EVELYNE SANTANA GIRÃO

Avaliação dos fatores preditores, características clínicas, microbiológicas e epidemiologia molecular da diarreia por *Clostridioides difficile* em pacientes internados em cinco hospitais brasileiros

SÃO PAULO

2021

EVELYNE SANTANA GIRÃO

Avaliação dos fatores preditores, características clínicas, microbiológicas e epidemiologia molecular da diarreia por *Clostridioides difficile* em pacientes internados em cinco hospitais brasileiros

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profª. Drª. Silvia Figueiredo Costa

SÃO PAULO

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Girão, Evelyne Santana
Avaliação dos fatores preditores, características clínicas, microbiológicas e epidemiologia molecular da diarreia por Clostridioides difficile em pacientes internados em cinco hospitais brasileiros / Evelyne Santana Girão. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Diarreia 2.Clostridioides difficile 3.Metronidazol 4.Vancomicina 5.Sequenciamento completo do genoma 6.Epidemiologia molecular

USP/FM/DBD-279/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“E no fim, o amor que você recebe é igual ao amor que você dá. ”

(The Beatles)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduilton e Valtina, meu alicerce e referência.

Ao meu esposo Leonardo, meu parceiro de vida.

Às minhas filhas Lia e Sara, razão e sentido de tudo.

À minha irmã, Milena, e aos meus amigos, meu amor infinito.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Silvia Figueiredo Costa, pela acolhida generosa desde a Residência Médica e o Mestrado. Pelos ensinamentos de medicina e de vida, fundamentais para minha formação. Pelo cuidado comigo e com todos ao seu redor, incentivando e despertando o que há de melhor em nós. Minha eterna gratidão.

À Profa. Anna Sara Levin, exemplo de profissional e de ser humano, fonte de inspiração sempre.

Ao meu pai, José Eduilton Girão, referência maior de medicina, de ética e de amor ao próximo. Médico de homens e de almas.

Ao Prof. e amigo Jorge Luiz Nobre Rodrigues, por despertar em mim a paixão pela infectologia, pelo incentivo e oportunidades. Por tornar meus dias mais leves.

A Professora Gerly Anne Brito, pelo acolhimento em seu laboratório e pela valorosa contribuição para essa pesquisa.

À equipe do LIM-49, em especial à Sania, Géssica, Camila, Roberta, Constância, Tatiana e Evelyn, que tornaram possível a realização desse projeto.

Às enfermeiras Daniely, Geovania e Janete, pela ajuda na inclusão de pacientes e coleta de amostras do Hospital Universitário Walter Cantidio (HUWC/UFC) e do Hospital São José.

À Cecília Costa e a todos do Laboratório de Microbiologia Médica da UFC, pelo apoio e participação fundamental no processamento das amostras do Ceará.

Ao Setor de Microbiologia do Hospital São Jose, em especial dr. Jacó Mesquita, e ao Jaldir, pela ajuda na realização dos testes moleculares.

Aos colegas Ícaro Boszczowski e Filipe Piastrelli, pela inclusão dos pacientes do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

Aos colegas Hugo Morales, Keite Nogueira e Adriane Maestri, pela inclusão dos pacientes do Hospital das Clínicas da UFPR.

Ao amigo Bruno Tavares, pela dedicação e disponibilidade na busca ativa, coleta de dados e amostras dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Ao amigo Lauro Perdigão, pelas orientações, sugestões e risadas.

A amiga Maura, pela acolhida em sua casa, pelos conselhos, sugestões e amizade.

Ao Antônio Brazil Jr, pela disponibilidade na análise estatística dos dados.

À Tanila Aguiar Coutinho, pelo apoio fundamental junto à Plataforma Brasil e aos Comitês de Ética dos hospitais participantes.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Beatriz Souza Dias, Prof. Mauro Salles e Dra. Maura Salaroli, pelas correções e sugestões valiosas para essa pesquisa.

Aos amigos do SCCIH do Hospital São José, do Hospital Walter Cantídio e do Hospital Regional da UNIMED, pelo apoio e pela amizade.

Ao meu Amor Leonardo, sem o qual teria sido impossível. Obrigado pela paciência, incentivo, correções, sugestões e por participar de tudo, desde o início.

Aos pacientes e seus familiares, que aceitaram participar do estudo e tornaram possível a sua realização.

Esta tese foi confeccionada no formato que enfatiza a produção de artigos científicos e está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução.....20

2.Objetivo.....45

3. Métodos.....47

3.1. Desenho do Estudo..... 48

3.2. Período, População e Local do Estudo.....48

3.3. Critérios de Inclusão.....51

3.4. Critérios de Exclusão.....51

3.5. Definições.....51

3.6. Coleta e processamento de amostras.....55

3.7. Isolamento de *C. diificile* por cultura.....58

3.8. Testes de sensibilidade a antimicrobianos.....58

3.9. Sequenciamento do genoma e análise bioinformática 61

3.10. Aspectos éticos.....62

3.11 Variáveis avaliadas.....62

3.12 Análise de dados.....64

4. Resultados.....66

4.1 Dados de diarreia por *C. difficile* em 5 hospitais brasileiros- 1ª publicação 67

4.2 Dados sobre fatores preditores, características clínicas, microbiológicas e epidemiologia molecular da diarreia por C. *difficile*- 2ª publicação.....81

5. Discussão.....120

6. Conclusões.....129

7. Anexos.....131

6. Referências Bibliográficas.....166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	*Clostridioides difficile*
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DACD	Doença associada ao *Clostridioides difficile*
DM	*Diabetes mellitus*
ELISA	*Enzyme linked immunoabsorbent assay*
ESCMID	*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FDA	*Food and Drug Administration*
GDH	Glutamato desidrogenase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC- FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC- UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HUWC-UFC	Hospital Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará em Fortaleza
HSJ	Hospital São José de Doenças Infecciosas e Parasitárias
HAOC	Hospital Alemão Oswaldo Cruz

IDSA	*Infectious Disease Society of America*
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IMT	Instituto de Medicina Tropical
LAMP	*Loop-mediated isothermal amplification assay*
LIM-49	Laboratório de Investigação Médica nº 49
MALDI-TOF	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*
MIC	*Minimal Inhibitory Concentration*
MLST	*Multilocus Sequence Typing*
NAAT	*Nucleic acid amplification test*
NAP 1	*North America Pulsed field type 1*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
REDCap	*Research Eletronic Data Capture*
SGC	Sequenciamento de Genoma Completo
SHEA	*Society for Healthcare Epidemiology of America*
ST	*Sequence Type*
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TMF	Transplante de microbiota fecal

TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definições de doença grave e complicada associada a Infecção por *C. difficile*.....28

Tabela 2. Testes diagnósticos para doença associada a C. *difficile*.....32

Tabela 3. Recomendações para tratamento de doença associada a *C. difficile* (DACD) segundo as 3 principais diretrizes.....41

Tabela 4. Pontos de corte utilizados na categorização de sensibilidade de 35 cepas de *C. difficile* com os respectivos halos de inibição de crescimento pelo método disco difusão (mm) 119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatogenia da infecção por *C. difficile* 22

Figura 2. Algoritmos com múltiplos passos para diagnóstico de infecção por *C. difficile,* baseado em testes de amostras fecais.....35

Figura 3. Recomendações para realização de testes laboratoriais de diagnostico de infecção por *C. difficile* com base em critérios institucionais pré-estabelecido.....37

Figura 4. Distribuição geografica dos hospitais participantes do estudo.....50

Figura 5. Aplicativo on-line que utiliza um sistema de pontuação de gravidade da CDAD.....54

Figura 6. Teste rápido C Diff Quik Chek Complete, para detecção de GDH e toxinas A/B.....56

Figura 7. Teste rápido molecular Xpert® *C. difficile* (Cepheid) para detecção de CD produtor de toxina.....57

Figura 8. Fluxo de coleta de processamento de amostras.....60

RESUMO

Girão ES. ***Avaliação dos fatores preditores, características clínicas, microbiológicas e epidemiologia molecular da diarreia por Clostridioides difficile em pacientes internados em cinco hospitais brasileiros*** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Clostridioides difficile (CD) é o principal agente causador de diarreia relacionada à assistência à saúde no mundo. São escassos os seus dados epidemiológicos no Brasil, principalmente no tocante à prevalência, caraterização clínica, microbiológica e molecular. Os objetivos desse estudo foram avaliar o percentual de CD em pacientes com diarreia internados em hospitais brasileiros, assim como analisar seus fatores preditores, características clínicas e moleculares. Trata-se de estudo de coorte prospectivo, descritivo, observacional, onde coletou-se amostras de fezes de pacientes com diarreia internados em 5 hospitais de diferentes regiões do país. Incluiu-se pacientes $\geq$ 18 anos que apresentaram 3 ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 horas. Todas as amostras foram submetidas ao teste rápido para detecção simultânea do antígeno glutamato desidrogenase (GDH) e toxinas A e B, por método imunoenzimático (TECHLAB® C. diff Quik Chek ®), e ao teste rápido molecular Xpert® *C. difficile* (Cepheid,*)* para detecção das cepas de CD produtoras de toxinas. As amostras foram cultivadas em meio específico e a identificação de CD foi confirmada pelo MALDI-TOF. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos, extração de DNA e sequenciamento completo de genoma também foram realizados. Incluiu-se 377 amostras de 361 pacientes. CD foi encontrado em 15% (56/377) dos casos, utilizando como definição de doença associada ao CD (DACD) a presença de teste positivo para toxina A/B nas fezes ou teste rápido molecular positivo. A análise multivariada identificou como fatores preditores independentes para diarreia por CD: uso prévio de meropenem (OR, 4,09, 95%IC, 2,097-7,09, p<0,006), presença de muco nas fezes (OR, 3,29; 95% IC, 1,406-7,22, p=0.006) e leucocitose com > 20% de bastões (OR, 3,77; 95% IC, 1,28-11,12, p=0,016). A maioria dos pacientes (68%) apresentou DACD leve a moderada. Metronidazol oral foi o tratamento de escolha em 74% dos casos,

com 85% de sucesso. A taxa de recidiva após término do tratamento foi de 14% no grupo do metronidazol. A mortalidade geral dos pacientes com DACD foi de 19%, e nenhum óbito foi-lhe atribuído. Trinta e cinco cepas de CD foram recuperadas, todas sensíveis ao metronidazol e à vancomicina, porém, resistentes à ciprofloxacina. O sequenciamento completo do genoma revelou 17 tipos de ST, seis dos quais foram novos, sendo o ST42 foi o mais comum. As cepas hipervirulentas BI/NAP1/027 não foram identificadas. O gene *ermB* foi mais encontrado nas cepas pertencentes ao ST42 (p=0,004). Concluiu-se que o uso prévio de meropenem, presença de muco nas fezes e leucocitose com desvio a esquerda são fatores preditores para DACD. A maioria dos casos de DACD pode ser tratada com metronidazol oral, com boa resposta clínica, o que parece ser uma opção apropriada para casos leves a moderados em nosso meio.

Descritores: Diarreia; *Clostridioides difficile*; Metronidazol; Vancomicina; Sequenciamento completo do genoma; Epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Girao ES. ***Predictive factors, outcomes, microbiological characteristics, and molecular epidemiology of Clostridioides difficile diarrhea in five Brazilian hospitals*** **[**thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Clostridioides difficile (CD*)* is the leading cause of health care-associated diarrhea worldwide. There are few studies addressing the role of *C. difficile* infection (CDI) in Brazil. The aim of this study was to evaluate the positivity of CD in patients with diarrhea admitted to Brazilian hospitals, as well as to analyse its predictive factors, its clinical, microbiological, and molecular characteristics. This is a prospective, descriptive, observational cohort study, where stool samples were collected from patients with diarrhea admitted to 5 hospitals in different regions of the country. Patients > 18 years old with 3 or more non-formed stool evacuations within 24 hours were included. All samples were tested for glutamate dehydrogenase (GDH) and toxins A/B, and for detection of the toxin B gene (*tcdB*), binary toxin gene (*cdtA*), and deletion of 117 nucleotides in the *tcdC* gene. All samples were also cultured. CD identification was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy (MALDI-TOF/MS). Antimicrobial susceptibility tests and whole-genome sequencing (WGS) of *C. difficile* strains were performed. 377 stool samples from 361 patients were included and 15% were positive for CD. CDI cases were defined by a positive ELISA test for toxins A and B or a nucleic acid amplification test (NAAT) for a toxin gene performed in a diarrheic patient. Multivariate analysis identified as predictive factors for CDI: prior use of meropenem (OR 4.09, 95% CI 2.097–7.095; p< 0.001), mucus in stools (OR 3.29; 95% CI 1.406-7.722; p=0.006) and neutrophil left-shift with >20% of bands (OR 3.77; 95% IC 1.280–11.120; p=0.016). Most patients (68%) had non-severe CDI. Oral metronidazole was the initial treatment in 74% of cases, with 85% of success. Relapse was observed in 14% of the metronidazole group. The overall mortality was 19%, with no deaths attributed to CDI. All isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin, but resistants to ciprofloxacin. The WGS revealed 17 different sequence types

(ST) and the six new ones. ST42 was the most common ST and hypervirulent strains BI/NAP1/027(ST1/RT027) were not found. The *ermB* gene was more frequently found in isolates of ST42 (p=0.004). In conclusion, patients with prior use of meropenem, mucus in stools and neutrophil left-shift with >20% of bands were more likely to have CDI in our study. Most cases can be treated with oral metronidazole with good clinical response, which seems to be an appropriate option for non-severe CDI in Brazil.

Descriptors: Diarrhea; *Clostridioides difficile*; Metronidazole; Vancomycin; Whole-genome sequencing; Molecular epidemiology.

.

1 INTRODUÇÃO

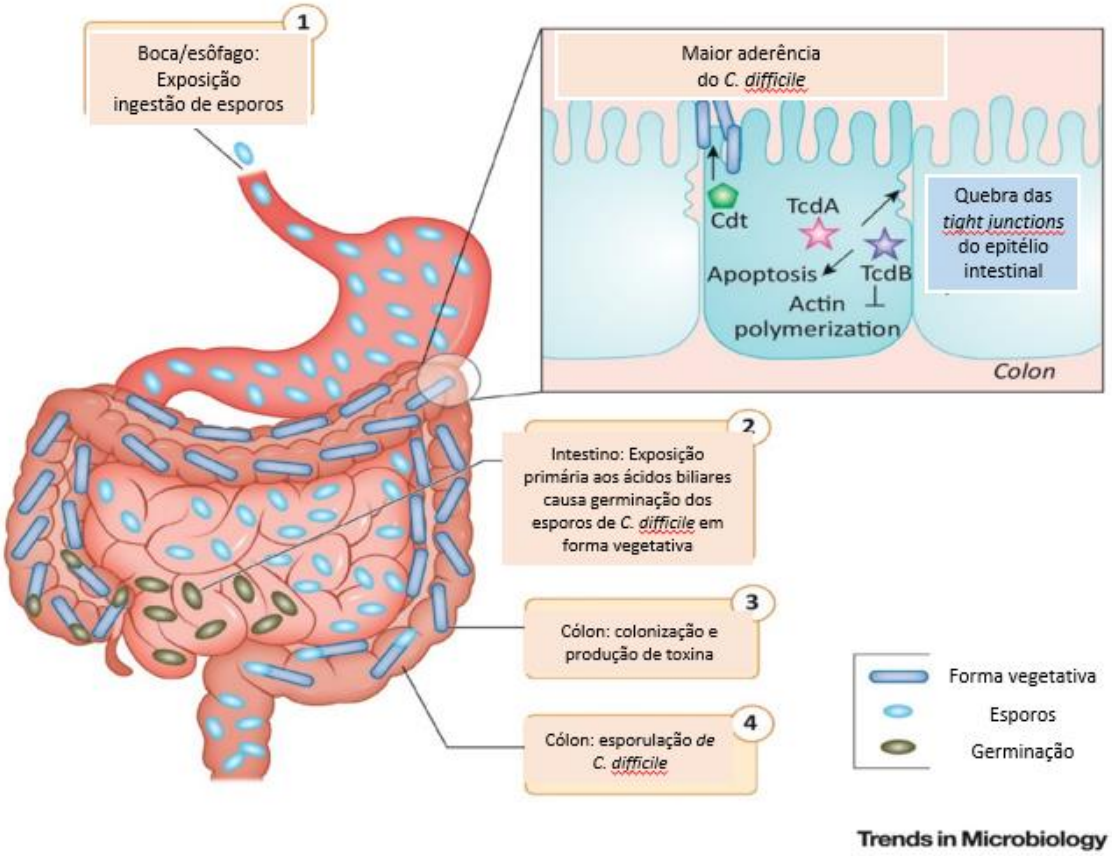
Clostridioides (Clostridium) difficile (CD) é um bacilo gram-positivo anaeróbio formador de esporos e produtor de toxinas. Atualmente, representa a principal causa de diarreia relacionada à assistência à saúde no mundo. Sua transmissão se dá por via fecal-oral, fômites e através de mobiliário e equipamentos. Os esporos persistem no ambiente por períodos prolongados e são resistentes a vários desinfetantes comerciais, favorecendo a sua propagação ambiental[1,2].

Infecções por CD podem variar desde diarreia leve e aquosa à colite pseudomembranosa, fulminante, podendo levar à morte. Estima-se que 5 a 15% da população geral seja portadora assintomática de CD. Há relato de taxa de colonização de mais de 20% em adultos hospitalizados, podendo chegar a 50% em residentes de instituições de longa permanência[3]. Sua colonização e ligação à mucosa intestinal são facilitadas pela alteração da microbiota intestinal normal. Essa alteração pode ocorrer por uso de antimicrobianos ou antineoplásicos, ou por redução da mobilidade colônica causada por cirurgias ou antiperistálticos. Uma vez no intestino, os esporos se convertem em formas vegetativas produtoras de toxinas, tornando-se suscetíveis à morte por agentes antimicrobianos. A resposta imune do hospedeiro ao CD provavelmente exerce um papel determinante na condição de portador assintomático[4,5].

O principal fator de virulência do CD é a produção de toxinas. As cepas toxigênicas podem produzir até três tipos: toxina A (TcdA), toxina B (TcdB) e toxina binária (CDT). Essas toxinas levam à ativação e recrutamento de vários mediadores inflamatórios, além de exercerem efeito citotóxico direto na mucosa intestinal. Os níveis de toxina nas fezes correlacionam-se à gravidade da doença[4]. A toxina A atua diretamente os neutrófilos, promovendo quimiotaxia daqueles que se localizam nas pseudomembranas e nas camadas subjacentes da mucosa intestinal. A toxina B é essencial para a virulência do CD, sendo cerca de 10 vezes mais potente do que toxina A como causadora de dano da mucosa do cólon[6,7.] Os genes que codificam as toxinas A (*tcdA*) e B (*tcdB)* de CD estão localizados dentro de um locus de patogenicidade o PaLoc e são encontrados apenas em cepas toxigênicas. A regulação dos genes das toxinas A e B é mediada pelo gene *tcdC* e suas mutações associam-se à superprodução de

ambas as toxinas. A minoria de cepas de CD (10 a 30 %) não é produtora de toxinas. Essas cepas podem colonizar o trato gastrointestinal e crescer em meios de cultura, sem exercer efeito patogênico[8].

Figura 1- Fisiopatogenia da infecção por *C difficile.* Adaptado de Sandhu BK, 2018 [5]



1.1. Epidemiologia

CD é o principal agente causador de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) nos Estados Unidos da América (EUA) e corresponde a 15% a 25% dos casos de diarreia hospitalar[9]. Nos EUA, as hospitalizações por doença associada aos *Clostridioides difficile* (DACD) dobraram de 2000 a 2010, com projeção de crescimento contínuo, especialmente devido a incorporação de métodos diagnósticos laboratoriais mais sensíveis[10]. Dados de meta-análise recente, que analisou 229 estudos e relatórios de vigilância de 41 países do mundo, encontrou taxa global de DACD relacionada a assistência à saúde de 2,24 por 1000 internações/ano e 3,54 por 10.000 pacientes-dia/ano. As taxas mais elevadas foram descritas na América do Norte e entre pacientes idosos[11].

Estudos de prevalência de DACD são escassos. Na Europa, taxas de prevalência de DACD em pacientes hospitalizados variaram de 6%, em países como França e Bélgica, a 20% na Eslovênia e Bulgária[12]. Na América Latina, a Costa Rica publicou em 2008 o primeiro estudo de CD em adultos, com prevalência reportada de 30%[13].

Após o ano 2000, houve aumento da incidência e da gravidade de DACD. A taxa de mortalidade atribuída a esse agente era menor que 1,5%, antes de 2000, tendo aumentado para 5,7%, chegando até 16,7% em períodos de surto[14]. Esse aumento foi atribuído ao surgimento de nova cepa hipervirulenta, caracterizada como *"North American Pulsed Field Type1"* (NAP1), ou "*Restriction enzyme a analysis type*" (BI) ou "*PCR ribotype 027*" (NAP1/BI/027). Várias características encontradas em NAP1/BI/027 contribuem para sua hipervirulência. Dentre elas, polimorfismos no gene regulador negativo, *tcd*C, aumentando a produção das toxinas A e B; presença dos genes que codificam a toxina binária (*tcd*A e *tcd*B) e elevado nível de resistência a fluoroquinolonas. Essa cepa hipervirulenta foi descrita pela primeira vez em 2005 por investigadores norte-americanos e canadenses[15,16]. Já na Europa, foi relatada pela primeira vez na Inglaterra e, logo depois, na Holanda em 2011[17]. Na América Latina, existem poucos estudos analisando as cepas circulantes. O

primeiro isolado da NAP1/BI/027 foi na Costa Rica em 2009[18], com relatos subsequentes na Colômbia, México, Chile e Honduras[19,20,21].

Dados recentes evidenciam o surgimento de DACD na comunidade, em indivíduos sem internação prévia. Estima-se que 20% a 28% das DACD seja comunitária, com incidência de 20 a 50 casos por 100.000 habitantes nos EUA, Suécia e Inglaterra [22,23,24]. Estudos recentes mostram que 82% dos pacientes com DACD comunitário tiveram passagem por serviços de saúde de forma ambulatorial [25,26].

1.2.*C. difficile* no Brasil

São escassos os dados da DACD no Brasil, com subnotificação de casos em nosso meio. Poucos hospitais dispõem de métodos apropriados para o seu diagnóstico, sendo os testes de detecção de toxina A e B nas fezes, de baixa sensibilidade, o mais utilizado na prática clínica [27,28]. Ademais, Silva et al. demonstraram que os diferentes kits para detecção de toxina por ELISA disponíveis no mercado brasileiro apresentam baixa sensibilidades, variando de 61 a 68%[29].

Dados recentes de dois hospitais de ensino em Porto Alegre, com pacientes adultos de terapia intensiva e transplantados de órgãos sólidos, encontraram prevalência de DACD de 8,3% [30]. Um estudo realizado em 2014, com 74 adultos de um hospital universitário do Rio de janeiro, identificou 5,4% de infecção por CD, todos em pacientes com doenças onco-hematológicas[31]. Outro estudo recente realizado em unidade de onco-hematologia e transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) de São Paulo identificou incidência acumulada de 3,1% de DACD, com significativo aumento ao longo do tempo[32].

Pouco se sabe sobre a epidemiologia do DACD no Nordeste do Brasil. Em 2017, Costa et al encontraram elevada positividade (48%) de DACD em pacientes adultos internados em hospital oncológico em Fortaleza, Ceará. No entanto, esse estudo avaliou casuística pequena de pacientes, todos imunossuprimidos. Esse grupo de pesquisadores também identificou, pela primeira vez, um novo ribotipo de CD, o ICC-45, filogeneticamente relacionado

a cepa NAP1/027/ST[33]. Alguns anos antes, esse mesmo autor havia relatado o primeiro caso da América Latina de diarreia por CD adquirido na comunidade, em paciente portador do vírus HIV, com neoplasia de reto, sem hospitalização recente ou uso prévio de antimicrobianos [34].

Pires et al publicaram, em 2018, o primeiro relato de diarreia por cepa hipervirulenta de CD no Brasil. A cepa foi isolada de paciente internado em hospital de Porto Alegre, com antecedente de exposição à vários antimicrobianos. Foram encontrados, nessa cepa, os genes da toxina *tcd*A e *tcd*B e a deleção do gene *tcd*C, que indicam a superprodução de toxina. A cepa foi classificada como ST67, pertencente ao clade 2, que contém grande diversidade de sequenciamento genético onde também se inclui a cepa ST1 (NAP1 / 027)[35]. Desde então, não houve mais publicações de DACD por cepas hipervirulentas no Brasil. Estudos recentes de epidemiologia molecular demonstram alta diversidade de genética de CD em hospitais brasileiros com novas cepas e novos ribotipos. O ST42, também classificado como ribotipo RT106, foi o tipo mais identificado em vários estudos, seguido pelo ST2 (RT014) [36,37].

1.3. Fatores de Risco

O uso de antibióticos é o principal fator de risco para DACD. Esses alteram o equilíbrio da microbiota intestinal e diminuem a resistência à colonização pelo CD, o que facilita a transformação dos esporos em formas vegetativas. Quase todos os antibióticos são associados ao desenvolvimento de DACD, incluindo aqueles utilizados no seu tratamento, como metronidazol e vancomicina. Penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas, clindamicina e fluoroquinolonas são os mais envolvidos. Esse desequilíbrio na microbiota intestinal pode persistir por mais de 3 meses após término da antibioticoterapia. Por conseguinte, pacientes podem permanecer suscetíveis a DACD por todo esse tempo[38.]

Outros fatores de risco para DACD vem sendo estudados, dentre eles: idade avançada (> 65 anos), internação previa, supressão do ácido gástrico (uso de inibidores de bomba de prótons), alimentação enteral, cirurgia

gastrointestinal, quimioterapia, TCTH e doença inflamatória intestinal. Pacientes com idade acima de 65 anos, apresentam maior incidência de DACD e maior mortalidade em vários estudos[38] **.** Além disso, esse grupo etário tem sido associado a um maior risco de infecção por cepas hipervirulentas como a BI/NAP1/027, assim como a DACD recorrente [39].

Hospitalização nos ultimos 90 dias também é um fator de risco importante para DACD. Reúne-se aqui várias questões relevantes, como ambiente contaminado por esporos, higiene subótima das mãos dos profissionais de saúde e presença de comorbidades. A relação entre o uso de inibidores de bomba de protons e DACD permanece um assunto não resolvido. Alguns estudos sugeriram ser esse um fator de risco para DACD[40]. No entanto, vários outros não conseguiram corroborar esse achado[41]. Alterações laboratoriais também foram encontradas como preditores de DACD hospitalar, tais como elevação de creatinina sérica, hipoalbuminemia e leucocitose[42,43]

Embora vários fatores de risco para DACD, relacionados à medicações e às caracteristicas dos pacientes, venham sendo exaustivamente estudados, o real papel de cada um deles ainda é controverso. Isso se explica pois, em sua maioria, os estudos são retrospectivos, observacionais, com heterogeneidade de populações, viéses e confundidores, o que dificulta a análise dos dados.

1.4. Manifestações Clínicas

C. difficile pode causar um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde portador assintomático à colite fulminante com megacólon tóxico. DACD é classificada como: leve a moderada, grave ou fulminante, baseada em parâmetros clínicos e laboratoriais. Diarreia, definida como três ou mais evacuações com fezes não formadas em 24 horas, é o sintoma cardinal de DACD[27]. Ela pode vir acompanhada de muco ou sangue oculto, no entanto melena ou hematoquezia são raros. Outras manifestações incluem: dor hipogástrica, cólicas, febre baixa, náusea e anorexia. A febre está presente em 15% dos casos. Leucocitose superior à 15.000 células/ml também pode ser encontrada. Os sintomas geralmente se iniciam na vigência da antibioticoterapia,

podendo surgir meses após a sua suspensão**.** No entanto, a maioria dos casos ocorre em até duas semanas do uso do antibiótico. Cerca de 5 a 10% dos pacientes com DACD não tem exposição previa a antibioticoterapia [44,45].

As diretrizes americanas atuais da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) utilizam alguns critérios para definir casos graves de DACD e orientar a melhor e escolha da terapia. São eles: contagem de leucócitos acima 15.000 células/ml; creatinina sérica maior ou igual a 1,5 mg/dl ou aumento em 1,5 vezes o seu valor basal [46]. Vale ressaltar que esses critérios se baseiam na opinião de especialistas, sem estudos robustos que os validem. Vários outros critérios de gravidade têm sido usados, tais como o critério da Sociedade Americana de Gastroenterologia de 2021 e critérios da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID) de 2014[47,48]. No entanto nenhum deles foi aceito universalmente, por também se basear na opinião de especialista, com problemas na sua validação**.**

Cerca de 25 a 30% dos pacientes com DACD evoluem com infecção recorrente, definida como reaparecimento dos sintomas dentro de duas a oito semanas após o término do tratamento e resolução dos sintomas**.** Menos comumente, DACD recorrente pode surgir após dois meses da descontinuação do tratamento. Uma vez que os pacientes tenham evoluído com recidiva, eles estão sob um risco significativamente maior de apresentar novas recorrências. Fatores de risco para recorrência incluem: idade acima de 65 anos, presença de comorbidades, uso de antibióticos concomitantes durante o tratamento do CD e falta de resposta imune mediada por anticorpos para a toxina B**.** Os sintomas recorrentes podem ser devido à recaída da cepa infectante inicial ou reinfecção por uma nova cepa de CD. A maioria dos casos se deve a recorrência da mesma cepa, independentemente do intervalo entre os episódios [49,50].

Tabela 1. **Definições de doença grave e complicada associada a Infecção por *C. difficile.* Adaptado de Ooijevaar RE, 2018 [44]**

Diretriz	DACD grave	DACD complicada
Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas **(ESCMID), 2014 [48]**	DACD com 1 ou mais dos seguintes achados: • Leucocitose > 15.000 cel/mm^3 • Albumina sérica < 3 g/dl • Aumento creatinina sérica acima 50% ou >1,5 mg/dl	Incorporado na definição de doença grave por CD
Colégio Americano de Gastroenterologia (ACG) 2021 [47]	• Leucocitose > 15.000 cels/mm^3 • Creatinina sérica >1,5 mg/dl	• Hipotensão ou Choque • Íleo • Mega colón
Sociedade Americana de Doenças Infecciosas **(IDSA/SHEA), 2017 [46]**	• Leucocitose > 15.000 cels/mm^3 • Creatinina sérica >1.5 mg/dl	• Hipotensão ou Choque • Íleo • Mega colón

DACD: Doença associada a *C. difficile;* IDSA: *Infectious Disease Society of America*: Society *for Healthcare Epidemiology of America.*

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico de DACD baseia-se em: 1) combinação de sinais e sintomas, tais como diarreia (definida como três ou mais evacuações diárias em 24 horas), sem nenhuma outra causa identificável, associados a detecção de toxinas A e/ou B nas fezes ou de cepas de CD produtores de toxinas; ou 2) identificação de colite pseudomembranosa na colonoscopia ou em achados histopatológicos[30]. Exames laboratoriais isolados não conseguem distinguir entre colonização e infecção por CD[51]. Esses devem ser realizados apenas em pacientes com diarreia bem definida. Amostras de fezes bem formadas de pacientes assintomáticos não devem ser testadas, pois a presença do gene da toxina do CD não distingue entre infecção ou colonização, uma vez que não há comprovação da expressão do gene com produção de toxinas[52,53.]

A estratégia ideal para o diagnóstico laboratorial do DACD ainda é controversa. Existe uma ampla variedade de testes e algoritmos diagnósticos (Tabela 2). Vários métodos laboratoriais estão disponíveis, dentre eles: cultura toxigênica; ensaio de neutralização de citotoxicidade em cultura celular; imunoensaios enzimáticos (ELISA) e ensaios imunocromatográficos para a detecção de glutamato desidrogenase (GDH), toxina A ou B, ou ambas; e testes de amplificação de ácidos nucleicos (*Nucleic acid amplification test*- NAAT).

Os testes considerados padrão-ouro para diagnóstico de DACD são: cultura toxigênica e ensaio de neutralização de citotoxicidade em cultura celular. O primeiro baseia-se no isolamento de CD em cultura e determinação de cepa produtora de toxina. Trata-se de um método trabalhoso e demorado, limitando seu uso na prática clínica. No segundo teste, um filtrado de fezes é aplicado sobre uma monocamada de células e é observado o efeito citopático depois de 24-48 horas. Em seguida, é realizada a neutralização com um antissoro, ou com antitoxina de *C. sordellii* ou com antitoxina de CD. Historicamente esse último método foi considerado padrão-ouro. No entanto, atualmente a maioria dos especialistas considera que ele não apresentou a sensibilidade desejada em estudos de comparação de ensaios. A sensibilidade reportada desse teste é bastante variável (65% a 90%) e, quando comparada ao cultivo de CD

toxigênico, o ensaio de neutralização de citotoxicidade teve uma sensibilidade aproximada de 75% a 85% [54,55].

Testes para detecção de toxina A e B nas fezes são os métodos mais utilizados na prática clínica no Brasil. Esses utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais, dirigidos contra antígenos específicos das toxinas de CD, que são incorporados em testes imuno-enzimáticos (ELISA) ou imunocromatográficos. Muitos kits comerciais estão disponíveis no mercado, com resultados rápidos, baratos e de fácil execução. A maioria das cepas de CD produzem as toxinas A e B, embora algumas cepas produzam apenas toxina B. É importante ressaltar que as toxinas são degradas à temperatura ambiente e podem ser indetectáveis dentro de duas horas após a coleta. A sensibilidade e especificidade desses testes variam de 47 a 98,7% e 84 a 100%, respectivamente, enquanto o valor preditivo positivo varia de 50% a 100% e o valor preditivo negativo varia de 87% a 99,8%[56,57]. Recentemente testes de ELISA ultrassensíveis para detecção de toxinas tem demonstrado resultados promissores, com sensibiidade de 97,7% e especificidade de 100%. Esses ensaios são rápidos, têm melhor sensibilidade analítica, que é de até 3 ordens de magnitude mais sensível que testes de ELISA convencionais e são comparáveis ao teste de referência, o de citotoxicidade celular. Essa nova metodologia parece promissora como teste único para diagnostico de DACD, podendo vir a substituir os algoritmos de testes em várias etapas atualmente recomendados[58,59].

A glutamato desidrogenase (GDH) é uma enzima produzida em elevados níveis em todos os isolados de *C. difficile*, incluindo cepas toxigênicas e não toxigênicas, podendo ser detectada por ELISA ou imuno-cromatografia. Um resultado positivo apenas indica a presença de CD, sem prever a capacidade dessa cepa de produzir toxinas. Além disso, o GDH de *C. difficile* pode reagir de forma cruzada com a da *C. sordellii*, com resultados falso-positivos. Recentemente diversos consensos têm recomendado o uso de testes rápidos de detecção simultânea de GDH por ELISA como método de triagem para diagnóstico de DACD. Devido ao seu elevado valor preditivo negativo (VPN), que varia de 80,0% a 100%, um teste negativo para GDH geralmente descarta a doença. No entanto, um resultado positivo deve ser confirmado por um segundo

teste mais específico para detecção de toxinas. Amostras com resultados discordantes, como teste negativo para GDH e positivo para toxina, são raros e precisam ser testados novamente. No caso de amostras positivas para GDH e negativas para as toxinas, a realização de outros testes, tais como os NAATs, são recomendados [46,51].

Testes de biologia molecular baseados na amplificação de ácido nucleico (NAAT) detectam os genes reguladores da produção de toxina A e B (genes *tcdA* e *tcdB*). Esses possuem elevada especificidade (>95%) e sensibilidade (>90%), com um valor preditivo positivo menor do que os testes de detecção de toxinas, mas com elevado valor preditivo negativo para CD. No entanto, testes positivos podem identificar cepas toxigênicas sem expressão em pacientes assintomáticos, podendo o seu uso isolado levar a tratamentos desnecessários e aumentos de custos. Seu uso deve ser restrito a pacientes com quadro diarreico [46,51,60]

Recentemente, novas metodologias de amplificação de ácido nucleico para detecção de CD têm surgido, tornando essa tecnologia mais acessível. A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP- *Loop-mediated isothermal amplification assay*) é uma alternativa de baixo custo, onde as extrações de DNA são realizadas em temperatura constante, sem a necessidade de termociclador[61]. O uso do LAMP para diagnóstico de CD tem apresentado elevada sensibilidade e especificidade, quando comparado a culturas toxigênicas [62,63]

Tabela 2. **Testes diagnósticos para doença associada a C. *difficile*. Valores preditivos negativos e positivos são comparados ao ensaio de neutralização de citotoxicidade em cultura celular como padrão-ouro para diagnóstico de DACD. Adaptado de Thabit AK, 2019** [64]

Teste	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo	Substância detectada
Cultura toxigênica	Baixo	Alto	Esporos ou células de *C. difficile* toxigênico
Teste de amplificação de ácido nucleico	Baixo	Alto	Genes de *C. difficile* toxigênico
Glutamato-desidrogenase	Baixo	Alto	Antígeno comum de *C. difficile*
Ensaio de neutralização de citotoxicidade em cultura celular	Alto	Moderado	Toxina livre
Teste imunoenzimático para toxina A e B	Moderado	Moderado	Toxina livre

DACD=Doença associada a *C. difficile*

A tipagem das cepas de CD também é importante ferramenta no diagnóstico laboratorial do CD, principalmente em situações de surto. Métodos mais precisos também são necessários para identificação de cepas circulantes, introdução de novas cepas e conhecimento de cepas emergentes patogênicas. Existem vários métodos de tipagem molecular disponíveis. A eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel etectrophoresis* -PFGE) foi um dos primeiros métodos utilizados para análise molecular de CD. No entanto, esse método não consegue separar com precisão moléculas muito grandes de DNA e, portanto, pode resultar em subjetividade para a interpretação dos resultados**.** Na Europa, a ribotipagem (RT) tornou-se o método mais frequentemente utilizado para tipagem de CD. Este possui uma boa capacidade discriminatória, apesar apresentar alguma dificuldade em diferenciar as cepas fortemente relacionadas, como o ribotipo 027, 106 e 017 [65]**.**

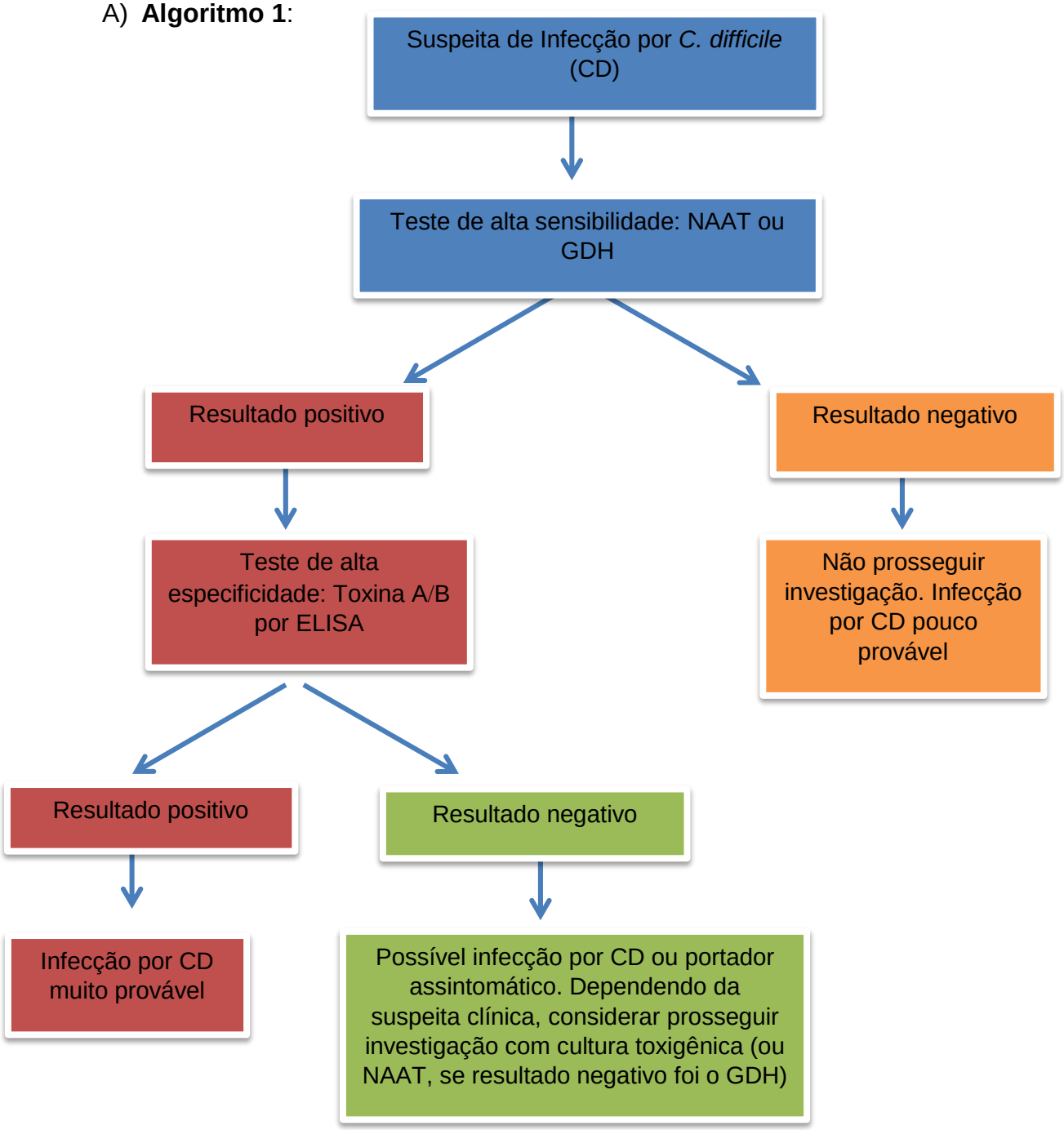
Outro método mais recente e cada vez mais utilizado é o sequenciamento completo do genoma. Trata-se de poderosa ferramenta de genotipagem que vem sendo cada vez mais utilizada. Esse método tem alto poder discriminatório quando comparado a outras tecnologias semelhantes, tais como *Multilocus sequence typing* (MLST) e *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE.) No entanto seu uso ainda é limitado pelo alto custo, tempo mais demorado e necessidade de um sistema de bioinformática adequado para análise do banco de dados [66,67]**.**

Diretrizes recentes recomendam abordagens diagnósticas com múltiplos testes, sob a forma de algoritmos, na suspeita de DACD (Figura 1). Entretanto, a melhor metodologia e fluxograma ideal ainda não foram estabelecidos. Preferencialmente um algoritmo com 2 a 3 estágios deve ser utilizado, onde um teste positivo inicial de triagem seja seguido de um ou dois testes confirmatórios [46,51]. Essas diretrizes recomendam que a escolha dos testes para CD seja baseada na probabilidades pré-teste da doença na população avaliada. Os NAAT não são recomendados como testes isolados, quando os critérios para testagem do paciente não estão claros ou se outras causas de diarreia não forma afastadas. No entanto, em pacientes com elevada probabilidade pré-teste para DACD, o NAAT isolado ou teste para detecção de toxina podem ser usados (Figura 2) [46,51].

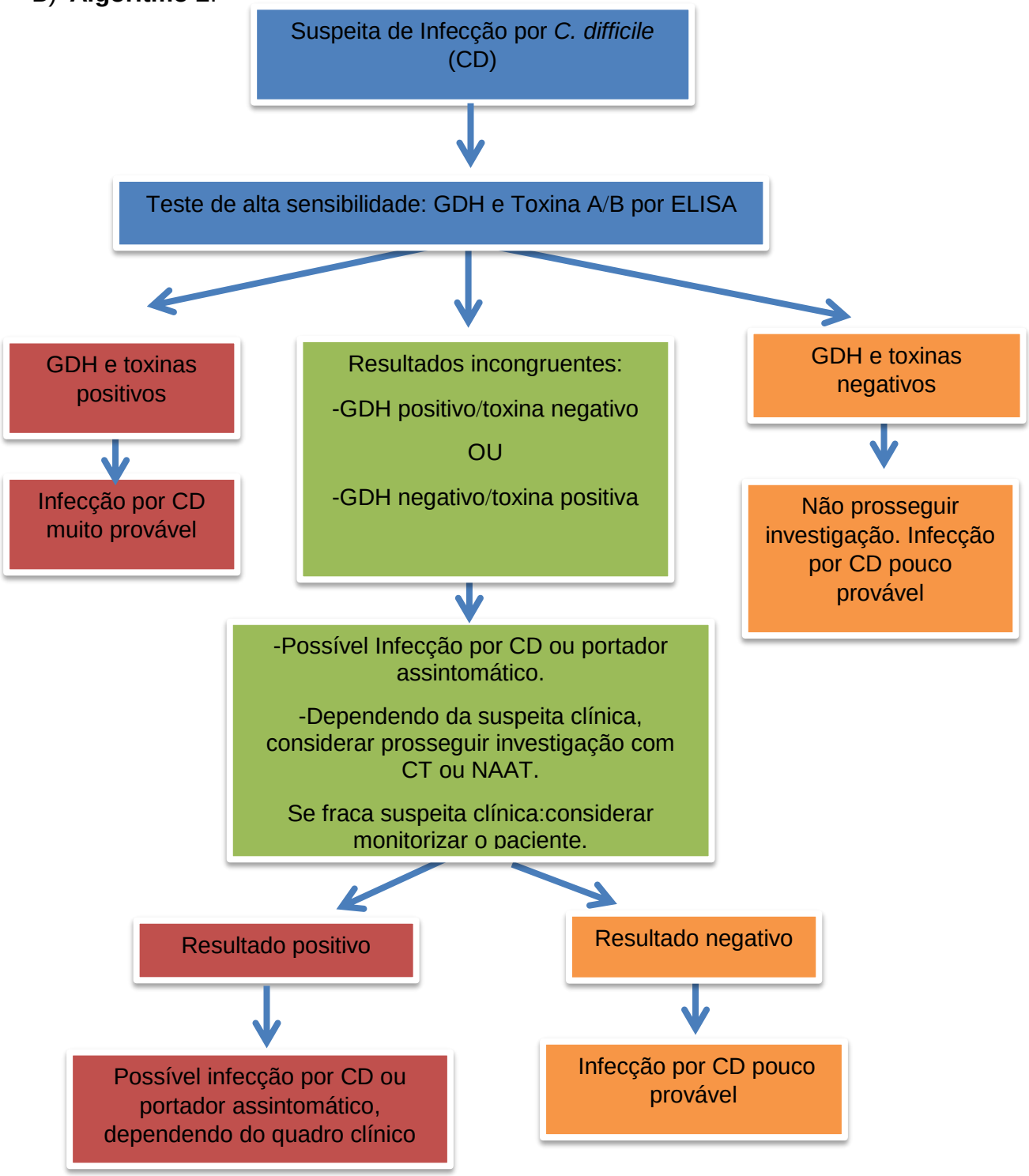
Uma revisão sistemática publicada recentemente, incluindo 238 artigos, avaliou a acurácia dos testes para diagnostico de DACD. Esse estudo recomendou o uso de algoritmos que usam o NAAT sozinho ou em combinação com GDH ou GDH mais toxina EIA para diagnóstico da doença em adultos. No entanto, esse estudo foi incapaz de identificar qual é o melhor teste para diagnostico de DACD pelo fato de que a grande maioria dos estudos não ter incluído desfechos clínicos [53].

Figura 2. Algoritmos com múltiplos passos para diagnóstico de infecção por *C. difficile*, baseado em testes de amostras fecais. Adaptado das Diretrizes do ESCMID 2016 [36].

A) **Algoritmo 1**:

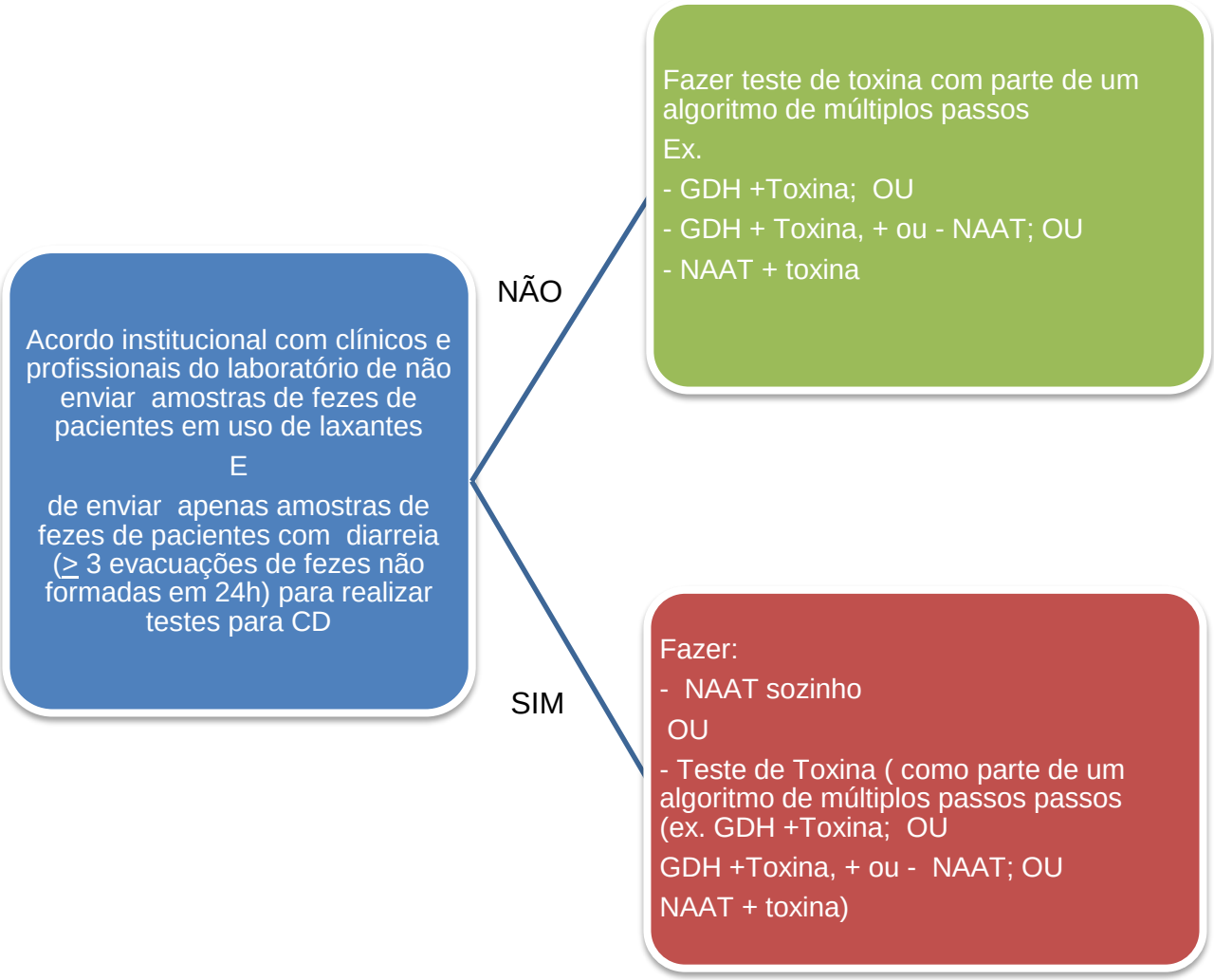


B) **Algoritmo 2**:



CD*: C. difficile*; NAAT- *Nucleic acid amplification test;* GDH- Glutamato desidrogenase; CT: cultura toxigênica

Figura 3. Recomendações para realização de testes laboratoriais de diagnostico de infecção por *C.difficile* com base em critérios institucionais pré-estabelecidos. Adaptado da Diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) 2017[46]



CD*: C. difficile*; NAAT- *Nucleic acid amplification test;* GDH- Glutamato desidrogenase

1.6. Tratamento

O portador assintomático de CD não necessita de tratamento e sua identificação pode ser útil para prevenir a transmissão hospitalar desse agente. A DACD deve ser tratada de acordo com a gravidade da doença e o risco de recorrência e complicações. Sempre que possível, deve-se tentar suspender o antibiótico em uso. Estudos demonstram que o uso continuado de antimicrobianos está associada à duração prolongada da diarreia e maior risco de recorrência[68]**.** Para caso leves, as diretrizes europeias sugerem aguardar 48 horas após a suspensão do antibiótico antes de iniciar qualquer tratamento para CD, visto que muitas vezes a diarreia é autolimitada. Testes para controle de cura não devem ser realizados, pois não predizem resposta terapêutica ou risco de recorrência [46,51]**.** Embora as diretrizes internacionais continuem a categorizar o tratamento com base na gravidade da doença, essa estratificação continua sendo um desafio, pois não há ensaios controlados randomizados validando os escores de gravidade utilizados.

Várias drogas são usadas para tratamento de DACD, sendo o metronidazol o medicamento mais antigo utilizado. Para o primeiro episódio de DACD, vancomicina oral e fidaxomicina são as drogas atualmente recomendadas pelas diretrizes americanas de 2017, independentemente da gravidade da doença (tabela 3). Segundo essa diretriz, o metronidazol não deve mais ser usado como terapia de primeira linha para casos não-graves, devendo ser considerado apenas nos casos em que a vancomicina oral e a fidaxomicina não estiverem disponíveis. Tais recomendações foram baseadas em dois estudos multicêntricos duplo-cegos, randomizados, controlados que compararam metronidazol à vancomicina oral no tratamento de CD. Nesses estudos, a vancomicina foi superior ao metronidazol, independentemente da gravidade do paciente[69]. Outros estudos mais recentes corroboram esses achados, incluindo uma meta-análise e um estudo retrospectivo que demonstraram maior sobrevida dos pacientes que usaram vancomicina oral em comparação com os que usaram metronidazol [70,71]. As razões para a falha do metronidazol são pouco compreendidas. Uma das explicações pode se relacionar aos baixos níveis da droga nas fezes dos pacientes usando

metronidazol oral, devido a sua boa absorção, que diminue à medida que a inflamação do cólon desaparece, enquanto os níveis de da vancomicina oral ou fidaxomicina (que são pouco absorvidos) permanecem elevados durante todo o tratamento[72]**.** Raramente, resistência ao metronidazol em cepas de CD tem sido descrita, sem aparente aumento [73,74]**.**

No entanto, ainda há controvérsias sobre o nivel de evidência que embasa tais recomendações. Estudos controlados, randomizados, que compararam vancomicina com o metronidazol no tratamento de DACD, incluindo aqueles publicados após o lançamento da diretriz, falharam em demonstrar uma diferença estatisticamente significativa nas taxas de sucesso, de recorrência e mortalidade geral entre as duas drogas. Embora algumas publicações favoreçam a vancomicina, é importante notar que existem inconsistencias metodológicas entre estudos que possam ter influenciado nesse resultado. Além disso, os critérios utilizados para definir a gravidade da DACD não foram consistentes entre os estudos, pois baseiam-se na opinião de especialistas e ainda precisam ser validados[75,76,77]**.**

A fidaxomicina é uma boa alternativa para tratamento de CD, especialmente em pacientes com alto risco de infecções recorrentes. Esse agente está indicado como primeira linha para episódio inicial de DACD ou na primeira recorrência da infecção. Estudos randomizados, controlados demonstraram taxas de sucesso semelhantes da fidaxomicina comparada à vancomicina, mas com uma maior taxa de resposta sustentada e menor recorrência com a primeira droga[78,79]. Estudo mais recente comparou doses estendidas de fidaxomicina com vancomicina oral e encontrou melhor resposta clínica sustentada para grupo da fidaxomixina em portadores da cepa hipervirulenta 027do CD [80]**.** No entanto, essa droga apresenta custo elevado e ainda não está disponível no Brasil.

Na primeira recorrência de DACD, após uso prévio de metronidazol, recomenda-se um curso padrão de vancomicina oral ou fidaxomicina. Se o primeiro tratamento foi com vancomicina ou fidaxomicina, na recidiva deve ser feito um segundo curso de vancomicina prolongado, com redução lenta e gradual da dose. Para tratamento da segunda recidiva e/ou recidivas subsequentes,

vários esquemas foram propostos, incluindo a vancomicina por tempo prolongada, seguida de rifaximina e fidaxomicina. No entanto, as evidências são limitadas sobre a eficácia desses esquemas. Metronidazol oral deve ser evitado para qualquer recorrência devido à sua menor eficácia e risco potencial de toxicidade neurológica com uso prolongado. Caso o paciente necessite de antibioticoterapia sistêmica concomitantemente ou logo após a conclusão da terapia para DACD, há poucas evidências que embasem a instituição de profilaxia secundária com vancomicina oral [81,82,83].

Vancomicina combinada ao transplante de microbiota fecal (TMF) é uma estratégia de primeira escolha para casos com múltiplas recorrências. O TFM consiste na infusão de fezes processadas, coletadas de um doador saudável, para o trato intestinal de um paciente com DACD, em centros especializados. A eficácia do TMF foi avaliada em vários ensaios randomizados controlados, com taxas de cura de 70 a 90%[84,85].

Vários outros antimicrobianos, tais como teicoplanina, tigecicliina, nitazoxanida, rifampicina e rifaximina apresentam ação *in vitro* contra CD, no entanto ainda com dados clínicos limitados[86]. Recentemente novos agentes vêm sendo estudados, incluindo o ridinilazol, um antibiótico não absorvível, além de abordagens não-farmacológicas, como uso de probióticos, anticorpos monoclonais e bacteriófagos com atividade contra cepas específicas de CD[87]. Dentre esses, apenas o anticorpo monoclonal antitoxina bezlotoxumab já tem aprovação pelo FDA, com redução em até 40% do risco de DACD recorrente quando prescrito durante um episódio inicial[88].

Tabela 3. Recomendações para tratamento de doença associada a *C. difficile* (DACD) segundo as 3 principais diretrizes. Adaptado de Thabit AK, 2019 [64]

	IDSA/SHEA, 2017	ESCMID, 2014	ACG, 2021
Episódio inicial, não grave	Vancomicina VO OU Fidaxomicina VO por 10 dias Se os ATM acima estiverem indisponíveis: metronidazol VO por 10 dias	Metronidazol VO por 10 dias OU Vancomicina VO ou Fidaxomicina VO por 10 dias Parar ATM indutores e observar por 48h	Vancomicina VO OU Fidaxomicina VO por 10 dias OU Metronidazol VO por 10 dias (para paciente de baixo risco: jovens, ambulatoriais, com mínimas comorbidades)
Episódio inicial grave	Vancomicina VO OU Fidaxomicina VO por 10 dias	Vancomicina VO por 10 das OU Fidaxomicina VO por 10 dias	Vancomicina VO por 10 das OU Fidaxomicina VO por 10 dias
Episódio inicial fulminante	Vancomicina VO Se íleo paralítico: considerar adicionar enema de vancomicina + metronidazol EV	Cirurgia se terapia com ATM falhar, se peritonite, megacólon tóxico ou perfuração intestinal	Vancomicina VO+ considerar Metronidazol EV Se íleo: Adicionar enema de vancomicina

Primeira recorrência	Se primeiro tratamento padrão: vancomicina VO prolongada com redução gradual por 2-8 semanas Se primeiro tratamento com vancomicina: Fidaxomicina por 10 dias Se primeiro tratamento com metronidazol: Vancomicina por 10 dias	Vancomicina VO por 10 das Ou Fidaxomicina VO por 10 dias	Vancomicina VO prolongada, com redução gradual. OU Fidaxomicina VO por 10 dias
Segunda recorrência	Vancomicina VO prolongada com redução gradual por 2-8 semanas OU Vancomicina VO por 10 dias, seguida por Rifaximina por 20 dias OU Fidaxomicina por 10 dias	Vancomicina VO prolongada com redução gradual por pelo menos 3 semanas OU Fidaxomicina VO por 10 dias OU Vancomicina por 10 dias	Transplante de microbiota fecal
Múltiplas (≥3recorrên-cias) após tratamento adequado	Transplante de microbiota fecal	Igual a segunda recorrência Transplante de microbiota fecal+ vancomicina VO por-14 dias	Transplante de microbiota fecal

1.7. Controle e Prevenção

São várias as estratégias para prevenção de DACD em instituições de saúde, dentre elas: detecção precoce de portadores, medidas de isolamento com precauções de contato, higiene das mãos, limpeza ambiental e racionalização do uso de antimicrobianos. Detecção precoce do CD com rápida implementação de medidas de precaução de contato são essenciais para evitar a transmissão, o que requer métodos rápidos e acurados para diagnóstico[89].

Pacientes com suspeita ou comprovação de DACD devem ser colocados em quartos privativos com banheiros individuais, sempre que possível. Uma abordagem ideal para a descontinuação das precauções de contato para DACD é incerta. As diretrizes internacionais recomendam a continuação das medidas de isolamento pelo menos 48 horas após a resolução da diarreia. No entanto a manutenção do isolamento por mais tempo, após a resolução de diarreia, pode ser razoável, uma vez que a eliminação persistente de CD nas fezes é comum. Em instituições com alta incidência de DACD, manutenção das precauções de contato até a alta é recomendada [90].

Profissionais de saúde devem realizar a higienização das mãos com água e sabão visto que o álcool a 70% não erradica os esporos de CD. Atenção especial deve ser dada a limpeza do ambiente, equipamentos e superfícies. Os esporos de CD podem sobreviver em superfícies secas por tempo prolongado, e a desinfecção com produtos à base de quaternário de amônia são ineficazes. Essa requer uso de um agente esporicida, como o hipoclorito de sódio. Programas de gerenciamento do uso antimicrobianos desempenha um papel importante no controle da DACD, com redução significativa na sua incidência [91].

Vacinas eficazes contra o CD ainda não estão disponíveis no mercado, no entanto vários produtos já estão sendo estudados. Existem pelo menos três vacinas contra CD atualmente em diferentes estágios de ensaios clínicos. Essas vacinas contêm toxóides A e B que induzem a produção de citotoxinas neutralizantes dessas toxinas. Muitas dessas vacinas têm se mostrado seguras e imunogênicas em voluntários saudáveis [92,

Apesar da relevância do tema, são escassos os dados epidemiológicos, clínicos e microbiológicos de DACD no nosso meio, justificando-se a necessidade do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a taxa de positividade de *C. difficile* em pacientes com diarreia internados em hospitais brasileiros
- Avaliar os fatores preditores, características clínicas, microbiológicas e moleculares das diarreias por *C.difficile* em pacientes internados em hospitais brasileiros**.**

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever os aspectos clínicos das diarreias por *C. difficile;*
- Avaliar a resposta terapêutica e a evolução clínica dos pacientes com diarreia por *C. difficile*
- Caracterização fenotípica e genotípica das cepas de *C. difficile* isoladas desses pacientes
- Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas de *C. difficile* isoladas

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo, descritivo, observacional que coletou amostras de fezes de pacientes com diarreia internados nos centros participantes.

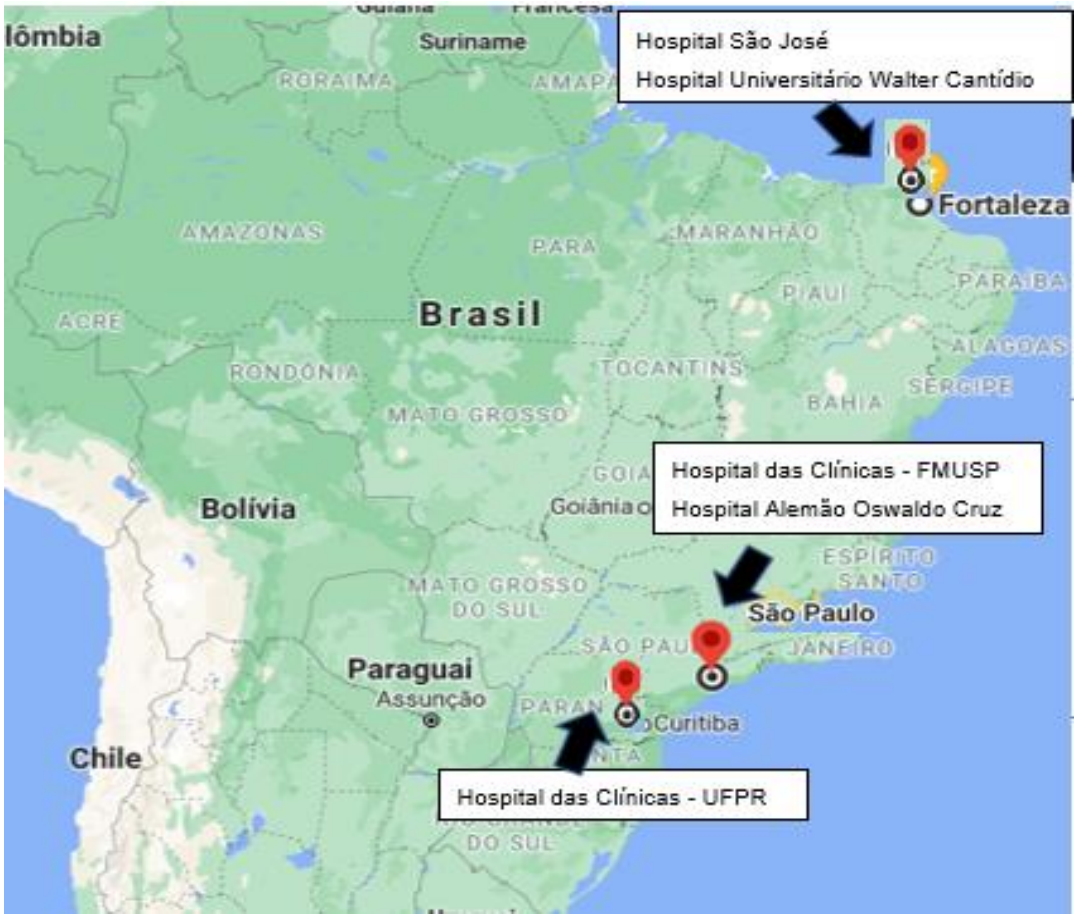
3.2 Período, População e Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A inclusão de casos ocorreu de abril de 2018 a julho de 2019 em 5 hospitais brasileiros, localizados nas diferentes regiões do país: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em São Paulo, SP; Hospital Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC) em Fortaleza, CE; Hospital São José de Doenças Infecciosas e Parasitárias (HSJ) em Fortaleza, CE; Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) em Curitiba, PR e Hospital Alemão Oswaldo Cruz (HAOC) em São Paulo, SP. Trata-se de uma amostra por conveniência, onde foram selecionados hospitais de população mais acessível para os pesquisadores. Os pacientes com diarreia internados nesses hospitais foram identificados através de vigilância ativa pelos pesquisadores, além de divulgação do estudo através de cartazes afixados nas unidades.

O HC-FMUSP é um hospital público, terciário, universitário, conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS). É constituído por sete institutos especializados e dois hospitais auxiliares, que somam cerca de 2.200 leitos. O Instituto Central dispõe de 24 enfermarias clínicas, doze enfermarias cirúrgicas e doze Unidades de Terapia Intensiva (UTI), abrangendo um total de 987 leitos. O HUWC-UFC é um hospital terciário, universitário, também conveniado ao SUS, constituído por 248 leitos, sendo 14 leitos de UTI.O HSJ é um hospital terciário, vinculado ao SUS, referência em doenças infectocontagiosas do estado do Estado do Ceará, formado por 134 leitos, sendo 8 de terapia intensiva. O HC-UFPR é um hospital público, terciário, universitário, conveniado ao SUS, constituído por 350 leitos, sendo 53 de UTI.O HAOC é um hospital privado, terciário, constituído por 357 leitos, com 37 de terapia intensiva.

Nos hospitais públicos (HC-FMUSP, HSJ, HUWC e HC-UFPR) os pacientes com suspeita e/ou confirmação de DACD ficaram sob precaução de contato, em quartos compartilhados com outros pacientes sem CD, com exceção da Unidade de Transplante de Medula do HC-FMUSP, onde todos os pacientes ficam internados em quartos individuais. No Hospital Alemão Oswaldo Cruz, todos os pacientes com DACD ficaram internados em quartos individuais, em precauções de contato. Em todos os hospitais do estudo existe a recomendação de evitar uso de álcool a 70%, no entanto sem uma política de bloqueio ou restrição do seu uso.

Figura 4. Distribuição geográfica dos hospitais participantes do estudo



Fonte: O autor, Adaptado de Google maps 2021
(https://www.google.com/maps)

3.3 Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo pacientes internados nos 5 hospitais citados que apresentavam todos os seguintes critérios:

1. Idade ≥ 18 anos;

2. Presença de diarreia, definida por 3 ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 horas ou em menos horas consecutivas;

3. Presença de pelo menos UM dos seguintes critérios abaixo:

- Diarreia de início após 48 horas do internamento hospitalar;
- Diarreia de início na comunidade ou até de 48 horas da internação, em pacientes com antecedente de internação ou passagem por um serviço de saúde nos 3 meses antes do início da diarreia;

4. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.4 Critérios de exclusão:

1. Pacientes em uso de laxantes
2. Amostras repetidas do mesmo paciente, referentes ao mesmo episódio diarreico
3. Pacientes em tratamento para DACD por mais de 24h da data da coleta das fezes
4. Fezes armazenadas por mais de 72h após a coleta
5. Qualquer condição médica que, na opinião do investigador, possa comprometer a capacidade do paciente de participar do estudo ou interferir na interpretação dos resultados.

3.5. Definições

- Doença associada ao *C. difficile*: Paciente com diarreia (3 ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 horas ou em menos horas

consecutivas) com evidência de CD produtor de toxina A/B, isto é, com pelo menos um dos testes positivos abaixo:

a) Teste positivo para toxina A/B nas fezes, OU

b) Teste de reação em cadeia da polimerase (PCR, (*Polymerase Chain Reaction*) positivo para detecção do gene produtor de toxina B (t*cdB*), toxina binária (*cdt*) ou deleção do gene *tcdC* de CD[46].

- Diarreia associada à assistência à saúde, com início na comunidade: Diarreia de início na comunidade ou em até 48 horas do internamento, em pacientes com antecedente de internação ou passagem por um serviço de saúde nos 3 meses antes do início da diarreia[46]

- Recidiva de diarreia por CD: Episódio de diarreia por CD em duas a oito semanas do início do primeiro episódio, após interrupção do tratamento, desde que o primeiro tenha tido resolução dos sintomas, com terapêutica adequada[46].

- Critérios de gravidade da DACD: Foi utilizado um aplicativo on-line que utiliza um sistema de pontuação de gravidade da CDAD, onde são avaliados os seguintes critérios, com atribuição da pontuação abaixo [93]:

+1 ponto:

- Imunossupressão e / ou condição médica crônica
- Dor abdominal e / ou distensão
- Hipoalbuminemia (<3 g/dL)
- Febre (> 38,5-C)
- Admissão na UTI

+2 pontos:

- Tomografia computadorizada (TC) com achados inespecíficos de pancolite, 2 ascites e / ou espessamento da parede intestinal
- Contagem de leucócitos> 15.000 ou <1.500 e / ou contagem de bastões
- Aumento da creatinina sérica > 1,5 vezes o valor basal

+3 pontos:

- Sinais de irritação peritoneal

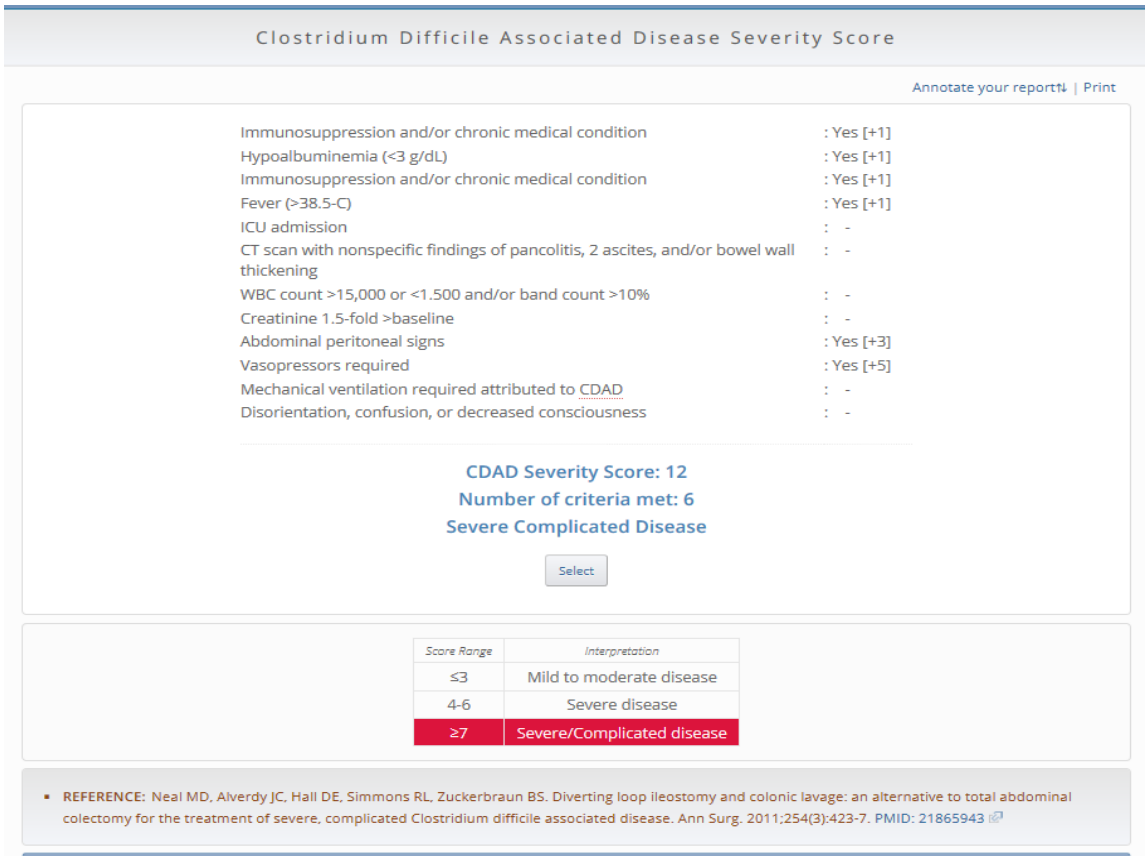
+5 pontos:

- Necessidade de uso de vasopressores
- Necessidade de ventilação mecânica atribuída ao CDAD
- Desorientação, confusão ou diminuição da consciência

-Interpretação:

- Pontuação $\leq$ 3: doença leve a moderada
- Pontuação entre 4 e 6: doença grave
- Pontuação $\geq$ 7: doença grave com complicação

Figura 5. Aplicativo on-line que utiliza sistema de pontuação de gravidade da CDAD. Adaptado de Neal MD, 2011[93]



Clostridium Difficile Associated Disease Severity Score

Annotate your report | Print

Immunosuppression and/or chronic medical condition	: Yes [+1]
Hypoalbuminemia (<3 g/dL)	: Yes [+1]
Immunosuppression and/or chronic medical condition	: Yes [+1]
Fever (>38.5-C)	: Yes [+1]
ICU admission	: -
CT scan with nonspecific findings of pancolitis, 2 ascites, and/or bowel wall thickening	: -
WBC count >15,000 or <1.500 and/or band count >10%	: -
Creatinine 1.5-fold >baseline	: -
Abdominal peritoneal signs	: Yes [+3]
Vasopressors required	: Yes [+5]
Mechanical ventilation required attributed to CDAD	: -
Disorientation, confusion, or decreased consciousness	: -

CDAD Severity Score: 12
Number of criteria met: 6
Severe Complicated Disease

Select

Score Range	Interpretation
≤3	Mild to moderate disease
4-6	Severe disease
≥7	Severe/Complicated disease

- REFERENCE: Neal MD, Alverdy JC, Hall DE, Simmons RL, Zuckerbraun BS. Diverting loop ileostomy and colonic lavage: an alternative to total abdominal colectomy for the treatment of severe, complicated Clostridium difficile associated disease. Ann Surg. 2011;254(3):423-7. PMID: 21865943

Mortalidade atribuída ao *C. difficile:* Óbito diretamente relacionadas às complicações da DACA, tais como: megacólon tóxico, perfuração intestinal, peritonite e choque séptico.

3.6 Coleta e processamento as amostras

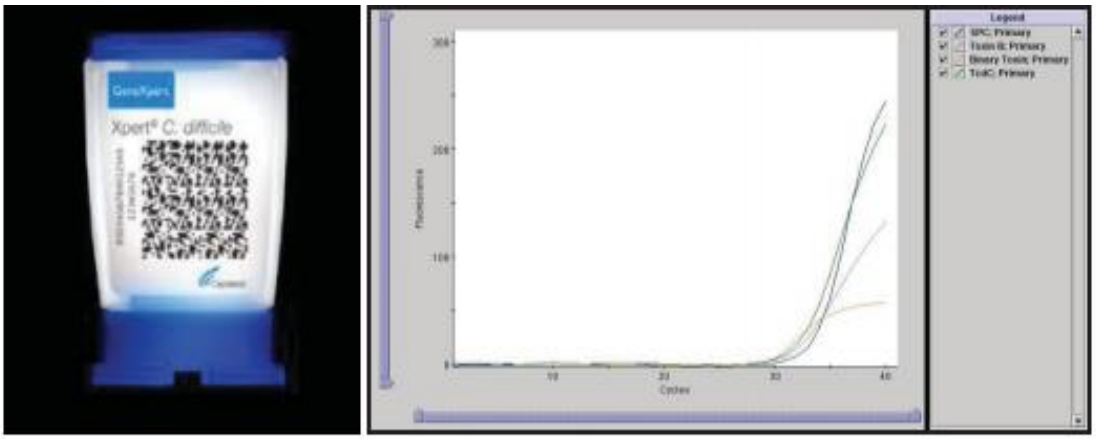
As amostras de fezes provenientes de evacuação espontânea foram colocadas em um frasco de coleta estéril com boca larga e tampa bem ajustada e identificadas com os dados dos pacientes, a data e horário da coleta. As amostras foram transportadas em um recipiente com gelo até o laboratório de cada hospital. Nesses laboratórios, as amostras de fezes foram submetidas aos seguintes testes: a) Teste rápido C Diff Quik Chek Complete; e b) Teste rápido molecular Xpert® *C. difficile* (Cepheid) para detecção de CD. O teste C. Diff Quik Chek Complete (TechLab, Blacksburg, VA, EUA) é um ensaio imunoenzimático rápido (30-40 min) que detecta simultaneamente o antígeno Glutamato Desidrogenase (GDH) e as toxinas A e B do *C. difficile* em um único poço de reação. O teste GeneXpert *C. difficile* (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) é um ensaio *in vitro* qualitativo que utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) automatizada em tempo real para detecção de sequências dos genes da toxina B (*tcdB*), toxina binária (*cdt*) e deleção do gene *tcdC* de *C difficile*. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um computador e um software pré-instalado para efetuar os testes em amostras colhidas e visualizar os resultados. Os sistemas requerem a utilização de cartuchos GeneXpert® descartáveis, de utilização única, que contêm os reagentes de PCR e onde decorre o processo de PCR e extração de DNA. Como os cartuchos são autônomos, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada. Os primers e as sondas presentes no ensaio Xpert *C. difficile* detectam sequências nos genes da toxina B (*tcdB*), toxina binária (*cdt*) e deleção de *tcdC*. Em seguida, essas amostras foram congeladas a – 20 ºC e analisadas dentro de um prazo máximo de dois meses, para identificação por meio de cultura.

Figura 6. Teste rápido C Diff Quik Chek Complete, para detecção de GDH e toxinas A/B

GDH: Glutamato desidrogenase; Tox: toxinas

Fonte: o autor (2021)

Figura 7. Teste rápido molecular Xpert® *C. difficile* (Cepheid) para detecção de CD produtor de toxina



Fonte: Xpert® HCV VL Fingerstick (2021), Adaptado do site: www.cepheid.com/pt/tests/Virology/Xpert-HCV-VL-Fingerstick

3.7 Isolamento de *C. difficile* por cultura

Antes do cultivo as amostras passaram por um tratamento de choque com álcool. O tratamento de choque baseou-se na adição de 1 ml de fezes líquidas e 1 ml de álcool absoluto em um tubo estéril de polipropileno de 15 ml. Em seguida as fezes foram deixadas em repouso por 35 minutos à temperatura ambiente e então foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* semeado no meio de cultura seletivo (CD Agar Base) por meio de um swab.

Logo após, as placas foram incubadas em anaerobiose em uma jarra de acrílico utilizando dois envelopes geradores de anaerobiose por 72 horas a 37ºC. O mesmo swab utilizado para semeio no meio de cultura seletivo foi inoculado em um tubo contendo 5 ml de caldo *Brucella*. O tubo foi incubado por 7 dias, a 37º C em anaerobiose. As cepas com crescimento nesse meio foram semeadas no meio cromogênico seletivo para *Clostrifioides* spp chromID® *C. difficile* agar (ChromID *Clostridium difficile* agar (IDCd; bioMérieux SA, France).

As amostras de fezes foram congeladas a -20 ºC. As cepas coletadas nos hospitais de São Paulo, assim como algumas cepas coletadas nos hospitais do Ceará, foram encaminhadas para o Laboratório de Investigação Médica, Bacteriologia, LIM-49, localizado no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- FMUSP. Lá essas cepas foram submetidas a identificação do gênero e espécie por espectrometria de massas MALDI-TOF®- *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Brucker Daltonic MALDI Biotyper®), além de testes de sensibilidade a antimicrobianos e sequenciamento completo do genoma.

3.8 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Método de Disco-Difusão

Os isolados de CD foram cultivados em ágar *Brucella* com 10% de sangue desfibrinado estéril de cavalo e vitamina K, em anaerobiose por 48 horas. Foram preparadas suspensões bacterianas em 2 ml de caldo de Tioglicolato, com

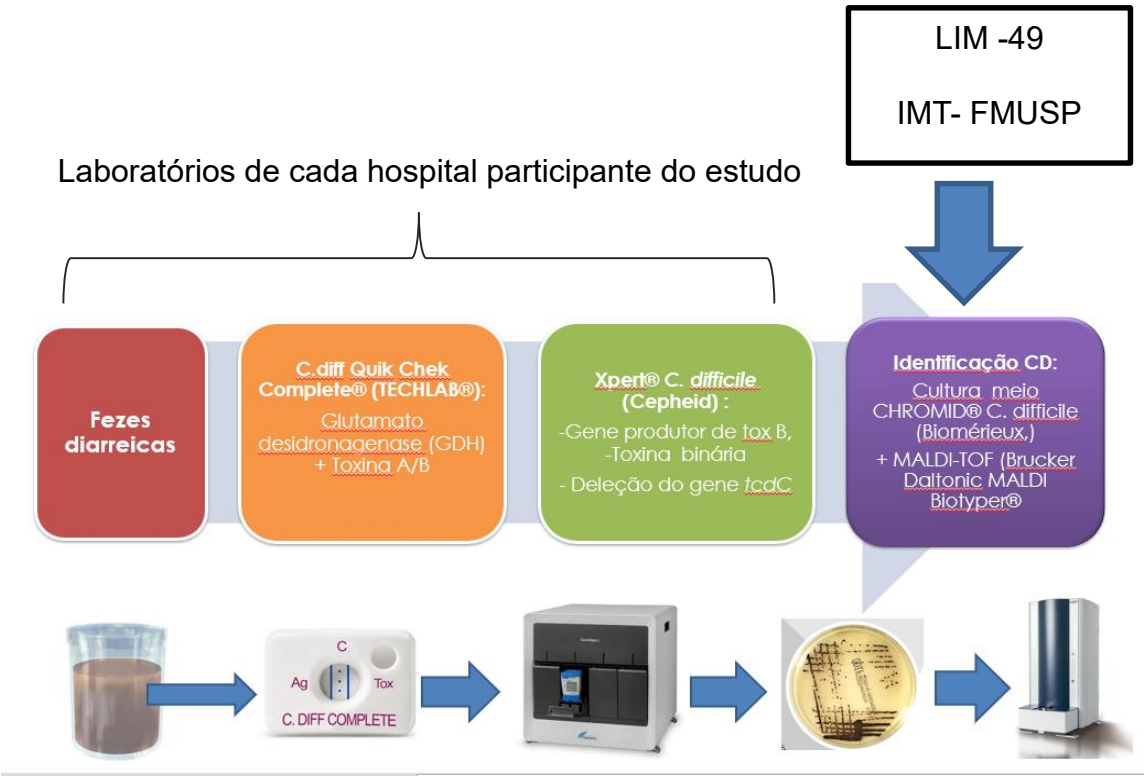
turbidez equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland. A suspensão foi semeada em até 15 minutos (após sua preparação) sobre a superfície do ágar *Brucella* suplementado com 20% de sangue de carneiro desfibrinado estéril e vitamina K.

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. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37°C durante 24 horas em até 15 minutos após a aplicação dos discos. Após o período de incubação, foram aferidos os diâmetros dos halos de inibição de azitromicina, ciprofloxacina, metronidazol, moxifloxacina, levofloxacina, teicoplanina e vancomicina. Utilizamos os critérios de interpretação e os pontos de corte descritos por Fraga EG et al, 2016[74], pela ausência de critérios de disco-difusão para testes de sensibilidade a antimicrobianos para CD pelo CSLI- *Clinical and Laboratory Standards Institute* e EUCAST-*European Commiittee of Antimicrobial Susceptibility Testing.*

Método ETEST

Foram utilizadas fitas de ETESTs, da bioMérieux, com determinação das centrações inibitórias mínimas (CIM) para vancomicina, metronidazol e ciprofloxacina das cepas de CD isoladas. Os pontos de corte para determinar resistência para CD para o metronidazol (> 2 mg/l) e para a vancomicina (> 2 mg/ l) foram determinados de acordo com as diretrizes do EUCAST (versão 8.1, 2018. http://www.eucast.org). Para ciprofloxacina usamos o ponto de corte ≥ 8mg/L, seguindo as recomendações do CLSI) [20], visto que o EUCAST não tem ponto de corte de ciprofloxacina para CD.

Figura 8. Fluxo de coleta de processamento de amostras



IMT: Instituto de Medicina Tropoical; FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; LIM-49: Laboratório de Investigação Médica nº 49

Fonte: O autor (2021)

3.9 Sequenciamento completo do genoma e análise bioinformática

As cepas de CD foram submetidas ao sequenciamento do genoma para identificação de genes de resistência e virulência. O DNA total foi extraído com o kit Qiagen QiAamp DNA minikit. A qualidade do DNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, USA). A concentração do DNA foi verificada utilizando-se o fluorômetro Qubit® (Thermo Scientific, Delaware, USA). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,5%. Os isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma total pela metodologia de MiSeq Illumina™. As bibliotecas foram preparadas com o kit comercial Nextera XT Illumina™ de acordo com as instruções do fabricante. Este kit usa um transposon para simultaneamente fragmentar e marcar o DNA com adaptadores. O DNA é amplificado com uma reação de PCR e marcado com índices. A qualidade das bibliotecas geradas foi avaliada em sistema Tape Station (Agilent). Segmentos pareados de leitura (*paired end reads*) com mais de 500 pares de bases foram processados na plataforma de sequenciamento MiSeq IlluminaTM (corrida com cartucho 2 x 300 pb) do Laboratório de Investigação Médica 15 da rede Premium de Multiusuários da USP, locado na Faculdade de Medicina da USP sob supervisão da Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie. A qualidade dos arquivos gerados no sequenciamento foi avaliada pelos programas FastQC v. 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33. Foi realizada montagem do genoma *de novo* usando-se o programa VelvetOptimiser v. 2.2.5. Os contigs formados foram ordenados pelo Abacas v. 1.3.1[94] usando cepa referência cujo genoma está disponível AM180355.1 no site do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). O genoma foi anotado com o programa Prokka v. 1.14 [95]. Foi realizada curadoria dos genes com o programa Artemis 16.0.0, identificando genes codificadores de proteínas. Os genes de virulência e resistência foram pesquisados nas plataformas ResFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/), Virulence Factors Database (http://www.mgc.ac.cn/Vfs) e BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). A sequência tipo (ST) dos isolados foi checada através da ferramenta MLSTfinder (Multilocus Sequence Typing) (https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/)[96]. Plasmídeos foram avaliados com a ferramenta PlasmidFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/)[97]. A

filogenia foi inferida usando o pipeline REALPHY do Instituto Suíço de Bioinformática (https://realphy.unibas.ch/realphy/). Todas os genomas foram alinhados com o genoma de referência AM180355.1, disponível no site do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.11 Aspectos Éticos

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Pesquisa -CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o número 2.025.392. Em seguida foi submetida à aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa de todos os hospitais participantes, com pareceres favoráveis: HUWC-UFC: 2.217.633; HSJ: 2.144.350; HC-UFPR: 2.480.851 e HAOC: 3.018.988. O termo de consentimento foi assinado pelo paciente ou seu representante legal e pelo pesquisador responsável foi arquivado, ficando sob a guarda deste. A identidade dos participantes foi mantida em sigilo. O estudo foi realizado com o apoio financeiro do Laboratório Pfizer e do Laboratório BioMérieux.

3.11 Variáveis avaliadas

Relativas aos pacientes:

As seguintes informações foram avaliadas no dia da inclusão do paciente no estudo:

- Data e motivo da internação hospitalar
- Data da coleta das fezes
- Idade, em anos completos
- Sexo
- Comorbidades, baseada no diagnóstico pelos médicos assistentes
- Unidade de internação e nome do hospital
- Internação hospitalar nos últimos 90 dias
- Cirurgia nos últimos 90 dias

- Consulta médica nos últimos 90 dias
- Uso de antimicrobianos (ATM) nos últimos 90 dias, com descrição dos mesmos
- Uso atual de imunossupressores e tipo de imunossupressor
- Quimioterapia nos últimos 90 dias
- Radioterapia nos últimos 90 dias
- Uso atual de ATM (no dia do início da diarreia)
- Uso de dieta enteral (no dia do início da diarreia)
- Uso de inibidores de bomba de prótons
- Uso de laxante (no dia do início da diarreia ou 24 horas antes)
- Uso de probióticos (no dia do início da diarreia)
- Data do início da diarreia
- Descrição das características da diarreia e do quadro clínico associado: número de evacuações, presença de muco, sangue, dor abdominal, dor a descompressão brusca, febre, calafrios, incontinência fecal, sinais de peritonite, íleo paralítico, mega cólon tóxico, instabilidade hemodinâmica, insuficiência respiratória, colectomia
- Escores de gravidade para infecção por CD: presença de imunodepressão, dor abdominal e/ou distensão abdominal, hipoalbuminemia, febre, admissão da UTI, TC de abdômen com pancolite, ascite e/ou espessamento de parede abdominal, leucocitose ou leucopenia, elevação da creatinina > 1,5 vezes a basal, sinais de irritação peritoneal, necessidade de drogas vasoativas, necessidade de ventilação mecânica atribuída ao CD, desorientação, confusão mental ou rebaixamento do sensório
- Internação na UTI pelo CD
- Exames laboratoriais: leucócitos, creatinina sérica, albumina sérica, lactato sérico

- Resultados dos testes para diagnóstico do CD: teste rápido para detecção de toxina e GDH, teste rápido molecular Xpert ® *C difficile*, cultura para CD, colonoscopia
- Tratamento do CD: data do início, nome do ATM usado, tempo de tratamento, dose do ATM, resposta clínica no final do tratamento, recidiva da diarreia após término do tratamento, data da recidiva, ATM usado para tratamento da recidiva
- Evolução do paciente após 30, 60 e 90 dias
- Desfecho no hospital: alta ou óbito, com data e descrição do motivo do óbito, se ocorrido
- Dados do ambiente físico e precauções de isolamento: número de pacientes no mesmo quarto, uso de precauções de conato, troca do álcool 70% por água e sabão para higiene das mãos dos profissionais de saúde e limpeza de equipamentos e superfícies com álcool 70%.

3.12. Análise de Dados

Os dados foram coletados e gerenciados usando a plataforma eletrônica REDCap (*Research Eletronic Data Capture*), hospedada no Hospital das Clínicas de São Paulo- FMUSP. Foi realizada análise descritiva das características dos pacientes, dos exames realizados para diagnóstico de DACD e do tratamento utilizado. Nas variáveis numéricas, os dados foram apresentados em média e desvio-padrão, e em mediana e percentis. Nas variáveis categóricas os dados foram expostos em frequência e taxa de prevalência de modo a investigar associações entre fatores de risco e doença por *C. difficile*.

Na análise das características dos participantes foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, verificada a não aderência dos dados à distribuição gaussiana. Na investigação de associação entre as variáveis categóricas foi usado o teste de qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado para comparação das variáveis nas análises univariadas e multivariadas foi de valor de $p<0,05$. Variáveis com $p<0,10$ e com plausibilidade

biológica (ex. idade) foram selecionadas para o modelo de análise multivariada do tipo *Stepwise Forward*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS e Microsoft Excel 2016.

Não foram observados surtos de DACD nos centros participantes durante o período do estudo. Todos os pacientes incluidos foram avaliados durante a internação hospitalar e o acompanhamento foi realizado, em boa parte deles, até 3 meses após o término da terapia com CDI, através de contato telefônico e/ou revisão retrospectiva de prontuários.

4 RESULTADOS

Os resultados desse estudo estão contidos nos seguintes artigos abaixo já publicados.

4.1 Dados de positividade diarreia por *C.difficile* em 5 hospitais brasileiros

Detalhes desse estudo estão contidos no artigo intitulado **"Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study", publicado no periódico *Anaerobe* [Dec; 66: 102267. 2020, doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102267. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33080372], na íntegra abaixo**

Article name: Prevalence of *Clostridioides* difficile associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: a multicenter, prospective study

Authors names Evelyne Santana Girão [1,2,6], Bruno de Melo Tavares [2], Sania Alves dos Santos [3], Gessica Lorena Gamarra 3, Camila Rizek [3], Roberta Cristina Martins [3], Lauro Vieira Perdigão Neto [2,3], Constancia Diogo [3],Tatiana D' Annibale Orsi [3], Evelyn Patricía Sanchez Espinoza [2,3], Hugo Manuel Paz Morales [4], Keite da Silva Nogueira [4], Adriane Ceshin Maestri [4], Icaro Boszczowski [2,5], Filipe Piastrelli [5], Cecilia Leite Costa [7], Daniely Viana Costa [1], Geovania Maciel [1], Janete Romão [6], Thais Guimarães [2], Gerly Anne de Castro Brito [7], Silvia Figueiredo Costa [2,3] .

Affiliations:

1- Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

2- Divisão de Moléstias Infecciosas, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

3- LIM-49, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de

São Paulo, São Paulo, Brazil

4- Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

5- Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brazil

6- Hospital São José de Doenças Infecciosas, Fortaleza, Brazil
7- Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

Corresponding author: Evelyne Santana Girão. Address: General Tertuliano Potiguara, 272/1800 Zip Code: 60135280 – Fortaleza, Ceará, Brazil. Phone: +55-85988418448 Email address: egirao@usp.br

Abstract

Epidemiological data on CD infection (CDI) in Latin American are scarce. CDI prevalence and strains characterization were prospectively evaluated in 5 Brazilian hospitals from different regions. Prevalence rates of CDI were 15%, ranging from 0 to 37%. ST42 was the most common Sequence Type and hypervirulent strains were not3 identified.

Keywords: *Clostridioides difficile*; diarrhea; prevalence; Brazilian centers

Manuscript:

*Clostridioides (*formerly *Clostridium) difficile* (CD) is considered an emerging health threat, resulting in severe diarrhea, excessive costs and significant morbidity and mortality [1]. CD is the most common cause of healthcare-associated diarrhea worldwide. Most epidemiological studies have been conducted in high income countries and there are few studies addressing the role of CDI in Latin America. In Brazil, epidemiologic data are still limited, especially regarding the prevalence and spread of virulent strains [3]. Diagnosing CDI can be difficult, and to date, there is no gold-standard test to diagnosis CD infection (CDI). No single commercial method can be used as a stand51 alone test. The European and American Societies recommend a multistep algorithm for CD testing. Clinical evaluation is needed to discern between CDI from asymptomatic carriage for samples without free toxin detected by toxin A and B enzyme immunoassay (EIA) test, but with glutamate dehydrogenase (GDH) or positive nucleic acid amplification test (NAAT) positive results [4,5]. The aim of this study was to assess the prevalence of CD associated diarrhea in hospitalized Brazilian patients.

This prospective, multicentre, observational study was conducted at five tertiary Brazilian hospitals located in three state capitals (Fortaleza, São Paulo and Curitiba) from different regions. Hospitalized patients > 18 years old with diarrhea (defined as >3 soft stools within 24 hours) were included. These patients were selected by an active search for possible cases of CDI. Patients were excluded if they had community62 associated diarrhea, defined as onset of symptoms in the community or during the first 48 hours of admission and with no prior hospitalization in the last 3 months [4]. CDI cases were defined as a positive test for toxins A and B or a positive NAAT in a patient with diarrhea [4]. Patients could be included more than once if they had distinct diarrheal episodes, with a time interval greater than one month between them. Clinical and demographic data were collected for each patient, after the study was approved by the local ethics committees of all participating hospitals and following informed written consent.

All faecal samples were tested for glutamate dehydrogenase (GDH)/ toxins A and B, using a rapid enzyme immunoassay (EIA) test (C. diff Quick Chek Complete®, TechLab-EUA), and for polymerase chain reaction (PCR), using a commercial real-time kit (Xpert® C. difficile, Cepheid, USA). This PCR kit detects toxin B gene (tcdB), binary toxin gene (cdtA), and deletion of 117 nucleotides on the tcdC gene. All stool samples were cultured on cefoxitin-cycloserine-frutose agar (CCFA, Oxoid ®) and fastidious anaerobe broth (FAB). Suspected CD colonies were also incubated in a chromogenic culture medium, ChromID C. difficile agar® (CDIF; bioMérieux, France). The identification was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy (MALDI-TOF/MS, Brucker Daltonics, Germany). Whole-genome sequencing (WGS) of CD isolates were performed and detailed data are being submitted for publication in another journal. No CDI outbreaks were observed during the study period. All CDI patients were evaluated during their hospital stay and follow-up of CDI cases was performed until 3 months after the end of CDI therapy. An online CDI severity score system was used to stratify patients [6]. CDI85 attributable mortality was defined as deaths related to CDI complications, such as toxic megacolon, peritonitis, and septic shock.

From April 2018 to July 2019, 400 stool samples from 381 patients were collected. Twenty-three samples were excluded: 16 samples were repeated, from the same diarrheic episodes, and 7 were from patients with unavailable data. Only 377 samples from 361 patients were included into the final analysis (Figure 1). The overall prevalence of CDI was 15% (56/377). The prevalence rates of CDI varied widely between the hospitals, as shown Table 1. Most notably, differences in age profiles, comorbidities and samples of patients included per center were found, which certainly contributed to this discrepancy. High prevalence rates were observed in Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná in Curitiba (23%) and in Hospital Alemão Oswaldo Cruz in São Paulo (37%), in the south and southeast of the country, while in Hospital São José (HSJ), located in the northeast region, there were no CDI cases. These differences can be justified by several factors, including the small number of patients included in these hospitals. Another important fact is that HSJ is a local reference center for Infectious Diseases, with a predominance of HIV positive patients. Among the 26 patients included from this center, 22 (85%) were HIV positive. Analyzing all hospitals, our data shows a low CDI prevalence in HIV patients, 2.5% (1/39), which contrasts with past studies that demonstrated that HIV infection is a risk factor for CDI. Furthermore, there are still limited epidemiologic data about CDI in HIV infected patients and more studies are needed [7]. Other marked epidemiological difference in our study is the proportion of immunocompromised non- HIV included in each center, with higher rates in HC-UFPR in Curitiba (57%). Great proportion of onco-hematological patients and hematopoietic stem cell transplant recipients in this population may also have contributed to a high CDI prevalence, since this population has been described as at greatest risk for CDI [8]. Most CDI patients (94%) in our data received antibiotics in the last three months. Antibiotic consumption could also be attributed to differences in prevalence CDI rates, although it was not observed in different centers. The overall mortality of our patients was 22% (84/377), with significantly differences between hospitals, but with no deaths attributed to CDI. Culture was positive in 65 samples (17%), and CD was confirmed in 35 strains by MALDI-TOF. No deletion in the *tcdC* gene was identified. Binary toxin was found only in 15 CD strains. The WGS was performed in 29 non-duplicate toxigenic sequenced strains. WGS revealed 18 different Sequence Types (STs), five (28%) of which

were novel: ST554, ST666, ST667, ST668 and ST669 (GenBank accession number PRJNA598327). The most common STs identified were ST42 (n=9, 50%), ST5 (n=3, 17%) and ST103 (n=2, 11%). The classical hypervirulent strains ST1/RT027 and ST11/RT078 were not identified.

To the best of our knowledge, this is the largest multicenter prospective Brazilian study about epidemiologic aspects of healthcare-associated CDI in our country. Most published data come from single-centres and are often retrospective series. One important strength of our cohort is the use of three tests (GDH, toxin A/B, and NAAT) for all samples since there are a small number of studies that used this three-test strategy. EIA tests for toxin A/B detection are the most widely used techniques in many countries, which may result in missed diagnoses.

In Brazil, CDI rates are underreported, and EIA toxin tests are also the most used diagnostic test. Silva et al. recently showed that different commercially available toxin A/B EIA kits used in Brazil have unsatisfactory sensitivities, ranging from 61 to 68% [9]. In our study the CDI prevalence was 15% using a three-test strategy. Similar to the present report, a recent point-prevalence Brazilian study found 12% of CDI prevalence among 153 patients with diarrhea from different centres [10]. Other national studies reported variable prevalence rates that were as high as 32% [11] and 48% [12]. However, most of these studies had methodological divergences and enrolled only high140 risk patients. As it has been shown in others Brazilian hospitals, the most frequent ST isolated in our study was ST42, ST5 and ST103.

The ST42 has been reported in several countries as USA and China [13, 14]. ST5 is one of the most prevalent ST described in Europe causing CDI and it has been reported in China as well [15, 16]. Hypervirulent strains ST1/RT027 and ST11/RT078 were not identified in our study, according to other local reports [17]. Until now, RT027 was only reported in two patients from a South region hospital in Brazil, one of which was classified as ST67 [18].

In conclusion, this study revealed a high prevalence of CDI in Brazil, with high diversity of strains, with novel STs. Further surveillance studies must be

performed to increase our knowledge about ST circulating in Brazil, including hypervirulent isolates.

Acknowledgements

Special thanks to bioMerieux, for the donation of chromogenic culture medium, ChromID C. difficile agar® and Pfizer that supported this work.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding source

Pfizer (grant 53233563) supported this work, as independent researcher.

References

[1] Lessa FC, Winston LG, McDonald LC; Emerging Infections Program *C. difficile* Surveillance Team. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. N Engl J Med. 2015 Jun 11; 372(24):2369-70.

[2] Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, et al. *Clostridium* difficile: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. J Med Microbiol 2012;61(Pt 2):169–79.

[3] Trindade CRN, Domingues Regina Maria CP, Ferreira EO. The epidemiology of *Clostrodioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. Anaerobe, 2019; 58:13-21.

[4] McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis 2018; 66 (7): e1–e48

[5] Crobach MJT, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2016; 22: Suppl 4: S63-81

[3] Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case fatality rate, United States, 2000-2005. Emerg infect Dis 2008; 14:929-31.

[4] McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis 2018; 66 (7): e1–e48

[5] Crobach MJT, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2016; 22: Suppl 4: S63-81

[6] Neal MD, Alverdy JC, Hall DE, Simmons RL, Zuckerbraun BS. Diverting loop ileostomy and colonic lavage: an alternative to total abdominal colectomy for the treatment of severe, complicated *Clostridium difficile* associated disease. Ann Surg 2011; 254 (3):423-7.

[7] Bella SD, Friedrich AW, and García-Almodóvar E, et al. *Clostridium difficile* infection among hospitalized HIV-infected individuals: epidemiology and risk factors: results from a case-control study (2002–2013). BMC Infect Dis 2015; 15:194.

[8] Guddati AK, Kumar G, Ahmed S, et al. Incidence and outcomes of *Clostridium difficile*-associated disease in hematopoietic cell transplant recipients. Int J Hematol. 2014 Jun;99(6):758-65.

[9] Silva RO, Vilela EG, Neves MS, et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea at a university hospital in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2014; 47: 447-50.

[10] Pires RN, Falci DR, Monteiro AA, et al. High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. Infect Control Hosp Epidemiol 2019 ;40(4):484-485.

[11] Cançado LGG, Silva SRO, Rupnik M, et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic associated diarrhea in a university hospital of Brazil. Anaerobe 2018; 54: 65–71.

[12] Costa CL, Carvalho CBM, González RH, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. Anaerobe 2017; 48:232–236

[13] Yin C, Chen DS, Zhuge J, McKenna D, Sagurton J, et al. Complete Genome Sequences of Four Toxigenic *Clostridium difficile* Clinical Isolates from Patients of the Lower Hudson Valley, New York, USA. Genome Announc 2018 Jan 25; 6(4): e01537.

[14] Cheng JW, Liu C, Kudinha T, Xiao M, et al. The tcdA negative and tcdB positive Clostridium difficile ST81 clone exhibits high-level fluoroquinolone resistance: a multi-center study in Beijing, China. Int J Antimicrob Agents 2020 Apr 21:105981. Doi: 217 10.1016/j.ijantimicag.2020.105981. Online ahead of print.

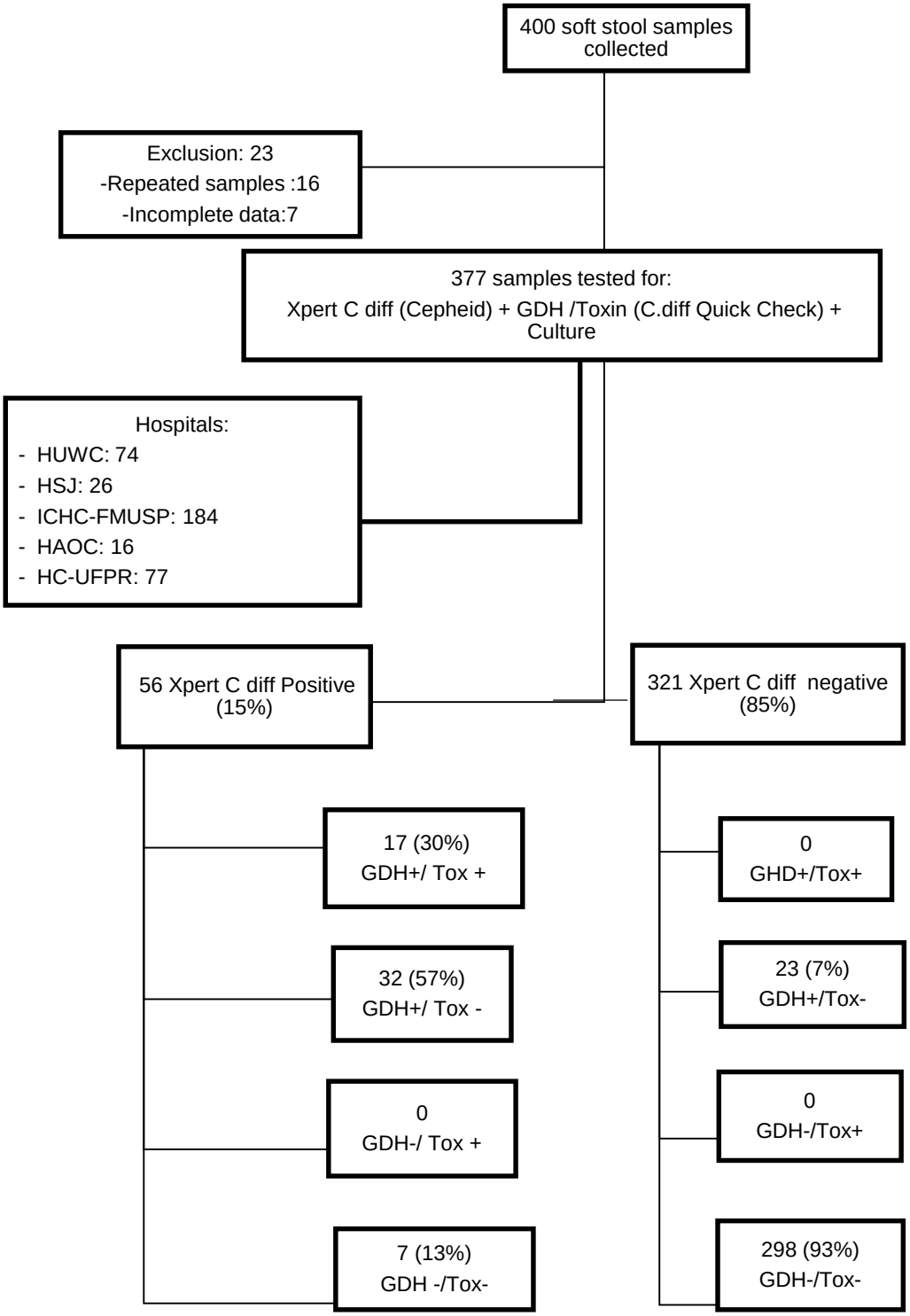
[15]. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011; 377:63–73.

[16] Chen YB, Gu SL, Shen P et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitals during a 4-year period in China. J Med Microbiol 2018; 67(1):52-59

[17] Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium) difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. Anaerobe 2019; 56:34-39.

[18] Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol 2018; 39(3):371-373.

Figure 1- Inclusion flowchart of patients with diarrhea enrolled in the study and their test results



GDH: glutamate dehydrogenase; Tox: toxin A and B; HUWC: Hospital Universitário Walter Cantídio; HSJ: Hospital São José de Doenças Infecciosas; ICHC-FMUSP: Instituto Central-

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; HAOC: Hospital Alemão Oswaldo Cruz; HC-UFPR: Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Table 1. Prevalence rates of *C. difficile* infection in the different hospitals and main clinical data of patients, April 2018 to July 2019-

	Name of Hospital, City				
Characteristics	HUWC, Fortaleza Beds=248 N (%)	HSJ, Fortaleza Beds=134 N (%)	ICHC-FMUSP, São Paulo Beds=987 N (%)	HAOC, São Paulo Beds=357 N (%)	HC-UFPR, Curitiba Beds=350 N (%)
N stool samples	74	26	184	16	77
N patients	70	26	172	16	77
CDI positive cases	5	0	27	6	18
CDI prevalence	7%	0	15%	37%	23%
Age, median y (range)	52 (17-86)	44 (20-65)	60 (18-89)	66 (32-88)	49 (18-81)
Male	45 (61)	14 (54)	99 (54)	6 (38)	45 (58)
ICU stay	18 (24)	12 (46)	47 (26)	2 (33)	26 (34)
Underlying disease					
Hypertension	20 (27)	1 (4)	57 (31)	3 (19)	14 (18)
Hematologic disease	18 (24)	0	39 (21)	0	20 (26)

Neurologic disease	10 (14)	12 (46)	34 (18)	4 (25)	16 (21)
Cardiovascular disease	18 (24)	2 (8)	40 (22)	4(25)	7 (9)
Renal disease	14 (19)	2 (8)	41 (22)	3 (19)	10 (13)
HSCT	9 (12)	1 (4)	47(25)	0	12 (16)
Pulmonary disease	8 (11)	12 (46)	11 (6)	0	12 (16)
Diabetes	13 (18)	0	21 (11)	3 (19)	5 (6)
Hepatic disease	12 (16)	2 (8)	19 (10)	1 (6)	5 (6)
Cancer	9 (12)	1 (4)	11 (6)	3 (19)	9 (12)
SOT	17 (23)	0	16 (9)	0	0
Rheumatologic disease	2 (3)	0	11 (6)	0	5 (6)
HIV	2 (3)	22 (85)	3 (2)	0	12 (16)
Immunocompromised (non-HIV)	35 (48)	4 (15)	95 (52)	7 (43)	44 (57)
Hospitalization in the last 3 months	45 (61)	11 (42)	62 (34)	4 (25)	56 (73)
Use of proton pump inhibitors	61 (82)	17 (65)	157 (85)	8 (50)	56 (73)
Use of probiotics	8 (11)	1 (4)	7 (4)	3 (19)	0
Previous ATB use I the last 3 months	69 (93)	23 (88)	154 (84)	10 (63)	71 (92)

STs of CD strains isolated	ST666, ST667, ST42	0	ST3, ST4, ST5, ST8, ST14, ST15, ST33 ST42, ST149, ST463, ST554, ST668, ST669,	ST2, ST42, ST48, ST103	NA
CD strains with Binary toxin	3	0	9	0	3
Severe CDI	3	1	7	1	5
Overall mortality	8 (11)	11 (42)	43 (23)	3 (19)	19 (25)
CDI mortality	0	0	0	0	0

HUWC: Hospital Universitário Walter Cantídio; HSJ: Hospital São José; ICHC-FMUSP: Instituto Central- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; HAOC: Hospital Alemão Oswaldo Cruz; HC-UFPR: Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná; ICU: intensive care unit; ATB: antibiotic; STs: sequence types; HIV: human immunodeficiency virus; NA: not available CDI: *C. difficile* infection; ICU: intensive care unit; HSCT: hematopoietic stem cell transplant; SOT: solid organ transplant;

Pontos importantes do manuscrito

Conforme exposto anteriormente, a taxa de positividade global de DACD foi de 15% (56/377), com grande variação entre os hospitais. Esses hospitais apresentam perfis de pacientes diversos, com comorbidades específicas, e com número discrepante de pacientes incluídos por centro, o que certamente teve impacto nesses resultados. Uma diferença epidemiológica marcante foi a proporção de pacientes imunossuprimidos não HIV incluídos em cada centro, com maiores índices no HC-UFPR em Curitiba (57%), em sua maioria pacientes onco-hermatológicos. Esse achado possivelmente contribuiu para maior taxa de DACD nessa instituição, uma vez que atinge valores de 23%.

No grupo dos pacientes com DACD, maioria dos pacientes (94%) com DACD fez uso de antibióticos nos últimos três meses. A mortalidade geral dos pacientes foi de 22% (84/377), com diferenças significativas entre os centros, mas sem óbitos atribuídos ao CD.

A cultura para anaeróbios foi positiva em 65 amostras (17%), 35 das quais tiveram CD confirmado por MALDI-TOF. Não foram encontradas deleções no gene *tcdC* e a toxina binária foi identificada em apenas 15 cepas de CD.

O sequenciamento do genoma foi realizado em 29 cepas de CD. Nossos isolados foram designados como pertencentes a 18 ST distintos, sendo 5 desses (28%) novos: ST554, ST666, ST667, ST668 and ST669 (*GenBank accession number* PRJNA598327). O ST mais encontrado foi o ST42 ST42 (n= 9, 50%), ST5 (n =3, 17%) e ST103 (n=2, 11%). As cepas hiper virulentas clássicas ST1/RT027 e ST11/RT078 não foram identificadas na nossa amostra.

4.2 Dados sobre fatore preditores, características clínicas, microbiológicas e epidemiologia molecular da diarreia por C. *difficile*

Detalhes desse estudo estão contidos no artigo intitulado **"Predictive factors, outcomes, and molecular epidemiology of *Clostridioides difficile* diarrhea in Brazilian hospitals", publicado no periódico *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Sep;40(9):1821-1832. Doi: 10.1007/s10096-021-04189-3. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33783664, na íntegra abaixo:**

Article name: Predictive factors, outcomes, and molecular epidemiology of *Clostridioides difficile* diarrhea in Brazilian hospitals

Authors name : Evelyne Santana Girão [1,2,3], Bruno de Melo Tavares [2] , Sania Alves dos Santos [4], Gessica Lorena Gamarra [4], Camila Rizek [4], Roberta Cristina Martins [4] , Lauro Vieira Perdigão Neto [2,4], Constancia Diogo [4], Tatiana D' Annibale Orsi [4], Hugo Manuel Paz Morales5 & Keite da Silva Nogueira5 & Adriane Ceshin Maestri5 & Icaro Boszczowski [2,6], Filipe Piastrelli [6], Cecilia Leite Costa [7], Daniely Viana Costa [1], Geovania Maciel [1], Janete Romão [3], Thais Guimarães [2], Gerly Anne de Castro Brito [7] , Silvia Figueiredo Costa [2,4]

Affiliations:

1- Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, R. Pastor Samuel Munguba, 1290 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará 60430-372, Brazil

2- Divisão de Moléstias Infecciosas, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

3- Hospital São José de Doenças Infecciosas, Fortaleza, Brazil

4- LIM-49, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

5- Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

6- Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brazil

7- Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

Corresponding author: Evelyne Santana Girão. Address: General Tertuliano Potiguara, 272/1800 Zip Code: 60135280 – Fortaleza, Ceará, Brazil. Phone: +55-85988418448 Email address: egirao@usp.br

Abstract

Little is known about the role of lineage of strains of *Clostridioides difficile* (CD) on the clinical presentation of CD infection (CDI) in Latin America, especially regarding the treatment response. We conducted a multicenter, prospective study to investigate the predictive factors and treatment outcomes of CDI in hospitalized patients and to performed phenotypical and molecular characterization of CD strains. A total of 361 diarrheic patients at 5 hospitals from different regions of the country were enrolled. All stool samples were tested for glutamate dehydrogenase (GDH), toxins A and B, and toxin genes using a nucleic acid amplification test (NAAT). Specimens were cultured and susceptibility profile and whole-genome sequencing (WGS) were performed. CDI positivity was 15% (56/377). Predictive factors for CDI were prior use of meropenem (OR 4.09, 95% CI 2.097– 7.095; p20% of bands (OR 3.77; 95% IC 1.280–11.120; p=0.016). Overall mortality was 19%, with no deaths attributed to CDI. Oral metronidazole was used in 74% of cases, with 85% of cure and 14% of recurrence. A total of 35 CD isolates were recovered, all of them susceptible to metronidazole and vancomycin. The WGS revealed 17 different STs, six of which were novel. ST42 was the most common ST and hypervirulent strains were not found. Severe CDI were caused by ST42, ST5, ST8, ST48, ST33 and a novel ST667. The ermB gene was more frequently found in isolates of ST42 (p=0.004).

Keywords: *Clostridioides difficile, d*iarrhea, predictive factors, metronidazole, molecular epidemiology.

Introduction *Clostridioides* (formerly *Clostridium) difficile* (CD) is the leading cause of healthcare-associated diarrhea worldwide [1]. Many factors appear to influence the chance of acquiring *C. difficile* infection (CDI) and their accurate identification can be useful to identify high-risk patients. Treatment with

antimicrobials, older age and hospitalization are significant risk factors for CDI [2]. Changes in the epidemiology of CDI have occurred since 2000, due, in part, to the emergence and subsequent spread of hypervirulent NAP1/BI/RT027 strains [3, 4]. The prevalence rates and distribution of CD strains differ between geographical regions and varies widely between the countries. The diagnosis of CDI can be difficult and continues to be a significant clinical challenge. Laboratory diagnosis of CDI involve detection of CD toxin or toxigenic strains of CD from stools. No single commercial test is suitable as a stand-alone test confirming CDI. Most scientific societies recommend a strategy based on a two-step algorithm that includes a sensitive screening method followed by a more specific one [5, 6]. Molecular typing has facilitated the understanding of CD epidemiology, by providing information on the origin, spread, emergence, and detection of strains with increased virulence [7].

There are few studies addressing the circulating CD strains in Latin America; however, NAP1/027 ribotype has already been reported in Colombia, Costa Rica, Mexico, Chile, Honduras and Brazil [8–12]. Although only one case of these hypervirulent strains has been reported in our country, epidemiologic data are still limited, especially regarding their antimicrobial resistance profile.

Metronidazole is the drug of choice for nonsevere CDI, whereas vancomycin or fidaxomicin has been recommended for severe infection [5]. Recent updates to American guidelines now give preference to vancomycin over metronidazole for all CDI, since it seems to be more effective, combined with the more favorable pharmacokinetics, safety, and tolerability [5, 13–15]. The aim of this study was to evaluate the predictive factors and treatment outcomes of CDI in hospitalized patients, as well as to perform phenotypical and molecular characterization of CD strains.

Materials and methods

Study design and data collection

This prospective, multicenter observational study was conducted at 5 tertiary Brazilian hospitals located in 3 state capitals from different regions of the

country: Hospital Universitário Walter Cantídio, from Federal University of Ceará and Hospital São José de Doenças Infecciosas, in Fortaleza, Ceará; Hospital das Clínicas, from University of São Paulo and Hospital Alemão Oswaldo Cruz, in São Paulo, São Paulo; and Hospital das Clínicas, from Federal University of Paraná, in Curitiba, Paraná. Our study included consecutive hospitalized patients > 18 years old with diarrhea (defined as >3 soft stools within 24 h), with suspected CDI.

More than one stool sample per patient could be collected if it was from different diarrheic episodes, defined as new diarrhea after the resolution of the previous episode. All CDI patients were evaluated during their hospital stay, and follow-up was performed until 3 months after the end of CDI therapy.

Definitions

A CDI case was defined as a patient with diarrhea and with a stool positive for CD A/B toxins or a positive NAAT for CD toxin genes, based on the international guidelines criteria [5,6]. CDI was classified as mild to moderate or severe disease according to a severity score system used to stratify CDI patients [16]. Recurrence was defined as a new diarrhea episode with positive CD assay in the next 2–8 weeks [5]. All deaths were assessed by the researcher responsible for each hospital to determine whether the death was attributable to CDI, that is, if CDI directly contributed to death and there was a causal link between them, such as toxic megacolon, peritonitis or septic shock [17]. Patients with community-onset, healthcare facility-associated diarrhea, defined as diarrhea that occurred within 28 days after discharge from a healthcare facility, were also included. Patients were excluded if they had community associated diarrhea, defined as onset of symptoms in the community or during the first 48 hours of admission and with no prior hospitalization in the last 3 months. [5]. Repeated CD positive samples from the same diarrheic episode, from the same patient, were also excluded. Clinical and demographic data were collected for each patient, and the study was approved by the local ethics committees of the participating hospitals.

Microbiological analysis

All fecal samples were tested for glutamate dehydrogenase (GDH)/ toxins A and B using a rapid enzyme immunoassay (EIA) test (C. diff Quick Chek Complete®, TechLab). A commercial real-time polymerase chain reaction (PCR) kit (Xpert® C. difficile BT, Cepheid) was used in all samples for detection of toxin B gene (tcdB), binary toxin gene (cdtA), and a single nucleotide deletion at the position of 117 in the tcdC gene. All samples were also cultured. Alcohol shock was performed on stool sample, followed by culture on cefoxitin–cycloserine–frutose agar (CCFA, Oxoid ®) and fastidious anaerobe broth (FAB). Suspected CD colonies were also incubated in a chromogenic culture medium, ChromID C. difficile agar® (CDIF; bioMérieux, France). The identification was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy (MALDI-TOF/MS, Brucker Daltonics, Germany). Antimicrobial susceptibility of CD isolates was determined using disk diffusion (Cefar, São Paulo, Brazil) and E-test strips (ETEST®, bioMérieux, France). Disk diffusion was used as a screening test to the following antibiotics: metronidazole, vancomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, teicoplanin, and azithromycin, as described by Fraga et al. [18]. After this, we used the E-test to determine the minimal inhibitory concentrations (MIC) for ciprofloxacin, metronidazole, and vancomycin. Resistance breakpoints were set in agreement with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) as follows: metronidazole (>2 mg/L), vancomycin (>2mg/L), according to EUCAST [19] and ciprofloxacin (≥8 mg/L), according to the (CLSI) [20]. EUCAST has no susceptibility breakpoint for ciprofloxacin.

Whole-genome sequencing

Whole-genome sequencing (WGS) of CD isolates was performed. Total DNA was extracted with a QIAamp DNAMini Kit (Qiagen, Japan), and the libraries were prepared with a Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina,USA). Paired reading segments were processed with the MiSeq Illumina Sequencing Platform (Illumina, USA). Genome assembly was performed again using VelvetOptimiser v. 2.2.5. Genes were curated with Artemis 16.0.0. The sequence type (ST) of isolates was determined using the MLST finder (Multilocus Sequence

Typing) tool (https://cge.cbs.dtu.dk/ services/MLST/). Phylogeny was inferred using the Swiss Institute of Bioinformatics REALPHY pipeline (https:// realphy.unibas.ch/realphy/). All genomes were aligned with reference genome AM180355.1, available on the National Biotechnology Information Centre website (http://www.ncbi. nlm.nih.gov). The sequence data produced in this study was deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the BioProject accession number PRJNA598327. The eBURST algorithm was used to identify groups of related isolates (clonal complexes) within MLST data set for C. difficile and PubMLST database (https://pubmlst.org/organisms/ clostridioides-difficile), available in June 2020 that contains 690 STs) [21]. The virulence and resistance genes were searched on the ResFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/), Virulence Factors Database (http://www.mgc. ac.cn/Vfs) and BLAST platforms (https://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi). The Virulence Factors Database was used as an initial screening, but all virulence genes were curated manually, and the toxin genes was searched manually independent of the database results. The sequence type (ST) of the isolates was checked using the MLST finder tool (Multilocus Sequence Typing) (https://cge.cbs.dtu.dk/ services/MLST/). Plasmids were evaluated with the Plasmid Finder tool (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/).

Statistical analysis

Predictive factors for CDI were evaluated by univariate and multivariate model using stepwise forward, and $p<0.05$ was considered significant. We also evaluated the association between ST and severity of CDI. Patients' characteristics analysis was done by continuous variables expressed as means, standard deviations, medians, and intervals. Categorical variables were compared with the 2 or Fisher's exact test. Quantitative variables were examined with a Student's *t* test or Mann–Whitney. p values of < 0.05 were considered statistically significant, and a significance level of 5% was adopted.

Predictive factors for CDI were evaluated by univariate analysis. All non-overlapping variables with $p<0.05$ on univariate analysis were entered in a logistic regression stepwise forward model. The presence of resistance genes in the

lineage was compared using Fisher's exact test. Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0 and Microsoft Excel 2016.

Results

From April 2018 to July 2019, 400 samples from 381 patients were collected. A total of twenty-three samples were excluded: 16 samples were repeated, from de same diarrheic episodes, and 7 were from patients with unavailable data. A total of 377 samples from 361 patients were included in the final analysis (Fig. 1). The frequency CDI positive samples was 15% (56/377.

The clinical and demographic data from the 361 patients are displayed in Table 1. Most CDI patients (94%) received antibiotics in the last three months. Ceftriaxone (43%), meropenem (42%), vancomycin (30%), piperacillin-tazobactam (27%), trimethoprim-sulfamethoxazole (25%), ciprofloxacin (15%) and clindamycin (15%) were the most used agents.

The univariate analysis identified as predictive factors for CDI: prior use of ceftriaxone (OR 2.07; 95% CI 1.14–3.78; p=0.015), meropenem (OR 3.41; 95% CI 1.83–6.35; p<0.001), onset of diarrhea before hospitalization (OR 4.38; 95% CI, 1.69–11.2; p=0.004), median of 5 soft stools per day (p=0.036), and stool mucus (OR 3.09; 95% CI 1.41–6.78; p=0.003). CDI was less frequent in HIV-positive (OR 0.14; 95%CI 0.01–1.04; p=0.026) and in lung-disease patients (OR 1.12; 95% CI 0.01–0.95; p=0.019) (Table 1). Eight patients (15%) had community-onset healthcare facility-associated CDI compared with 4% in the negative group (OR 4.38; 95% CI 1.69–11, p=0.004) (Table 2). Previous use of proton pump inhibitors was not associated with CDI and use of probiotics were less frequent in CDI group, but with no statistically significant association (OR 0.14; 95% CI 0.008–2.47; p=0.087). Most patients (68%) had non severe CDI according to the severity score [16]. There were no cases of toxic megacolon or fulminant colitis. In the univariate analysis, no independent risk factor was associated with severe forms of CDI.

In the multivariable logistic regression model, several factors were independently associated with CDI including prior use of meropenem (adjusted

OR 4.09, 95% CI 2.097–7.095; p< 0.001), presence of mucus in stools (adjusted OR 3.29; 95% CI 1.406–7.722; p=0.006) and neutrophil left-shift with >20% of bands (OR 3.77; 95% IC 1.280–11.120; p=0.016) (Table 3).

Oral metronidazole was the first-line therapy in 74% (39/ 53) of CDI patients, while vancomycin was used only in 15% (8/53). Among CDI patients with non-severe disease, 78% (28/ 36) used oral metronidazole, with 79% (22/28) of symptom resolution. Three of these patients (14%) experienced relapse of CDI in less than 3 months (Table 4). No CDI outbreaks were observed during the study period.

Among CDI patients with severe forms, 65% (11/17) were treated with oral metronidazole, with 91% of success. Relapse was observed in 20% of this group. Among all CDI patients treated with oral vancomycin as the first choice, five had no severe disease, and three had severe forms. Diarrhea resolution occurred in 75%of cases with no relapses. The median duration of CDI treatment was 10 days for metronidazole and 16 days for vancomycin (Table 4). The overall mortality in CDI patients was 19%, with no differences compared to the CDI-negative group. There were no deaths directly attributed to CDI.

Among the 56 CDI positive cases (with stool samples positive for CD A/B toxins or NAAT for CD toxin genes), C. difficile was recovered from culture in 35 samples, all confirmed by MALDI-TOF. The culture positivity rate was 62.5% (35/56), ranging between hospitals, with higher rates (89%) observed in São Paulo hospitals and lower rates (60%) in Ceará centres. No deletion at position 117 in the *tcdC* gene was detected. All strains were susceptible to metronidazole, vancomycin, levofloxacin, moxifloxacin, teicoplanin, and azithromycin and resistant to ciprofloxacin, using disk diffusion as screening test, according to Fraga et al. [18]. The MIC50/ MIC90 values, using the E-test, for metronidazole was 0.064 mg/L/0.125 mg/L; for vancomycin was 0.25 mg/ L/0.38 mg/L, and for ciprofloxacin was >32/>32 mg/L, respectively (Table 5). However, EUCAST breakpoints for metronidazole and vancomycin are based on epidemiological cutoff values (ECOFFs) and only distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility. We found no discrepancies between disk diffusion and the

E-test results, and all strains were susceptible to metronidazole and vancomycin and resistant to ciprofloxacin.

The WGS was performed in all 35 CD strains isolated from culture. A total of 29 non-duplicate toxigenic sequenced strains were detailed in a phylogenetic tree and 6 strains were excluded, because they were duplicated, corresponding to the same diarrheic episode (Fig. 2). WGS revealed 17 different STs, six (35%) of which were novel: ST463, ST554, ST666, ST667, ST668, and ST669 (GenBank accession number PRJNA598327). The most common STs identified were ST42 (n=10, 59%), ST5 (n=3, 18%) and ST103 (n=2, 12%) The eBURST analysis of CD using all STs available in the MLST database was done to analyze the evolutionary and genetic diversity (Fig. 3). We compared all the STs with the MLSTs present in the PubMLST database to verify the clonal complex of each isolate. Our strains belong to 3 clonal complexes (CC1, CC4 and CC10); the four novel STs (ST669, ST666, ST463, and ST554) are singletons. No CDI severe case was related to ST singletons.

The hypervirulent strains ST1/RT027 and ST11/RT078 were not identified. The strains of severe CDI cases belonged to STs: ST42, ST5, ST667, ST33, ST48, and ST8. The ST42 and ST5 were the most frequent found among severe cases of CDI. The most frequent resistance genes identified were erm (B) in 11 (38%), mef (A) in 7(24%) and ant (6)-la in 3 (10%) strains (Fig. 2). The erm (B) gene was most frequently found in ST42 strains compared to other STs (OR19.0 IC 2.7-145.6; p=0.004). There was no association between previous use of lincosamides and ST42. Three (10%) patients whose strains were sequenced used macrolides previously and none in the group assigned as ST42. Some of our isolates also have amino acid substitution in GyrA and GyrB genes mediating fluoroquinolone resistance, like GyrA: T82I in HC131; GyrB: I139R in HC139 and OC101; GyrB: V130I in HC66; GyrB: S366A in HU74 and GyrB: S416A in HC132 and HU74 strains. The 3 ST5 founded harbored the toxins genes tcdA, tcdB and tcdT.

Discussion

In the present study, the frequency of CDI cases was 15%, as observed in other national reports [22]. We used a four-test strategy, with all samples being simultaneously tested for GDH, toxins A/B, NAAT, and culture to improve the accuracy of CDI diagnosis. Due the lack of national surveillance for CDI and few prospective studies from Latin America and Brazil, our findings may provide useful information about local epidemiology and treatment outcomes.

Our study tried to analyze clinical or laboratory findings that could be associated with an increased risk of CDI among hospitalized patients with diarrhea. Well-defined risk factors for CDI include advanced age, antibiotic exposure, prior recent hospitalization, and co-morbidities [23]. In our study, it seems that there was not a significantly increased odds of CDI among patients age > 65 years, as demonstrated by other authors [24]. Meropenem was the only antibiotic associated with a significant increased risk of CDI in our cohort, in contrast to previous studies that supported that clindamycin and cephalosporins were most strongly associated antibiotics [25]. However, our results agree well with Cançado et al. that also reported that previous carbapenem use was a risk factor for CDI. According to our data, they also found a high rate of carbapenem use, which might reflect a more severe underlying illness in these patients [26]. A high rate of carbapenem use was also reported in a recent point prevalence survey that evaluated antimicrobial use at Brazilian hospitals, and found that meropenem as the second most frequent antibiotic prescribed, after ceftriaxone [27]. These results can be explained by several reasons, one of them related to the high rates of antimicrobial resistance, particularly in Gram-negative organisms, reported in Brazilian centers [28], as well as the inclusion of patients with health care-related CDI in our sample, excluding the community cases

The use of proton pump inhibitors was not an independent predictor of CDI in our study. Although some authors suggest that gastric acid suppression may have an influence on CDI development, this topic remains controversial, as some meta-analyses have found conflicting results associating pump inhibitors use with CDI [29]. In our study we found that probiotic use may decrease the risk of CDI in the bivariate analysis, but it was not confirmed in multivariable analysis. Conflicting data still exists about probiotics for the prevention of CDI. Some

authors have shown that probiotic use may reduce the incidence of CDI in high-risk populations, although other clinical trials have yielded different results. [30, 31].

An interesting aspect of our study is the presence of mucus in stools and neutrophil left shift with >20% of rods as strong predictors of CDI, which has not been previously described. These findings can be promising markers to differentiate between those patients with CDI and other causes of diarrhea. Surprisingly, our data shows a low incidence of CDI in HIV patients, which contrasts with past authors that demonstrated that HIV infection, is a risk factor for CDI. Furthermore, there are still limited epidemiologic data about CDI in HIV-infected patients [32].

Concerning treatment outcomes, an important finding of our study was the great usage of oral metronidazole to treat most CDI patients with high clinical cure, mainly in nonsevere cases. In this group, 78% of patients received metronidazole with almost 80% of success and only 14% of recurrence. Another key finding in our cohort was the low usage of oral vancomycin to treat severe CDI cases. This may be due to several factors, as the absence of the hypervirulent and resistant strains in our country or the under-recognition of severe CDI in our population. Another point that may favors the large use of metronidazole in our centers is the absence of commercially vancomycin capsules or solution in Brazil, as well as fidaxomicin, also not available, just as it happens in other middle-income countries. We also do not have national treatment guidelines, and each hospital follows its own protocols. Similar to our results, the use of metronidazole for severe CDI cases was also reported by some authors, with a minority of this patients being treated with oral vancomycin, and with satisfactory response [33, 34]. There is a conflicting point regarding the ideal treatment of nonsevere CDI in literature. Some societies guidelines recommend metronidazole for mild and moderate disease. On the other hand, the new American guidelines favors vancomycin over metronidazole for all CDI cases, based on the evidence of vancomycin superiority [5, 35]. Like in our study, some authors recently demonstrated no difference in the therapeutic effects between vancomycin and metronidazole, among patients with nonsevere CDI, regarding

clinical cure, recurrence rate, and mortality [36]. The low rate of severe cases and the absence of mortality attributable to CDI in our study are argued in favor of the possibility of upholding metronidazole as the first-line therapy for uncomplicated cases in our centers. Considering the necessity to understand and monitor local and epidemiologic data (e.g., treatment, drug usage and availability, positivity CDI rates, resistance profile, epidemic strains), this study can be useful to secure proper local management of CDI in our country.

In the present study, all isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin. This finding is in accordance with a recent published review that found that resistance to metronidazole and vancomycin is rare [37]. In Brazil, few studies have evaluated CD susceptibility to antimicrobials, and all of them showed good susceptibility to metronidazole [12, 18]. Fluoroquinolone is not a drug for CDI treatment but its resistance in CD strains is associated with the emergence of hypervirulent isolates, such as BI/ NAP1/027 [38]. Resistance to fluoroquinolones is mediated by the presence of chromosomal mutations in the QRDRs of the *GyrA* and *GyrB* genes [39]. Our data showed that all the isolates were resistant to ciprofloxacin. However, clinically important resistance genes associated with fluoroquinolones, such as the *GyrA*: T82I, *GyrB:* I139R, *GyrB:* V130I, *GyrB:* S366A and GyrB: S416A were detected only in few strains in our study, with no association with severe CDI cases. Moreover, the most common resistance genes present in our samples were *erm (B), mef (A)* and *ant (6)-la*. In CD these genes confer resistance to macrolides, lincosamides, streptogramins B, and aminoglycosides, respectively.

Clinically important resistance genes, which confer resistance to metronidazole and vancomycin, such as the *NimB*, and the Van family, were not detected in our strains. Of the five novel ST isolates in our study, no one was found to carry resistance genes. Besides, *emrB* and *mefA* genes were found in 50% of CD strains from severe cases and the ST42 harbored significantly more *emrB* genes comparing to the others ST. The *emrB* gene confers resistance to macrolides, mediate by rRNA methylase that modify 23S ribosomal RNA, and to lincosamides as well. Although we did not find association between previous use of macrolides and ST42 in our patients, it is a class of antibiotic frequently used

in Brazil, in the community and hospital settings. This characteristic may perhaps explain the predominance of this lineage in the country.

It is thought that disk diffusion criteria for antimicrobial susceptibility testing of anaerobes have not been defined yet and a MIC method should be used. However, few studies have evaluated disk diffusion for antimicrobial susceptibility of CD comparing with E-test MICs [17, 40]. And, like our results, they found an acceptable agreement between these two methods to some antimicrobials used for CD treatment, such as metronidazole, vancomycin and ciprofloxacin.

Another key aspect of our study was the access of national molecular CD strains data. The 17 STs found in our cases revealed a high genetic diversity of CD strains. Most frequent ST isolated was ST42 (59%), ST5 and ST103. This corroborates previous reports in other Brazilian hospitals, which also found ST42/RT106 as the most common circulating ST [41]. ST42/ RT106 is endemic in Colombia, as it was in United Kingdom hospitals ten years ago [42, 43]. The ST42 has been also reported in several countries as USA and China [44, 45]. ST5 is one of the most prevalent STs described in Europe causing CDI and it has also been reported in China as well [46, 47].

The hypervirulent strains ST1/RT027 and ST11/RT078 were not identified on our study, according to most other local reports [12]. Until now, RT027 was only reported in two patients from a South region hospital in Brazil, one of which was classified as ST67 [11]. We found six novel STs and severe CDI were caused by strains assigned most frequently as ST5 and ST42 in Sao Paulo, Southeast of Brazil. Moreover, in our study, severe CDI cases were not frequent in northeast of the country and the only one case found belonged to a novel ST assigned as ST667. Costa et al, also described a clade 2 strain in northeast of Brazil and classified it as a new ST41/RT821, which is phylogenetically related to the NAP1/027 strain [48]. We found novel STs that are singletons. The ST42 that belonged to CC1, was the most frequent and harbored significantly more *erm (B)* that leads to macrolide resistance compared with the others STs.

Our study has several limitations. First, our cohort was restricted to the inpatient teaching hospitals, and our sample size was relatively small.

Furthermore, it was not possible to address the real prevalence of CDI in the included institutions because we were not able to analyze stools from all patients with diarrhea in the hospital. In addition, some CD strains were not obtained to perform phenotypical and molecular characterization, which led to undermining the true prevalence and diversity of CD STs.

In conclusion, patients with prior use of meropenem, with mucus in stools and neutrophil left-shift with >20% of bands, were more likely to have CDI, and these parameters may be useful to differentiate between those patients with CDI and other etiologies. This study revealed a high diversity of CD strains in Brazilian centers, with new sequence types. ST42 was the most common ST and hypervirulent strains were not found. Severe CDI were caused by ST42, ST5, ST8, ST48, ST33, and a novel ST667. The *ermB* gene was more frequently found in isolates of ST42.

Acknowledgements

Special thanks to bioMérieux, for the donation of chromogenic culture medium, ChromID C. difficile agar® and Pfizer that supported this work.

Author contribution

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by: Evelyne Santana Girão, Silvia Figueiredo Costa, Bruno de Melo Tavares, Sania Alves dos Santos, Gessica Lorena Gamarra, Camila Rizek, Roberta Cristina Martins, Lauro Vieira Perdigão Neto, Constancia Diogo, Tatiana D' Annibale Orsi, Hugo Manuel Paz Morales, Keite da Silva Nogueira, Adriane Ceshin Maestri, Icaro Boszczowski, Filipe Piastrelli, Cecilia Leite Costa, Daniely Viana Costa, Geovania Maciel, Janete Romão. The first draft of the manuscript was written by: Evelyne Santana Girão. The final review was done by Silvia Figueiredo Costa. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Pfizer (grant 53233563) supported this work, as independent researcher.

Data Availability

The data supporting the findings of this study are available within the corresponding author.

Declarations

All authors declare no competing interests.

Ethical approval

This protocol was approved by the ethical committee from all participating institutions: Hospital Universitário Walter Cantídio, from Federal University of Ceará, in Fortaleza, Ceara (N°2.217.633); Hospital São José de Doenças Infecciosas, in Fortaleza, Ceará (N°2.144.350); Hospital das Clínicas, from University of São Paulo, in São Paulo, São Paulo (N°2.025.392) and Hospital Alemão Oswaldo Cruz, in São Paulo, São Paulo (N°2.025.392); and Hospital das Clínicas, from Federal University of Paraná, in Curitiba, Paraná (N°2.480.851)

Consent to participate

All subjects that participated of this study gave a written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Consent to publish

All authors consented to publish this study

References

1. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG et al (2013) Guidelines for diagnostics, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol 108:478–498.

2. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L et al (2011) Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. N Engl J Med 365(18):1693–1703

3. Lessa FC, Winston LG, McDonald LC (2015) Emerging Infections Program *C. difficile* Surveillance Team. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. N Engl J Med 372(24):2369–2370

4. Nagy E (2018) What do we know about the diagnostics, treatment and epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in Europe? J Infect Chemother 24:164–170

5. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S et al (2018) Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis 66(7): e1–e48

6. CrobachMJT, Planche T, Eckert C et al (2016) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 22(Suppl 4): S63–S81

7. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP et al (2013) Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. Euro Surveill 18(4):20381

8. Salazar CL, Reyes C, Atehortua S et al (2017) Molecular, microbiological and clinical characterization of *Clostridium difficile* isolates from tertiary care hospitals in Colombia. PLoS One 12(9): e0184689

9. Jiménez A, Araya R, Paniagua D, Camacho-Mora Z et al (2018) Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in a National Geriatrics Hospital from Costa Rica. J Hosp Infect 99(4):475–480

10. Guerrero-Araya E, Meneses C, Castro-Nallar E, Guzmán AM et al (2020) Origin, genomic diversity and microevolution of the *Clostridium difficile* B1/NAP1/RT027/ST01 strain in Costa Rica, Chile, Honduras and Mexico. Microb Genom 6(5): e000355

11. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ et al (2018) Hypervirulent Clostridium difficile strain has arrived in brazil. Infect Control Hosp Epidemiol 39(3):371–373

12. Trindade CRN, Domingues Regina Maria CP, Ferreira EO (2019) The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: a systematic review covering thirty years. Anaerobe 58:13–21

13. Igarashi Y, Tashiro S, Enoki Y et al (2018) Oral vancomycin versus metronidazole for the treatment of *Clostridioides difficile* infection: meta-analysis of randomized controlled trials. J Infect Chemother 24(11):907–914. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.08.003

14. Sarna K, Gross A (2019) vancomycin versus metronidazole for nonsevere *Clostridioides difficile* infection: are the data adequate to change practice? Ann Pharmacother 53(8):845–852. https://doi. org/10.1177/1060028019829764

15. Fabre VR, Dzintars K, Avdic E, Cosgrove SE (2018) Role of metronidazole in mild *Clostridium difficile* infections. Clin Infect Dis 67:1956–1958. https://doi.org/10.1093/cid/ciy474

16. Lungulescu OA, Cao W, Gatskevich E et al (2011) CSI: a severity index for Clostridium difficile infection at the time of admission. J Hosp Infect 79:151–154

17. European Centre for Disease Prevention and Control (2015) European surveillance of Clostridium difficile infections. Surveillance protocol version 2.2. ECDC, Stockholm. https://doi. org/10.2900/44795

18. Fraga EG, Nicodemo AC, Sampaio JLM (2016) Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. Braz J Infect Dis 20(5):476–481

19. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2018) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. http://www.eucast.org

20. CLSI (2018) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

21. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ (2018) Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res 3:124. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1

22. Pires RN, Falci DR, Monteiro AA et al (2019) High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. Infect Control Hosp Epidemiol 40(4):484– 485. https://doi.org/10.1017/ice.2019.27

23. Eze P, Balsells E, Kyaw MH, Nair H (2017) Risk factors for *Clostridium difficile* infections an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. J Glob Health 7(1):010417

24. Leffler DA, Lamont JT (2015) *Clostridium difficile* infections. N Engl J Med 373:287–288

25. Slimings C, Riley TV (2014) Antibiotis and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 69:881–891

26. Cançado LGG, Silva SRO, Rupnik M et al (2018) Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic associated diarrhea in a university hospital of Brazil. Anaerobe 54:65–71

27. Matos Porto AP, Goossens H, Versporten A, Costa SF, on behalf of Brazilian Global-PPS working group (2019) Global point prevalence survey (Global-PPS) of antimicrobial consumption in Brazilian hospitals. J Hosp Infect 104:165–171. https://doi.org/10. 1016/j.jhin.2019.10.016

28. BRASIL (2017) ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2017.
https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletimseguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude (acessed18 december 2020)

29. Arriola V, Tischendorf J,Musuuza J et al (2016) Assessing the risk of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection with proton pump inhibitor use: a meta-analysis. Infect Control Hosp Epidemiol 37:1408–1417

30. Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CKF et al (2017) Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. Cochrane Database Syst Rev (12):CD006095. https://doi.org/10.1002/14651858.CD006095

31. Hickson M (2011) Probiotics in the prevention of antibiotic associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Gastroenterol 4(3):185197. https://doi.org/10.1177/ 1756283X11399115

32. Bella SD, Friedrich AW, García-Almodóvar E et al (2015) *Clostridium difficile* infection among hospitalized HIV-infected individuals: epidemiology and risk factors: results from a casecontrol study (2002–2013). BMC Infect Dis 15:194

33. Le F,Arora V, Shah DNet al (2012) A real-world evaluation of oral vancomycin for severe *Clostridium difficile* infection: implications for antibiotic stewardship programs. Pharmacotherapy 32(2):129– 134. https://doi.org/10.1002/PHAR.1002

34. Khanafer N, Blais L, Barbut F et al (2015) Treatment of *Clostridium difficile* infection in a French university hospital. Scand J Gastroenterol 50(10):1253–1260. https://doi.org/10.3109/ 00365521.2015.1033746

35. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* Infection. Clin Microbiol Infect 20(Suppl. 2):1–26

36. Stevens VW, Nelson RE, Schwab-Daugherty EM et al (2017) Comparative effectiveness of vancomycin and metronidazole for the prevention of recurrence and death in patients with *Clostridium difficile* infection. JAMA Intern Med 177(4):546–553

37. Sholeh M, Krutova M, Forouzesh M et al (2020) Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control 9(1):158. ttps://doi.org/10.1186/s13756-020-00815-5

38. Dingle KE, Didelot X, Quan TP et al (2017) Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. Lancet Infect Dis 17(4):411–421

39. Baine SD, Wilcox MH (2015) Antimicrobial resistance and reduced susceptibility in *Clostridium difficile*: potential consequences for induction, treatment, and recurrence of C. difficile infection. Antibiotics 4:267–298. https://doi.org/10.3390 antibiotics4030267

40. Erikstrup LT, Danielsen TKL, Hall V, Olsen KEP, Kristensen B, Kahlmeter G, Fuursted K (2012) Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. Clin Microbiol Infect 18(8): E266–E272

41. Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG et al (2019) Molecular epidemiology of *Clostridioides (*previously *Clostridium) difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. Anaerobe 56:34–39

42. Salazar CL, Reyes C, Cienfuegos-Gallet AV et al (2018) A. Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 591, 106 and 002, the dominant strain types circulating in Medellin, Colombia. PLoS One 13(4): e0195694

43. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH, EUCLID study group Diversity of Clostridium difficile PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea (EUCLID), 2012 and 2013. Euro Surveill 21(29)

44. Yin C, Chen DS, Zhuge J, McKenna D, Sagurton J et al (2018) Complete genome sequences of four toxigenic *Clostridium difficile*: clinical isolates from

patients of the Lower Hudson Valley, New York, USA. Genome Announc 6(4): e01537–e01517

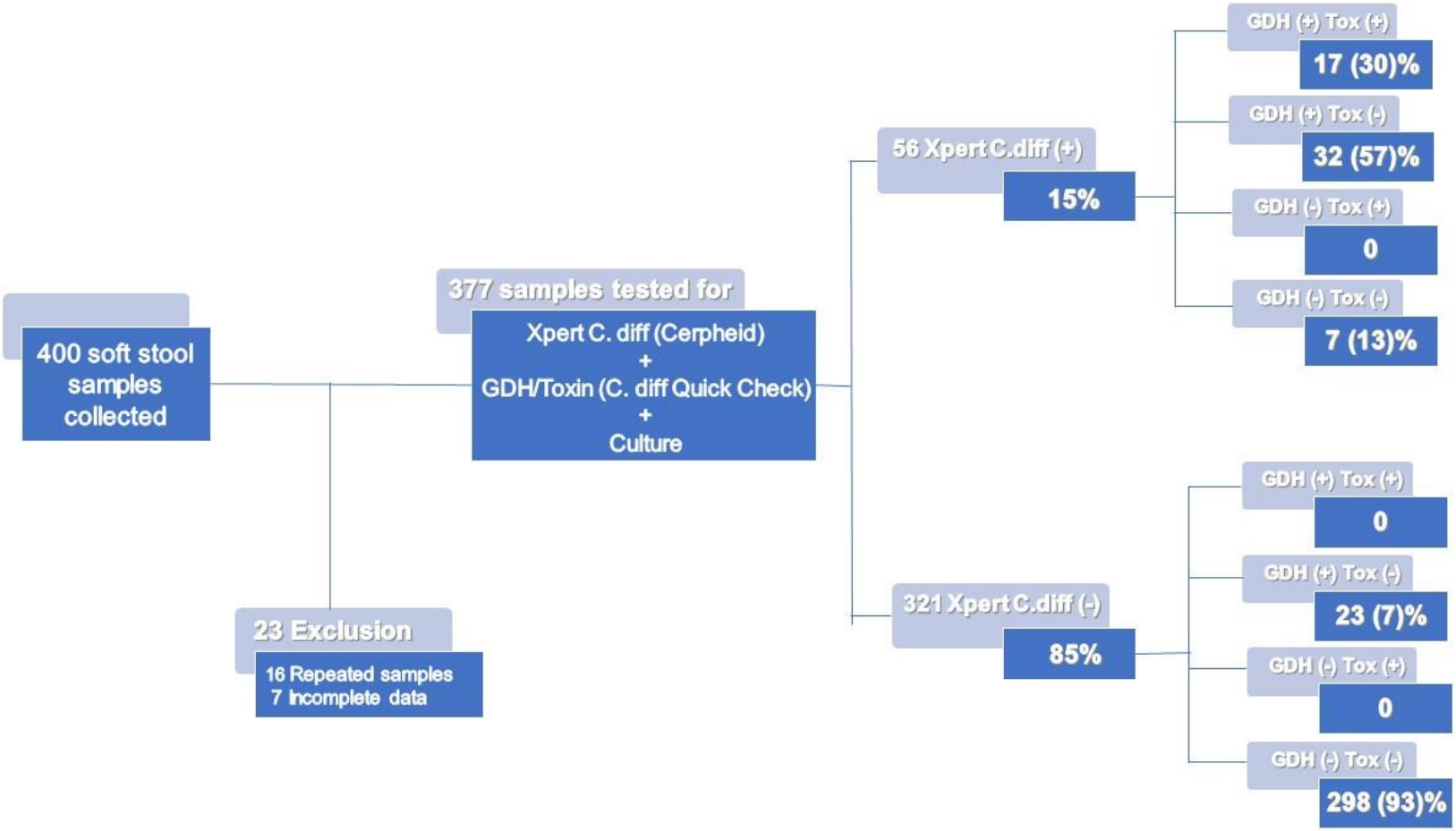
45. Cheng JW, Liu C, Kudinha T, Xiao M et al (2020) The *tcdA* negative and *tcdB* positive *Clostridium difficile* ST81 clone exhibits high-level fluoroquinolone resistance: a multicenter study in Beijing, China. Int J Antimicrob Agents: 105981. https://doi.org/ 10.1016/j.ijantimicag.2020.105981 Online ahead of print

46. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH et al (2011) *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 377:63–73

47. Chen YB, Gu SL, Shen P et al (2018) Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitals during a 4-year period in China. J Med Microbiol 67(1): 52–59

48. Costa CL, López-Ureña D, de Oliveira AT et al (2016) A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. Anaerobe 40:76–84

Figure 1- Inclusion flowchart of patients enrolled in the study and their test results-



.

Table 1. Clinical data of patients with diarrhea: comparison of patients with *C. difficile* infection (CDI) and individuals with diarrhea due to other causes in 5 Brazilian Hospitals, April 2018 to July 2019

Characteristics	CDI Positive	CDI Negative	Univariate analyses	*p* value
	N=53 patients (%)	N=308 patients (%)	OR (95%CI)	
Age, median y (p25-p75)	61(45-69)	54(38-65)		0.359
< 45	13(25)	106(34)		
45- 54	10(19)	51(17)		
55-65	10(19)	66(21)		
> 65	20(38)	85(28)		
Male	33(62.3)	169(55)	1.37(0.74-2.42)	0.317
Origin of sample (city)				
Fortaleza (2 hospitals)	5(9.4)	94 (30)		
São Paulo (2 hospitals)	29(55)	167(54)		
Curitiba (1 hospital)	19(36)	63(20)		
ICU stay	10(19)	88(29)	0.58(0.27-1.20)	0.147

Underlying disease				
Hypertension	17(32)	70(22)	1.60(0.85-3.03)	0.142
Diabetes	9(17)	31(10)	1.82(0.81-4.09)	0.138
Cardiovascular disease	14(26.4)	54(17.5)	1.68(0.85-3.32)	0.127
Renal disease	14(26.4)	51(16,6)	1.80(0.91-3.57)	0.085
Haematology disease	12(22.6)	63(20,5)	1.13(0.56-2,29)	0.717
Neurologic disease	11(21)	58(19)	1.12(0.54-2.33)	0.742
HSCT	8(15)	58(19)	0.76(0.34-1.71)	0.516
Autologous	3(28.6)	38(59.4)		
Allogeneic	5(71.4)	26(40.6)		
Cancer	6(11.3)	26(8.4)	1.38(0.54-3.54)	0.443
SOT	2(3.8)	31(10)	0.35(0.08-1.51)	0.197
Kidney	1(50)	10(29.4)		
Liver	0(0)	2(68)		
Kidney-liver	1(50)	1(3)		
Liver disease	3(5.7)	34(11)	0.48(0.14-1.63)	0.233

Rheumatologic disease	3(5.7)	15(5)	1.17(0.32-4.18)	0.736
Lung disease	1(2)	40(13)	0.12(0.01-0.95)	0.019
HIV	1(2)	37(12)	0.14(0.01-1.04)	0.026
Hospitalization in the last 3 months	31(59)	139(45)	1.71(0.94-3.09)	0.072
Surgery in the last 3 months	8(15)	63 (20.5)	0.69(0.31-1.54)	0.365
Previous ATB use (last 3 months)	50(94.3)	264(85.7)	2.7(0.83-9.2)	0.085
Ceftriaxone	23(43.4)	83(27)	2.07(1.14-3.78)	0.015
Meropenem	22(41.5)	53(17.2)	3.41(1.83-6.35)	<0.001
Vancomycin	16(30.2)	59(19,2)	1.82(0.95-3.5)	0.067
Piperacillin-tazobactam	14(26.4)	84(27.3)	0.95(0.49-1,85)	0.897
Trimethoprim-sulfamethoxazole	13(24.5)	86 (28)	0.83 (0.42-1.64)	0.609
Ciprofloxacin	8 (15)	36 (18)	1.34(0.58-3.07)	0.484
Clindamycin	8 (15)	31(10)	1.58 (0.68-3.6)	0.276

Imunossupressive therapy	17(32)	107(35)	0.88 (0.47-1.65)	0.706
Chemotherapy in the last 3 months	13(24.5)	72(23.4)	1.06(0.54-2.1)	0.855
Use of proton pump inhibitors	41(77.4)	246(80)	0.86(0.42-1.73)	0.676
Use of probiotics	0(0)	18(6)	0.14(0.008-2.47)	0.087

CDI: *C. difficile* infection; ICU: intensive care unit; HSCT: hematopoietic stem cell transplant; SOT: solid organ transplant; HIV: human immunodeficiency virus; ATB: antibiotic

Table 2. Characterization of diarrheic episodes and patient's outcomes: comparison of patients with *C. difficile* infection (CDI) and individuals with diarrhea due to other causes, April 2018 to July 2019

Characteristics	**CDI Positive** N=53 Patients (%)	**CDI Negative** N=308 Patients (%)	**Univariate analyses** OR (95% CI)	***p* Value**
Days of hospitalization until diarrhea, median (range)	17(0-106)	11(0-104)		0.282
Community-onset / healthcare facility-associated CDI	8(15)	12(4)	4.38(1.69-11)	0.004
Number soft stools, median (25-p75)	5(4-6)	4(4-5)		0.036
Diarrhea with mucus	11(21)	24(8)	3.09(1.41-6.78)	0.003
Diarrhea with blood	6(11)	22(7)	1.65(0.63-4.30)	0.274
Abdominal pain	20(38)	90(29)	1.16(0.79-2.69)	0.213
Fever ≥38.5 °C	12(23)	80(26)	0.83(0,41-1,66)	0.607
Fecal incontinence	12(23)	7(23)	1.0(0.49-2.01)	0.997
Signs of peritonitis	1(2)	3 (1)	1.95(0.19-19.1)	0.472
Ileus	1(2)	1(0.3)	5.9(0.36-95.8)	0.272
Megacolon toxic	0(0)	1(0.3)	1.91(0.07-47.6)	>0.999
Hemodynamic instability	2(4)	7(2)	1.68(0.34-8.34)	0.626
ICU admission	1(2)	0(0)	17(0.70-438.5)	0.147
Leucocyte count ≥15,000 cels/mm^3	15(28)	51(16.6)	1.98(1.01-3.88)	0.041
Band Neutrophils> 20%	7(13.5)	10 (3)	4.63(1.67-12.7)	0.005
Creatinine >50% above the baseline	9(17)	25(8)	2.31(1.01-5.28)	0.069
Albumin reduction < 30g/L	7(13)	22(7)	2.13 (0.84-5.40)	0.222
Non severe CDI	36(68)			
Severe CDI	17(32)			
Death	10(19) *	71(23)	0.7 (0.37-1.62)	0.500

CDI*: C. difficile* infection; ICU: intensive care unit. *No deaths were attributed to CDI

Table 3. Multivariate analyses of risk factors associated with diarrhea caused by *C difficile* infection

Variable	Multivariate analysis OR adjusted (95% CI)	*P* value
Lung disease	0.138 (0.018-1.046)	0.055
Previous meropenem use (last 3 months)	4.095 (2.097-7.095)	<0.001
Diarrhea with mucus	3.295 (1.406-7.722)	0.006
Band Neutrophils > 20%	3.772 (1.280-11.120)	0.016

Table 4. Clinical outcomes and treatment of CDI patients

	N=53 patients	(%)
Severity of CDI		
Mild to moderate disease	36	68
Severe disease	17	32
Types of treatment		
Mild to moderate disease		
Metronidazole PO [1]	28	78
Vancomycin PO [2]	5	14
Metronidazole IV [3]	2	6
Metronidazole IV [3] + Vancomycin PO [2]	1	3
Severe disease		
Metronidazole PO [4]	11	65
Vancomycin PO [5]	3	18
Metronidazole IV [6]	1	6
Metronidazole IV [6] + vancomycin PO [5]	1	6
Metronidazole PO [4] + metro + vanco PO [5]	1	6
Treatment response		
Mild to moderate disease		

Metronidazole PO	28	78
Resolution of diarrhea	22	79
Partial response	2	7
No response	4	14
Recurrence	3	14
Vancomycin PO	5	14
Resolution of diarrhea	4	80
Partial response	1	20
Recurrence	2	50
Metronidazole IV	2	6
Resolution of diarrhea	2	100
Recurrence	0	0
Metronidazole PO + Vancomycin PO	1	3
Resolution of diarrhea	1	100
Recurrence	1	100
Severe disease		
Metronidazole PO	11	65
Resolution of diarrhea	10	91
Partial response	1	9

Recurrence	2	20
Vancomycin PO	3	18
Resolution of diarrhea	2	67
Partial response	1	33
Recurrence	0	0
Metronidazole IV	1	6
Resolution of diarrhea	1	100
Recurrence	0	0
Metronidazole IV + vancomycin PO	1	6
Resolution of diarrhea	0	0
Partial response	1	100
Metronidazole PO + metro IV+ vanco PO	1	6
Resolution of diarrhea	0	0
Partial response	1	100

CDI: *C. difficile* infection; PO: oral; IV: intravenous; vanco: vancomycin; metro: metronidazole

[1] Metronidazole PO doses: 500 mg three times daily. Median duration of treatment: 10 days

[2] Vancomycin PO doses: 125 mg four times daily. Median duration of treatment: 11,5 days. None of these patients received vancomycin tapers.

[3] Metronidazole IV doses: 500 mg three times daily. Median of duration of treatment: 11 days

[4] Metronidazole PO doses: 500 mg three times daily. Median of duration of treatment: 10,2 days

[5] Vancomycin PO doses: 250 to 500 mg four times daily. Median of duration of treatment: 14 days. None of these patients received vancomycin tapers.

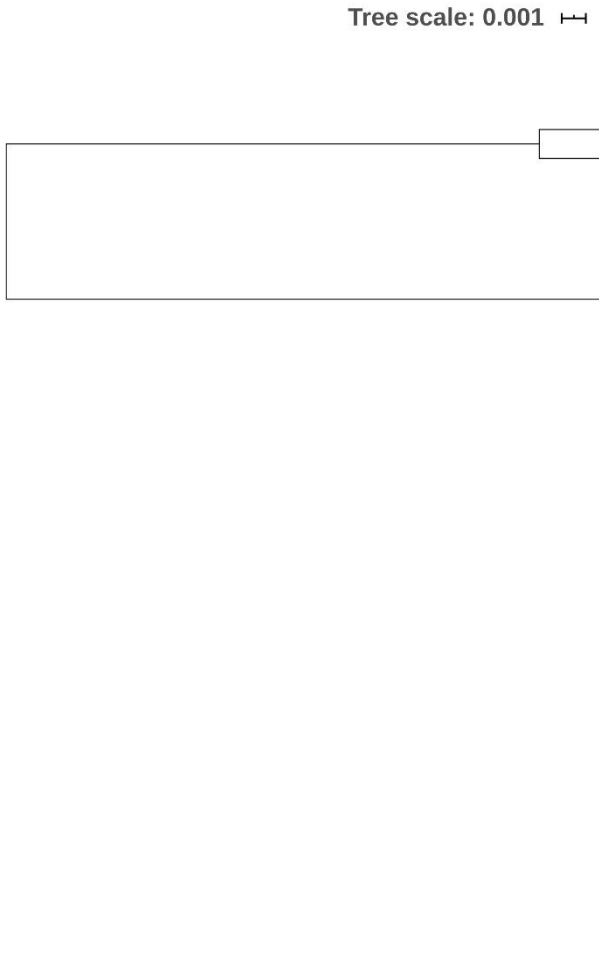
[6] Metronidazole IV doses: 500 mg three times daily. Median of duration of treatment: 13,2 days

Table 5. Susceptibility profile of 35 *Clostridioides difficile* isolates by E-Test

Antimicrobial	CLSI Breakpoint (mg/L)	EUCAST Breakpoint (mg/L)	Range of MIC (mg/L)	MIC 50	MIC 90	Nº of strains	
						Susceptible	Resistant
Ciprofloxacin	≥ 8		>32	>32	>32	0	35
Metronidazole		>2	<0.016-0.380	0.064	0.125	35	0
Vancomycin		>2	0.19-0.50	0.25	0.38	35	0

EUCAST: with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute; MIC: minimum inhibitory concentrations

Figure 2. Maximum likelihood tree generated from whole-genome multiple alignments of 29 *C. difficile* stains

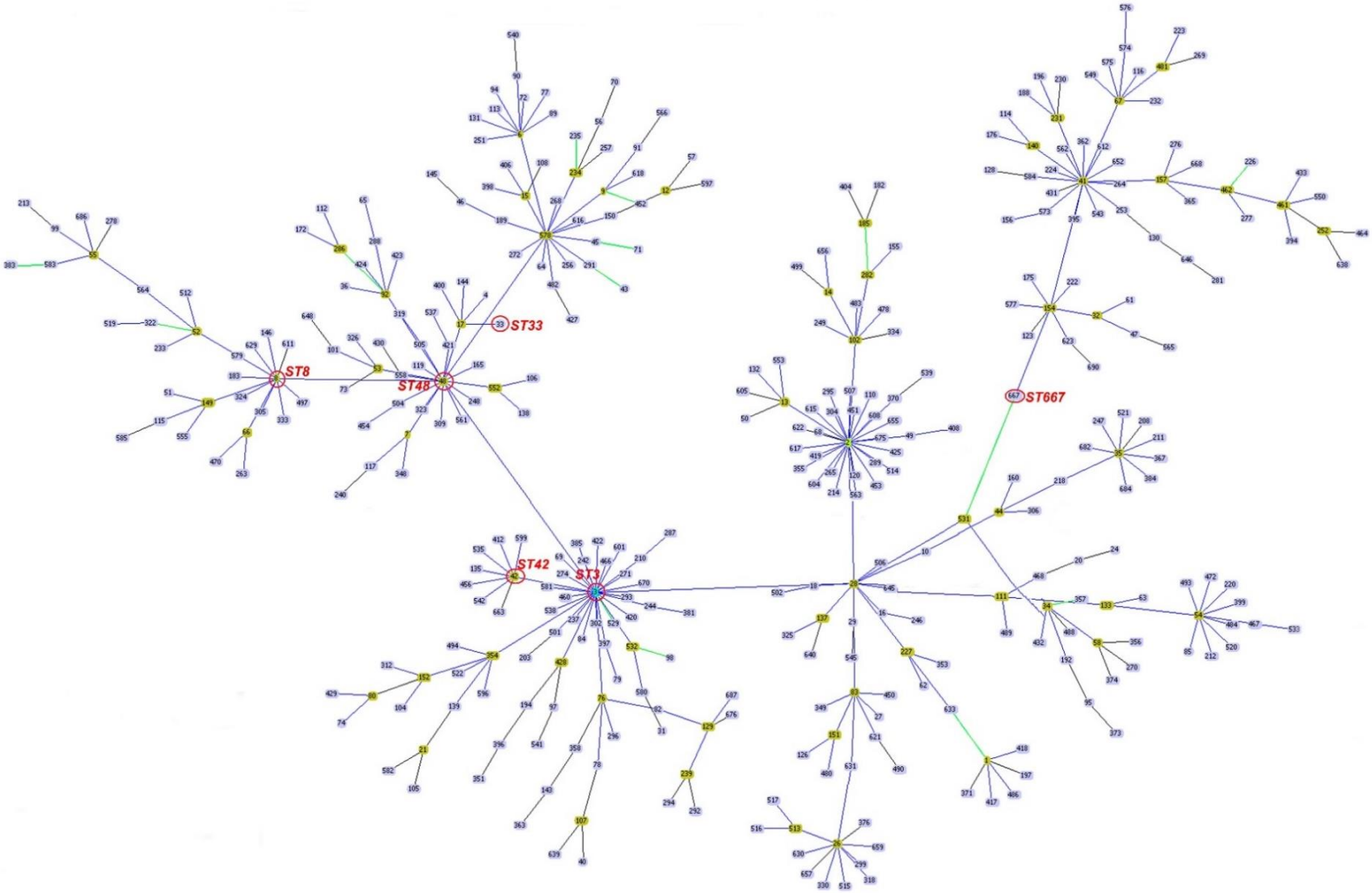


	Collection Date (year-month)	ST	Clonal Complex	Severity of CDI	toxin genes			resistance genes						
					toxA	*toxB*	*cdt*	*ant(6)-Ia*	*erm(B)*	*erm(G)*	*lnu(C)*	*msr(D)*	*mef(A)*	*tet(W)*
HC132	2019-02	ST669	singleton	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
HU74	2019-02	ST666	singleton	Mild to moderate	-	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
HC129	2019-02	ST5	CC4	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC20	2018-05	ST5	CC4	Severe	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC45	2018-07	ST5	CC4	Severe	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HU58	2018-11	ST667	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC118	2019-01	ST668	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC208	2019-06	ST463	singleton	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
HC68	2018-10	ST554	singleton	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC31A	2018-05	ST33	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC66	2018-09	ST4	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	*cdt*	-	-	-	-	-	-	-
HC204	2019-07	ST15	CC1	Mild to moderate	-	*toxB*	-	*ant(6)-Ia*	*erm(B)*	-	-	-	-	-
HC71	2018-10	ST103	CC10	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
OC108	2019-01	ST103	CC10	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
AM180355														
OC96	2019-01	ST48	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	-	-	-	*erm(G)*	-	*msr(D)*	*mef(A)*	-
HC139	2019-03	ST14	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
OC101	2019-01	ST2	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	*mef(A)*	-
HC115	2019-01	ST149	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	*ant(6)-Ia*	*erm(B)*	-	*lnu(C)*	-	-	-
HC22	2018-05	ST8	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
HC172	2019-04	ST42	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	*ant(6)-Ia*	-	-	-	-	*mef(A)*	*tet(W)*
HC89	2018-12	ST42	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	-	-	-	-	-	-
HC48	2018-07	ST42	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	-	-
HC51	2018-07	ST42	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	-	-
HC142	2019-03	ST42	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	-	-
OC110	2019-03	ST42	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	*mef(A)*	-
HC191	2019-05	ST42	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	*mef(A)*	-
HC131	2019-02	ST42	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	*mef(A)*	-
HC164	2019-03	ST42	CC1	Mild to moderate	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	*mef(A)*	-
HC11A	2018-04	ST42	CC1	Severe	*toxA*	*toxB*	-	-	*erm(B)*	-	-	-	*mef(A)*	-

HC: strain from Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; HU: strain from Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza; OC: strain from Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo.

*Resistance Genes: *ant (6) -la*: aminoglycoside nucleotidyltransferase. *erm(B):* erythromycin ribosomal methylases of class B; *erm(G):* rRNA adenine N-6-methyltransferase; *msr(D):* macrolide resistance; *mef(A):* macrolide efflux A domain protein; *lnu(C):* lincosamide nucleotidyltransferase; *tet(W):* tetracycline resistance protein

Figure 3. eBURST analysis of *Clostridium difficile* STs using MLST database of June 2020.



Pontos importantes do manuscrito

A maioria (68%) dos pacientes com CD apresentou doença leve a moderada. A mortalidade geral dos pacientes com DACD foi de 19%, no entanto, nenhum óbito foi atribuído a esse agente. O metronidazol oral foi usado como terapia de primeira linha em 74% dos pacientes e a vancomicina oral em apenas 15%. Dentre os pacientes com doença leva a moderada, 78% usaram metronidazol oral, com 79% de sucesso. Recidiva foi observada em 14% desses pacientes. Dentre os pacientes com DACD grave, 65% foram tratados com metronidazol oral, com 91% de resposta clínica e 20% de recidiva.

A análise univariada identificou como fatores preditores para DACD: uso prévio de ceftriaxona (RR, 2,07; 95% IC,1,14-3,78, p=0,015), de meropenem (RR, 3,41; 95%IC, 1,83-6,35, p<0,001), início da diarreia antes da internação (RR, 4,38; 95% IC, 1,69-11,2, p=0,004), mediana de 5 evacuações ao dia (p=0.036) e presença de muco nas fezes (RR, 3,09; 95%IC, 1,41-6,78, p=0,003). A análise multivariada identificou como fatores independentes para DACD: uso prévio de meropenem (OR, 4,09, 95%IC, 2,09-7,09, p<0,001), presença de muco nas fezes (OR, 3,2; 95% IC, 1,40-7,72, p=0,006) e desvio a esquerda com > 20% de bastões (OR, 3,77; 95% IC, 1,28-11,12, p=0,016)

Diarreia por *C. difficile* foi menos frequente em pacientes infectados pelo vírus HIV/AIDS (RR, 0,14; 95% IC, 0,01-1,04, p=0,026) e naqueles com doença pulmonar (RR, 1,12; 95% IC, 0,01-0,95, p=0,019) que foram fatores de proteção significativos para diarreia por CD.

Trinta e cinco cepas de CD foram obtidas por meio de cultura e confirmadas por MALDI-TOF. Todas foram sensíveis ao metronidazol, vancomicina, levofloxacina, moxifloxacina, teicoplanina e azitromicina e resistentes à ciprofloxacina, usando tanto o disco difusão como o ETEST

O sequenciamento do genoma foi realizado em 29 cepas de CD. Na primeira análise, descrita na publicação anterior, encontramos 18 ST distintos, sendo o ST42 o mais prevalente. Após novas análises, mais profundas, identificamos que a cepa HC51, inicialmente identificada como ST3, na verdade pertence ao ST42, o que se justifica pelo fato desses STs,

ST3 e ST42, serem muito próximos, com apenas um alelo de diferença entre eles.

Após nova rodada, foram identificados 17 ST distintos, sendo 6 desses (35%) novos: ST463, ST554, ST666, ST667, ST668 and ST669 (GenBank accession number PRJNA598327). O ST mais encontrado foi o ST42 (n= 10, 59%), ST5 (n =3, 18%) e ST103 (n=2, 12%). As cepas hipervirulentas clássicas ST1/RT027 e ST11/RT078 continuaram sem ser identificadas.

A árvore filogenética SNP mostrou que nossas cepas pertencem a 3 complexos clonais (CC1, CC4 e CC10) e que os quatro novos STs (ST669, ST666, ST463 e ST554) são *singletons*. O ST42 e ST5 foram os mais encontrados entre os casos graves de DACD.

Os genes de resistência mais identificados foram: *erm (B*), *mef (A)* e *ant (6)-la* . O gene *erm (B)* foi o mais frequentemente encontrado em cepas do ST42 em comparação com outros STs (OR19.0 IC 2.7-145,6; p = 0,004). Não houve associação entre o uso prévio de lincosamidas e ST42. Alguns das cepas possuiam uma substituição de aminoácidos nos genes *GyrA* e *GyrB,* associados *a* resistência a fluoroquinolona.

Tabela 4. Pontos de corte utilizados na categorização de sensibilidade de 35 cepas de *C. difficile* com os respectivos halos de inibição de crescimento pelo método disco difusão (mm)

Número	Metronidazol	Resultado** (S >= 33mm)	Cipro	Vanco	Resultado (S >= 22mm)	Teico	Levo	Moxi	Resultado (S >=18mm)	Azitro
HC11	>60	S	15	30	S	22	19	24	S	**0**
HC 20C	42	S	0	27	S	20	18	25	S	27
HC22	52	S	**0**	30	S	23	14	24	S	21
HC31A	58	S	**0**	30	S	25	15	24	S	28
HC 45C	55	S	15	28	S	24	15	23	S	25
HC48	>60	S	**0**	40	S	23	14	20	S	**0**
HC51	>60	S	**0**	40	S	25	20	20	S	**0**
HC52	56	S	**0**	30	S	25	19	23	S	**0**
HC58	>60	S	**0**	40	S	25	17	23	S	**0**
HC59	>60	S	**0**	40	S	25	16	24	S	24
HC60	>60	S	**0**	40	S	30	20	29	S	**0**
HC66	>60	S	**0**	39	S	23	15	22	S	20
HC68	55	S	**0**	30	S	24	14	20	S	24
HC71	60	S	**0**	30	S	25	15	22	S	23
HC 89	50	S	0	30	S	20	19	24	S	25
OC 96A	48	S	14	28	S	24	17	23	S	0
OC 96B	49	S	15	28	S	20	21	28	S	0
OC 101	40	S	0	26	S	20	17	23	S	16
OC 108	50	S	10	28	S	23	0	15	R	30
HC 109A	55	S	17	31	S	23	20	28	S	0
HC 109B	46	S	17	29	S	25	20	27	S	0
OC 110A	44	S	14	25	S	24	16	26	S	0
OC 110B	48	S	15	28	S	24	19	27	S	0
HC 115	42	S	12	31	S	22	19	26	S	0
HC 118CD	62	S	15	28	S	24	16	22	S	24
HC 129	65	S	14	29	S	22	15	26	S	29
HC 131	42	S	0	29	S	20	0	12	R	0
HC 139P	60	S	18	35	S	26	15	25	S	35
HC 142P	65	S	12	26	S	21	16	24	S	0
SJ06	>60	S	**0**	40	S	29	5*	25	S	25
SJ13A	>60	S	**0**	>40	S	30	18	29	S	**0**
SJ15A	>60	S	**0**	>40	S	27	13	25	S	**0**
HU 39	46	S	15	26	S	24	22	30	S	27
HU 41	52	S	15	28	S	22	20	26	S	24
HU 45	48	S	17	24	S	22	20	27	S	24

Cipro: ciprofloxacina; vanco: vancomicina; teico: teicoplanina, levo: levofloxacina; Moxi: moxifloxacina; azitro: azitromicina

5 DISCUSSÃO

Até o presente momento, este é o maior estudo prospectivo multicêntrico que aborda a epidemiologia, aspectos clínicos e moleculares da DACD no Brasil. A maioria dos dados publicados sobre o tema é proveniente de sries retrospectivas, em um único centro, com número pequeno de pacientes. Os poucos estudos multicêntricos nacionais sobre DACD publicados são no formato de prevalência pontual *(point prevalence*), sem seguimento ou evolução clínica dos pacientes.

O nosso estudo fornece uma visão mais abrangente da DACD em hospitais brasileiros de diversas regiões do país. No entanto, vale ressaltar que ele se baseia em uma amostra de conveniência dos hospitais envolvidos, que durante um ano concordaram voluntariamente em contribuir para a vigilância da DACD. Portanto não é representativo da real prevalência da doença em nosso país.

Nossos resultados mostram que 15% das amostras de fezes diarreicas de pacientes internados foram positivas para CD toxigênico, semelhante a outras publicações nacionais. Em 2019, um estudo de prevalência pontual realizado em três estados brasileiros, que avaliou 153 pacientes internados com diarreia, encontrou uma positividade de 12% de CD [27]. Outros estudos nacionais relataram prevalência mais elevadas, variando de 32% em pacientes em um hospital em Minas Gerais [98] a 48% em um hospital oncológico de Fortaleza[33]. Ambas as publicações incluíram um número pequeno de pacientes, [110, 48] respectivamente, o que dificulta a extrapolação desses dados. A maior casuística nacional até então publicada foi a de Spadão et al, que avaliou 439 pacientes onco-hematológicos e TCTH de um hospital em São Paulo, com uma positividade de DACD de 14,6%[32], identificada apenas através de teste de toxina, sem uso de método molecular. No entanto, maioria dos estudos de prevalência de DACD publicados apresenta divergências metodológicas, com diferenças nas definições de DACD e nos testes diagnósticos utilizados, dificultando análise dos dados.

Um aspecto importante do nosso estudo foi o fato de termos utilizado quatro metodologias distintas para diagnóstico de CD. Todas as amostras foram testadas simultaneamente para detecção de GDH, toxinas A/B, NAAT e enviadas para cultura. São raras as publicações que utilizam essa estratégia de múltiplos

testes, o que nos possibilitou aumentamos a acurácia do diagnóstico nos nossos pacientes.

Na nossa casuística, adotamos como definição de DACD a presença de diarreia, com pelo menos três evacuações de fezes não formadas em 24h, com a detecção de toxina A/B nas fezes ou genes de CD produtores de toxina. Tudo isso baseado nas diretrizes atuais e em publicações recentes[46], que recomendam o uso de NAAT isolado ou em combinação com GDH ou GDH mais toxina, além da detecção de toxinas nas A/B para diagnóstico de DACD. No entanto, entendemos as limitações desses métodos e os riscos do diagnostico em excesso, principalmente quando usamos apenas o NAAT isolado, mesmo selecionando apenas pacientes com diarreia documentada.

No nosso estudo, tentamos analisar achados clínicos ou laboratoriais que fossem preditores de infecção por CD em pacientes internados com diarreia. Os fatores de risco tradicionais para DACD são: idade avançada, exposição a antibióticos, hospitalização recente e presença de comorbidades [99]. Apesar da idade acima de 65 anos ser descrita como fator de risco importante para DACD e para o desenvolvimento de formas graves, não encontramos esse achado na nossa casuística. A mediana de idade dos nossos pacientes com DACD foi de 61 anos, sem diferença significativa quando comparada ao grupo sem CD. Mesmo após estratificação por faixa etária, não observamos risco aumentado de DACD nos mais idosos, pela análise multivariada.

Uma metanálise, que incluiu 17 revisões sistemáticas, identificou o uso prévio de antibióticos, inibidores da bomba de prótons, antagonistas dos receptores da histamina e doença renal crônica como fatores de risco para DACD [100]. Em nosso estudo, o uso prévio de meropenem foi fator de risco significativo para DACD. Esse achado foi interessante, visto que a maioria dos estudos sobre o tema relaciona a clindamicina e as cefalosporinas como principais antibióticos associados a DACD. No entanto, nossos dados são semelhantes ao relatados por Cançado et al, que também encontraram o uso prévio de carbapenêmicos como fator de risco para DACD [98]. De forma semelhante à nossa, esses autores também encontraram um consumo elevado de carbapenêmico, o que pode refletir maior gravidade nos pacientes estudados além de altas taxas de multirresistência bacteriana, conforme relatos prévios em

hospitais brasileiros[101]. Dentre os nossos pacientes com DACD, o meropenem foi o segundo antibiótico mais usado, correspondendo a 42% dos casos. Uma alta taxa de uso de carbapenêmicos também foi relatada em uma publicação recente que avaliou uso de antimicrobianos em hospitais brasileiros, e constatou que meropenem foi o segundo antibiótico mais frequentemente prescrito, após ceftriaxona [102].

O uso de inibidores da bomba de prótons não foi um fator de risco independente para DACD em nosso estudo. Embora alguns autores sugiram que a supressão do ácido gástrico exerça papel importante no desenvolvimento de infecção por CD, este assunto permanece controverso, uma vez que algumas metanálises demonstraram resultados conflitantes a esse respeito[103]

Na nossa casuística, identificamos que o uso de probióticos reduziu o risco de DACD na análise bivariada, no entanto tal achado não foi confirmado na análise multivariável. Existem dados conflitantes sobre o papel dos probióticos para a prevenção de infecção por CD. Alguns autores demonstraram que o uso de probióticos pode reduzir a incidência de DACD em populações de alto risco, embora outros ensaios clínicos mostrem resultados diferentes [104,105].

A presença de muco nas fezes e leucocitose com desvio a esquerda, com> 20% de bastões, foram preditores de DACD na nossa casuística, o que não vem sendo descrito por outros autores. Esses achados podem ser úteis para predizer a chance CD em paciente internados que apresentam diarreia para diferenciar entre aqueles pacientes com DACD de outras patologias.

Surpreendentemente, nossos dados mostram uma baixa prevalência de diarreia por CD em pacientes com HIV, o que contrasta com o relato de outros autores, que demonstraram que a infecção pelo HIV é um fator de risco para DACD[106]. Esses defendem a hipótese de que a supressão imunológica relacionada ao HIV pode ser um fator de risco para infecção por CD. No entanto, a epidemiologia do CD em pacientes infectados pelo HIV tem sido pouco estudada, com poucos dados publicados.

Um achado muito importante do nosso estudo foi o uso do metronidazol oral para tratamento da maioria dos pacientes com DACD, com altas taxas de cura, principalmente nos casos leves a moderados. Neste grupo, 78% dos pacientes receberam metronidazol com quase 80% de sucesso e apenas 14%

de recidiva. Outro dado significativo da nossa casuística foi o baixo uso da vancomicina oral para tratamento de casos graves de DACD, observado em apenas 18%. Nesses pacientes, também observamos um uso predominante de metronidazol oral (65%), com 91% de sucesso.

Tais achados podem ser justificados por vários fatores, dentre eles: a grande proporção (68%) de casos não graves de DACD na nossa população estudada, assim como a ausência de cepas hiper virulentas no nosso meio. Outro fator importante é a ausência da formulação oral, comercialmente disponível, de vancomicina no Brasil, assim como a não disponibilidade da fidaxomicina no mercado nacional, o que certamente favorecem o uso preferencial do metronidazol oral para tratamento de DACD. Somado a isso tudo, ainda identificamos a ausência de diretrizes nacionais para tratamento de DACD, o que leva a cada hospital a seguir seus próprios protocolos. No entanto, resultados semelhantes aos nossos já foram relatadas por alguns autores, que também identificaram um uso predominante de metronidazol para casos graves de DACD, com boa resposta [107,108].

O tratamento ideal para casos leves a moderados de DACD ainda é motivo de controvérsias. Apesar de algumas sociedades internacionais recomendarem a vancomicina oral apara todos os casos de DADC, os dados que embasam essa diretriz são conflitantes. Como evidenciado em nosso estudo, alguns autores também não encontraram diferença na eficácia da vancomicina e metronidazol, para casos não- graves da doença, no que diz respeito a cura clínica, recorrência e mortalidade [71].

Duas metanálises publicadas em 2015 [109,110] e uma mais recente, de 2018[111], também encontraram taxas de cura semelhantes entre metronidazol e vancomicina oral para DACD leve a moderada, sem benefício significativo na mortalidade com nenhum dos dois antimicrobianos. No entanto, o número de estudos que compara os desfechos clínicos nessa população específica de pacientes ainda é limitado. Diante desses resultados e levando-se em conta o menor custo do metronidazol e, teoricamente, seu menor potencial de seleção de *Enterococcus* sp resistente a vancocimicina (VRE), outras sociedades, incluindo o ESCMID, continuam recomendando o metronidazol como terapia de escolha para episódio inicial de DACD leve a moderada[48]. A baixa proporção de

casos graves e a ausência de mortalidade atribuída ao CDI em nosso estudo corroboram e fortalecem a manutenção do metronidazol oral como terapia de primeira linha para casos não graves de DACD nos hospitais brasileiros.

No Brasil, poucos estudos avaliaram a sensibilidade do *C. difficile* aos antimicrobianos e todos demostraram altas taxas de sensibilidade ao metronidazol[74]. No presente estudo, todas as cepas analisadas foram sensíveis ao metronidazol e vancomicina. Este achado está de acordo com uma revisão sistemática recente, que analisa 111 publicações de vários continentes, cujos resultados demonstram que a resistência do CD a metronidazol e à vancomicina ainda é rara[112].

Os testes de sensibilidade antimicrobiana "padrão-ouro" recomendados *C. difficile* são aqueles que detectam o valor da CIM, através do método E-test ou ágar-diluição. Não existem pontos de corte definidos pelo CLSI ou EUCAST para identificar a sensibilidade do CD aos antibióticos pelo método disco-difusão. Poucos estudos avaliaram a acurácia do disco-difusão nessa situação, e sua inter-relação com o E-test. E, semelhante aos nossos resultados, alguns autores encontraram altas taxas de concordância entre esses dois métodos para alguns antimicrobianos usados para tratamento de DACD, como metronidazol, vancomicina e ciprofloxacina [113,114]. Dessa forma, o disco-difusão pode ser uma opção mais atrativa diante do baixo custo.

As fluoroquinolonas não são medicamentos usados para o tratamento de CD, mas o achado de cepas resistentes está associado ao surgimento de isolados hipervirulentos, como BI/ NAP1/ 027115 A resistência às fluoroquinolonas é mediada pela presença de mutações cromossômicas nos genes GyrA e GyrB [116]. Nossos dados mostraram que todos os isolados eram resistentes a ciprofloxacina. No entanto, genes de resistência clinicamente importantes, associado a fluoroquinolonas, como o *GyrA: T82I, GyrB: I139R, GyrB: V130I, GyrB: S366A e GyrB:S416A* foram detectados apenas em algumas cepas em nosso estudo, com nenhuma associação com casos graves de DACD. Além disso, a os genes de resistência mais encontrados em nossas amostras foram: *erm(B), mef(A) e ant (6) -Ia.* No CD, esses genes conferem resistência a macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas B e aminoglicosídeos, respectivamente.

Genes que conferem resistência ao metronidazol e vancomicina, com importância clínica, como o *NimB* e a família *Van* não foram detectados em nossas cepas. Dentre os cinco ST novos que isolamos em nosso estudo, nenhum deles carreava genes de resistência. Além disso, os genes *emrB* e *mefA* genes foram encontrados em 50% das cepas de CD de casos graves e as cepas com ST42 continham, significativamente, mais genes emrB em comparação com os outros ST. O gene *emrB* confere resistência aos macrolídeos, mediados pela rRNA metilase que modifica o RNA ribossômico 23S, assim como aos confere resistência às lincosamidas.

Embora não tenhamos encontrado associação entre o uso prévio de macrolídeos e a ocorrência de cepas com ST42 em nossos pacientes, essa é uma classe de antibióticos frequentemente utilizado no Brasil, tanto na comunidade como em ambiente hospitalar. Essa característica talvez explique a predominância dessa linhagem, de CD pertencentes ao ST42, no nosso país.

Outro aspecto-chave do nosso estudo foi a avaliação molecular das cepas de CD circulantes no nosso país. O sequenciamento do genoma foi realizado em 29 cepas de CD. Na primeira análise, descrita na primeira publicação, foram encontrados 18 ST distintos. Após novas análises, mais detalhadas, identificamos que a cepa HC51, inicialmente identificada como ST3, na verdade pertence ao ST42, o que se justifica pelo fato desses STs, ST3 e ST42, serem muito próximos, com apenas um alelo de diferença entre eles. Na figura em anexo (análise do eBURST) vemos que o ST42 se origina do ST3, então são realmente muito próximos e com pouquíssimas diferenças entre si. Ressaltamos que existem dificuldades nas análises de sequenciamento, que por vezes acabam sendo subjetivas e variam muito de acordo as bases de dados utilizadas e os programas de montagem.

Após nova análise, foram identificados 17 ST distintos, sendo 6 desses (35%) novos: ST463, ST554, ST666, ST667, ST668 and ST669 (GenBank accession number PRJNA598327). O ST mais encontrado foi o ST42 (n= 10, 59%), ST5 (n =3, 18%) e ST103 (n=2, 12%). As cepas hipervirulentas clássicas ST1/RT027 e ST11/RT078 continuaram sem ser identificadas.

Os 17 STs encontrados na nossa casuística revelaram uma alta diversidade genética desse agente, com predomínio de cepas pertencentes ao

ST42 (59%), ST5 (18%) e ST103 (12%). Isso corrobora achados de outros estudos nacionais, que também encontraram ST42/RT106 como o ST mais prevalente em hospitais brasileiros98. Cepas do CD pertencentes ao ST42 também são endêmicos na Colômbia, e vários outros países como EUA e China [117,118,119,120]. ST5 é um dos os STs mais prevalentes descritos na Europa causando CDI também relatado na China [121,122]

As cepas hipervirulentas ST1/RT027 e ST11/RT078 não foram identificadas nos nossos pacientes, assim como na maioria das publicações nacionais [28]. Até o momento, a cepa ST1/RT 027 foi relatado apenas em dois pacientes de um hospital na região sul do Brasil, um dos quais foi classificado como ST67[35]. No entanto, Costa et al. descreveram uma cepa pertencente ao clado 2, em hospital no Ceará, e a classificaram como um novo ST41/ R821, que é filogeneticamente relacionada à cepa NAP1 / 027. Tais autores sugerem que outras possíveis cepas hipervirulentas já estão circulando no Brasil [48].

Na nossa casuística encontramos seis novos STs, ainda não descritos: ST463, ST554, ST666, ST667, ST668 e ST669. Foram realizadas análises eBURST das cepas de CD usando todos os STs disponíveis no banco de dados MLST, para avaliar a sua evolução e diversidade genética. Comparamos todos os STs com o MLSTs presentes no banco de dados PubMLST para verificar o complexo clonal de cada isolado. Nossas cepas pertencem a 3 complexos clonais (CC1, CC4 e CC10) e os quatro novos STs (ST669, ST666, ST463 e ST554) são *singletons.*

Os casos graves de DACD da nossa amostra foram causados, prioritariamente, por cepas pertencentes ao ST5 e ST42 em São Paulo, Sudeste do Brasil. Além disso, em nosso estudo, os casos graves de DACD foram raros nos hospitais do Nordeste do país, sendo o único caso encontrado pertencente ao novo ST ST667. Encontramos novos STs que são singletons. O ST42 foi o ST mais encontrando, e abrigava significativamente mais genes *erm(B),* relacionado a à resistência a macrolídeos. O ST42, que Nenhum dos nossos casos de DACD grave foram relacionados ao ST *singletons.*

Nosso estudo possui várias limitações. Primeiro, nossa amostra foi relativamente pequena e limitada a hospitais terciários, universitários, o que não a torna tão representativa da realidade nacional, com dificuldade de

extrapolarmos esses dados para o restante do país. Além disso, não foi possível calcularmos a real prevalência da DACD em pacientes internados, visto que não fomos capazes de analisar as fezes de todos os pacientes que apresentavam diarreia nesses hospitais. Isso ocorreu por dificuldades na coleta e reprocessamento de algumas amostras, que infelizmente não entraram no estudo.

Outro aspecto negativo foi a impossibilidade de encaminharmos todas as cepas de CD coletadas para caracterização fenotípica e molecular em São Paulo, em especial aquelas oriundas de outras cidades. Com isso, não conseguimos realizar análise em quantidade maior de cepas de CD, das várias regiões do país. No entanto, devido à falta de dados de vigilância nacional sobre DACD, nossos resultados podem fornecer informações úteis sobre epidemiologia local e ajudar na elaboração de protocolos de tratamento e prevenção dessa importante patologia.

6 CONCLUSÕES

Diante dos pontos expostos acima, concluímos:

1. No primeiro estudo, encontramos um percentual de 15% de CD em pacientes internados com diarreia, com ampla variação, de 0 a 37% entre os hospitais de diferentes regiões do país;

2. Identificamos grande diversidade genética nas cepas de CD, com predomínio do ST42, ST5 e S103, e isolamento de novos STs (ST554, ST666, ST667, ST668 e ST669);

3. No segundo estudo, identificamos que o uso prévio de meropenem, presença de muco nas fezes e leucocitose com mais de 20% de bastões, foram fatores preditores de *C. difficile*;

4. Metronidazol oral foi o tratamento de escolha em 74% dos pacientes e a vancomicina oral em apenas 15%. Dentre os pacientes com doença leve a moderada, 78% usaram metronidazol oral, com 79% de sucesso e 14% de recidiva. Essa droga parece ser opção apropriada para doença leve a moderada no nosso meio;

5. A mortalidade geral dos pacientes com DACD foi de 19%, e nenhum óbito foi atribuído ao CD. Quadros graves foram causados pelos STs: ST42, ST5, ST8, ST48, ST33 e novo ST667. O gene *ermB* foi mais frequentemente encontrado em isolados de ST42

7 ANEXOS

ANEXO A- Pareceres dos Comitês de Ética em Pesquisas dos Centros participantes do estudo

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros.

Pesquisador: silvia figueiredo costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62288516.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.025.392

Apresentação do Projeto:

Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de estudo com objetivo de avaliar a prevalência de C. difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não apresenta risco para os pacientes. Serão analisados dados clínicos e laboratoriais e amostras de fezes que já são coletadas na rotina do atendimento dos pacientes.

Benefícios:

Espera-se com este projeto: • Produzir conhecimento científico relativo à epidemiologia da diarreia por CD em hospitais de diversas regiões do Brasil;• Utilizar esse conhecimento para tomada de decisões e elaboração de estratégias de prevenção e controle da infecção por CD, o que pode reduzir a transmissão hospitalar desse patógeno, com redução da morbi-mortalidade associada;• Avaliar o perfil de sensibilidade das cepas brasileiras de CD aos principais antimicrobianos

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.025.292

utilizados na prática clínica, influenciando diretamente na escolha de tratamentos mais eficazes, com consequente melhora da resposta e a sobrevida dos pacientes, redução de tempo de internação e custos hospitalares;• Identificar os principais genótipos de CD circulantes no Brasil, avaliando a presença de cepas hipervirulentas descritas no resto do mundo;• Contribuir para a qualidade de atenção a pacientes com diarreia hospitalar nos hospitais brasileiros,otimizando o seu diagnostico, abordagem terapêutica e sobrevida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nenhuma.

Recomendações:

Sugerimos aprovação do estudo, pois o TCLE foi adaptado na forma de convite na linguagem do paciente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugerimos aprovação do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685930.pdf	23/03/2017 14:15:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	23/03/2017 14:14:54	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Parecer_DMIP.doc	24/10/2016	silvia figueiredo	Aceito

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.035.382

Outros	Parecer_DMIP.doc	11:48:48	costa	Aceito
Outros	Cadastro_Clostridium.pdf	24/10/2016 11:48:06	silvia figueiredo costa	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_Clostridium.pdf	24/10/2016 11:47:14	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_clostridium.doc	30/05/2016 23:39:31	silvia figueiredo costa	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	30/05/2016 23:35:32	silvia figueiredo costa	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 20 de Abril de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ / SECRETARIA DE SAÚDE DE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros.

Pesquisador: silvia figueiredo costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 62288616.5.3004.5044

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.144.350

Apresentação do Projeto:

O aumento da incidência, gravidade e mortalidades associadas ao Clostidium difficile tem sido verificado devido à presença de cepas mais virulentas e o uso de testes múltiplos em populações de risco, como imunodeprimidos, idosos, e pacientes de longa permanência nos leitos. O estudo a ser desenvolvido é do tipo transversal com abordagem descritiva e analítica. Os pacientes suspeitos responderão a um questionário e disponibilizará amostra fecal para análise laboratorial através de vários métodos. Variáveis clínicas e demográficas serão obtidas dos prontuários. Estima-se a avaliação de 300 indivíduos dentre as cinco instituições coparticipantes do estudo. Os dados serão tratados estatisticamente através de programa estatístico.

Objetivo da Pesquisa:

A principal finalidade do estudo é determinar a prevalência de Clostidium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros. Também descrever o perfil de sensibilidade e antimicrobianos, realizar a caracterização molecular de cepas isoladas e avaliar a resposta terapêutica e a evolução clínica dos pacientes com diarreia devido ao Clostidium difficile.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco aos participantes do estudo, uma vez que as informações requeridas serão coletadas dos prontuários, entrevistas dos pacientes e amostras de fezes. A contribuição do

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia **CEP:** 60.455-610
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 **Fax:** (85)3101-2319 **E-mail:** melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ / SECRETARIA DE SAÚDE DE

Continuação do Parecer: 2.144.350

trabalho dar-se-á pelo conhecimento de dados epidemiológicos da diarreia por Clostidium difficile em hospitais de diversas regiões do Brasil, visando contribuir para a qualidade de atenção ao paciente otimizando seu diagnóstico, abordagem terapêutica e sobrevida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O uso de múltiplos testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção é recomendado para melhor evidencia da doença. O estudo prevê a utilização de teste rápido molecular para detecção de cepas produtoras de toxina B, toxina binária e com deleção do gene tcdC. Também a identificação bacteriana por meio de cultura, testes de sensibilidade aos antimicrobianos, extrações de DNA, detecções dos genes das toxinas, das toxinas e tipificações por PFGE. Algumas amostras serão submetidas ao sequenciamento total do genoma para identificação da virulência e genes de resistência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O referido projeto apresentou todos os termos e compromissos necessários para aprovação e viabilidade ética.

Recomendações:

Definido corretamente o fluxograma desde a coleta da amostra ate seu envio para a USP.

Conversado com a direção geral Dra Tania Mara Coelho que aprovou a utilização do aparelho de Genexpert doado pelo Ministerio da Saude para processamento das amostras de C. difficile.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José ANALISOU e APROVOU SEM PENDÊNCIAS.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685930.pdf	23/03/2017 14:15:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	23/03/2017 14:14:54	silvia figueiredo costa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685930.pdf	22/03/2017 10:59:17		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685930.pdf	03/03/2017 10:59:36		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	08/02/2017		Aceito

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia **CEP:** 60.455-610
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 **Fax:** (85)3101-2319 **E-mail:** melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ / SECRETARIA DE SAÚDE DE

Continuação do Parecer: 2.144.350

Básicas do Projeto	ETO_685930.pdf	09:57:03		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685930.pdf	22/11/2016 13:16:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEClostriNov2016.docx	22/11/2016 13:15:55	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Parecer_DMIP.doc	24/10/2016 11:48:48	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Cadastro_Clostridium.pdf	24/10/2016 11:48:06	silvia figueiredo costa	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_Clostridium.pdf	24/10/2016 11:47:14	silvia figueiredo costa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685930.pdf	12/07/2016 14:46:53		Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_Clostridium.pdf	12/07/2016 14:39:58	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_clostridium.doc	30/05/2016 23:39:31	silvia figueiredo costa	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	30/05/2016 23:35:32	silvia figueiredo costa	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

FORTALEZA, 28 de Junho de 2017

Assinado por:
Melissa Soares Medeiros
(Coordenador)

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia **CEP:** 60.455-610
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 **Fax:** (85)3101-2319 **E-mail:** melmedeiros@hotmail.com

UFC - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros

Pesquisador: EVELYNE SANTANA GIRAO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69981317.8.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.217.633

Apresentação do Projeto:

Projeto da pesquisadora Evelyne Girão coordenada pela prof.a.Silvia Figueiredo FMUSP. Cronograma: maio/16 a abril/2019. Orçamento: R$ 16.947,00 (financiamento próprio- LIM USP). O Clostridium difficile (CD) é o principal agente causador de diarreia hospitalar no mundo. Não dispomos, na atualidade, de dados e de meios adequados para diagnóstico dessa infecção no Brasil. O presente estudo tem como objetivo avaliar a prevalência de diarreia por CD em pacientes internados em hospitais brasileiros, além de analisar aspectos clínicos e biológicos dessas cepas causadoras dessa infecção. Trata-se de estudo de prevalência, multicêntrico. Serão incluídos pacientes internados em hospitais terciários de diversas regiões do país que desenvolverem diarreia durante a internação, no período de 12 meses. Os pacientes serão identificados clinicamente e terão suas amostras de fezes coletadas para avaliar a presença de CD. Essas amostras serão submetidas ao teste rápido molecular Xpert® C. difficile (Cepheid) para detecção das cepas de CD produtores de toxina B, toxina binária e com deleção do gene tcdC. Em seguida as amostras serão encaminhadas para identificação bacteriana por meio de cultura nos respectivos laboratórios de bacteriologia das instituições participantes. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos, extrações de DNA, detecções dos genes das toxinas, detecções das toxinas e tipificações por PFGE ("pulsed field gel eletrophoresis") também serão realizados. Espera-se com

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8013 **Fax:** (85)3281-4561 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

este projeto conhecer a epidemiologia da diarreia por CD em nosso meio, identificar os principais genótipos de CD circulantes no país e avaliar a presença de cepas hipervirulentas, já descritas no resto do mundo. Tal conhecimento visa contribuir para elaboração de estratégias de prevenção e controle da infecção por CD. É também esperado que análise do perfil de sensibilidade do CD aos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica, possa auxiliar na escolha de terapêutica antimicrobiana. O estudo será desenvolvido no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em colaboração com a Lodon School of Hand Hygiene and tropical Medicine, UK. Serão incluídos pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em São Paulo-SP, no Hospital Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC) em Fortaleza-CE, no Hospital São José de Doenças Infecciosas e Parasitárias (HSJ) em Fortaleza -CE, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) em Curitiba-PR, e no Hospital Alemão Osvaldo Cruz (HAOC) em São Paulo- SP. É um estudo de prevalência onde serão avaliados todos pacientes que desenvolverem diarreia durante a internação hospitalar nos centros participantes, ao longo de 12 meses. Nesse período, os pacientes serão identificados clinicamente e terão suas amostras de fezes coletas para avaliar a presença de CD. Serão incluídos participantes com idade 18 anos, presença de diarreia definida como 3 ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 horas ou em menos horas consecutivas e presença de pelo menos um dos seguintes critérios: Diarreia de início após 48 horas do internamento hospitalar; Uso de antibióticos nos últimos 90 dias antes do início do quadro diarreico; Uso de imunossupressores, quimioterapia ou radioterapia nos últimos 30 dias antes do início do quadro diarreico; Internamento por mais de 48 horas no mesmo quarto ou espaço físico junto com outro paciente portador de diarreia por Clostridium difficile (paciente contactante de caso confirmado de CD) e com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Serão excluídos participantes com presença de Ileostomia, colostomia ou ressecção colônica maior do que a hemicolectomia; obstrução/ suboclusão intestinal; sangramento ou Hemorragia intestinal grave; qualquer condição médica que, na opinião do investigador, possa comprometer a capacidade do paciente de participar do estudo ou interferir na interpretação dos resultados. A coleta dos espécimes clínicos será realizada nos hospitais participantes, sendo as mesmas enviadas, inicialmente, para os laboratórios locais dos respectivos hospitais, onde serão submetidas ao teste rápido molecular Xpert® C. difficile (Cepheid) para detecção das cepas de CD produtores de toxina B, toxina binária e com deleção do gene tcdC.

Essas amostras também serão encaminhadas para identificação bacteriana por meio de cultura nos

respectivos laboratórios de bacteriologia das instituições participantes. No Laboratório de Bacteriologia LIM 54 da FMUSP também serão realizados testes de sensibilidade dessas cepas aos antimicrobianos, extrações de DNA, detecções dos genes das toxinas, detecções das toxinas e tipificações por PFGE ("pulsed field gel eletrophoresis") e sequenciamento total do genoma.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos Gerais: Avaliar a prevalência de diarreia por C. difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros

Objetivos Especificos:

- Descrever os aspectos clínicos das diarreias por C. difficile;
- Isolar, descrever o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, realizar a caraterização molecular de cepas de C. difficile isoladas desses pacientes e fazer um estudo comparativo da virulência dessas cepas isoladas.
- Avaliar a resposta terapêutica e a evolução clínica dos pacientes com diarreia por CD

Avaliação dos Riscos e Beneficios:

A pesquisadora descreve:

Riscos do projeto: Relacionados ao extravio de informações do prontuário, que serão minimizados devido a assinatura do termo de compromisso para utilização dos dados do prontuário.

Beneficios e Resultados esperados:

- Produzir conhecimento cientifico relativo à epidemiologia da diarreia por CD em hospitais de diversas regiões do Brasil;
- Utilizar esse conhecimento para tomada de decisões e elaboração de estratégias de prevenção e controle da infecção por CD, o que pode reduzir a transmissão hospitalar desse patógeno, com redução da morbi-mortalidade associada;
- Avaliar o perfil de sensibilidade das cepas brasileiras de CD aos principais antimicrobianos utilizados na prática clinica, influenciando diretamente na escolha de tratamentos mais eficazes, com consequente melhora da resposta e a sobrevida dos pacientes, redução de tempo de

UFC - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.217.633

internação e custos hospitalares;
- Identificar os principais genótipos de CD circulantes no Brasil, avaliando a presença de cepas hipervirulentas descritas no resto do mundo;

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou: TCLE, orçamento, cronograma, fiel depositário, currículo, concordância do chefe do serviço, termo de compromisso p utilização dos prontuários.

Recomendações:

Sem recomenmdações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo se encontra adequado, do ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deverá apresetar a este CEP/HUWC, relatórios parciais (semestrais) e final (após o término do estudo).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_942462.pdf	20/06/2017 10:10:26		Aceito
Outros	10_Termo_de_compromisso.pdf	20/06/2017 10:08:26	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Outros	09_Fiel_depositario.pdf	20/06/2017 10:08:11	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Cronograma	08_CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO_ATUAL.docx	20/06/2017 10:07:50	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	07_Concordancia.pdf	20/06/2017 10:07:17	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Outros	06_CV_Evelyne_Santana.pdf	20/06/2017 10:05:37	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Outros	05_Autorizacao_local_DraAirtes.pdf	20/06/2017 10:05:18	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Orçamento	04_ORCAMENTO.pdf	20/06/2017 10:04:58	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 **Fax:** (85)3261-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.317.633

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	03_TCLE.docx	20/06/2017 10:04:45	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02_projeto_clostridium_ATUAL_12_JUNHO_2017.doc	20/06/2017 10:04:30	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_assinada.pdf	20/06/2017 10:03:34	EVELYNE SANTANA GIRAO	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

FORTALEZA, 14 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 **Fax:** (85)3281-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO
CRUZ - SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros.

Pesquisador: silvia figueiredo costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 62288516.5.3006.0070

Instituição Proponente: HOSPITAL ALEMAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.018.988

Apresentação do Projeto:

Durante o período do estudo de 12 meses serão avaliados todos os pacientes que desenvolverem diarreia durante a internação. Os pacientes serão identificados clinicamente e

terão suas amostras de fezes coletadas para avaliação da presença de Clostridium difficile (Cepheid); em seguida as amostras serão encaminhadas para identificação bacteriana por cultura nos respectivos laboratórios de bacteriologia das instituições participantes. No Laboratório de Bacteriologia LIM54 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo também serão realizados testes de sensibilidade aos antimicrobianos, extrações de DNA, detecções dos genes das toxinas, detecções das toxinas, e tipificações por PFGE ("pulsed Field gel eletrophoresis").

Objetivo da Pesquisa:

1) a prevalência de diarreia por Clostridium difficile (CD) em hospitais brasileiros, 2) isolar, descrever o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, realizar a caracterização molecular de cepas de CD isolados desse pacientes, e fazer um estudo comparativo da virulência dessas cepas isoladas, e 3) avaliar a resposta terapêutica e a evolução clínica dos pacientes com diarreia por CD.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Endereço: Rua João Julião, 331
Bairro: Paraíso **CEP:** 01.323-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3549-0993 **Fax:** (11)3549-0992 **E-mail:** cep@haoc.com.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO CRUZ - SP

Continuação do Parecer: 3.018.988

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora envia a esse CEP uma emenda ao projeto "Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros", relatando a inclusão do Instituto do Câncer do Ceará, como mais um centro co-participante dessa pesquisa.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A carta enviada a esse CEP contempla as informações necessárias sobre a nova emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CartaEncaminhamentoCEP2018.pdf	20/09/2018 11:01:01	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	CV_Icaro_Boszczowski.pdf	27/11/2017 14:44:36	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Anuencia_Oswaldo_Cruz.pdf	27/11/2017 14:38:13	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_clostridium_ATUAL_NOV_2017.doc	27/11/2017 14:35:56	silvia figueiredo costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	23/03/2017 14:14:54	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Parecer_DMIP.doc	24/10/2016 11:48:48	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Cadastro_Clostridium.pdf	24/10/2016 11:48:06	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_clostridium.doc	30/05/2016 23:39:31	silvia figueiredo costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua João Julião, 331
Bairro: Paraíso **CEP:** 01.323-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3549-0863 **Fax:** (11)3549-0862 **E-mail:** cep@hacc.com.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO CRUZ - SP

Continuação do Parecer: 3.018.988

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 13 de Novembro de 2018

Assinado por:
Edmir Felix da Silva Junior
(Coordenador(a))

UFPR - HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -

CEP/HC/UFPR

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de diarréia por Clostridium difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros.

Pesquisador: silvia figueiredo costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 62288516.5.3003.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.480.851

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda para inclusão de um centro coparticipante. Refere-se ao estudo multicêntrico prospectivo observacional de prevalência, que será desenvolvido no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em colaboração com o Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a London School of Hand Hygiene and Tropical Medicine, UK. Serão incluídos pacientes internados em hospitais terciários de diversas regiões do país que desenvolverem diarreia durante a internação, no período de 12 meses.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

• Avaliar a prevalência de C. difficile em pacientes internados em hospitais brasileiros

Objetivo Secundário:

• Isolar, descrever o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, realizar a caracterização molecular de cepas de C. difficile isoladas desses pacientes e fazer um estudo comparativo da virulência dessas cepas isoladas.

• Avaliar a resposta terapêutica e a evolução clínica dos pacientes com diarreia por CD.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não apresentará risco para os pacientes. Serão analisados dados clínicos e laboratoriais e amostras de fezes que já são coletadas na rotina do atendimento dos pacientes.

Benefícios: Espera-se com este projeto: • Produzir conhecimento científico relativo à epidemiologia da diarreia por CD em hospitais de diversas regiões do Brasil;

• Utilizar esse conhecimento para tomada de decisões e elaboração de estratégias de prevenção e controle da infecção por CD, o que pode reduzir a transmissão hospitalar desse patógeno, com redução da morbimortalidade.

• Avaliar o perfil de sensibilidade das cepas brasileiras de CD aos principais antimicrobianos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda que tem por objetivo informar a inclusão de um novo centro co-participante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Emenda devidamente apresentada.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CEP/HC/UFPR

UFPR - HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -

PlataForma Brasil

Continuação do Parecer: 2.480.851

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CV_Icaro_Boszczowski.pdf	27/11/2017 14:44:36	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Anuencia_Oswaldo_Cruz.pdf	27/11/2017 14:38:13	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_clostridium_ATUAL_NOV_2017.doc	27/11/2017 14:35:56	silvia figueiredo costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	23/03/2017 14:14:54	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Parecer_DMIP.doc	24/10/2016 11:48:48	silvia figueiredo costa	Aceito
Outros	Cadastro_Clostridium.pdf	24/10/2016 11:48:06	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_clostridium.doc	30/05/2016 23:39:31	silvia figueiredo costa	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CURITIBA, 31 de Janeiro de 2018

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador)

Anexo B- Ficha de Coleta de dados do Estudo: "Avalição da prevalência de diarreia por *C. difficile* em pacientes internados em hospitais brasileiros"

No. Ficha_____ Data do preenchimento ____/____/____

Nome do Hospital: _____ Cidade: _____ Estado: ____

1. DADOS DO PACIENTE: **local de internação:** _____

Nome: _____ _____				**Nº prontuário**
Data Nascimento: ___/___/___	**Idade:**	**Sexo:** □ **masc** □ **fem**	**Telefone (s):**	**Email:**
Data da internação hospitalar: - ____/____/____				

Motivo da internação hospitalar	□Exacerbação da dç de base	□Infecção bacteriana	□Infecção viral	□Diabettes	□HIV/SIDA
	□D cardiovasc	□D neurológica	□D renal	□D hepática	□D Reumato
	□Politrauma	□D hematol	□D pulmonar	□Neoplasia	
	□Cirurgia eletiva: Tipo _____		□Cirurgia urgência: tipo_____		
	□HAS	□D cardiovasc	□D neurológica	□D renal	Diabettes
	□D hematol	□D pulmonar	□D endocrino	□D reumat	D hepática
	□Neoplasia: tipo _____		□HIV último CD4=_____ data: ___/____/___) Última Carga Viral_____ (data: ___/____/___)		
	□TCTH data: ___/____/___ □autólogo □halogênico		□outros: _____		
	□TOS: Data __/___/__		Tipo de TOS:		
			□rim	□coração	□pulmão	□intestino

			□fígado	□rim-fígado	□pâncreas	□rim-pâncreas
Internação hospitalar nos últimos 90 dias			□sim: data alta: ___/____/___		Não	
Cirurgia nos últimos 90 dias			□sim data: ___/____/___		□não	
Tipo de cirurgia	□ cardíaca	□TGI	□ neurológica		□ vascular	□otorrino
	□cabeca-pescoço	□urológica	□ginecológica		□ outra_____	
	□ortopédica	□ plástica				
Consulta médica (UBS, UPA, consultório) nos últimos 90 dias			□sim data__/__/__	□não		
Uso de antimicrobiano (ATM) nos últimos 90 dias □sim (data: ___/____/___ □ não			Nome ATM (s**)** _____ _____			
Uso atual de imunossupressores			□sim	□não		
Tipo de imunossupressor	□ prednisona: Dose _____		□ hidrocortisona: dose _____			
	□ azatioprina: Dose_____		□ methotrexate: dose_____			
	□tacrolimus: Dose _____		□everolimus: dose _____			
	□sirolimus: dose_____		□ ciclosporina: dose_____			
	□ micofenolato: Dose _____		□ outros: dose_____			
	□ Ac monoclonais: tipo _____dose: _____					
	□ Imunobiológicos: tipo: _____dose: _____					
Quimioterapia nos últimos 90 dias	□sim: data ___/___/___				□não	
Radioterapia nos últimos 90 dias			□sim: data ___/___/___		□não	
	Tipo de ATM:					

Uso atual de ATM (no início da diarreia) □**sim** □**não**	ATM 1	Data de início: ___/____/___	
	ATM 2	Data de início: ___/____/___	
	ATM 3	Data de início: ___/____/___	
	ATM 4	Data de início: ___/____/___	
Uso atual Dieta enteral		□sim	□não
Uso de inibidor de bomba próton últimos 90 dias		□sim	□não
Uso de laxante nome. _____		□sim	□não
Uso de próbióticos nome: _____		□sim	□não

2. DADOS CLÍNICOS

Data do início diarreia: (data: ___/____/___) (Definição de diarreia: 3 ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 h ou em menos horas consecutivas)		
Nº episódios de diarreia por dia: _____		
Presença de muco nas fezes	□sim	□não
Presença de sangue nas fezes	□sim	□não
Dor abdominal	□sim	□não
Dor à descompressão brusca	□sim	□não
Febre (definição: temp axilar> 37,8ºC	□sim (temp máx curso dç_____)	□não
Calafrios	□sim	□não
Incontinência fecal	□sim	□não
Sinais de peritonite /perfuração intestinal	□sim	□não
Íleo paralítico (Def: Disfunção intestinal grave com vômitos ou ausência de fezes, com sinais radiológicos de distenção alças intestinais):	□sim	□não
Megacólon tóxico (Def: sinais radiológicos de distensão de cólon, isto é: > 6 cm de largura transversal do cólon, com sinais de SIRS	□sim	□não
Instabilidade hemodinâmica com Choque distributivo (def: PA sistólica < 90 mmHg	□sim	□não
Insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica	□sim	□não
Internação em UTI pelo *C difficile*	□sim	□não
Colectomia	□sim	□não
Leucocitose (definição: leuco> 15.000/mm^3	□sim	□não

(N º máximo de leucócitos no curso da dç: _____)		
Desvio a esquerda com>20% bastões	□sim	□não
Leucopenia (definição: leuco< 4.000/mm³ (N º mínimo de leucócitos no curso da dç: _____)	□sim	□não

Creatinina sérica: _____	Aumento da creatinina > 50% do valor basal: □sim □não
Lactato sérico: _____	Lactato elevado (> 5mmol/ L): □sim □não
Albumina sérica: _____	Redução da albumina < 3 g/dL: □sim □não

3. DIAGNÓSTICO do *C. difficile*

Teste rápido para detecção Toxina + Glutamato desidrogenase (GDH)	□ POS	□NEG	□INDETER
Teste Rápido Molecular Xpert® *C. difficile*	□ POS	□NEG	□INDETER
Cultura *C.difficile*	□ POS	□NEG	□não realizado
Colonoscopia	□sim (Presença de colite pseudomembranosa: □sim □não		□não

4. TRATAMENTO do *C. difficile*

Tratamento para *C. difficile*		□sim	□não
□ Metronidazol VO: Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Metronidazol EV Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Vancomicina VO Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Fidaxomicina VO Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Teicoplanina VO Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Tigeciclina VO Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Probióticos VO Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□Nitazoxanida VO Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	
□outros: _____ Dose/dia: _____	Data início: ___/___/__	Data término: ___/___/__	

□Transplante Microbiota Fecal	Data: ___/___/__		Via administração _____
Suspensão do ATM em uso	□sim		□não
Resposta clínica no 7ºdia de tratamento	□Resolução diarreia		□ sem resposta
	□Melhora parcial (def: redução nº evacuações ou aumento consistência das fezes		□Piora da diarreia (Def: aumento nº evacuações ou piora clínica)
Resposta clínica ao final do tratamento	□Resolução diarreia		□ sem resposta
	□Melhora parcial (def: redução nº evacuações ou aumento consistência das fezes		□Piora da diarreia (def: aumento nºevacuações ou piora clínica)
Evolução Clínica do paciente	□ Alta hospitalar: ___/___/__		Óbito: ___/___/__ Causa: _____
Óbito relacionado à diarreia por *C difficile*	□ sim		□não
Recidiva da diarreia após término do tratamento	□ sim: Data: ___/___/__		□não
Seguimento após término do tratamento:	□ sim		□não
Evolução após 30 dias	□ sem diarreia	□ recidiva diarreia	Sem informação
Evolução após 60 dias	□ sem diarreia	□ recidiva diarreia	Sem informação
Evolução após 90 dias	□ sem diarreia	□ recidiva diarreia	Sem informação

5. DADOS DO AMBIENTE

Internamento do paciente em quarto individual	□ sim	□não: Nº pacientes no quarto:_____
Paciente em isolamento de contato	□ sim	□não
Troca do álcool 70% por água e sabão para higiene das mãos profissional saúde	□ sim	□não
Higiene de superfícies e/ou equipamentos com álcool 70%	□ sim	□não

6.SCORE DE GRAVIDADE PARA INFECÇÃO POR *C. difficile*

-Imunossupressão e/ou comorbidades (1 ponto)	□ sim	□não:
-Dor abdominal e/ou distensão abdominal (1 ponto)	□ sim	□não
-Hipoalbuminemia (< 3g/dl) (1 ponto)	□ sim	□não
-Fever (>38.5°C) (1 ponto)	□ sim	□não
-Admissão em UTI (1 ponto)	□ sim	□não
-TC de abdômen com pancolite, ascite e /ou espessamento de parede intestinal (2 pontos)	□ sim	□não
-Leucócitos > 15.000 ou < 1.500 e/ou bastões > 10% (2 pontos)	□ sim	□não
-Aumento da Creatinina > 1,5 vezes do valor basal (2 pontos)	□ sim	□não
-Sinais de irritação peritoneal (3 pontos)	□ sim	□não
-Uso de drogas vasoativas (5 pontos)	□ sim	□não
-Ventilação mecânica atribuída ao *C diffile* (5 pontos)	□ sim	□não
-Desorientação, confusão mental ou rebaixamento do sensório (5 pontos)	□ sim	□não
Valor total do Score de Gravidade (**Soma dos itens positivos acima**)	□ ≤3 (doença leve a moderada) □ 4-6 (doença grave) □ ≥7 (doença grave complicada)	

Anexo C-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:

_____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: .....

SEXO: M □ F □ DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP: .....TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: .....SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO. ...../...../.....

ENDEREÇO: .....Nº..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

_____

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Avalição da prevalência de diarréia por *Clostridioides difficile* em pacientes internados em hospitais brasileiros"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Silvia Figueiredo Costa

Departamento: Professora associada do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e chefe do Laboratório de Investigação Médica LIM-54 do HC-FMUSP.

Endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 - 1º andar sala 102 Cerqueira Cesar - São Paulo - SP - 05403-000
E-mail: mipdepto@usp.br ou deptomi@usp.br
Fone: (11) 3088-4945/3061-7018 CV: http://lattes.cnpq.br/1477475164233116; Email: costasilviaf@ig.com.br; silviacosta@up.br..

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 MESES.....

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **"Avalição da prevalência de diarréia por *Clostrioides difficile* em pacientes internados em hospitais brasileiros**". Esta pesquisa é coordenada pelo (a) dr(a)._____, médico(a) responsável local, do Hospital _____ e tem como objetivo principal estudar e a presença de uma bactéria chamada *Clostridioides difficile* em pacientes internados nessa instituição. Esta bactéria é uma das causas de diarréia em pacientes hospitalizados ou naqueles que fizeram uso recente de antibióticos e pode causar dor e aumento da barriga, fezes amolecidas ou liquidas e em casos mais graves parada da eliminação de fezes. Esse estudo tem como objetivo avaliar a presença dessa bactéria como causadora de diarreia em pacientes internados nos hospitais e estudar melhor as características desse microrganismo. Para participar desse estudo você deverá realizar coleta de fezes para que a pesquisa e o estudo dessa bactéria sejam efetuados, ficando essas fezes armazenadas para outros estudos. A coleta de fezes não oferece risco para os participantes. Além disso, você responderá a perguntas relacionadas aos sintomas que você está sentindo e ao tratamento ao qual você está sendo submetido. É importante garantir que você receberá prontamente o tratamento para a infecção caso a presença da bactéria se confirme nas suas fezes.

Você está internado (a) no hospital _____ e, portanto, está sendo cuidado por equipe responsável, na enfermaria ou em Unidade de Terapia Intensiva. Se decidir participar desse estudo, continuará recebendo dieta, cuidados de enfermagem, medicações, procedimentos e todo tipo de tratamento apropriado para a sua doença, seguindo as orientações do seu médico, <u>independentemente da sua participação nessa pesquisa</u>.

Sua identidade será mantida em sigilo, sendo a divulgação dos resultados dos seus exames totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão com interesse científico, sem qualquer possibilidade de identificação dos

pacientes por outros componentes da equipe de saúde, exceto pelos responsáveis diretos por seu tratamento. A sua participação deverá ser voluntária e consciente. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação neste estudo. Em qualquer momento, você terá o direito de desistir da pesquisa sem necessidade de dar explicações. A eventual desistência não acarretará prejuízo ou discriminação quanto à manutenção do seu tratamento.

Reforçamos que não haverá qualquer prejuízo para o paciente que não quiser entrar na pesquisa, bem como se quiser sair a qualquer momento do andamento desta. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O (a) pesquisador (a) responsável local é a Dr (a) _____, que pode ser encontrado (a) no endereço_____ telefone:_____. Se você tiver alguma dúvida entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital: _____, telefone_____, email_____.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo "**Avalição da prevalência de diarréia por *Clostridioides difficile* em pacientes internados em hospitais brasileiros**". Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha* Data ____/____/____

(*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo D- PUBLICAÇÃO RELACIONADA AO TEMA DA PESQUISA

Anaerobe 71 (2021) 102410

Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Clostridioides difficile* infection: A prospective diagnostic performance study

Evelyne Santana Girão [a, b, *], Saidy Liceth Vásconez Noguera [c], Evelyn Patricia Sanchez Espinoza [c], Camila Loredana Pereira Alves Madeira Bezerra [b], Fernando Molina Lino [b], Marina Farrel Côrtes [c], Sânia Alves dos Santos [c], Gláucia Paranhos-Baccala [d], Lauro Vieira Perdigão Neto [b, c], Silvia Figueiredo Costa [b, c]

[a] Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil
[b] Divisão de Moléstias Infecciosas, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
[c] LIM-49, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
[d] Open Innovation and Partnership Department or bioMérieux, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 March 2021
Received in revised form
25 May 2021
Accepted 22 June 2021
Available online 24 June 2021

Keywords:
Clostridioides difficile
Loop-mediated isothermal amplification assay
Nucleic acid amplification test

ABSTRACT

A novel Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay, HiberGene's CD was evaluated with 82 unformed stools from patients suspected of *C. difficile* infection (CDI). Compared to glutamate dehydrogenase (GDH) toxins A/B test (C.diff Quik Chek®), HiberGene's LAMP showed 100% of sensitivity and 95,8% of specificity; and compared to FilmArray™ GI panel ® (BioFire), a sensitivity of 81,2% and a specificity of 100%, with 96.38% of agreement.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Clostridioides difficile (CD) is the leading cause of healthcare-associated diarrhea [1]. In Brazil, there are few studies addressing the role of CDI and national data are scarce. Enzyme immunoassay (EIA) toxin are the most used diagnostic test for CDI and molecular-based assays are costly and not easily accessible. Reported CDI prevalence rates are 15%, with high variations between different regions of the country [2].

CD infection (CDI) remains a diagnostic challenge and no single assay is suitable as a stand-alone test confirming CDI [3]. European guidelines have recommended a two-step algorithm for diagnosis of CDI consisting of a highly sensitive screening test followed by a specific confirmatory test detecting free toxins [4]. Recently some authors have recommended the use of nucleic acid amplification test (NAAT) alone for detection of CD toxin genes if there are pre agreed institutional criteria for patient stool submission [5]. The lack of a rapid, accurate, and inexpensive diagnostic test for CDI remains an important barrier to clinical and epidemiological containment of CDI.

Currently, NAAT for detection of CDI, that can be performed as point-of-care (POC) tests, has expanded, and became more accessible. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), a novel NAAT, have been developed for the diagnosis of CDI, and compared to other non-culture-based methods, is sensitive and specific [6,7]. Since LAMP assay can be performed under isothermal conditions, using a waterbath or thermocycler block, there is no need for thermal cycling, which reduces the cost compared with real-time polymerase chain reaction (RT-PCR [8]. HiberGene's LAMP assay is a novel qualitative test that targets the *tcdA* and *tcdB* genes of CD. The aim of this study was to compare the performance of the HiberGene's LAMP assay with the C. diff Quik Chek test (GDH/ELISA) and FilmArray diarrhea assays for the diagnosis of CD diarrhea.

This prospective, observational study was conducted at Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a

* Corresponding author. Rua: Pastor Samuel Munguba, 1290 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Cep: 60430-372, Brazil.
E-mail address: egirao@usp.br (E.S. Girão).

https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102410
1075-9964/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

public, tertiary and teaching hospital. Hospitalized patients ≥7 years old with diarrhea (defined as ≥3 soft stools within 24 h) were included. These patients were selected by an active search for possible cases of CDI. Patients were excluded if they had community-associated diarrhea, defined as onset of symptoms in the community or during the first 48 h of admission and with no prior hospitalization in the last 3 months [5]. Clinical and demographic data were collected for each patient, after the study was approved by the ethic committee, and following informed written consent. All stools samples were tested for glutamate dehydrogenase (GDH)/toxins A and B test (C. diff Quik Chek Complete®, TechLab-EIA), for HiberGene HG C. Difficile® (HiberGene Diagnostics, Dublin, Ireland) and for FilmArray™ GI panel (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, Utah, USA). All samples were stored and analyzed at the Laboratório de Investigação Médica 49 (LIM-49), Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. The specimens were tested according to the manufacturer's instructions. CDI case was defined as patient with diarrhea, with three or more daily bowel movements, that was found to be positive for C diff Quik Chek test, both GHD and Toxin, that were also FilmArray positive for CD, based on the international guidelines criteria [4,5].

1. C. diff Quik Chek test

The C. DIFF Quik Chek Complete® test is a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of *C. difficile* GDH antigen and toxins A and B in a single reaction. All stool samples were tested within 48 h after delivery to the laboratory, and, if necessary, were stored at 4 °C until 72 h. The positive control was used to all samples tested.

2. HiberGene's, HG C. Difficile LAMP assay

HiberGene's LAMP assay is a qualitative test based on loop-mediated isothermal amplification technology (LAMP) that employ as target the toxin A and B genes *tcdA* and *tcdB of C. difficile*. The HiberGene's assay was performed according to the manufacturer's procedure.

3. BioFire FilmArray gastrointestinal (GI) panel

This is a multiplexed NAAT detects 22 of the most common GI pathogens in a single panel, including 13 bacteria, 5 viruses and 4 parasites. The following agents are included in the FilmArray GI panel: *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, and *C. upsaliensis*), *Clostridioides difficile* toxin A/B, *Pseudomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and *V. cholerae*), *Yersinia enterocolitica*, *Enteroaggregative E. coli* (EAEC), *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) lt/st, *Shiga-like toxin-producing E. coli* (STEC) stx1/stx2, *E. coli O157*, *Shigella/Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Adenovirus* F40/41, *Astrovirus*, *Norovirus* GI/GII, *Rotavirus A*, and *Sapovirus* (I, II, IV, and V). Identification of *C difficile* was based upon detection of toxin A gene (*tcdA*) and toxin B gene (*tcdB*). A simple protocol was development according to manufacturer's specifications.

The sensitivity and specificity of the Hibergene's LAMP assay to CDI was compared with the C. diff Quik Chek test (both GHD and Toxin positive) associated to FilmArray positive test, considered here the "gold standard" for CDI, as well as the positive predictive value and negative predictive value of the test. In addition, to asse the agreement between the assays, the Cohen's kappa was performed according to the following formula and the interpretation of Cohen's kappa [$\kappa = Pr(a) - Pr(e)/1 - Pr(e)$] (Table 1).

From April 2018 to March 2020, 82 samples were included (1 sample per patient), as described in Fig. 1. Most of the patients were immunosuppressed (61%) and 94% had previous use of antimicrobials on the last 3 months, as displayed in Table 2. Between the 82 samples, ten (12%) were GDH positive/toxin positive, five (6%) were GDH positive/toxin negative, and 67 (82%) were GDH negative/toxin negative. Using FilmArray assay, 16 (20%) were positive, and 66 (80%) were negative for the presence of toxin-encoding genes (*tcdA*/*tcdB*). Among positive samples for the *C.difficile* in FilmArray assay (n = 16), four (25%) were positive for other pathogens too, such as *Enteroaggregative E. coli* (EAEC), *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Salmonella* and *Rotavirus A* (one of each). Besides that, among the samples that were *C. difficile* negative for this test, we found 8 (12%) to be positive for others gastrointestinal pathogens: 5 with *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), 2 with *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) and *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) and 1 with *Sapovirus*. Using HiberGene's LAMP assay, 13 (16%) samples were positive, and 69 were negative (84%). The agreement between the methods is shown in Table 3. Discordant results between HiberGene's LAMP and FilmArray assay occurred in three samples, all of them with negative HiberGene's LAMP and positive FilmArray results. Between them, two samples were negative C. diff Quik Chek Test (both GDH and toxin negative results), and one inconclusive C. diff Quik Chek Test result (GDH positive/toxin negative). In the last one, FilmArray assay was positive for *Enteroaggregative E. coli* (EAEC) and *Rotavirus A*. The results of the samples' behavior in relation to the various tests are summarized in Table 4. HiberGene's LAMP assay showed a sensitivity of 100% and a specificity of 95,8% when compared to C. diff Quik Chek test and a sensitivity of 81,2% and a specificity of 100% compared with FilmArray assay. The tests showed 96.38% of agreement, corresponding to almost perfect value of Kappa (0.80–0.90).

To our knowledge, this is the first reported study comparing the LAMP assay for detection of CDI with C diff Quik Chek test and FilmArray GI panel. The HiberGene's LAMP assay demonstrated high sensitivity and specificity compared to C diff Quik Chek test and FilmArray assay, with a good agreement rate between them (96,3%).

Of the 82 stool specimens analyzed, 10 (12%) were positive for CD using C. diff Quik Chek, 13 (16%) using HiberGene's LAMP and 16 (19.5%) using FilmArray GI panel. When we used the C. diff Quik Chek (both GDH and toxin positive) plus FilmArray positive as gold standard, 10 (12%) samples were positive for CD. It's important to highlight that a great proportion of our patients were immunosuppressed, 36% with hematological diseases and 20% hematopoietic stem cell transplant recipients. In this population, Film Array has the advantage of being able to simultaneously detect other bacterial, viral and parasitic pathogens, with can be associated with CDI.

Laboratory diagnosis of CDI has traditionally been based on detecting CD toxin A/B in stool by EIA, with are relatively insensitive, detecting only 30%–70% of CDI [10]. Commercially available combined GDH and toxin A/B EIA assays increased diagnostic

Table 1
Interpretation of Cohen's Kappa.

Value of Kappa	Level of Agreement	% of Data that are Reliable
0–.20	None	0–4%
.21–.39	Minimal	4–15%
.40–.59	Weak	15–35%
.60–.79	Moderate	35–63%
.80–.90	Strong	64–81%
Above.90	Almost Perfect	82–100%

Adapted from McHugh, M., 2012 [9].

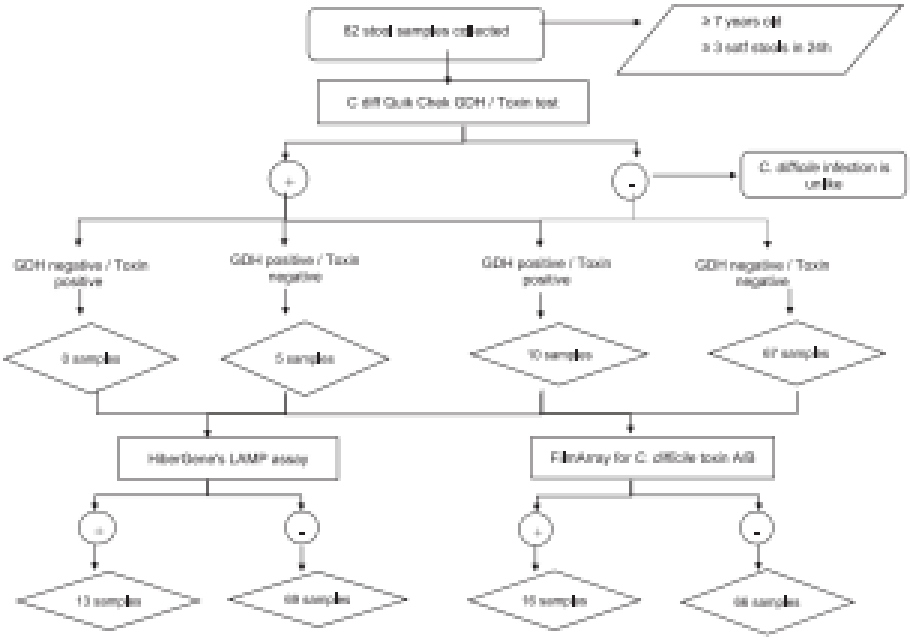


Fig. 1. Test algorithms for patients with diarrhea, with suspected *C. difficile* infection (CDI), using *C. diff Quik Chek* GDH/Toxin, Hibergene LAMP assay and FilmArray tests.

Table 2
Clinical data of patients with diarrhea, with suspected C. difficile infection (CDI), April 2018 to March 2020.

Characteristics	N = 82 patients (%)
Age, median years (range)	49 (3–81)
Gender (female)	46 (56)
Underlying disease	
Haematology disease	30 (36)
HSCT	17 (20)
Diabetes	13 (16)
Autoimmune disease	11 (13)
Neurologic disease	8 (10)
Cancer	7 (8)
Gastrointestinal disease	6 (7)
Renal disease	5 (6)
SOT	2 (2)
Immunocompromised	50 (61)
Previous ATB use in the last 3 months	77 (94)
Piperacillin-tazobactam	20 (26)
Trimethoprim- sulfamethoxazole	17 (22)
Meropenem	11 (14)
Cefotaxime	10 (13)
Clindamycin	8 (10)
Vancomycin	8 (10)
Ciprofloxacin	6 (8)
Azithromycin	6 (8)
Community-onset, healthcare facility-associated diarrhea	5 (6)
Previous CID episode	3 (4)

CDI: *C. difficile* infection; HSCT: hematopoietic stem cell transplant; SOT: solid organ transplant; ATB: antibiotic.

accuracy. However, if the GDH and toxin results are discordant, then additional a highly specific NAAT is required [11]. Molecular-based assays are being increasingly used as on step test for CDI,

Table 3
Comparison of Hibergene's LAMP with C. diff Quik Chek test and FilmArray assay in 82 samples of patients with suspected C. difficile infection.

	Hibergene's LAMP	Hibergene's LAMP
C. diff Quik Chek test	POSITIVE	NEGATIVE
GDH+/toxin+	10	0
GDH+/toxin-	3	2
GDH-/toxin-	0	67
FilmArray assay		
Positive	13	3
Negative	0	66

GDH: glutamate dehydrogenase; Toxin: toxin A and B; LAMP: loop-mediated isothermal amplification.

but most of them are too labor-intensive, complex, and costly [12]. LAMP assay for detection of CDI is an emerging nucleic acid test and few papers have been published to date [7,8]. Until now, LAMP assays are not a routine methodology used in clinical Brazilian laboratories for CDI diagnosis.

A recent meta-analysis evaluating LAMP as standalone diagnostic test for CDI found a pooled sensitivity and specificity of 95% and 99%, respectively [8]. These data suggest that possibility that the LAMP assay may be more sensitive and specific than real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in detecting CDI. O'Horo et al., in a systematic review, also evaluated the performance of LAMP in detecting CDI, and found 92% of sensitivity and 94% specificity, compared with toxigenic culture, and 87% of sensitivity and 97% of specificity, when used cytotoxicity as a standard assay [13]. They suggested that RT-PCR may be more suitable in epidemic conditions with higher *C. difficile* prevalence, while LAMP may be better in settings with lower *C. difficile* prevalence.

Table 4
Comparison of Hibergene's LAMP, C. diff Quik Chek test and FilmArray assay results of 82 samples of patients with suspicious of *C. difficile* infection.

C. diff Quik Chek Test GDH	*C. diff Quik Chek Test* Toxin	FilmArray GI panel	HiberGene's LAMP	n
+	−	−	−	15
+	+	−	−	10
+	+	+	+	10
−	−	−	−	66

GDH: glutamate dehydrogenase; Toxin: toxin A and B; LAMP: loop-mediated isothermal amplification; GI: gastrointestinal.

However, LAMP assays, as other molecular methods for CDI diagnostic, have limitations. A positive LAMP test result can only identify the presence of toxigenic *C. difficile* genes, which is not proof of toxin expression, and is not an indication for therapy. Therefore, clinical assessment remains essential to detect true infection.

Limitations of this study include the small patient population and the single center design. Also, the traditional gold standard method for CDI diagnosis, toxigenic culture or culture cytotoxicity neutralization assay, was not used in our samples. However, two highly sensitive and specific routine methods were compared with HiberGene's LAMP assay, which proved to be useful to CDI diagnostic.

In conclusion, our findings indicate that HiberGene's LAMP assay is a useful test for CDI, with high sensitivity, specificity and strong agreement among other diagnostic tests and Filmarray that can be very helpful in management of co-infected patients. Thus, LAMP method can be exploited as field test especially in resource limited settings in developing countries, resulting in increased access to proper diagnosis and treatment.

Declaration of competing interest

None declared.

Acknowledgements

Special thanks to bioMerieux for the donation of FilmArray™ GI panel and HiberGene for donation of HG C. Difficile LAMP assay.

References

[1] F.C. Lessa, Y. Mu, W.M. Bamberg, et al., Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States, N. Engl. J. Med. 372 (2015) 825–834.
[2] E.S. Girão, B. de Melo Tavares, S. Alves Dos Santos, et al., Prevalence of Clostridioides difficile associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: a multicenter, prospective study, Anaerobe 66 (2020) 102267.
[3] N. Bagdasarian, K. Rao, P.N. Malani, Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review, J. Am. Med. Assoc. 313 (4) (2015) 398–408, https://doi.org/10.1001/jama.2014.17103.
[4] M.J.T. Crobach, T. Planche, C. Eckert, et al., European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection, Clin. Microbiol. Infect. 22 (Suppl 4) (2016) S63–S81.
[5] L.C. McDonald, D.N. Gerding, S. Johnson, et al., Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults and children: 2017 update by the infectious diseases society of America (IDSA) and society for healthcare epidemiology of America (SHEA), Clin. Infect. Dis. 66 (7) (2018) e1–e48.
[6] B.L. Boyanton, P. Sural, C.R. Loomis, et al., Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *C. difficile* detection, J. Clin. Microbiol. 50 (2012) 640–645.
[7] W. Chen, W. Liu, Y. Li, et al., Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification in detection of Clostridium difficile in stool samples: a meta-analysis, Arch. Med. Sci. 11 (5) (2015 Oct 12) 927–936.
[8] A. Lloyd, V. Pasupuleti, P. Thota, C. Pant, D.D. Rolston, A.V. Hernandez, et al., Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 82 (1) (2015) 4–10.
[9] Mchugh ML. Lessons in Biostatistics Interrater Reliability : the Kappa Statistic. :276–282.
[10] E.J. Kvach, D. Ferguson, P.F. Riska, M.L. Landry, Comparison of BD GeneOhm C diff real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection, J. Clin. Microbiol. 48 (2010) 109–114.
[11] S.E. Sharp, L.O. Ruden, J.C. Pohl, P.A. Hatcher, L.M. Jayne, W.M. Ivie, Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of clostridium difficile disease, J. Clin. Microbiol. 48 (2010) 2082–2086, https://doi.org/10.1128/JCM.00129-10 [PMID: 20375230.
[12] F.C. Tenover, S. Novak-Weekley, C.W. Woods, L.R. Peterson, T. Davis, P. Schreckenberger, F.C. Fang, A. Dascal, D.N. Gerding, J.H. Nomura, R.V. Goering, T. Akerlund, A.S. Weissfeld, E.J. Baron, E. Wong, E.M. Marlowe, J. Whitmore, D.H. Persing, Impact of strain type on detection of toxigenic Clostridium difficile: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches, J. Clin. Microbiol. 48 (2010) 3719–3724.
[13] J.C. John C O'Horo, A. Jones, M. Sternke, et al., Molecular techniques for diagnosis of Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis Review, Mayo Clin. Proc. 87 (7) (2012 Jul) 643–651.

ANEXO E- PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

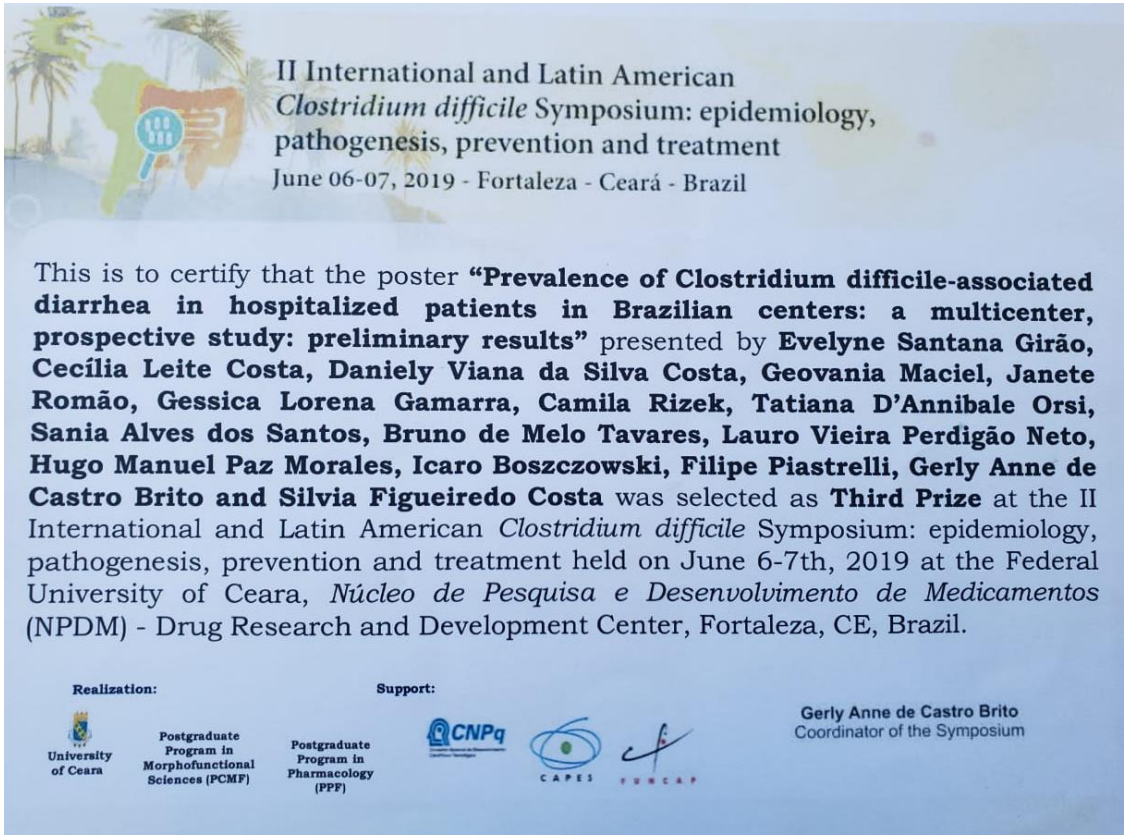
1. Apresentação dos resultados parciais do estudo sob a forma de Poster: “Avaliação da prevalência de diarreia por *Clostridium difficile* em pacientes internados em hospitais brasileiros- resultados preliminares”, no XVI Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2018, Porto Alegre, RS.

2. Apresentação dos resultados parciais do estudo sob a forma de Paper Poster: “Prevalence of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in hospitalized patients in Brazilian centers: a multicenter, prospective study: preliminary results”. N° P0278, no ECCMID 2019 - *29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, em Amsterdam, Holanda, em 13/04/2019.

3. Apresentação dos resultados do estudo sob forma de Paper Poster: “Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Clostridioides difficile* infection: a prospective diagnostic performance study”, No 04546, no – ECCMID 2021 – *31 st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Online, de 9 a 12 de julho 2021.

ANEXO F- PREMIAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

Prêmio de 3° lugar- melhor trabalho: “Prevalence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients in Brazilian center: a multicenter, prospective study: preliminary results”, apresentado no *II International and Latin American Clostridium difficile Symposium: epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment*, em Fortaleza, CE, em 07/06/2019.



II International and Latin American
Clostridium difficile Symposium: epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment
June 06-07, 2019 - Fortaleza - Ceará - Brazil

This is to certify that the poster **“Prevalence of Clostridium difficile-associated diarrhea in hospitalized patients in Brazilian centers: a multicenter, prospective study: preliminary results”** presented by **Evelyne Santana Girão, Cecília Leite Costa, Daniely Viana da Silva Costa, Geovania Maciel, Janete Romão, Gessica Lorena Gamarra, Camila Rizek, Tatiana D’Annibale Orsi, Sania Alves dos Santos, Bruno de Melo Tavares, Lauro Vieira Perdigão Neto, Hugo Manuel Paz Morales, Icaro Boszczowski, Filipe Piastrelli, Gerly Anne de Castro Brito and Silvia Figueiredo Costa** was selected as **Third Prize** at the II International and Latin American *Clostridium difficile* Symposium: epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment held on June 6-7th, 2019 at the Federal University of Ceara, *Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos* (NPDM) - Drug Research and Development Center, Fortaleza, CE, Brazil.

Realization:

University of Ceara

Postgraduate Program in Morphofunctional Sciences (PCMF)

Postgraduate Program in Pharmacology (PPF)

Support:

CNPq

CAPES

FUNCAP

Gerly Anne de Castro Brito
Coordinator of the Symposium

8 REFERÊNCIAS

1. Bartlett JG. Detection of Clostridium difficile infection. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31 (Suppl 1): S35-S37.

2. Freeman J et al. The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. Clin Microbiol Rev 2010; 23:529-549.

3.Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents. Clin Infect Dis 2007; 45:992.

4. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. Clostridium difficile infection. Nat Rev Dis Primers. 2016 Apr 7; 2:16020.

5. Sandhu BK, McBride SM. Clostridioides difficile. Trends Microbiol. 2018 Dec; 26(12):1049-1050. doi: 10.1016/j.tim.2018.09.004.

6. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, et al. Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile. Nature 2009; 458:1176.

7.Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile responsible for a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000; 38:2706.

8.Geric B, Rupnik M, Gerding DN, et al. Distribution of Clostridium difficile variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. J Med Microbiol 2004; 53:887

9. Lessa FC, Winston LG, McDonald LC; Emerging Infections Program C. difficile Surveillance Team. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. N Engl J Med. 2015 Jun 11; 372(24):2369-70

10. Gould CV, Edwards JR, Cohen J, et al.Effect of nucleic acid amplification testing on population-based incidence rates of Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis 2013; 57:1304-7.

11. Balsells E, Shi T, Leese C, Lyell I, Burrows J, Wiuff C, Campbell H, Kyaw MH, Nair H. Global burden of Clostridium difficile infections: a systematic review and meta-analysis. J Glob Health. 2019 Jun; 9(1): 010407.

12.Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier J S, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ, ECDIS Study Group. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011; 377: 63-73

13.Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. Clostridium difficile: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. J Med Microbiol 2012; 61:169-179.

14. Kwon JH, Olisen MA, Dubberke ER. The morbidity, mortality, and costs associated with *Clostridium difficile* infection. Infec Dis Clin North Am 2015; 29:123-134

15. McDonald LC.; KillgoreG.E.; Thompsom A.; Owens RC.; Kazakova SV.; Sambol SP; Johnson S; Gerding N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. New England Journal of Medicine. 2005, 8, p. 2433-2441, 2005.

16. Warny M.; Pepin J.; Fang A.; Killgore G.; Thompson A.; Brazier J.; Frost E.; McDonald C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 2005. 366: 1079-1084

17. BauerM. P.; Notermans D. W.; Van Benthem. H.; Brazier JS; Wilcox M. H.; Rupnik M.; Monnet D. L.; Van DisselJ. T.; Kuijper EJ; Ecdis Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet. 377, p.63-73, 2011.

18. Quesada-Gomez C; López – Urena D; Acuna-Amador L; Villalobos-Zuniga M; DU; Freire R; Guzman-Verri C; et al. Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence**.** Journal of Clinical Microbiology, 2015 v. 53, 2015. 21.

19. Salazar CL, Reyes C, Atehortua S et al. Molecular, microbiological, and clinical characterization of *Clostridium difficile* isolates from tertiary care hospitals in Colombia. PLoS One 2107; 12(9): e0184689

20. Jiménez A, Araya R, Paniagua D, Camacho-Mora Z et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in a National Geriatrics Hospital from Costa Rica. J Hosp Infect 2018; 99(4):475–480.

21.Guerrero-Araya E, Meneses C, Castro-Nallar E, Guzmán AM et al. Origin, genomic diversity and microevolution of the *Clostridium difficile* B1/NAP1/RT027/ST01 strain in Costa Rica, Chile, Honduras and Mexico. Microb Genom 2020; 6(5): e000355.

22. Kutty PK, Woods CW, Sena AC, et al. Risk factors for and estimated incidence of Community associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. Emerg Infect Dis. 2010; 16(2):197-204

23. Karlström O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG. A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*–associated diarrhea in Sweden: The *Swedish C. difficile* Study Group. Clin Infect Dis.1998; 26(1):141-145.

24**.** Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection.J Antimicrob Chemother. 2008; 62(2): 388-396.

25. Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. use os gastric acid- suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*- associated disease. JAMA 2005; 294:2889-2995.

26. Lessa FC. Community-associated *Clostridium difficile* infection: how real is it? Anaerobe 2013; 24:121-123.

27. Pires RN, Falci DR, Monteiro AA, Caurio CFB, Tuon FF, EA, França IL, John JF, Sukiennik TCT, Saldanha GZ, Martins AF, Pasqualotto AC. High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-

prevalence study. Infection Control & Hospital Epidemiology 2019;40(4):484-485. doi: 10.1017/ice.2019.27.

28.Trindade CRN, Domingues Regina Maria CP, Ferreira EO. The epidemiology of *Clostrodioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. Anaerobe, 2019;58:13-21. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.03.002.

29. Silva RO, Vilela EG, Neves MS, et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a nucleic acid amplification test for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at a university hospital in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2014; 47: 447-50.

30. Pires RN, Monteiro AA, Carneiro LC, Baethgen LF, Tavares R, Lincho CS, Park S, Perlin D, Rodrigues Filho EM Pasqualotto AC. *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? *Am J Infect Control*. 2014 Apr;42(4):459-60.

31. Secco DA Balassiano IT, BoenteRF, Miranda KR, BrazierJ, Hall V, Filho JS, Lobo LA, Nouer SA, Domingues RMCP. *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. Anaerobe 28 (2014) 85e89

32. Spadão F.; Gerhardt J.; Guimarães T.; Dulley, F.; Almeida JUNIOR, J.N.; Batista, M.V.; Shikanai-Yasuda, M.A.; Levin, A.S. & Costa SF. Incidence of diarrhea by *Clostridium difficile* in hematologic patients and hematopoietic stem cell transplantation patients: risk factors for severe forms and death. Rev. Inst. Med. Trop 2014; 56(4): 325-328

33. Costa CL, Mano de Carvalho CB, González RH, Gifoni AC, RibeiroRA, Quesada-Gómez C, Brito GAC. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. Anaerobe, 2017, Dec; 48:232-236

34. Costa CL, Quesada-Gómez C, de Carvalho CB, González RH, Gifoni MA, Ribeiro RA, de Castro Brito GA. Community-acquired diarrhea associated

with *Clostridium difficile* in an HIV-positive cancer patient: first case report in Latin America. Int J Infect Dis. 2014 Sep; 26:138-9.

35. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, Falci DR, Caurio CFB, Sukiennik TCT, Adam FC, Pasqualotto AC, Martins AF Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol. 2018; 39(3): 371-373.

36. Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG, Figueiredo HCP, Rupnik M, Wilcox MH, Fawley WN, Blanc DS, Faria Lobato FC, Silva ROS. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. Anaerobe 2019 Apr; 56:34-39.

37. Balassiano IT, dos Santos-Filho J, Vital-Brazil JM, Nouér SA, Souza CR, Brazier JS, et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek 2011; 99:249-55.

38. Dubberke ER, Reske KA, Yan Y, Olsen MA, McDonald LC, Fraser VJ. *Clostridium difficile*--associated disease in a setting of endemicity: identification of novel risk factors. Clin Infect Dis. 2007 Dec 15;45(12):1543-9.

39. Vardakas KZ, Konstantelias AA, Loizidis G, Rafailidis PI, Falagas ME. Risk factors for development of *Clostridium difficile* infection due to BI/NAP1/027 strain: a meta-analysis. Int J Infect Dis. 2012;16: e768-73.

40. Yearsley KA, Gilby LJ, Ramadas AV, Kubiak EM, Fone DL, Allison MC. Proton pump inhibitor therapy is a risk factor for *Clostridium difficile* associated diarrhoea. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24:613–9.

41. Lowe DO, Mamdani MM, Kopp A, Low DE, Juurlink DN. Proton pump inhibitors and hospitalization for *Clostridium difficile*–associated disease: a population-based study. Clin Infect Dis 2006; 43:1272–6.

42. Tabak YP, Johannes RS, Sun X, Nunez CM, McDonald LC. Predicting the risk for hospital-onset *Clostridium difficile* infection (HO-CDI) at the time of inpatient admission: HO-CDI risk score. Infect Control Hosp Epidemiol. 2015;36(6): 695-701.

43. Lungulescu OA, Cao W, Gatskevich E, Tlhabano L, Stratidis JG. CSI: A severity index for *Clostridium difficile* infection at the time of admission. J Hosp Infect. 2011;79(2):151-154.

44. Ooijevaar RE, van Beurden YH, Terveer EM, Goorhuis A, Bauer MP, KellerJJ, Mulder CJJ, Kuijper EJ, Update of treatment algorithms for *Clostridium difficile* infection, *Clinical Microbiology and Infection* (2018).

45. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. N Engl J Med 2008; 359:1932.

46**.** McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis 2018; 66. e1 -e48.

47. Kelly CR, Fischer M, Allegretti JR, LaPlante K, Stewart DB, Limketkai BN, Stollman NH. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. Am J Gastroenterol. 2021 Jun 1;116(6):1124-1147. doi: 10.14309/ajg.000000000000127.

48. Debast SB, Bauer MP, Kuipjper EJ;European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Uptade of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014; 20(Suppl 2):1-26.

49. Kelly CP. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? Clin Microbiol Infect 2012; 18 Suppl 6:21.

50. Hu MY, Katchar K, Kyne L, et al. Prospective derivation, and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. Gastroenterology 2009; 136:1206.

51.Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection Clin Microbiol Infect. 2016, Aug; 22 Suppl 4: S63-81. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.010. Epub 2016 Jul 25.

52. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, Nguyen HH6, Huang B, Tang YW, Lee LW6, Kim K, Taylor S, Romano PS, Panacek EA, Goodell PB, Solnick JV, Cohen SH. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era JAMA Intern Med. 2015 Nov;175(11):1792-801.

53. Kraft CS, Parrott JS, Cornish NE, et al. A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis of nucleic acid amplification tests (NAATs) and algorithms including NAATs for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in adults. Clin Microbiol Rev 2019; 32: e00032-18

54. Burnham CA.; Carrol KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. Clinical Microbiology Reviews. 2013; 26:604-30

55. Planche T, Wilcox MH. Diagnostic pitfalls in *Clostridium difficile* infection. Infect Dis Clin Am. 2015; 29:63-82.

56. Chen S, Gu H, Sun C, Wang H, Wang J. Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins and laboratory diagnosis of *Clostridium infections*. Infection 2017; 45:255-262

57. De Jong E, de Jong AS, Bartels CJ, van der Rijt-van den Biggelaar C, Melchers WJ, Sturm PD. Clin and Laboratory evaluation of real-time PCR for

Clostridium difficile toxin A and B genes. Eur j Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31; 2219-25.

58. Sandlund J, Bartolome A, Almazan A, Tam S, Biscocho S, Abusali S, Bishop JJ, Nolan N, Estis J, Todd J, Young S, Senchyna F, Banaei N Ultrasensitive Detection *of Clostridioides difficile* Toxins A and B by Use of Automated Single-Molecule Counting Technology. J Clin Microbiol. 2018 Oct 25; 56(11

59. Pollock NR, Banz A, Chen X, et al. Comparison of *Clostridioides difficile* stool toxin concentrations in adults with symptomatic infection and asymptomatic carriage using an ultrasensitive quantitative immunoassay. Clin Infect Dis. 2019; 68 (1):78-86.

60. Planche TD. Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA, et al. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicenter diagnostic validation study of *C difficile* infection. Lancet Infect Dis. 2013; 13:936-45.

61. Boyanton BL, Sural P, Loomis CR, et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *C. difficile* detection. J Clin Microbiol 2012; 50: 640-5.

62. Chen W, Liu W, Li Y, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification in detection of *Clostridium difficile* in stool samples: a meta-analysis. Arch Med Sci 2015 Oct 12; 11(5): 927–936.

63. Lloyd A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DD, Hernandez AV, et al. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 82(1):4–10**.**

64. Thabit AK, Alsolami MH, Baghlaf NA, Alsharekh RM, et al. Comparison of three current *Clostridioides difficile* infection guidelines: IDSA/SHEA, ESCMID, and ACD guidelines. Infection 2019; 19 august

65.Killgore, G. et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragmen length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. J. Clin. Microbiol. 200; 8 46, 431–437.]

66. Eyre, D. W. et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on wholegenome sequencing. N. Engl. J. Med 2013; 369: 1195–1205.

67. Kumar, N. et al. Genome-based infection tracking reveals dynamics of *Clostridium difficile* transmission and disease recurrence. Clin. Infect. Dis 2016; 62:746–752.

68. Hu MY, Katchar K, Kyne L et al. Prospective derivation and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. Gastroenterology 2009; 136:1206.

69. Johnson S, Louie TJ, Gerding DN, et al. Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for *Clostridium difficile* infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. Clin Infect Dis. 2014; 59: 345-354

70. Di X, Bai N, Zhang X, et al. A meta-analysis of metronidazole and vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* infection, stratified by disease severity. Braz J Infect Dis. 2015; 19: 339-349.

71.Stevens VW, Nelson RE, Schwab-Daugherty EM, et al. Comparative effectiveness of vancomycin and metronidazole for the prevention of recurrence and death in patients with *Clostridium difficile* infection. JAMA Intern Med. 2017; 177: 546-553.

72. Bolton RP, Culshaw MA. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. Gut 1986; 27:1169.

73. Baines SD, O'Connor R, Freeman J, et al. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 2008; 62:104

74. Fraga EG, Nicodemo AC, Sampaio JLM. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion Braz J Infect Dis 2016 (20); 5:476-481

75. Stevens VW, Nelson RE, Schwab-Daugherty EM, et al. Comparative effectiveness of vancomycin and metronidazole for the prevention of recurrence and death in patients with *Clostridium difficile* infection. JAMA Intern Med. 2017; 177:546-553. doi:10.1001/jamainternmed.2016.9045

76 Siegfried J, Dubrovskaya Y, Flagiello T, et al. Initial therapy for mild to moderate *Clostridium difficile* infection: exploring the role of oral metronidazole versus vancomycin in 168 hospitalized patients. Infect Dis Clin Pract. 2016; 24:210-216.

77. Nguyen CT, Li J, Anders S, Garcia-Diaz J, Staffeld-Coit C, Hand J. Comparison of outcomes with vancomycin or metronidazole for mild-to-moderate *Clostridium difficile* associated diarrhea among solid organ transplant recipients: a retrospective cohort study. Transpl Infect Dis. 2018; 20: e12867. doi:10.1111/tid.12867

78. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 2011; 364:422-43.

79. Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, et al. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: fidaxomicin versus vancomycin. Clin Infect Dis.2012; 55 (Suppl 2): S154-161

80. Guery B, Menichetti F, Anttila VJ, et al. Extended-pulsed fidaxomicinv ersus vancomycin for *Clostridium difficile* infection in patients 60 years and older (EXTEND): a randomised, controlled, open-label, phase 3b/4 trial. Lancet Infect Dis. 2018; 18: 296-30

81. Johnson S, Schriever C, Galang M, et al. Interruption of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. Clin Infect Dis. 2007; 44: 846-848.

82. Drekonja DM, Butler M, MacDonald R, et al. Comparative effectiveness of *Clostridium difficile* treatments: a systematic review. Ann Intern Med. 2011; 155: 839-847.

83.Sirbu BD, Soriano MM, Manzo C, et al. Vancomycin Taper and Pulse Regimen with Careful Follow-up for Patients with Recurrent *Clostridium difficile* Infection. Clin Infect Dis 2017; 65:1396.

84.Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, et al. Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. Ann Intern Med 2015; 162:630.

85. Hvas CL, Dahl Jørgensen SM, Jørgensen SP, et al. Fecal Microbiota Transplantation Is Superior to Fidaxomicin for Treatment of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. Gastroenterology 2019; 156:1324.

86. Nelson RL, Suda KJ, Evans CT. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in adults. Cochrane Database Syst Rev 2017; 3:CD004610.

87. Dieterle MG, Rao K, Young VB. Novel therapies and preventative strategies for primary and recurrent *Clostridium difficile* infections. Ann N Y Acad Sci. 2019; 1435(1):110-138. doi:10.1111/nyas.13958

88. Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, et al; MODIFY I and MODIFY II Investigators. Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 2017; 376(4):305-317. doi:10.1056/NEJMoa1602615

89. Ma J, Dubberke E. Current management of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in adults: a summary of recommendations from the 2017 IDSA/SHEA clinical practice guideline. Pol Arch Interm Med 2019; 129(3):189-198

90. Banach DB, Bearman G, Barnden M, et al. Duration of Contact Precautions for Acute-Care Settings. Infect Control Hosp Epidemiol 2018; 39:127

91. Baur D, Gladstone BP, Burkert F, et al. Effect of antibiotic stewardship on the incidence of infection and colonisation with antibiotic-resistant bacteria and *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2017; 17:990.

92.Goldberg EJ, Bhalodia S, Jacob S, Patel H, Trinh KV, Varghese BA, Yang J, Young SR, Raffa RB. *Clostridium difficile* infection: A brief update on emerging therapies.

93. Neal MD, Alverdy JC, Hall DE, Simmons RL, Zuckerbraun BS. Diverting loop ileostomy and colonic lavage: an alternative to total abdominal colectomy for the treatment of severe, complicated *Clostridium difficile* associated disease. Ann Surg. 2011; 254(3):423-7.

94. Assefa, S., Keane, T. M., Otto, T. D., Newbold, C. & Berriman, M. ABACAS: algorithm-based automatic continuation of assembled sequences. Bioinformatics 25, 1968–1969, (2009).

95. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068–2069, (2014).]

96. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, et al. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. J. Clin. Micobiol. 2012. 50(4): 1355-1361.

97. E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. Carattoli A, Zankari Antimicrob. Agents Chemother. 2014. April 28th.

98. Cançado LGG, Silva SRO, Rupnik M, et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic associated diarrhea in a university hospital of Brazil. Anaerobe 2018; 54: 65–71.

99. Eze P, Balsells E, Kyaw MH and Nair H. Risk factors for *Clostridium difficile* infections-an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. J of Global Health 2017.

100. Slimings C, Riley TV. Antibiotis and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2014; 69:881-91.

101. BRASIL (2017) ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2017.https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletimseguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude (acessed 18 december 2020).

102. Matos Porto AP, Goossens H, Versporten A, Costa SF, on behalf of Brazilian Global-PPS working group (2019) Global point prevalence survey (Global-PPS) of antimicrobial consumption in Brazilian hospitals. J Hosp Infect 104:165–171. https://doi.org/10. 1016/j.jhin.2019.10.016

103. Arriola V, Tischendorf J, Musuuza J et al (2016) Assessing the risk of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection with proton pump inhibitor use: a meta-analysis. Infect Control Hosp Epidemiol 37:1408–1417.

104. Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CKF et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. Cochrane Database Syst Rev 2017 ;(12):CD006095.

105. Hickson M. Probiotics in the prevention of antibiotic associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Gastroenterol 2011; 4(3):185197. https://doi.org/10.1177/ 1756283X11399115.

106. Bella SD, Friedrich AW, García-Almodóvar E et al (2015) *Clostridium difficile* infection among hospitalized HIV-infected individuals: epidemiology and risk factors: results from a case-control study (2002–2013). BMC Infect Dis 15:194.

107. Le F, Arora V, Shah DN et al. A real-world evaluation of oral vancomycin for severe *Clostridium difficile* infection: implications for antibiotic stewardship programs. Pharmacotherapy 2012; 32(2):129– 134.

108. Khanafer N, Blais L, Barbut F et al. Treatment of *Clostridium difficile* infection in a French university hospital. Scand J Gastroenterol 2015; 50(10):1253–1260.

109. Li R, Lu L, Lin Y, Wang M, Liu X. Efficacy and safety of metronidazole monotherapy versus vancomycin monotherapy or combination therapy in patients with *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2015; 10: e0137252. doi: 10.1371/journal.pone.0137252

110. Di X, Bai N, Zhang X, et al. A meta-analysis of metronidazole and vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* infection, stratified by disease severity. Braz J Infect Dis. 2015; 19:339-349. doi: 10.1016/j.bjid.2015.03.006

111. Igarashi Y, Tashiro S, Enoki Y, et al. Oral vancomycin versus metronidazole for the treatment *of Clostridioides difficile infection*: meta-analysis of randomized controlled trials. J Infect Chemother. 2018; 24:907-914. doi:10.1016/j. jiac.2018.08.003

112. Sholeh M, Krutova M, Forouzesh M et al (2020) Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control 9(1):158. ttps://doi.org/10.1186/s13756-020-00815-5

113. European Centre for Disease Prevention and Control (2015) European surveillance of *Clostridium difficile infections*. Surveillance protocol version 2.2. ECDC, Stockholm. https://doi. org/10.2900/44795

114. Erikstrup LT, Danielsen TKL, Hall V, Olsen KEP, Kristensen B, Kahlmeter G, Fuursted K. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. Clin Microbiol Infect 2012; 18(8): E266–E272

115. Dingle KE, Didelot X, Quan TP et al. Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. Lancet Infect Dis 2077; 17(4):411–421

116. Baine SD, Wilcox MH. Antimicrobial resistance and reduced susceptibility in *Clostridium difficile*: potential consequences for induction, treatment, and recurrence of C. difficile infection. Antibiotics 2015; 4:267–298.

117. Salazar CL, Reyes C, Cienfuegos-Gallet AV et al. A. Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 591, 106 and 002, the dominant strain types circulating in Medellin, Colombia. PLoS One 2018; 13(4): e0195694

118. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH, EUCLID study group Diversity of Clostridium difficile PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea (EUCLID), 2012 and 2013. Euro Surveill 21(29)

119. Yin C, Chen DS, Zhuge J, McKenna D, Sagurton J et al. Complete genome sequences of four toxigenic *Clostridium difficile*: clinical isolates from patients of the Lower Hudson Valley, New York, USA. Genome Announc 2018; 6(4): e01537–e01517

120. Cheng JW, Liu C, Kudinha T, et al. The tcdA-negative and tcdB-positive *Clostridium difficile* ST81 clone exhibits a high level of resistance to fluoroquinolones: a multi-centre study in Beijing, China. Int J Antimicrob Agents. 2020 Jul;56(1):105981. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105981. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32330584.

121. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011; 377:63–73 47.

122. Chen YB, Gu SL, Shen P et al (2018) Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitals during a 4-year period in China. J Med Microbiol 2018; 67(1): 52–59.