a antimicrobianos entre bactérias anaeróbias, principalmente entre as do gênero *Clostridium* representa um importante desafio no tratamento das diarreias por este agente. Testes para avaliação da resistência devem ser realizados, a fim de determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* das cepas de *Clostridium difficile*, possibilitando definir as melhores opções terapêuticas.

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) permitem a realização de um monitoramento em trabalhos de vigilância epidemiológica e a promoção de medidas de controle para evitar a disseminação de bactérias multirresistentes, seja dentro de uma instituição ou regionalmente (Paiva, 2010).

De um modo geral, as técnicas de TSA são classificadas em qualitativas e quantitativas. A técnica qualitativa empregada na rotina é o método de disco-difusão, padronizado tanto pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) quanto EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). É um método que se baseia na difusão no ágar do antimicrobiano impregnado em um disco de papel de filtro, onde a sensibilidade é determinada através do diâmetro do halo de inibição do antimicrobiano frente ao crescimento do microrganismo, cujo diâmetro é inversamente proporcional a MIC (Nicodemo, 2003).

Diferentemente das técnicas qualitativas, as quantitativas determinam a concentração inibitória mínima (MIC) expressando em números a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo *in vitro* (Rossi e Andreazzi, 2005). Estas técnicas (microdiluição, macrodiluição e ágar-diluição) podem ser realizadas através de métodos

dilucionais manuais, e por métodos automatizados. Estes testes são realizados semeando-se suspensões padronizadas de bactérias na superfície de uma série de placas de ágar, cada uma contendo uma concentração diferente do antibiótico, que abrange os limites terapêuticos da droga (Nicodemo, 2003).

O E-test (AB BIODISK) é um teste difusional que permite a determinação da MIC através da utilização de uma fita de plástico branco (5mm de largura por 50 mm de comprimento), que contém um gradiente exponencial pré-definido do antibiótico. Diferentemente do método de disco-difusão (zona de inibição em círculo), forma-se uma área de inibição de crescimento em elipse, entre a fita e a zona de crescimento bacteriano (Sanchez e Jones, 1993; Nicodemo, 2003).

Os sistemas automatizados de diluição são compostos por: BD Phoenix System (Becton e Dickinson); MicroScan WalkAway 40/96, MicroScan WalkAway SI e autoScan-4 (Dade Behring); Vitek, Vitek 2 e Vitek 2 Compact (bioMérieux). Deve ser mencionado que os sistemas automatizados não substituem a qualificação do microbiologista, que precisa conhecer as limitações e adequações dessas novas tecnologias na detecção de resistência de diferentes microrganismos (Turnidge et al., 2007; Paiva, 2010).

Devido ao risco de recorrência e de resistência microbiana, o trabalho proposto tem como objetivo principal avaliar prospectivamente o perfil de sensibilidade/resistência de *Clostridium difficile* frente a diferentes antimicrobianos de isolados clínicos hospitalares provenientes da cidade de São Paulo, fazendo a comparação de duas metodologias para diagnóstico: disco-difusão e ágar diluição. Como objetivo secundário, avaliar prospectivamente o perfil de sensibilidade/resistência de isolados clínicos hospitalares de *Clostridium difficile* provenientes de seis hospitais terciários da cidade de São Paulo e fornecer evidências para fundamentar o diagnóstico e o tratamento empírico das diarreias causadas por *Clostridium difficile*.

2 OBJETIVOS

PRIMÁRIO

Este estudo tem como objetivo principal avaliar e comparar os métodos de difusão em disco e diluição em ágar, na detecção do perfil de sensibilidade/resistência a diferentes antimicrobianos de isolados clínicos hospitalares de *Clostridium difficile* provenientes da cidade de São Paulo.

SECUNDÁRIOS

1. Avaliar prospectivamente o perfil de sensibilidade/resistência de isolados clínicos hospitalares de *Clostridium difficile* provenientes de seis hospitais terciários da cidade de São Paulo;
2. Fornecer evidências para fundamentar o diagnóstico e o tratamento empírico das diarreias causadas por *Clostridium difficile*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLADOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Foram utilizados 50 isolados consecutivos de *Clostridium difficile* detectados na rotina do Laboratório Fleury – Medicina Diagnóstica de pacientes hospitalizados em seis hospitais terciários do município de São Paulo durante o período de março a dezembro de 2013. A identificação do gênero e espécie foi realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF® (Bruker Daltonik, Bremen, 2002). Só foram cultivados os isolados de amostras de fezes positivas para toxinas A e/ou B utilizando-se ensaio imunoenzimático (ELISA – Remel ou Riedel) com anticorpos monoclonais específicos para toxinas A e B.

Após o isolamento e confirmação da pureza dos isolados os mesmos foram armazenados em leite desnatado a 10% (Molico®) aliquotado em tubos Eppendorf® e congelados – 80° C. Quando necessário, foram subcultivados em anaerobiose, em ágar Brucella com 5% de sangue de cavalo. Um registro numérico único foi atribuído a cada cepa, sem vínculo com a designação original.

Não foi objetivo deste trabalho avaliar os dados epidemiológicos desses pacientes.

MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

Os isolados foram descongelados em lotes de dez e, a seguir, cultivados em ágar Brucella com 10% de sangue desfibrinado estéril de cavalo, em anaerobiose por 48 horas. Foi realizado um subcultivo nas mesmas condições, exceto quanto ao tempo de incubação de 24 horas.

A anaerobiose foi gerada utilizando-se geradores Anaerogen® (Oxoid) em jarras de acrílico. O método de disco-difusão foi realizado segundo a descrição de Erikstrup et al. (2012). Foram preparadas suspensões bacterianas em 2 mL de caldo tioglicolato, com turbidez equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland ($\approx 3,0 \times 10^8$ UFC/mL) com auxílio do equipamento DensiCheck® (bioMérieux).

A suspensão foi semeada sobre a superfície do ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina (5µg/mL) e vitamina K (1µg/mL), meio recomendado pelo CLSI (documento M11-A8) e EUCAST (2012) para testes de sensibilidade de anaeróbios. As suspensões foram utilizadas em até 15 minutos após a sua preparação. O inóculo foi espalhado uniformemente sobre a superfície do meio com o auxílio de um swab e em até 15 minutos foram aplicados dois discos por placa de 90 x 15 mm. Os Antimicrobianos e a potência dos discos utilizados estão descritos na tabela 01. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37° C durante 24 horas em até 15 minutos após a aplicação dos discos. A regra 15-15 minutos é recomendada pelo EUCAST (2012).

Após o período de incubação, foram aferidos os diâmetros dos halos de inibição com luz refletida considerando 100% de inibição. Nossos dados para DD representam a média de dois ensaios (testes em duplicata) com arredondamento para número inteiro. Foram aceitos intervalos de DD de ± 03 mm, de modo a permitir a comparação/correlação entre o primeiro e o segundo lote de testes. Intervalos superiores a 03 mm foram descartados e repetidos.

Os diâmetros das zonas de inibição foram correlacionados com as respectivas concentrações inibitórias mínimas (MICs) obtidas por diluição em ágar.

Devido à escassez de dados e informações para o controle de qualidade da cepa de *Clostridium difficile* ATCC 700057, a execução de testes de sensibilidade e os procedimentos foram realizados em duplicata, sendo 05 isolados processados a cada lote de testes, somando ao todo 50 testes aplicados por droga. Além disso, as combinações com as cepas padrão também foram testadas simultaneamente na bateria de testes do trabalho atual. Para metronidazol e nitazoxanida não há discos disponíveis comercialmente. Desta forma, as drogas foram preparadas no laboratório em solução (p/v) em discos de papel de 6 mm e foram impregnados com 5 µg de cada substância em 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para os glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina foram usados discos com 5 µg, com concentrações diferentes das disponíveis comercialmente. Entretanto, um trabalho proposto por Erikstrup et al. (2012) demonstrou que a

concentração de 5 µg apresenta bons resultados para as duas drogas. Dessa forma, foram preparados discos de 5 µg utilizando a mesma metodologia de impregnação para a nitazoxanida, porém para a teicoplanina e vancomicina foi utilizada água bidestilada como solvente e diluente.

Não existem pontos de corte definidos para DD para os antimicrobianos estudados nesse trabalho.

Tabela 01: Antimicrobianos e potência dos discos utilizados.

Antimicrobiano	Potência do disco (µg)
Metronidazol	5
Moxifloxacino	5
Nitazoxanida	5
Teicoplanina	5 e 30
Tigeciclina	15
Vancomicina	5

DILUIÇÃO EM ÁGAR

As MICs foram determinadas pelo método de diluição em ágar, seguindo as recomendações do CLSI (documento M11A8).

Os isolados foram descongelados em lotes de dez e a seguir cultivados em ágar Brucella com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril, em anaerobiose por 48 horas.

Ao preparar as placas de diluição em ágar foram utilizadas placas de 90 x 15 mm com um volume total de 20mL. A preparação das placas envolveu a adição de uma parte de uma solução do agente antimicrobiano (2mL) e nove partes (18mL) do ágar Brucella com 10% de sangue desfibrinado estéril de cavalo (ABSC) suplementado com hemina (5µg/mL) e vitamina K (1µg/mL).

No momento do preparo das placas com concentrações decrescentes dos respectivos antibióticos, o meio era mantido em banho-maria 48-50°C e os antibióticos mantidos aliquotados em tubos Falcon® de poliestireno. Eram pipetados 18mL do ágar suplementado e acrescentados à medida que a

temperatura atingia cerca de 37°C, homogeneizados, e então distribuídos 20mL nas placas.

Foram preparadas suspensões bacterianas em 2 mL de caldo tioglicolato com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Em seguida, 300 µL das suspensões bacterianas foram adicionadas a cada poço do replicador de Steers, sendo seu carimbo posicionado sob as placas, contendo diferentes concentrações dos antibióticos (tabela 2), partindo da menor para maior concentração. A inoculação foi realizada em placas de ágar Brucella com 10% de sangue desfibrinado estéril de cavalo (ABSC) suplementado com hemina (5µg/mL) e vitamina K (1µg/mL). A execução de testes de sensibilidade e os procedimentos foram realizados em duplicata. Os intervalos de MICs utilizados no trabalho foram os obtidos pelo primeiro lote de testes. Foram aceitos intervalos de MICs de ± 01 diluição por todas MICs, de modo a permitir a comparação com aqueles estabelecidos pelo CLSI e EUCAST. Intervalos de ± 2 diluições entre o primeiro e o segundo lotes de testes foram descartados e repetidos.

A cepa de *Clostridium difficile* ATCC 700057 foi utilizada no controle de qualidade e testada simultaneamente a cada lote de isolados testados. Os resultados do controle de qualidade para as cepas ATCC representam a média de 20 ensaios obtidos para cada droga, os mesmos estão descritos na tabela 06. Critérios para controle de qualidade ainda não estão estabelecidos para teicoplanina, consequentemente serão estabelecidos neste estudo. Para otimizar o crescimento de *Clostridium difficile*, as placas foram incubadas 48 horas a 37° C em anaerobiose antes da utilização. Após este período a MIC foi determinada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento das cepas (CLSI, 2012).

Não existem critérios interpretativos para MIC estabelecidos pelo CLSI (documento M100-S24) para os antimicrobianos: nitazoxanida, teicoplanina, tigeciclina e vancomicina. Segundo o CLSI (documento M100-S24), existem pontos de corte definidos para moxifloxacino e metronidazol (Tabela 03). Não existem critérios interpretativos para MIC estabelecidos pelo EUCAST (documento 5.16) para os antimicrobianos: teicoplanina e nitazoxanida. Porém,

existem pontos de corte para MIC definidos pelo EUCAST (documento 5.16) para: metronidazol, moxifloxacino, tigeciclina e vancomicina (Tabela 04). Não existem pontos de corte para MIC definidos por nenhuma instituição para nitazoxanida e teicoplanina. Desta forma, utilizamos a planilha ECOFFinder (Turnidge et al. 2006) para estimar valores de corte epidemiológico (ECOFFs).

Tabela 02: Antimicrobianos e intervalos de concentrações mínima e máxima utilizadas para determinação das MICs.

Antimicrobianos	Menor concentração (µg/mL)	Maior concentração (µg/mL)
Metronidazol	0,25	32
Moxifloxacino	0,25	32
Nitazoxanida	0,03	4
Teicoplanina	0,25	32
Tigeciclina	0,03	16
Vancomicina	0,25	32

A procedência dos meios de cultura e dos antibióticos para a ágar-diluição, dos sais dos antibióticos, o preparo das soluções estoque e suas respectivas diluições para incorporação estão descritos no Anexo 02.

Tabela 03: Limites de sensibilidade/resistência (µg/mL) de acordo com CLSI (documento M100-S24) para: metronidazol e moxifloxacino.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
Metronidazol	≤ 8 µg/mL	16 µg/mL	≥ 32 µg/mL
Moxifloxacino	≤ 2 µg/mL	4 µg/mL	≥ 8 µg/mL

Tabela 04: Limites de sensibilidade/resistência ($\mu\text{g/mL}$) de acordo com EUCAST (documento 5.16) para: metronidazol, moxifloxacino, tigeciclina e vancomicina.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL	RESISTENTE
Metronidazol	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$> 2 \mu\text{g/mL}$
Moxifloxacino	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	$> 4 \mu\text{g/mL}$
Tigeciclina	$\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$	$> 0,25 \mu\text{g/mL}$
Vancomicina	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$> 2 \mu\text{g/mL}$

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para avaliação da correlação MICs e diâmetros de halos de inibição foi utilizado o programa *GraphPad Prism* para executar o teste de normalidade, testes de correlação de D'Anderson e Pearson. O teste foi aplicado de duas formas:

- Comparação dos valores de diâmetro de halo com as MICs.
- Comparação das frequências da ocorrência dos pares de resultados composto por MICs e diâmetro do halo de inibição.
- Para ambas as formas aplicadas, os casos que se comportam como distribuição normal ($P \geq 0,05$), o coeficiente de Pearson (r) prediz como essa correlação ocorre (Tabela 5).

Tabela 05: Interpretação do coeficiente de Pearson.

Valor de “r”	Interpretação
1,0	Perfeita correlação positiva
0 a 1,0	Se uma variável aumenta, a outra também aumenta e vice-versa. *
0	Não há correlação
-1,0 a 0	Se uma variável aumenta, a outra diminui e vice-versa. *
-1,0	Perfeita correlação inversa

*Quanto mais próximo o valor de “r” estiver de 1,0 ou -1,0, a correlação é mais forte.

4 RESULTADOS

Foram estudadas 50 cepas de *Clostridium difficile* coletadas consecutivamente de pacientes hospitalizados em hospitais terciários do município de São Paulo durante o período de março a dezembro de 2013 junto ao Fleury Medicina Diagnóstica. A sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada em duplicata por duas técnicas distintas: Disco-difusão e Ágar-diluição.

Devido à escassez de dados e informações para o controle de qualidade do método de disco-difusão (DD) da cepa de *Clostridium difficile* ATCC 700057, a execução de testes de sensibilidade e os procedimentos foram realizados em duplicata, sendo 05 isolados processados a cada lote de testes, somando ao todo 50 testes aplicados por droga (figuras 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07). Os resultados do controle de qualidade do método de ágar-diluição (CIM) para as cepas ATCC, representam a média de 20 ensaios obtidos para cada droga (tabela 06).

Para MIC existem limites aceitáveis definidos pelo CLSI (documento M100-S24) e EUCAST (documento 5.16) para metronidazol e moxifloxacino. Para tigeciclina e vancomicina existem pontos de corte para MIC definidos somente pelo EUCAST (documento 5.16). Não existem critérios de interpretação para DD e MIC definidos em nenhuma instituição para a teicoplanina e nitazoxanida. Além disso, as combinações com as cepas padrão também foram testadas simultaneamente na bateria de testes do trabalho atual.

4.1 Controle de qualidade: avaliação da sensibilidade *in vitro* de *Clostridium difficile* ATCC 70057.

4.1.1 Disco-difusão

Figura 01: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de metronizadol (5 µg).

A média foi de 40 mm, com desvio padrão de ± 2 mm.

Figura 02: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de moxifloxacino (5 µg).

A média foi de 23 mm, com desvio padrão de ± 2 mm.

Figura 03: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de nitazoxanida (5 µg).

A média foi de 28 mm, com desvio padrão de ± 2 mm.

Figura 04: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (5 µg).

A média foi de 18 mm, com desvio padrão de ± 2 mm.

Figura 05: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (30 µg).

A média foi de 26 mm, com desvio padrão de ± 2 mm.

Figura 06: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de tigeciclina (15 µg).

A média foi de 38 mm, com desvio padrão de ± 3 mm.

Figura 07: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* cepa ATCC 700057, segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de vancomicina (5 µg).

A média foi de 23 mm, com desvio padrão de ± 2 mm.

4.1.2 Ágar-diluição

Tabela 06: Controle de qualidade para a cepa ATCC de *Clostridium difficile* 700057 utilizada no método de Ágar-diluição. As MICs representam a média de 20 ensaios obtidos para cada droga.

ANTIBIÓTICO	ÁGAR-DILUIÇÃO (µg/mL)
Metronidazol	0,5
Moxifloxacino	4
Nitazoxanida	0,125
Teicoplanina	2
Tigeciclina	0,125
Vancomicina	2

4.2 Avaliações da sensibilidade *in vitro* das amostras de *Clostridium difficile*.

4.2.1 Metronidazol

Figura 08: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de metronizadol (5 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

Figura 09: Curva de distribuição da MIC ($\mu\text{g/mL}$) do primeiro lote de testes para metronidazol entre os 50 isolados de *Clostridium difficile*.

Figura 10: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de metronidazol (5 μg) e a distribuição da MIC ($\mu\text{g/mL}$). (n=50).

A distribuição da figura 10, baseada nos pontos definidos pelo CLSI (documento M100-S24) mostra que metronidazol apresentou no primeiro lote

de testes 50 cepas sensíveis ao antimicrobiano, com $MIC \leq 8\mu\text{g/mL}$. A MIC_{50} foi de $1\mu\text{g/mL}$ e a MIC_{90} foi de $2\mu\text{g/mL}$.

A distribuição da figura 10, baseada nos limites de sensibilidade/resistência para o metronidazol, de acordo com o EUCAST (documento 5.16) mostra que o metronidazol, apresentou para o primeiro lote de testes, todas as 50 cepas sensíveis, com $MIC \leq 2\mu\text{g/mL}$. Nesta bateria de testes a MIC_{50} foi de $1\mu\text{g/mL}$ a MIC_{90} foi de $2\mu\text{g/mL}$. O coeficiente de Pearson foi de -0,38 e o valor de p foi de 0,006489, ou seja, estatisticamente significativo.

4.2.2 Moxifloxacino

Figura 11: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de moxifloxacino (5 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

A distribuição da figura 11 mostra que para o moxifloxacino houve quatro cepas (cepas de nº 03, 14, 25 e 47) com ausência de halo de inibição, ou seja, halos de 6mm (semelhantes ao diâmetro do disco).

Figura 12: Curva de distribuição da MIC ($\mu\text{g/mL}$) do primeiro lote de testes para moxifloxacino entre os 50 isolados de *Clostridium difficile*.

Figura 13: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de moxifloxacino (5 μg) e a distribuição da MIC ($\mu\text{g/mL}$). (n=50).

Conforme o CLSI (documento M100-S24) os limites de sensibilidade/resistência da distribuição da figura 13 mostra que para o moxifloxacino, houve no primeiro lote de testes quatro cepas (03, 14, 25 e 47) resistentes (as mesmas cepas com ausência de halo de inibição para a metodologia de DD). Estas cepas apresentaram $\text{MIC} \geq 32\mu\text{g/mL}$. Nesta

primeira bateria de testes apresentou três cepas sensíveis e 43 cepas com MIC intermediária. A MIC₅₀ e a MIC₉₀ para a bateria de testes foi de 4µg/mL.

Segundo os limites de sensibilidade/resistência para o moxifloxacino de acordo com o EUCAST (documento 5.16) a análise da figura 13 mostra que o moxifloxacino apresentou no primeiro lote de testes quatro cepas (cepas de nº 03, 14, 25 e 47) resistentes ao antimicrobiano com MIC ≥ 32 µg/mL (as mesmas cepas consideradas resistentes para a metodologia de disco-difusão). Na primeira bateria de testes 46 cepas foram sensíveis ao antimicrobiano com MIC ≤ 4 µg/mL. A MIC₅₀ e a MIC₉₀ para o teste foi de 4µg/mL. O coeficiente de Pearson foi de -0,84, ou seja, se uma variável aumenta a outra diminui e vice-versa. O valor de p foi menor que 0,00001.

4.2.3 Nitazoxanida

Figura 14: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de nitazoxanida (5 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

Figura 15: Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para nitazoxanida entre os 50 isolados de *Clostridium difficile*.

Figura 16: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de nitazoxanida (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL). (n=50).

Para a nitazoxanida não existem critérios de interpretação para DD e MIC definidos por nenhuma instituição.

Os limites de sensibilidade/resistência para nitazoxanida foram calculados utilizando a planilha Excel ECOFFinder (Turnidge, 2006). A análise da figura 16, baseada nos pontos corte (ECOFF) mostra que a nitazoxanida apresentou no primeiro lote de testes todas as 50 cepas sensíveis ao antimicrobiano, com $MIC \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$, pois o ECOFF 95,0% estabelecido para nitazoxanida foi de $0,25 \mu\text{g/mL}$. Para o primeiro lote de testes a MIC_{50} foi $0,06 \mu\text{g/mL}$ e a MIC_{90} de $0,12 \mu\text{g/mL}$. O coeficiente de Pearson foi de 0,35, ou seja, se uma variável aumenta a outra também aumenta e vice-versa. O valor de p foi de 0,012715, ou seja, estatisticamente significativo.

4.2.4 Teicoplanina

Para a teicoplanina não existem critérios de interpretação para DD e MIC definidos por nenhuma instituição.

Figura 17: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (5 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

Figura 18: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) com disco de teicoplanina (30 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

Figura 19: Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para teicoplanina entre os 50 isolados de *Clostridium difficile*.

Figura 20: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de teicoplanina (5 μ g) e a distribuição da MIC (μ g/mL). (n=50).

O coeficiente de Pearson foi de 0,08, ou seja, se uma variável aumenta a outra também aumenta e vice-versa. O valor de p foi de 0,580767, ou seja, estatisticamente não significativo.

Figura 21: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de teicoplanina (30 μ g) e a distribuição da MIC (μ g/mL). (n=50).

O coeficiente de Pearson foi de 0,06, ou seja, se uma variável aumenta a outra também aumenta e vice-versa. O valor de p foi de 0,678943, ou seja, não significante estatisticamente.

4.2.5 Tigeciclina

Figura 22: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) utilizando disco de tigeciclina (15 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

Figura 23: Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para tigeciclina entre os 50 isolados de *Clostridium difficile*.

Figura 24: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de tigeciclina (15µg) e a distribuição da MIC (µg/mL). (n=50).

Os limites de sensibilidade/resistência para tigeciclina de acordo com EUCAST (documento 5.16) demonstraram que a distribuição da figura 24 para tigeciclina apresentou no primeiro lote de testes 49 cepas sensíveis com MIC $\leq$ 0,25 µg/mL e uma cepa resistente ao antimicrobiano, com MIC de 0,5 µg/mL. No primeiro lote de testes a MIC₅₀ e a MIC₉₀ foi de 0,12 µg/mL.

O coeficiente de Pearson foi de -0,23, ou seja, se uma variável aumenta, a outra diminui e vice-versa. Porém, o valor de p foi de 0,108091, ou seja, não significativo estatisticamente.

4.2.6 Vancomicina

Figura 25: Curva de distribuição de *Clostridium difficile* segundo diâmetro do halo de inibição (mm) utilizando disco de vancomicina (5 µg). Representam a média de dois ensaios com arredondamento para número inteiro.

Figura 26: Curva de distribuição da MIC (µg/mL) do primeiro lote de testes para vancomicina entre os 50 isolados de *Clostridium difficile*.

Figura 27: Correlação entre a distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de vancomicina (5µg) e a distribuição da MIC (µg/mL). (n=50).

Baseado nos Limites de sensibilidade/resistência para vancomicina de acordo com EUCAST (documento 5.16), a análise da figura 27 mostra que a vancomicina apresentou para o primeiro lote de testes 29 cepas resistentes, com MIC > 2 µg/mL e 21 cepas sensíveis ao antibiótico, com MIC ≤ 2 µg/mL. Para o primeiro lote de testes a MIC₅₀ e a MIC₉₀ foram de 4µg/mL. O coeficiente de Pearson foi de -0,51, moderada negativa, ou seja, se uma variável aumenta, a outra diminui e vice-versa. O valor de p foi de 0,000155, ou seja, estatisticamente significativo.

5 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que o *Clostridium difficile* é um dos principais microrganismos relacionados na patogênese de doenças diarreicas associadas ao uso de antimicrobianos, pois o desequilíbrio da microbiota intestinal pelo uso de antibióticos leva à proliferação desse patógeno, cujas manifestações clínicas podem ser graves e fatais em alguns casos (Murray, 2006).

Segundo Rennie et al. (2012), existem duas metodologias para testar a sensibilidade a antimicrobianos para bactérias anaeróbias: a diluição em ágar e o E-test, fornecendo resultados semelhantes. Para Erikstrup et al. (2012), o método de disco-difusão é confiável para TSA de *Clostridium difficile*.

Devido à falta de documentos recentes pelo CLSI e EUCAST relativos aos limites de sensibilidade de *Clostridium difficile* e as dificuldades decorrentes desse fato, realizamos as análises dos testes de sensibilidade aos antibióticos em separado, avaliando inicialmente a sensibilidade das cepas ao metronidazol, moxifloxacino, nitazoxanida, teicoplanina, tigeciclina, e posteriormente à vancomicina, onde a escolha dos antimicrobianos avaliados foi baseada em dados da literatura sobre drogas disponíveis para o tratamento de infecções por *Clostridium difficile*.

A literatura sobre a realização e interpretação dos testes de sensibilidade *in vitro* para *Clostridium difficile* contém dados conflitantes e ainda existem dúvidas sobre a acurácia e a inter-relação dos diferentes métodos disponíveis.

Existe uma dificuldade de interpretação do método de disco-difusão devido a não existirem pontos de corte definidos por nenhuma instituição, embora alguns pesquisadores considerem esta metodologia aceitável na determinação susceptibilidade a antibióticos para bactérias anaeróbicas, especialmente aquelas de crescimento mais rápido (Erikstrup et al., 2012).

Os coeficientes de correlação observados entre os diâmetros dos halos de inibição e Concentração Inibitória Mínima foram abaixo do esperado, tornando inviável o método de disco-difusão para determinação de sensibilidade aos antimicrobianos nitazoxanida, teicoplanina e tigeciclina.

O metronidazol e a vancomicina ainda são os principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por *Clostridium difficile*. O metronidazol tem sido recomendado como tratamento de primeira escolha para a doença leve. Por sua vez, a vancomicina é recomendada para terapia em caso de infecções graves e em casos de recorrências (Bagdasarian et al., 2015). No entanto, alguns estudos sugerem a existência de cepas com sensibilidade reduzida a esses fármacos (Alcides et al., 2007; Bujanda e Cosme, 2009; Dinh et al. 2015).

A distribuição do metronidazol (figura 10) baseada nos limites aceitáveis de sensibilidade/resistência para essa droga de acordo com CLSI (documento M100-S24), mostra que todas as 50 cepas deste estudo foram sensíveis ao antimicrobiano, com $MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$. A MIC_{50} foi de $1 \mu\text{g/mL}$ e a MIC_{90} foi de $2 \mu\text{g/mL}$. O mesmo se confirmou para os limites de sensibilidade/resistência para o metronidazol de acordo com o EUCAST (documento 5.16). Todas as 50 amostras foram sensíveis, com $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$. Nesta bateria de testes a MIC_{50} foi de $1 \mu\text{g/mL}$ e a MIC_{90} foi de $2 \mu\text{g/mL}$. O coeficiente de Pearson foi de -0,38 e o valor de p foi de 0,006489, ou seja, estatisticamente significativo, sugerindo que halos de inibição $\geq 33\text{mm}$ possam ser interpretados como sensíveis pela método de disco-difusão.

Baseado nos limites de sensibilidade/resistência para vancomicina de acordo com EUCAST (documento 5.16), a distribuição para vancomicina (figura 27) mostra que a para o primeiro lote de testes 29 cepas resistentes, com $MIC > 2 \mu\text{g/mL}$ e 21 cepas sensíveis ao antibiótico, com $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$. Para o primeiro lote de testes a MIC_{50} e a MIC_{90} foram de $4 \mu\text{g/mL}$. O coeficiente de Pearson foi de -0,51, ou seja, moderada negativa. O valor de p foi de 0,000155, ou seja, estatisticamente significativo. Devido à moderada correlação, significância estatística e distribuição de halos de inibição das amostras próximos aos valores encontrados utilizando a cepa ATTC, sugere-se a utilização do método de disco-difusão para vancomicina, que halos com diâmetro $\geq 22\text{mm}$ possam ser considerados como sensíveis pelo método.

Considerando os limites de sensibilidade/resistência para o moxifloxacino de acordo com o CLSI (documento M100-S24) mostrou quatro cepas (03, 14, 25 e 47) com ausência de halo de inibição para a metodologia

de DD. Estas cepas apresentaram $MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$. Segundo o CLSI (documento M100-S24) os testes mostraram três cepas sensíveis (11, 19 e 49) e 43 cepas com MIC intermediária. A MIC_{50} e a MIC_{90} para o teste de ágar-diluição foi de $4\mu\text{g/mL}$. Utilizando os pontos de corte do EUCAST (documento 5.16) para determinação dos limites de sensibilidade/resistência para moxifloxacino, observamos a presença de quatro cepas (03, 14, 25 e 47) resistentes ao antimicrobiano com $MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$, ou seja, as mesmas cepas com ausência de halo de inibição para a metodologia de disco-difusão. O método mostrou 46 cepas sensíveis ao antimicrobiano com $MIC \leq 4 \mu\text{g/mL}$, sendo as MIC_{50} e MIC_{90} de $4\mu\text{g/mL}$.

Dessa forma, para o moxifloxacino houve uma boa correlação entre os métodos de disco-difusão e ágar-diluição, com coeficiente de Pearson de -0,84, ou seja, forte negativo e o valor de p foi menor que 0,00001. Além disso, as cepas 03, 14, 25 e 47 mostraram halos semelhantes de diâmetro do disco (06 mm) e MICs $\geq 32 \mu\text{g/mL}$. A resistência às quinolonas é sugerida como marcador (*screening*) da presença da cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 (McDonald, et al., 2005; Bartlett, 2006; Kuijper et al., 2007). Dessa forma, podemos sugerir que halos de inibição $\geq 18\text{mm}$ possam ser interpretados como sensíveis pela metodologia de disco-difusão.

A nitazoxanida tem se mostrado *in vitro* uma alternativa para tratamento de casos de infecções por *Clostridium difficile*, mantendo a atividade contra cepas resistentes ao metronidazol, com resultados comparáveis com a vancomicina em casos de recidivas e de infecções graves. Seu uso ainda é limitado no pela falta de ensaios clínicos, pois ainda são necessários mais estudos para esclarecer os limites de sensibilidade/resistência deste fármaco e a sua real eficácia terapêutica (Surawicz e Alexander, 2011; Ritter e Petri, 2013).

Devido à escassez de limites de sensibilidade/resistência para nitazoxanida, utilizamos a planilha Excel ECOFFinder (Turnidge, 2006). Baseados nos pontos corte (ECOFFs) realizados no Excel ECOFFinder, a nitazoxanida foi eficaz com todas as 50 cepas sensíveis ao antimicrobiano com $MIC \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$. O ECOFF 95,0% estabelecido para nitazoxanida foi de $0,25 \mu\text{g/mL}$. A MIC_{50} foi $0,06 \mu\text{g/mL}$, sendo a mais baixa entre todas as drogas

utilizadas neste estudo. A MIC₉₀ foi de 0,12 µg/mL. Com esses dados, podemos concluir que a nitazoxanida foi à droga que mostrou melhor atividade *in vitro* para as 50 amostras deste trabalho, porém, não houve boa correlação entre os métodos de disco-difusão e de ágar-diluição, com coeficiente de Pearson de 0,35, ou seja, fraco positivo, inutilizando o método de DD para nitazoxanida (valor de p foi de 0,012715, ou seja, estatisticamente significativo).

A teicoplanina é um glicopeptídeo que tem atividade *in vitro* contra o *C. difficile*. No entanto, resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que a equivalência entre as drogas foi obtida a partir de dois estudos com pequeno número de pacientes (Nelson et al. 2011; Ritter e Petri, 2013). Em nosso estudo, não houve boa correlação entre os métodos de disco-difusão e diluição em ágar para teicoplanina. O coeficiente de Pearson foi de 0,08 e valor de p foi de 0,580767 para a com concentração de disco de 5µg. Para a concentração de 30µg, o coeficiente de Pearson foi de 0,06 e valor de p foi de 0,678943, inviabilizando o método de DD para teicoplanina. Como referido para a nitazoxanida, a principal barreira para o uso de teicoplanina também está na falta de dados de ensaios clínicos e laboratoriais, e, assim, são necessários mais estudos para esclarecer os limites de sensibilidade/resistência para esta droga.

A tigeciclina é uma glicil-ciclina de uso intravenoso com amplo espectro de ação que inclui atividade contra o *Clostridium difficile* (Wilcox, 2007). Tem sido usada no tratamento de casos de CDI. Alguns estudos relataram falhas com esse antimicrobiano, levantando preocupações sobre o risco de resistência bacteriana a essa droga. Além disso, tem surgido preocupações sobre o aumento do risco de mortalidade associado à tigeciclina em infecções graves, o que resultou em um alerta do FDA (*Food and Drug Administration*) recomendando o uso de terapias alternativas em pacientes com infecções graves. Portanto, são necessários mais ensaios clínicos para avaliar a segurança e eficácia da tigeciclina em infecções por *Clostridium difficile* (Herpers et al, 2009; Lu et al. 2010; Ritter e Petri, 2013). Utilizando limites de sensibilidade/resistência para tigeciclina de acordo com o EUCAST (documento 5.16), verificamos 49 cepas sensíveis com MIC ≤ 0,25 µg/mL e somente uma cepa resistente ao antimicrobiano (cepa nº 03), com MIC de 0,5 µg/mL. A

MIC₅₀ e a MIC₉₀ foi de 0,12 µg/mL. O coeficiente de Pearson foi de -0,23, ou seja, fraco negativo e o valor de p foi de 0,108091, ou seja, não significativo estatisticamente, inviabilizando o método de DD.

O método de ágar-diluição é um método de boa acurácia, porém trabalhoso para ser executado na rotina laboratorial (Wust e Hardegger 1992; Olsson-Liljequist e Nord 1994; Rosenblatt e Gustafson, 1995; Wong SS et al., 1999).

Os resultados verificados neste estudo indicam a necessidade de mais estudos *in vitro* e clínicos para definir os limites de sensibilidade/resistência para a teicoplanina e a nitazoxanida, pois faltam critérios de interpretação tanto para disco-difusão quanto para ágar-diluição.

6 CONCLUSÃO

1. Devido à falta de correlação, significância estatística e de limites de sensibilidade/resistência, o método de disco-difusão parece pouco reproduzível para nitazoxanida, teicoplanina e tigeciclina;
2. Para o moxifloxacino houve boa correlação entre os métodos de disco-difusão e ágar-diluição, permitindo sugerir que para o moxifloxacino, halos de inibição $\geq 18\text{mm}$ possam ser interpretados como sensíveis pela metodologia de disco-difusão e halos com diâmetros $< 18\text{ mm}$ devam ser confirmados por metodologia dilucional;
3. Os resultados deste trabalho *in vitro* confirmaram a utilidade do metronidazol como uma droga eficaz no tratamento de infecção por *Clostridium difficile*. Para metronidazol, sugerimos que halos de inibição $\geq 33\text{mm}$ possam ser interpretados como sensíveis pelo método de disco-difusão e para cepas com halos de diâmetro $< 33\text{mm}$, a sensibilidade/resistência deva ser confirmada por metodologia dilucional;
4. Devido à significância estatística e distribuição de halos de inibição das amostras próximos aos valores encontrados utilizando a cepa ATTC, sugere-se que para vancomicina, halos com diâmetro $\geq 22\text{mm}$ possam ser considerados como sensíveis pelo método de disco-difusão;
5. Não foi possível avaliar através das metodologias utilizadas neste trabalho os limites de sensibilidade/resistência para a teicoplanina, devido à ausência de pontos de corte para esta droga (CLSI e EUCAST);
6. Por se mostrar uma droga com potente atividade *in vitro* contra *Clostridium difficile* (MIC_{50} e a MIC_{90} de $0,12\text{ }\mu\text{g/mL}$), a tigeciclina poderia ser mais uma opção terapêutica em infecções por *Clostridium*

difficile, dependendo de mais estudos *in vitro* e clínicos que avaliem a segurança e eficácia da droga;

7. A nitazoxanida foi à droga que mostrou melhor atividade *in vitro* por método dilucional, com a MIC₅₀ de 0,06 e a MIC₉₀ foi de 0,12 µg/mL, sugerindo ser a nitazoxanida útil para o tratamento, devido a sua eficácia *in vitro*. Ensaios clínicos e laboratoriais são necessários para confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

7 ANEXOS

ANEXO 01: Sensibilidade das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata para disco-difusão e ágar-diluição.

Sensibilidade ao metronidazol (discos de 5µg) e das amostras de *Clostridium difficile* (n=50).

CEPA	DISCO DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	35	35	1	1
02	35	35	1	1
03	30	31	2	2
04	36	36	1	1
05	35	36	1	1
06	36	38	1	1
07	34	34	2	2
08	39	40	1	1
09	37	38	1	1
10	37	37	1	1
11	36	36	1	1
12	36	37	1	1
13	38	38	1	1
14	30	30	2	2
15	36	37	1	1
16	36	38	1	1
17	34	35	2	2
18	38	38	1	1
19	37	37	2	2
20	38	39	1	1

Continua

Conclusão

21	39	39	1	1
22	36	37	2	2
23	35	37	1	1
24	35	36	2	2
25	30	31	2	2
26	33	33	1	2
27	34	35	1	1
28	36	37	1	1
29	38	38	1	1
30	36	38	2	2
31	34	35	1	1
32	35	35	1	1
33	37	37	1	1
34	37	37	1	1
35	34	34	1	1
36	33	34	1	1
37	34	35	1	1
38	38	38	1	1
39	36	36	1	1
40	36	37	1	1
41	34	35	1	1
42	36	36	1	1
43	37	37	1	1
44	35	36	1	1
45	36	36	1	1
46	35	35	1	1
47	30	30	1	2
48	37	38	1	1
49	38	38	1	1
50	36	37	1	1

Sensibilidade ao moxifloxacino (discos de 5µg) das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata.

CEPA	DISCO DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	23	23	4	4
02	22	23	4	4
03	6	6	32	32
04	18	19	4	4
05	21	22	4	4
06	21	21	4	4
07	21	21	4	4
08	23	24	4	4
09	15	16	4	4
10	20	21	4	4
11	20	22	2	4
12	21	22	4	4
13	21	22	4	4
14	6	6	32	32
15	21	22	4	4
16	13	14	4	4
17	15	16	4	4
18	20	21	4	4
19	21	22	2	4
20	20	21	4	4
21	23	23	4	4
22	21	22	4	4
23	23	24	4	4
24	20	20	4	4
25	6	6	32	32

Continua

Conclusão

26	21	22	4	4
27	21	22	4	4
28	20	21	4	4
29	19	20	4	4
30	19	20	4	4
31	22	23	4	4
32	24	24	4	4
33	21	21	4	4
34	23	24	4	4
35	20	21	4	4
36	13	15	4	4
37	14	16	4	4
38	18	18	4	4
39	17	18	4	4
40	15	16	4	4
41	22	23	4	4
42	25	25	4	4
43	24	24	4	4
44	22	22	4	4
45	22	23	4	4
46	22	23	4	4
47	6	6	32	32
48	23	23	4	4
49	21	23	2	4
50	21	23	4	4

Sensibilidade à nitazoxanida (discos de 5µg) das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata.

CEPA	DISCO DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	27	28	0,06	0,06
02	27	27	0,06	0,06
03	25	25	0,25	0,25
04	26	26	0,06	0,12
05	29	30	0,06	0,12
06	24	24	0,06	0,12
07	25	26	0,06	0,12
08	26	26	0,06	0,06
09	24	25	0,06	0,12
10	26	26	0,06	0,12
11	24	24	0,06	0,12
12	24	25	0,06	0,12
13	24	25	0,06	0,12
14	25	25	0,06	0,12
15	23	24	0,06	0,06
16	24	25	0,03	0,06
17	23	24	0,06	0,06
18	25	25	0,06	0,06
19	27	27	0,06	0,06
20	26	26	0,06	0,06
21	28	29	0,06	0,06
22	30	30	0,06	0,06
23	30	31	0,06	0,06
24	24	24	0,06	0,12
25	30	30	0,06	0,06

Continua

Conclusão

26	27	28	0,06	0,06
27	26	27	0,06	0,06
28	27	27	0,06	0,06
29	26	27	0,06	0,06
30	27	28	0,06	0,06
31	32	33	0,12	0,25
32	30	30	0,12	0,12
33	25	26	0,12	0,12
34	28	29	0,12	0,12
35	26	27	0,12	0,12
36	26	27	0,12	0,25
37	24	25	0,12	0,12
38	26	27	0,12	0,25
39	27	28	0,12	0,12
40	28	28	0,06	0,12
41	30	30	0,25	0,25
42	28	28	0,12	0,12
43	32	32	0,12	0,12
44	30	31	0,12	0,12
45	30	31	0,25	0,5
46	31	33	0,12	0,12
47	32	33	0,12	0,25
48	33	33	0,12	0,25
49	33	33	0,12	0,12
50	28	29	0,12	0,25

Sensibilidade à teicoplanina (discos de 5µg) das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata.

CEPA	DISCO DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	15	15	4	4
02	14	15	4	4
03	13	14	4	4
04	15	16	2	2
05	16	17	2	2
06	15	15	0,5	0,5
07	15	16	1	1
08	16	16	2	2
09	15	16	2	2
10	19	20	2	2
11	14	15	2	2
12	15	16	2	2
13	14	15	2	2
14	17	17	1	1
15	14	15	2	2
16	15	16	0,5	0,5
17	16	16	2	2
18	19	20	2	2
19	16	16	2	4
20	16	16	1	2
21	16	17	1	1
22	16	18	1	2
23	16	18	1	2
24	16	18	1	1
25	18	19	1	1

Continua

Conclusão

26	15	17	1	1
27	16	18	1	1
28	15	16	1	1
29	15	15	2	2
30	17	18	1	1
31	20	21	2	2
32	20	21	2	2
33	15	16	2	2
34	17	17	2	2
35	15	17	2	2
36	20	21	2	2
37	17	18	2	2
38	18	19	2	2
39	17	18	4	4
40	20	21	2	2
41	17	18	2	2
42	16	18	2	2
43	18	18	2	2
44	16	19	2	2
45	17	17	2	2
46	18	18	2	2
47	17	18	1	1
48	15	15	2	2
49	18	18	2	2
50	17	18	2	2

Sensibilidade à teicoplanina (discos de 30µg) das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata.

CEPA	DISCO DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	20	22	4	4
02	26	27	4	4
03	21	21	2	2
04	21	23	4	4
05	21	22	4	4
06	21	22	0,5	0,5
07	20	20	1	1
08	21	21	2	2
09	19	20	2	2
10	17	18	2	2
11	20	20	2	2
12	20	20	2	2
13	20	20	2	2
14	20	21	1	1
15	19	20	2	2
16	20	21	0,5	0,5
17	20	20	2	2
18	24	24	0,5	0,5
19	20	20	2	2
20	21	22	1	1
21	23	24	1	1
22	22	22	1	1
23	24	24	1	2
24	21	22	1	1
25	25	26	1	1

Continua

Conclusão

26	22	23	2	2
27	21	23	1	1
28	20	22	1	1
29	22	22	2	2
30	23	23	1	1
31	20	21	2	2
32	24	25	2	2
33	24	24	2	2
34	25	25	2	2
35	22	24	2	2
36	24	24	2	2
37	20	22	2	2
38	22	23	2	2
39	23	24	4	4
40	22	23	1	1
41	21	23	2	2
42	23	23	2	2
43	24	25	2	2
44	22	24	2	2
45	24	24	2	2
46	20	20	2	2
47	21	21	1	1
48	20	20	2	2
49	21	21	2	2
50	23	24	2	2

Sensibilidade à tigeciclina (discos de 15µg) das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata.

CEPA	DISCO DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	35	37	0,12	0,12
02	36	36	0,12	0,12
03	31	32	0,5	0,5
04	36	37	0,12	0,12
05	35	36	0,12	0,12
06	31	32	0,25	0,25
07	35	35	0,12	0,12
08	37	38	0,12	0,12
09	32	33	0,12	0,12
10	36	37	0,12	0,12
11	30	30	0,12	0,12
12	32	32	0,12	0,12
13	32	33	0,12	0,12
14	31	33	0,12	0,12
15	29	30	0,12	0,12
16	30	31	0,06	0,06
17	30	30	0,25	0,25
18	33	34	0,06	0,06
19	36	36	0,12	0,12
20	35	35	0,12	0,12
21	35	35	0,12	0,12
22	33	35	0,12	0,12
23	35	36	0,12	0,12
24	30	31	0,12	0,12
25	36	37	0,12	0,12

Continua

Conclusão

26	31	32	0,12	0,12
27	33	35	0,12	0,12
28	31	32	0,12	0,12
29	32	32	0,12	0,12
30	33	34	0,06	0,06
31	40	41	0,12	0,12
32	37	38	0,12	0,12
33	34	34	0,12	0,12
34	32	33	0,12	0,12
35	33	36	0,12	0,12
36	30	32	0,12	0,12
37	31	33	0,12	0,12
38	32	33	0,12	0,25
39	31	33	0,12	0,25
40	31	32	0,12	0,25
41	33	33	0,12	0,12
42	35	35	0,12	0,12
43	36	37	0,12	0,12
44	36	36	0,12	0,12
45	35	35	0,12	0,12
46	37	37	0,12	0,12
47	36	36	0,12	0,12
48	35	37	0,12	0,12
49	37	39	0,12	0,12
50	31	31	0,25	0,25

Sensibilidade à vancomicina (discos de 5µg) das amostras de *Clostridium difficile* (n=50). Testes em duplicata.

CEPA	D. DIFUSÃO (mm)		DILUIÇÃO EM ÁGAR (µg/mL)	
	1° TESTE	2° TESTE	1° TESTE	2° TESTE
01	20	21	4	4
02	23	25	4	4
03	19	22	8	8
04	23	24	4	4
05	25	25	4	4
06	23	23	4	4
07	23	25	4	4
08	21	22	4	4
09	24	25	4	4
10	24	24	4	4
11	21	23	4	4
12	24	25	4	4
13	25	25	2	2
14	24	25	2	4
15	25	26	2	2
16	22	24	2	4
17	23	24	2	2
18	25	25	2	2
19	20	21	4	4
20	25	25	2	4
21	24	25	2	2
22	23	24	2	2
23	24	24	2	2

Continua

Conclusão

24	25	25	2	2
25	22	24	2	2
26	21	24	2	4
27	25	26	2	2
28	23	23	2	4
29	24	24	2	2
30	21	21	2	2
31	23	25	4	4
32	21	23	8	8
33	23	24	4	4
34	23	23	4	4
35	23	23	4	4
36	21	23	4	4
37	22	22	4	4
38	24	25	4	4
39	23	23	4	4
40	22	24	8	8
41	25	26	2	4
42	21	22	4	4
43	24	25	4	4
44	24	25	2	4
45	22	23	4	4
46	24	24	4	4
47	23	24	2	2
48	21	22	4	4
49	24	25	2	2
50	22	23	4	4

DISTRIBUIÇÃO DOS LIMITES DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA (ECOFFs) – MIC (µg/mL) PARA *Clostridium difficile* DE ACORDO COM EUCAST (DOCUMENTO 5.16).

	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	ECOFF
<u>Amoxicillin</u>	0	0	0	0	11	14	37	53	148	328	69	12	0	1	1	1	0	0	0	ND
<u>Benzylpenicillin</u>	0	0	0	1	1	2	2	56	426	1054	368	264	43	16	5	0	0	0	0	ND
<u>Ciprofloxacin</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	79	143	13	63	59	171	0	ND
<u>Clindamycin</u>	0	0	0	1	5	8	21	76	212	478	1113	1398	837	121	14	16	12	387	518	16.0
<u>Daptomycin</u>	0	0	0	0	1	2	9	21	38	90	39	6	0	0	0	0	0	0	0	4.0
<u>Ertapenem</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	154	103	7	0	0	0	0	0	ND
<u>Erythromycin</u>	0	0	0	0	1	7	9	59	279	729	533	47	12	19	7	5	2	444	2128	2.0
<u>Fidaxomicin</u>	0	2	14	58	76	228	436	265	85	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	ND
<u>Fusidic acid</u>	0	0	0	0	3	71	181	312	322	171	37	0	0	0	0	0	0	5	0	2.0
<u>Linezolid</u>	0	0	0	0	0	0	1	8	50	111	30	13	1	1	0	0	0	0	0	ND
<u>Meropenem</u>	0	0	0	0	0	0	1	1	8	99	376	85	13	0	1	0	0	0	0	ND
<u>Metronidazole</u>	0	0	0	2	96	485	1291	2595	2119	896	302	52	3	0	0	1	0	0	0	2.0
<u>Moxifloxacin</u>	0	0	0	0	0	0	0	17	347	1186	1371	70	32	184	284	1732	2	0	0	4.0
<u>Piperacillin</u>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	17	225	393	173	72	22	3	22	0	ND
<u>Piperacillin-tazobactam</u>	0	0	0	0	0	0	0	1	18	162	716	1157	869	135	29	2	0	0	0	ND
	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	ECOFF
<u>Rifampicin</u>	1905	1407	2	1	1	2	0	0	4	4	0	1	0	0	7	50	9	0	0	0.0040
<u>Teicoplanin</u>	0	0	0	1	29	204	147	18	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ND
<u>Tetracycline</u>	0	0	4	2	400	409	77	12	6	9	16	46	38	15	24	13	2	25	0	0.25
<u>Tioacycline</u>	0	0	0	17	224	741	1683	898	13	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25
<u>Vancomycin</u>	0	0	0	0	4	2	13	374	3733	3460	335	29	3	1	1	0	0	0	0	2.0

Am.

ANEXO 02:**PROCEDÊNCIA DOS SAIS DE ANTIBIÓTICOS EM PÓ (SUBSTÂNCIA QUÍMICA).**

DROGA	MARCA	LOTE	ORIGEM
METRONIDAZOL	SIGMA®	SLBG3633V	EUA
MOXIFLOXACINO	SIGMA®	SZBB13XN	EUA
NITAZOXANIDA	SIGMA®	N029013Z	EUA
TEICOPLANINA	SIGMA®	SLGB1094V	EUA
TIGECICLINA	WYETH®	AIDV/12	BRASIL

PROCEDÊNCIA DOS DISCOS DE ANTIBIÓTICOS

DROGA	MARCA	LOTE	ORIGEM
MOXIFLOXACINO	OXOID®	1271576	INGLATERRA
TIGECICLINA	OXOID®	1448521	INGLATERRA

SOLUÇÕES ESTOQUE DE ANTIBIÓTICOS

DROGA	SOLVENTE	DILUENTE	CONCENTRAÇÃO µg/mL
METRONIDAZOL	DMSO	DMSO	32
MOXIFLOXACINO	ÁGUA BIDESTILADA	ÁGUA BIDESTILADA	128
NITAZOXANIDA	DMSO	DMSO	16
TEICOPLANINA	ÁGUA BIDESTILADA	ÁGUA BIDESTILADA	128
TIGECICLINA	ÁGUA BIDESTILADA	ÁGUA BIDESTILADA	32
VANCOMICINA	ÁGUA BIDESTILADA	ÁGUA BIDESTILADA	128

Para todas as drogas foram utilizadas uma solução mãe pronta na concentração de 10.000 µg/mL, contribuição do setor de Produção de Meios e Reativos (PMR) do Laboratório Fleury – Medicina Diagnóstica.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ANTIBIÓTICOS

Para cada antibiótico foi preparada uma solução estoque a partir de uma solução mãe pronta na concentração de 10.000µg/mL (Contribuição do setor de Produção de Meios e Reativos do Laboratório Fleury – Medicina Diagnóstica). A concentração utilizada por droga variava de acordo com os intervalos de concentrações necessários para cada bateria, obedecendo a seguinte fórmula:

$$V2 (\mu L) = \frac{V1 (\mu L) \times C1 (\mu g/mL)}{C2 (\mu g/mL)}$$

Onde:

V2 = volume a ser retirado da solução mãe (µL), para ser adicionado em 20mL da solução estoque a ser preparada.

V1= volume total da solução estoque a ser preparada (µL)

C1= concentração final (µg/mL)

C2= concentração da solução mãe (µg/mL)

METRONIDAZOL

SOLUÇÃO ESTOQUE:

$$V2 (\mu\text{L}) = \frac{V1 (\mu\text{L}) \times C1 (\mu\text{g/mL})}{C2 (\mu\text{g/mL})}$$

$$V2 = \frac{128 \times 20.000}{10.000}$$

$$V2 = 256 \mu\text{L em } 20\text{mL de}$$

Dessa forma foi obtida a solução estoque na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO:

1° tubo: 1mL de solução estoque (128 $\mu\text{g/mL}$) + 1mL de Caldo Brucella, resultando na Solução A = 64 $\mu\text{g/mL}$. Do 2° ao 9° tubo, foram colocados 2mL de Caldo Brucella. Ao 2° tubo foram acrescentados 2mL da Solução A, o que resultou numa concentração inicial de 32 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo foi retirado 2mL e passado para o 3° tubo, resultando em 16 $\mu\text{g/mL}$ e assim por diante, até o 9° tubo, chegando numa concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO EM ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO (1:10):

08 tubos com 18 mL de ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina e vitamina K + 2mL da solução de antibiótico correspondente do 2° ao 9° tubo.

CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NAS PLACAS ($\mu\text{g/mL}$):

1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

MOXIFLOXACINO

SOLUÇÃO ESTOQUE:

$$V2 (\mu\text{L}) = \frac{V1 (\mu\text{L}) \times C1 (\mu\text{g/mL})}{C2 (\mu\text{g/mL})}$$

$$V2 = \frac{128 \times 20.000}{10.000}$$

$$V2 = 256 \mu\text{L em } 20\text{mL de}$$

Dessa forma foi obtida a solução estoque na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO:

1° tubo: 1mL de solução estoque (128 $\mu\text{g/mL}$) + 1mL de Caldo Brucella, resultando na Solução A = 64 $\mu\text{g/mL}$. Do 2° ao 9° tubo, foram colocados 2mL de Caldo Brucella. Ao 2° tubo foram acrescentados 2mL da Solução A, o que resultou numa concentração inicial de 32 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo foi retirado 2mL e passado para o 3° tubo, resultando em 16 $\mu\text{g/mL}$ e assim por diante, até o 9° tubo, chegando numa concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO EM ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO (1:10):

08 tubos com 18 mL de ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina e vitamina K + 2mL da solução de antibiótico correspondente do 2° ao 9° tubo.

CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NAS PLACAS ($\mu\text{g/mL}$):

1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

NITAZOXANIDA**SOLUÇÃO ESTOQUE:**

$$V2 (\mu\text{L}) = \frac{V1 (\mu\text{L}) \times C1 (\mu\text{g/mL})}{C2 (\mu\text{g/mL})}$$

$$V2 = \frac{16 \times 20.000}{10.000}$$

$$V2 = 32\mu\text{L em } 20\text{mL}$$

Dessa forma foi obtida a solução estoque na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO:

1° tubo: 1mL de solução estoque (16 $\mu\text{g/mL}$) + 1mL de Caldo Brucella, resultando na Solução A = 8 $\mu\text{g/mL}$. Do 2° ao 9° tubo, foram colocados 2mL de Caldo Brucella. Ao 2° tubo foram acrescentados 2mL da Solução A, o que resultou numa concentração inicial de 4 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo foi retirado 2mL e passado para o 3° tubo, resultando em 2 $\mu\text{g/mL}$ e assim por diante, até o 9° tubo, chegando numa concentração de 0,03 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO EM ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO (1:10):

08 tubos com 18 mL de ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina e vitamina K + 2mL da solução de antibiótico correspondente do 2° ao 9° tubo.

CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NAS PLACAS ($\mu\text{g/mL}$):

1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03

TEICOPLANINA**SOLUÇÃO ESTOQUE:**

$$V2 (\mu\text{L}) = \frac{V1 (\mu\text{L}) \times C1 (\mu\text{g/mL})}{C2 (\mu\text{g/mL})}$$

$$V2 = \frac{128 \times 20.000}{10.000}$$

$$V2 = 256 \mu\text{L em } 20\text{mL de}$$

Dessa forma foi obtida a solução estoque na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO:

1° tubo: 1mL de solução estoque (128 $\mu\text{g/mL}$) + 1mL de Caldo Brucella, resultando na Solução A = 64 $\mu\text{g/mL}$. Do 2° ao 9° tubo, foram colocados 2mL de Caldo Brucella. Ao 2° tubo foram acrescentados 2mL da Solução A, o que resultou numa concentração inicial de 32 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo foi retirado 2mL e passado para o 3° tubo, resultando em 16 $\mu\text{g/mL}$ e assim por diante, até o 9° tubo, chegando numa concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO EM ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO (1:10):

08 tubos com 18 mL de ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina e vitamina K + 2mL da solução de antibiótico correspondente do 2° ao 9° tubo.

CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NAS PLACAS ($\mu\text{g/mL}$):

1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

TIGECICLINA**SOLUÇÃO ESTOQUE:**

$$V2 (\mu\text{L}) = \frac{V1 (\mu\text{L}) \times C1 (\mu\text{g/mL})}{C2 (\mu\text{g/mL})}$$

$$V2 = \frac{32 \times 20.000}{10.000}$$

$$V2 = 64\mu\text{L em } 20\text{mL}$$

Dessa forma foi obtida a solução estoque na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO:

1° tubo: 1mL de solução estoque (32 $\mu\text{g/mL}$) + 1mL de Caldo Brucella, resultando na Solução A = 16 $\mu\text{g/mL}$. Do 2° ao 9° tubo, foram colocados 2mL de Caldo Brucella. Ao 2° tubo foram acrescentados 2mL da Solução A, o que resultou numa concentração inicial de 8 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo foi retirado 2mL e passado para o 3° tubo, resultando em 2 $\mu\text{g/mL}$ e assim por diante, até o 10° tubo, chegando numa concentração de 0,03 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO EM ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO (1:10):

09 tubos com 18 mL de ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina e vitamina K + 2mL da solução de antibiótico correspondente do 2° ao 9° tubo.

CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NAS PLACAS ($\mu\text{g/mL}$):

1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03

VANCOMICINA**SOLUÇÃO ESTOQUE:**

$$V2 (\mu\text{L}) = \frac{V1 (\mu\text{L}) \times C1 (\mu\text{g/mL})}{C2 (\mu\text{g/mL})}$$

$$V2 = \frac{128 \times 20.000}{10.000}$$

$$V2 = 256 \mu\text{L em } 20\text{mL de}$$

Dessa forma foi obtida a solução estoque na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO:

1° tubo: 1mL de solução estoque (128 $\mu\text{g/mL}$) + 1mL de Caldo Brucella, resultando na Solução A = 64 $\mu\text{g/mL}$. Do 2° ao 9° tubo, foram colocados 2mL de Caldo Brucella. Ao 2° tubo foram acrescentados 2mL da Solução A, o que resultou numa concentração inicial de 32 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo foi retirado 2mL e passado para o 3° tubo, resultando em 16 $\mu\text{g/mL}$ e assim por diante, até o 9° tubo, chegando numa concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

DILUIÇÃO EM ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO (1:10):

08 tubos com 18 mL de ágar Brucella suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado estéril (ABSC), hemina e vitamina K + 2mL da solução de antibiótico correspondente do 2° ao 9° tubo.

CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NAS PLACAS ($\mu\text{g/mL}$):

1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

8 REFERÊNCIAS

Alcides AP, Brazier JS, Pinto LJ, Balassiano IT, Boente RF, de Paula GR, Ferreira EO, Avelar KE, Miranda KR, Ferreira MC, Domingues RM. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil: prevalent types of *Clostridium difficile* in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007; 92(1):53-59.

Aslam S, Musher DM. Nitazoxanide: clinical studies of a broad-spectrum anti-infective agent. *Future Microbiol*. 2007; 2(6):583-90.

Babinchak T, Ellis-Grosse E, Dartois N, Rose GM, Loh E. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(Suppl 5):S354–66.

Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA*. 2015; 313:398-408.

Baines SD, O'Connor R, Freeman J, Fawley WN, Harmanus C, Mastrantonio P, Kuijper EJ, Wilcox, MH. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62:1046–52.

Bartlett JG. Narrative review: The new epidemic of *Clostridium difficile* associated enteric disease. *Ann Intern Med*. 2006; 145:758-64.

Broekhuysen J, Stockis A, Lins RL, De Graeve J, Rossignol JF. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2000; 38: 387–94.

Bujanda L, Cosme A. *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Gastroenterol Hepatol*. 2009; 32:48-56.

Carrico RM, Alchibald LK, Bryant K, Dubberke E, Fauerbach LL, Garcia JG, Gould C, Koll B, Mayfield J, Pang X, Ramirez JA, Stephens D, Stricof RL,

Wiemken T. Guide to the elimination of *Clostridium difficile* in healthcare settings. *Association for Professionals in Infection Control & Epidemiology*. 2008; 1-66.

Campbell J, Zaki SR, McDonald LC. *Clostridium difficile* associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198(6):635.e1-6.

Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65: 501-21.

Chaparro-Rojas F, Mullane KM. Emerging therapies for *Clostridium difficile* infection - focus on fidaxomicin. *Infect Drug Resist*. 2013; 6:41-53.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria*. Approved standard document M11-A8. 8th ed. Wayne, Pa, USA. CLSI, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Approved standard document M100-S24. 24th ed. Wayne, Pa, USA. CLSI, 2014.

Dinh A, Bouchand F, Le Monnier A. Current treatment and epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Rev Med Interne*. 2015; 15:70-73

Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol*. 2008; 57(11):685-89.

Durai R. Epidemiology, Pathogenesis, and Management of *Clostridium difficile* Infection. *Dig Dis Sci*. 2007; 52(11):2958-62.

Erikstrup LT, Danielsen TK, Hall V, Olsen KE, Kristensen B, Kahlmeter G, Fuursted K, Justesen US. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(8):E266-72.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Version 2.1, Basel, SWZ, 2012.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Version 5.16, Basel, SWZ, 2015. Disponível em: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>

Falcão LS. *Aspectos da epidemiologia da colonização por Bacteroides spp. e Parabacteroides distasonis em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de Janeiro* [tese]. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010.

Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(3):529-49.

Gilles HM, Hoffman PS. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends Parasitol*. 2002; 18(3):95-97.

Golan Y, Louie T, Miller M, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A. Risk of recurrence and time to recurrence following treatment of *Clostridium difficile* infection: patient characteristics and the differential effect of fidaxomicin vs vancomycin. *Gastroenterology*. 2011; 140: S360–61.

Hegde DD, Strain JD, Heins, JR; Farver DK. New advances in the treatment of Clostridium difficile infection (CDI). *Ther Clin Risk Manag*. 2008; 4(5):949-64.

Herpers BL, Vlamincx B, Burkhardt O, Blom H, Biemond-Moeniralam HS, Hornef M, Welte T, Kuijper EJ. Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1732-35.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic E. coli. *Nature Review of Microbiology*. 2004; 2(2):123-40.

Kim JW, Lee KL, Jeong JB, Kim BG, Shin S, Kim JS, Jung HC, Song IS. Proton pump inhibitors as a risk factor for recurrence of Clostridium difficile associated diarrhea. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(28):3573-77.

Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, Pituch H, Reichert P, Schneider F, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Barbut F, Delmée M, Wilcox M, Pearson A, Patel BC, Brown DJ, Frei R, Akerlund T, Poxton IR, Tüll P. Update of Clostridium difficile associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill*. 2007; 12(6):E1-2.

Larson KC, Belliveau PP, Spooner LM. Tigecycline for the Treatment of Severe Clostridium difficile Infection. *Ann Pharmacother*. 2011; 45(7-8):1005-10.

Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue YK; OPT-80-003 Clinical Study Group. 6. Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection. *N Engl J Med*. 2011; 364(5):422-31.

Lu CL, Liu CY, Liao CH, Huang YT, Wang HP, Hsueh PR. Severe and refractory Clostridium difficile infection successfully treated with tigecycline and metronidazole. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35:311-12.

McDonald, LC ; Killgore, GE; Thompson, A; Owens, RC; Kazakova, SV; Sambol, SP; Johnson, S; Gerding, DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2005; 353:2433-41.

Mena A, Riera E, López-Causapé C, Weber I, Pérez JL, Oliver A. In Vivo Selection of Moxifloxacin Resistant *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5):2788-89.

Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. *Microbiologia Médica*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Nelson RL, Kelsey P, Leeman H, Meardon N, Patel H, Paul K, Rees R, Taylor B, Wood E, Malakun R. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; (9):CD004610.

Nicodemo AC. *Sensibilidade in vitro de isolados de Stenotrophomonas maltophilia: comparação de três metodologias (disco-difusão, E-test e ágar-diluição)* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

O'Connor JR, Galang MA, Sambol SP, Hecht DW, Vedantam G, Gerding DN, Johnson S. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:2813–17.

Olsson-Liljequist B, Nord CE. Methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis*. 1994; 18(suppl 4):S293–96.

Paiva RM. *Concentração Inibitória Mínima de Vancomicina para Staphylococcus sp. coagulase negativa resistente à Meticilina: comparação entre os métodos de microdiluição em caldo e e-test e correlação com falha terapêutica em pacientes com bacteremia* [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

Pereira, NG. Infecção pelo *Clostridium difficile*. 2014. *J Bras Med*; 102(5): 27-49.

Pinto LJ, Alcides AP, Ferreira EO, Avelar KE, Sabrá A, Domingues RM, Ferreira MC. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol*. 2003; 52 (12):1095-99.

Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schratzenholz A, Schild H, von Eichel-Streiber C. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. 2007; 446(7134):415-9.

Rennie RP, Turnbull L, Brosnikoff C, Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4):1153–57.

Ritter, AS; Petri Jr, WA. New Developments in Chemotherapeutic Options for *Clostridium difficile* Colitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2013; 26(5):461-70.

Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995; 22:279–84.

Rossi F, Andreazzi DB. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. 1a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Rouphael NG, O'Donnell JA, Bhatnagar J, Lewis F, Polgreen PM, Beekmann S, Guarner J, Killgore GE, Coffman B, Campbell J, Zaki SR, McDonald LC. *Clostridium difficile* associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198(6):635.e1-6.

Sanchez ML, Jones RN. E-test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiological application. *Antimicrob. News*. 1993; 8:1-8.

Spadão FS. *Aspectos clínicos e biológicos da diarreia por Clostridium difficile em pacientes hematológicos e transplantados de medula óssea* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Surawicz CM, Alexander J. Treatment of refractory and recurrent *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8:330–39.

Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:418-25. Disponível em: <http://community.clsi.org/micro/2015/02/19/rangefinder/>

Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 9a ed. Washington: ASM Press; 2007. p.1146-51.

Venugopal AA, Johnson S. Current State of *Clostridium difficile* Treatment Options. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 Suppl 2:S71-6.

Wilcox MH. Evidence for low risk of *Clostridium difficile* infection associated with tigecycline. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13:949–52

Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34:1–6

Wust J, Hardegger U. Comparison of the Etest and a reference dilution method for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992; 11:1169–73.