

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Renata Neto Pires

**Diarreia por *Clostridium difficile* em
pacientes críticos e em pacientes
transplantados.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2014

Renata Neto Pires

Diarreia por *Clostridium difficile* em pacientes críticos e em pacientes transplantados.

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Mestre.

Orientador: Dr. Prof. Alessandro Comarú Pasqualotto

**Porto Alegre
2014**

Agradecimentos

Este é um momento muito esperado e sonhado. É uma conquista grandiosa que requer agradecimentos verdadeiros, para pessoas importantes e marcantes nesta trajetória.

Primeiramente agradeço a Deus por me fazer ter fé, coragem e determinação. Agradeço aos meus pais que sempre estão nos bastidores dando o apoio moral e a confiança necessária para não desistir. Agradeço ao meu marido pelo incentivo constante, a paciência dedicada as minhas horas de estudos e, principalmente, à parceria de todos os momentos. Sem eles, provavelmente não teria força e incentivo para continuar seguindo os meus sonhos.

Agradeço aos colegas que sempre confiaram em mim, especialmente à Enfermeira Michele e aos demais colegas do serviço que me apoiaram e foram cúmplices durante esta caminhada. Ora por aceitar trocas de horário, ora por entender minha ausência ou a falta de paciência em razão das dúvidas, medos e cansaço.

Não posso deixar de citar a importante participação da Dra. Teresa, minha chefe no Controle de Infecção Hospitalar, pelo apoio sincero e palavras de confiança. Esse apoio foi o início da realização de um sonho.

E finalmente agradeço ao meu orientador, colega e amigo Dr. Prof. Alessandro, pois ele principalmente acreditou, confiou e fez com que esse sonho se tornasse realidade. Obrigada por todo ensinamento, paciência e parceria.

Dedico a vocês esse trabalho, que foi feito com muito carinho, dedicação e dificuldade. E também, para o meu filho João Pedro, que nasceu na reta final dessa etapa, um anjo, que me deu mais inspiração para continuar.

Sumário

Lista de Abreviaturas	IV
Resumo	V
1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia e fatores de risco	1
1.2. Diagnóstico e tratamento	5
1.3. Materiais e Métodos	9
1.3.1. Desenho do estudo	8
1.3.2. Aspectos Éticos	8
1.3.3. Aspectos Clínicos	9
1.3.4. Aspectos Estatísticos	9
1.3.5. Logística	11
1.3.6. Definição de caso	11
1.3.7. Testes Laboratoriais	11
1.4. Referências Bibliográficas	14
2. Objetivos	19
3. Artigo Científico Redigido em Inglês	20
4. Considerações Finais	28
5. Anexos	30
5.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	31
5.2. Resumo IV Congresso Gaúcho de Infectologia	32
5.3. Resumo IV Congresso Gaúcho de Infectologia	33
5.4. Pôster: XII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar	34
5.5. Ficha de coleta de dados HDVS	35
5.6. Ficha de coleta de dados UTI	37

Lista de abreviaturas utilizadas

C. difficile: *Clostridium difficile*

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CDI: *Clostridium difficile* infection

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HDVS: Hospital Dom Vicente Scherer

HNSC: Hospital Nossa Senhora da Conceição

ICD: Infecção por *Clostridium difficile*

NIH: National Institutes of Health

PCR: Polymerase chain reaction

TcdA: Gene da toxina A

TcdB: Gene da toxina B

TcdC: Gene da toxina C

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

Resumo

Diarreia por *Clostridium difficile* em pacientes críticos e em pacientes transplantados

Introdução: A infecção por *Clostridium difficile* (CDI) está associada a um aumento da mortalidade, internação prolongada e aumento dos custos hospitalares. Entretanto, muito pouco se sabe sobre a epidemiologia da CDI no Brasil. **Objetivo:** Determinar a frequência de CDI e identificar fatores de risco em dois hospitais do Sul do Brasil. **Materiais e métodos:** Estudo prospectivo observacional multicêntrico em que foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, que tiveram 3 ou mais evacuações líquidas ao longo do período de 24 horas, admitidos no Hospital 1: hospital de transplante; e Hospital 2: hospital terciário, incluindo apenas 40 leitos da Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Analisamos a presença de comorbidades, hospitalização e uso de antibióticos prévios (últimos 100 dias), imunossupressão, uso de ácidos supressores. Os pacientes foram considerados como tendo CDI na presença de ELISA positivo, em associação com uma cultura positiva para *C. difficile* ou teste positivo em tempo real. **Resultados:** Foram analisados 96 pacientes no período de 12 meses (2011-2012). A frequência de CDI nesta coorte foi de 8,3% (8/96). A idade média dos pacientes com CDI foi de 62 anos (19-87), a maioria do sexo masculino (n=7, 87,5%). 50% dos pacientes foram transplantados de órgãos sólidos, e 75% eram transplantados de fígado. A mediana do tempo de internação hospitalar até o diagnóstico foi de 35 dias. A mortalidade intra-hospitalar dos pacientes foi de 50% e 39,8% para os pacientes negativos para CDI. Fatores de risco independentes para CDI foram choque séptico na apresentação ($p=0,007$) e transplante de órgão sólido ($p=0,045$). **Conclusão:** Este é o primeiro estudo prospectivo realizado no Brasil. Nossos dados reforçam que *C. difficile* é responsável por um grande número de casos de diarreia nosocomial. O conhecimento da epidemiologia da CDI no ambiente hospitalar é um elemento chave para a implementação de precauções e práticas de segurança.

Palavras-chave: Diarreia; infecção; *Clostridium difficile*; epidemiologia.

1. Introdução

A infecção por *Clostridium difficile* (ICD) é considerada um problema de ocorrência mundial, relatada principalmente nos países desenvolvidos, onde os casos aumentam consideravelmente (Trifilio e cols., 2013). Esses aumentos têm sido observados nos pacientes pediátricos e adultos, sendo que as pessoas idosas têm sido afetadas ainda mais (Fayerberg e cols., 2013). *C. difficile* passou a ser o principal agente etiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde nos Estados Unidos (Dubberke e cols., 2008). A ICD resulta em um aumento da morbidade, hospitalização prolongada, aumento dos custos e mortalidade entre os pacientes infectados (Kasper e cols., 2012). Apesar dos numerosos estudos documentando a epidemiologia de ICD nos países desenvolvidos (Kasper e cols., 2012; Dubberke e Burdette., 2013; Trifilio e cols., 2013; Shaughnessy e cols., 2013; Tschudin-Sutter e cols., 2012; Wang e cols., 2013; Kuntz e cols., 2012), muito pouco é conhecido sobre os casos de ICD nos países da América Latina (Loo e cols., 2005).

1.1 Epidemiologia e fatores de risco

A diarreia por *C. difficile* é a causa mais comum de diarreia nosocomial de origem infecciosa, possuindo um amplo espectro de gravidade, desde casos (portadores) assintomáticos a enterocolite grave e óbito (Hardt e cols., 2008). *C. difficile* é um bacilo anaeróbico, gram-positivo e formador de esporos

(Dubberke e Burdette, 2013). O uso de antibióticos é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da ICD, em razão das alterações da microbiota intestinal (Shaughnessy e cols., 2013). Segundo Dubberke e Burdette (2013), *C. difficile* causa entre 6-25% dos casos de diarreia associada ao uso de antibióticos, mais de 75% dos casos de colite e mais de 90% dos casos de colite-pseudomembranosa associada aos antibióticos.

Segundo Loo e cols.(2005), a ICD foi relacionada a uma mortalidade de 6,9%, após o diagnóstico de 30 dias, e 16,7% após um ano do diagnóstico.

A ocorrência das infecções por *C. difficile* eleva consideravelmente os custos associados à saúde. Em um estudo de Kyne e cols.(2001), o gasto médio associado a pacientes hospitalizados com diarreia por *C. difficile* foi de US\$ 10.500,00 um custo que excedeu em US\$ 3.700,00, aquele empregado para pacientes sem esta infecção. Uma vez no ambiente, os esporos de *C. difficile* são de difícil eliminação, o que pode facilitar transmissão cruzada entre hospedeiros suscetíveis, com potencial para surtos hospitalares (Dancer, 2009). O conhecimento da epidemiologia da ICD é o elemento chave para possibilitar a implementação adequada das precauções e práticas de segurança (Muñoz e cols., 2007).

Embora a epidemiologia das infecções por *C. difficile* seja conhecida principalmente através de estudos conduzidos em países desenvolvidos, os poucos estudos conduzidos no Brasil mostram que este possa ser também um problema em nosso meio. Por exemplo, um estudo realizado na UNIFESP encontrou *C. difficile* como agente etiológico em 44,9% das diarreias

identificadas em 15,8% dos pacientes que internaram na unidade de terapia intensiva (UTI) (Marcon e cols., 2006).

Uso de antibióticos, hospitalização, idade avançada e doença severa estão estabelecidos como fatores de risco para ICD. Um estudo envolvendo 4.143 pacientes revelou que os inibidores de bomba de prótons estão significativamente associados às infecções causadas pelo *C. difficile* (Tschudin-Sutter e cols., 2012). Um recente estudo analisou a inclusão de disfunção renal ou insuficiência renal crônica como um marcador de severidade, e a insuficiência renal foi identificada como um fator independente de mortalidade nos pacientes com ICD (Shah e cols., 2013). Em outro estudo nos Estados Unidos, 13 de 1.000 pacientes internados encontravam-se colonizados ou infectados por *C. difficile* (Balassiano e cols., 2009).

Atualmente, *C. difficile* é considerado uma causa significativa de diarreia em transplantados cardíacos (Muñoz e cols., 2007). De fato, é uma das maiores causas de diarreia em pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos como um todo (Stelzmueller e cols., 2007). Um estudo encontrou que a incidência de ICD em transplantados de fígado varia entre 3-19%, consideravelmente alta diante da incidência esperada para outros pacientes hospitalizados (abaixo de 1%) (Wang e cols., 2013). Um grupo com risco significativo é o de pacientes submetidos a transplante hepático ortotópico, em que a presença de toxinas pode ser detectada em amostras fecais em até 63% dos pacientes com diarreia nosocomial (Kawecki e cols., 2007). A incidência de ICD em pacientes transplantados geralmente é mais alta a partir do terceiro mês após o procedimento, provavelmente em razão da maior exposição aos

antimicrobianos, aumento dos imunossupressores e também pelo aumento da exposição aos cuidados de saúde (Dubberke e Burdette, 2013).

O uso de inibidores de bomba de prótons e antagonistas de H₂ são comuns nos pacientes transplantados e podem ser também significantes fatores de risco para o desenvolvimento do ICD por causarem distúrbios na microbiota gastrointestinal, tornando mais fácil a colonização por *C. difficile* (Dubberke e Burdette, 2013).

Contudo, o mínimo proposto pelo SHEA-IDSA *Guideline* (2010) para a vigilância do ICD é coletar dados na internação e nos casos de ICD associados à assistência à saúde, visando conhecer o desfecho dos casos e monitorar a segurança dos pacientes. É importante ter a vigilância de ICD para determinar as taxas de ICD e fornecer um indicador para assegurar os pacientes e a instituição de saúde (Dubberke e cols., 2008).

As recomendações da SHEA-IDSA *Guideline* (2010) para manter a segurança dos pacientes e prevenir transmissão cruzada de *C. difficile* são baseadas em: cuidados na higienização das mãos dos profissionais e visitantes; uso da paramentação de barreira completa na precaução de contato por parte dos profissionais da saúde; quarto individual, quando possível; desinfecção de artigos e equipamentos e descontaminação do ambiente.

É importante que os profissionais do controle de infecção hospitalar sejam capazes de identificar pacientes com ICD o mais precocemente possível, para iniciar a precaução de contato em tempo hábil e calcular a taxa desta infecção no hospital (Dubberke e cols., 2008).

1.2. Diagnóstico e Tratamento

Sabe-se que a doença diarreica é a maior causa de morbidade nos países desenvolvidos e causa 12.600 mortes em crianças por dia na América Latina (Balassiano e cols., 2012).

O diagnóstico rápido e acurado das infecções por *C. difficile* é essencial para que haja um adequado manejo dos pacientes, para a instituição de medidas de controle de infecção e para monitorização epidemiológica. O ensaio de toxina fecal para neutralização de citotoxina em cultura celular é considerado o padrão-ouro para fins diagnósticos. Contudo, o resultado deste exame pode demorar até 72 horas, é trabalhoso e requer pessoal altamente treinado (Delmée e cols., 2005). Além disso, o teste não é adequadamente padronizado e sua interpretação é subjetiva (Wilkins e Lysterly, 2003). A maioria dos laboratórios tem utilizado como diagnóstico os testes de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) comercialmente disponíveis para as toxinas A e B (Barbut e cols., 2003).

O teste diagnóstico ideal deve ser altamente sensível e específico, mas também fácil e rápido de ser realizado. A detecção da toxina de *C. difficile* por ELISA permanece amplamente utilizada como um teste de diagnóstico para a ICD, mas dados recentes mostram que os ensaios de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) são muito mais sensíveis neste contexto (Deshpande e cols., 2011).

A PCR parece preencher plenamente esses critérios. Para o gene da toxina B (*tcdB*), que é essencial para desencadear a doença, a PCR tem um limite de detecção de 1×10^5 células de *C. difficile* por grama de fezes, com

uma sensibilidade de 100% e especificidade de 95%. Além disso, o resultado pode ser disponibilizado em menos de 4 horas (Van den Berg e cols., 2006; Barbut e cols., 2009). A PCR também permite o diagnóstico da cepa hipervirulenta, ribotipo 027, com valores preditivos negativos e positivos superiores a 90% (Sloan e cols., 2008).

A recomendação preconizada por SHEA-IDSA *Guideline* (2010), em relação ao teste diagnóstico para a detecção do *C. difficile*, é a realização do mesmo somente na presença de fezes diarreicas, sendo a cultura das fezes considerada o teste mais sensível para fins de estudos epidemiológicos. No entanto, o teste de PCR é mais rápido, sensível e específico, sendo encorajado sempre que possível.

O tratamento para ICD representa um grande desafio, devido à alta prevalência e a significativa taxa de recorrência. A infecção por *C. difficile* recorre em mais de 25% dos casos após o tratamento com metronidazol e vancomicina. Alguns estudos já reportam o transplante fecal como tratamento efetivo para os casos de ICD recorrente (Zanella Terrier e cols., 2013). O uso de tratamento múltiplo e tempo prolongado de exposição aos antimicrobianos também são considerados como fator de risco para ICD. No entanto, alguns estudos encontraram que 80% dos pacientes transplantados que desenvolveram ICD tiveram uso recente de antimicrobianos (Bignardi, 1998).

A severidade da ICD é dividida em três categorias: média a moderada, severa e complicada (Cohen e cols., 2010). ICD média a moderada caracteriza-se por paciente com dor abdominal e mínimos sintomas sistêmicos; ICD severa inclui dor abdominal, leucocitose e febre, além de outros sintomas sistêmicos e diarreia; ICD severa com complicações inclui os sintomas de doença severa

acompanhada por íleo paralítico, megacólon tóxico, hipotensão refratária e/ou insuficiência de múltiplos órgãos secundários à ICD (Cohen e cols, 2010).

Descontinuar as terapias e minimizar a frequência e duração dos antimicrobianos ainda são as medidas mais indicadas para a redução do risco de ICD. Metronidazol é a droga de escolha para a infecção média a moderada, enquanto vancomicina oral é a terapia preferida para ICD severa (Dubberke e Burdette, 2013). Nos estudos randomizados de Sheinfeld e Biggers (2008), a vancomicina apresentou melhor resultado na cura dos casos severos de ICD (85-97%), enquanto que o metronidazol oral teve uma menor porcentagem de cura (65-76%).

No estudo de Shaughnessy e cols. (2013), o risco de ICD recorrente foi alto entre os pacientes que receberam antibióticos desnecessariamente (17/36 [47%]). Segundo o mesmo autor, pneumonia em pacientes na UTI costuma ser a principal razão de uso inadequado de antimicrobianos, fato demonstrado também por diversos outros estudos.

Um estudo brasileiro descreveu uma mortalidade hospitalar de 27,6% em pacientes internados em terapia intensiva com diarreia por *C. difficile*, além de identificar como preditores independentes de mortalidade o Escore SOFA no início do quadro infeccioso e a idade do paciente. Neste estudo, não se utilizou a PCR como método diagnóstico (Marra e cols, 2007).

Em dezembro de 2005, foi descrito pelo *National Institutes of Health (NIH)/Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, uma nova cepa hipervirulenta de *C. difficile*. Esta cepa é mais resistente às quinolonas (Loo e cols., 2005) e tem emergido como uma causa de epidemias de diarreia associada a antibióticos no Canadá, Estados Unidos e Europa. A apresentação

tem sido descrita como uma doença mais grave, frequentemente evoluindo a megacólon tóxico (Hookman e Barkin, 2009). A cepa é denominada NAP1, BI ou ribotipo 027 toxinotipo III, todos sinônimos. Produz níveis significativamente mais elevados das toxinas A e B, assim como uma nova toxina binária, de ação desconhecida, mas provavelmente implicada na sua maior toxicidade. As epidemias por esta bactéria são difíceis de controlar e parecem estar associadas ao uso indiscriminado de antimicrobianos do grupo das quinolonas e cefalosporinas (Barbut e cols., 2009). A elevada produção das toxinas A e B parece estar relacionada a uma deleção no gene *tcdC*, um gene regulatório dos genes *tcdA* e *tcdB*, que codificam as toxinas A e B, as quais são citotóxicas e enteropáticas (Rupnik e cols., 1998). O único estudo realizado no Brasil não encontrou o ribotipo 027 e nenhuma deleção significativa no gene *tcdC* (Balassiano e cols., 2009). No entanto, um número pequeno de pacientes foi avaliado nesse estudo.

Na busca dos dados publicados de ICD, observa-se que temos poucos dados na América Latina em comparação aos países desenvolvidos. Não temos conhecimento da epidemiologia do *Clostridium difficile*, o que resulta em falta de prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde, na disseminação de casos, aumento dos custos hospitalares e crescente morbimortalidade.

De acordo com o aumento da incidência de ICD nos países desenvolvidos, procuramos investigar a frequência dessas infecções no Brasil, mais especificamente na região Sul, em relação à epidemiologia e fatores de risco de pacientes adultos transplantados e criticamente enfermos não

transplantados. Sabemos que esses pacientes são considerados suscetíveis a adquirir doenças, no entanto não conhecíamos o perfil epidemiológico desses pacientes, e tínhamos interesse em confirmar resultados com outros testes laboratoriais além do teste ELISA, que é a rotina diagnóstica em ambos os hospitais.

1.3. Materiais e Métodos

1.3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo observacional multicêntrico. Foram estudados pacientes internados na UTI clínico-cirúrgica de adultos de um hospital terciário, com 40 leitos (Hospital Nossa Senhora da Conceição, HNSC, Grupo Hospitalar Conceição), e de hospital de referência em transplantes de órgãos, com 65 leitos (Hospital Dom Vicente Scherer, HDVS). Ambas as instituições são localizadas em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos, admitidos em uma das unidades participantes do estudo e que apresentassem três ou mais evacuações líquidas ao longo de um período de 24 horas, a qualquer momento da internação.

1.3.2. Aspectos éticos

Este projeto foi submetido para a apreciação e aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições participantes (Parecer ISCMPA: 304/010). A participação dos pacientes neste projeto apenas se deu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). Os pacientes e/ou familiares receberam esclarecimentos acerca dos exames a

serem realizados, bem como dos objetivos gerais da pesquisa, e a condução deste estudo esteve de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos: Resolução CNS 466/2012.

1.3.3. Aspectos clínicos

A coleta de dados contemplou a obtenção de informações relacionadas aos dados demográficos e clínicos dos pacientes avaliados neste estudo. Foram registrados variáveis demográficas, presença de co-morbidades, internações e uso de antibióticos nos últimos 100 dias, tempo entre o transplante e o quadro de diarreia, imunossupressão utilizada, uso de supressores da produção de ácido gástrico, permanência na UTI e no hospital, e mortalidade hospitalar (observada). Os exames laboratoriais (já realizados na rotina destes pacientes) incluíram leucograma, proteína C-reativa e albumina sérica, obtidos, se disponíveis, no dia da coleta das fezes para pesquisa de *C. difficile*. Além disso, as terapias empregadas para o tratamento da infecção por *C. difficile* foram documentadas.

1.3.4. Aspectos estatísticos

Estatística descritiva foi utilizada para descrever os achados deste estudo. Variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Variáveis quantitativas foram comparadas através do teste T de Student ou teste U de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados. Valores de p alfa menores ou iguais a 5% foram considerados estatisticamente significativos. Variáveis associadas com valores p menores que 0,20 à análise univariada foram selecionadas para inclusão no modelo multivariado, construído para predição de variáveis independentemente

associadas com risco de morte ou recorrência. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa SPSS, versão 19.0.

1.3.5. Logística

As amostras foram coletadas no GHC e HDVS e enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa. As amostras foram armazenadas a 2-5°C por até 48h, e em seguida aliquotadas em três novos recipientes, identificados apenas com um número de estudo, sem ligação com dados do paciente. Quando não era possível a realização imediata dos testes, as amostras eram congeladas a -80 °C.

1.3.6. Definição de caso

Foi considerado caso de ICD quando fora obtido primeiramente resultado positivo para o teste ELISA, e após um resultado positivo para um dos dois testes laboratoriais, PCR e/ou cultura. As amostras que positivaram somente em um desses testes laboratoriais separadamente não foram consideradas casos.

1.3.7. Testes laboratoriais

ELISA

Para a detecção das toxinas A e B utilizou-se kit comercial (Premier Toxins A&B - Meridian Bioscience). Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As lavagens foram realizadas em uma lavadora de microplacas automatizada (ImmunoWash™ 1575 - Biorad). As leituras foram realizadas em um leitor automático de Microplacas (iMark™ - Biorad), utilizando um comprimento de onda de 450nm.

Cultura

As amostras foram inoculadas com alças descartáveis de 1/μL em meio seletivo *Clostridium difficile* agar (CLO), (bioMérieux), utilizando-se a técnica de esgotamento. As placas foram incubadas em anaerobiose em ambiente de anaerobiose (Anaerocult A, Merck KGaA) a 37°C por 36h. As colônias de *C. difficile* apresentam morfologia típica (aparência de “vidro quebrado”).

Extração do DNA bacteriano

O DNA foi extraído utilizando-se um kit comercial (QIAamp DNA Stool Mini Kit – Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A temperatura para lise bacteriana foi alterada de 70°C para 95°C. Após a extração, os DNAs foram armazenados a -80°C até o processamento. A concentração do DNA e sua pureza foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop® 2000, analisando a razão de DO 280/260nm.

PCR em tempo real (*in house*) para detecção do gene da toxina B (*tcdB*)

Para a reação da qPCR utilizou-se *primers* específicos e sonda *molecular beacons* específica, ambos cedidos pelo Public Health Research Institute (PHRI, New Jersey). As reações foram otimizadas para um volume de 25μL, com 0,4μM de cada primer, 6mM de magnésio, 0,5μM de *molecular beacon* (sequência protegida por patente), 12,5μL de Platinum Quantitative PCR Supermix-UDG, 5μL de DNA genômico e H₂O milliQ. As condições empregadas foram: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. O

limite de detecção foi determinado através de diluição seriada dos controles positivos. Em todas as reações utilizaram-se controles positivos (produto de PRC com 1185pb) e negativos (H₂OmilliQ).

Resultados discordantes

Todos os resultados discordantes foram repetidos para minimizar as chances de erro devido ao processamento das amostras.

1.4. Referências bibliográficas:

Balassiano IT, Miranda KR, Boente RF, Pauer H, Oliveira ICM, Santos-Filho J, *et al.* Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*. 2009 Jun;15(3):61-4.

Balassiano IT, Yates EA, Domingues RMCP, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*. 2012 Feb;61(pt 2):169-79.

Barbut F, Braun M, Burghoffer B, Lalande V, Eckert C. Rapid diagnosis of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr;47(4):1276-7.

Barbut F, Delme'e M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, *et al.* A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Oct;9(10):989-96.

Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect*. 1998;40:1-15.

Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Disease Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010 May;31(5):431-55.

Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):378-85.

Delmée M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a plea for culture. *J Med Microbiol*. 2005 Feb;54:187-91.

Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DD, Jan A, Deshpande N, Pant C, *et al.* Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2011 Oct;53(7):e81-90.

Dubberke ER, Burdette SD and the AST Infectious Diseases Community of Practice. *Clostridium difficile* infections in solid organ transplantation. Am J Transplan. 2013;13:42-49.

Dubberke ER, Gerding DN, Classen D, Arias KM, Podgorny K, Anderson DJ, *et al.* Estratégias para prevenção de infecções por *Clostridium difficile* em hospitais de cuidados agudos. Infect Control and Hosp Epidemiol. 2008;29:901-94.

Fayerberg E, Bouchard J, Kellie SM. Knowledge, attitudes and practice regarding *Clostridium difficile*: A survey of physicians in an academic medical center. Am J Infection Control. 2013 Mar;41(3):266-9.

Hardt C, Berns T, Treder W, Dumoulin FL. Univariate and multivariate analysis of risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea: importance of co-morbidity and C-reactive protein. World J Gastroenterol. 2008 Jul;14(27):4338-41.

Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. World J Gastroenterol 2009 Apr;15(13):1554-80.

Kasper AM, Nyazee HA, Yokoe DS, Mayer J, Mangino JE, Khan YM, *et al.* A multicenter study of *Clostridium difficile* infection – related colectomy, 2000-2006. Infect Control and Hosp Epidemiol. 2012 May;33(5):1-13.

Kawecki D, Chmura A, Pacholczyk M, Lagiewska B, Adadynski L, Wasiak D, *et al.* Detection of *Clostridium difficile* in stool samples from patients in the early period after liver transplantation. Transplant Proc. 2007 Nov;39(9):2812-5.

Kyne L, Farrel RJ, Kelly CP. *Clostridium difficile*. Gastroenterol Clin North America. 2001;30:753-75.

Kuntz JL, Johnson ES, Raebel MA, Petrik AF, Yang X, Thorp NL, *et al.* Epidemiology and healthcare costs of incident *Clostridium difficile* infections identified in the outpatient healthcare setting. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012 Oct;33(10):1031-8.

Loo VG, Poirier L, Miller MA, Ouqthon M, Libman MD, Michaud S, *et al.* A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Eng J Med. 2005 Dec;353(23):2442-9.

Marcon AP, Gamba MA, Vianna LA. Nosocomial Diarrhea in the Intensive Care Unit. Braz J Infect Dis. 2006 Dec;10(6):384-9.

Marra AR, Edmond MB, Wenzel RP, Bearman GM. Hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated disease in the intensive care unit setting: epidemiology, clinical course and outcome. BMC Infectious Diseases. 2007 May;7:42.

Muñoz P, Giannella M, Alcalá L, Sarmiento E, Fernandez Yañes J, Palomo J, *et al.* *Clostridium difficile*-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer? J Heart Lung Transplant. 2007 Sep;26(9):907-14.

Rupnik M, Avesani V, Janc M, Von Eichel-Streiber C, Delmée M. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. J Clin Microbiol. 1998 Aug;36(8):2240-7.

Scheinfeld N, Biggers K. Tolevamier, an orally administered, toxinbinding polymer for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Curr Opin Investig Drugs. 2008 Aug;9(8):913-24.

Shah DN, Bhatt NS, Welch JK, Koo HL, Garey KW. Defining acute renal dysfunction as a criterion for the severity of *Clostridium difficile* infection in patients with community-onset vs hospital-onset infection. J Hosp Infect. 2013 Apr;83(4):294-99.

Shaughnessy MK, Amundson WH, Kuskowski MA, DeCarolis DD, Johnson JR, Drekonja DM. Unnecessary antimicrobial use in patients with current or recent *Clostridium difficile* infection. Infect Control and Hosp Epidemiol. 2013 Feb;34(2):109-16.

Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of Real-Time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol. 2008 Jun;46(6):1996-01.

Stelzmueller I, Goegele H, Biebl M, Wiesmayr S, Berger N, Tabarelli W, *et al.* *Clostridium difficile* colitis in solid organ transplantation-a single-center experience. Dig Dis Sci. 2007 Nov;52(11):3231-6.

Trifilio SM, Pi J, Mehta J. Changing Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease during stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 19.2013;405-409.

Tschudin-Sutter S, Widmer AF, Perl TM. *Clostridium difficile*: novel insights on an incessantly challenging disease. Curr Opin Infect Dis. 2012 Aug;25(4):405-11.

Van den Berg RJ, Kuijper EJ, Van Coppenraet LE, Claas EC. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2006 Feb;12(2):184-6.

Zanella Terrier MC, Frossard JL, Simonet ML. Recurrent *Clostridium difficile* infections: the importance of the intestinal microbiota. Rev Med Suisse. 2013 Oct ;9(402):1898,1900-4.

Wang MS, Evans CT, Rodriguez T, Gerding DN, Johnson S. *Clostridium difficile* Infection and limitations of markers for severity in patients with hematologic malignancy. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013 Feb;34(2):127-32.

Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. J Clin Microbiol. 2003 Feb;41(2):531-4.

2. Objetivos

- Determinar a frequência de *Clostridium difficile* como agente etiológico das diarreias nosocomiais infecciosas em pacientes transplantados e em pacientes criticamente enfermos não transplantados;
- Identificar fatores de risco clínico-epidemiológicos associados ao diagnóstico de infecção por *Clostridium difficile*.

3. Artigo

Aceito na revista *American Journal of Infection Control* em 11 de novembro de 2013. Manuscrito: AJIC-D-13-00401

Publicado 24 de fevereiro de 2014.

***Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem?**

Renata N. Pires, RN^{1,2}; Alexandre A. Monteiro¹, Lilian C. Carneiro, PhD¹; Ludmila F.

Baethgen, PhD¹; Rejane Tavares, PhD⁵; Carla S. Lincho, MD³; Steven Park⁴; David Perlin,

PhD⁴; Edison M. Rodrigues Filho, MD^{2,3}; Alessandro C. Pasqualotto, MD PhD^{1,2}

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, PPG Patologia, Porto Alegre, RS, Brazil;

2. Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

3. Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil;

4. Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, New Jersey, NJ, USA;

5. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Correspondence: Alessandro C. Pasqualotto, Molecular Biology Laboratory, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Av Independência 155, 8º andar, 90035-075, Porto Alegre, Brazil. Tel: +55 51 99951614; Fax: +55 51 32137491; e-mail: pasqualotto@ufcspa.edu.br

Abstract

The epidemiology of *Clostridium difficile* infection (CDI) is virtually unknown in Brazil. In this prospective study, 8.3% of patients with nosocomial diarrhea were

found to have toxigenic strains of *C. difficile* in their feces. The relevant risk factors for CDI were receipt of solid organ transplantation and septic shock.

Clostridium difficile infection (CDI) is the leading infectious cause of nosocomial diarrhea in the developed world (1). CDI is associated with an increased morbidity, prolonged hospitalization and increased costs (2). However, very little is known about the epidemiology of CDI in Latin American countries (3). The incidence of CDI may actually be underestimated in these areas. Here we investigated the frequency of CDI in a cohort of patients attending two large hospitals in Brazil. Risk factors for CDI were characterized.

METHODS

This was a multicenter prospective observational study in which patients admitted in two large teaching hospitals, located within a 4 miles radius in Porto Alegre, Southern Brazil, were included. Hospital 1 is a transplant hospital with 65 beds; Hospital 2 is a tertiary hospital with 800 beds, including 40 beds in the intensive care unit (ICU). Adult (>18 years-old) patients showing >3 liquid stools over a 24 h period were considered for inclusion. For hospital 2, only patients admitted to the ICU were studied. Participation in the study was conditioned to the signature of an informed consent.

A standardized clinical report form was used for data collection. Clinical and demographic data were obtained, including the presence of co-morbidities, previous (last 100 days) hospitalizations and antibiotic use, immunosuppression, receipt of chemotherapy and use of acid suppressors.

Laboratory results performed on the day patients entered the study were also recorded.

For the purposes of this study, patients were considered as having CDI in the presence of a positive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for toxins A and B (Premier Toxins A & B, Meridian Bioscience), in association with either a positive culture for *C. difficile* (*C. difficile* agar – CLO, bioMérieux®) or positive real-time polymerase chain reaction (qPCR) test. All tests were performed in fresh fecal samples. DNA was extracted from stools using a commercial kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit-Qiagen). qPCR tests were performed with specific primers and probes (molecular beacons) aiming for the *tcdB* gene, both provided by the Public Health Research Institute (PHRI, NJ, USA). The qPCR assays were performed on an ABI 7500 thermocycler (Applied Biosystems). All reactions contained both negative (water) and positive controls (a specific 1185 bp PCR product of the *tcdB* gene).

In this study, two groups of patients were compared: patients with diarrhea due to *C. difficile* infection and patients with diarrhea due to other causes. Categorical variables were compared with chi-square or Fisher's exact test. Quantitative variables were treated with t Student or U Mann-Whitney test. P values of <0.05 were considered statistically significant. Variables associated with p values of <0.20 at univariate analysis were selected for inclusion in the multivariate model, using Enter selection. Data analysis was performed with SPSS, version 19.0.

RESULTS

A total of 96 patients were studied over a 12-month period (2011-2012). Of these, 60 were men (62.5%), with a median age of 63 years old (range, 19-94).

Most patients were in hospital 2 (n=67, 69.8%). The median length of hospital stay was 68.5 days (range, 7-339). Twenty four patients were solid organ transplant recipients. Twenty five patients (26.0%) received immunosuppressive drugs. The use of proton pump inhibitors was identified in 54 (56.3%), and 65 (67.7%) received opiates.

The frequency of CDI in this cohort was 8.3% (8/96). Median age of patients with CDI was 62 years old (range, 19-87) and the majority was male (n=7, 87.5%). Table 1 shows a comparison of risk factors for CDI in patients with nosocomial diarrhea. In CDI group, four patients (50.0%) were solid organ transplant recipients, and 75.0% had undergone a liver transplantation. Only one patient (12.5%) had community- and healthcare-associated CDI. Immunosuppressive therapy were used in 50.0% (n=4) and 50.0% (n=4) also received opiates.

Median length of hospital stay before the diagnosis of CDI was 35 days. Among transplant patients, the incidence of *C. difficile* was 17.2% (n=5), while in critically ill patients the incidence of CDI was 4.5% (n=3). The in-hospital mortality of CDI was 50.0%, in comparison to 39.8% for CDI-negative patients (p=0.418).

Table 2 shows the results for the multivariate analysis for risk factors for CDI. Independent risk factors for CDI were septic shock at presentation (p=0.007) and solid organ transplantation (p=0.045).

DISCUSSION

In this study, the frequency of CDI was 8.3% in patients with healthcare-associated diarrhea. This is the first prospective study conducted in Brazil aimed to determine the frequency of CDI in adult critically ill patients and

transplant recipients. Most of these studies that have been conducted so far in Brazil included only children (3,4) with limited data being available for adults (5). Even though CDI is a major problem in the hospital setting, several risk factors for community-acquired CDI have been identified (6). Using a standard definition for community-acquired CDI (7) (i.e., disease occurring within 48 hours of hospitalization), only one patient in our study was found to satisfy this criterion.

C. difficile toxin detection by ELISA remains largely employed as a diagnostic test for CDI, but recent data have shown that qPCR is far more sensitive in this context (8). Conversely, we observed that the detection of *C. difficile* toxins by ELISA had a greater clinical relevance and it may have a reduced cost, in comparison to qPCR. Among the main findings of this study are the identification of independent risk factors for CDI, including septic shock at disease presentation and receipt of a solid organ transplant. A recent study analyzed the inclusion of renal dysfunction or chronic renal failure as a marker of severity and renal dysfunction was identified as an independent predictor of mortality in CDI patients (9). Another study found that the incidence of CDI in liver recipients ranged between 3-19%, considerably higher than the expected incidence for other hospitalized patients (i.e., below 1%) (1).

Our study had some limitations. In special, some cases went missing during the study mostly due to unawareness of health care workers on the actual incidence of CDI in our population, resulting in a delay or no communication of suspicions cases.

Our data reinforce the results of other studies in which *C. difficile* was responsible for a large number of cases of nosocomial diarrhea. The major relevance of the study relies on providing epidemiological data for CDI, an infection that has been largely neglected in Latin America. Among patients with diarrhea, the identification of patients at high risk for CDI such as those with septic shock and solid organ transplant recipients may facilitate the implementation of infection control measures, until a proper diagnosis of CDI is performed. qPCR has demonstrated high sensitivity in screening patients with diarrhea for CDI.

Acknowledgements

We are grateful to all of those who were involved in sample collection and patient recruitment, particularly Marion W. Trombetta and Daniela Branco.

Financial support

This study was supported by an independent research grant by MSD.

Potential conflicts of interest

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

REFERENCES

1. Dubberke ER, Burdette SD and the AST Infectious Diseases Community of Practice. *Clostridium difficile* infections in solid organ transplantation. Am J of Transplant 2013; 13:42-49

2. Graf K, Cohrs A, Gastmeier P, et al. An outbreak of *Clostridium difficile* associated disease (CDAD) in a German university hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 543-545.
3. 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.
4. Alcides AP, Brazier JS, Pinto LJ, et al. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek 2007; 92: 53-59.
5. Balassiano IT, dos Santos- Filho J, Vital- Brasil JM, 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: 249-255.
6. Trifilio SM, Pi J, Mehta J. Changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease during stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2013; 19: 405-409.
7. APIC Guide to preventing *Clostridium difficile* infections. Association for professionals in infection control and epidemiology 2013.
8. Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DD, et al. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2011; 53:e81-e90.
9. Shah DN, Bhatt NS, Welch JK, Koo HL, Garey KW. Defining acute renal dysfunction as a criterion for the severity of *Clostridium difficile* infection in

patients with community-onset vs hospital-onset infection. *J Hosp Infect* 2013; 83: 294-299.

Table 1. Univariate analysis of risk factors for *C. difficile* infection (CDI) among patients with nosocomial diarrhea

Characteristics	Non-CDI n (%)	CDI n (%)	P value
Age, median (range), years	63 (19-94)	62 (19-87)	0.96
Sex, male	53 (60.2%)	7 (87.5%)	0.25
Admission to the transplant hospital	24 (27.3%)	5 (62.5%)	0.05
Chronic renal failure on hemodialysis	15 (17.0%)	2 (25.0%)	0.63
Solid organ transplantation	20 (22.7%)	4 (50.0%)	0.10
Immunosuppressive therapy	21 (23.9%)	4 (50.0%)	0.20
Previous antibiotic use	84 (87.5%)	5 (62.5%)	0.06
Use of opiates	61 (70.1%)	4 (50.0%)	0.26
Previous surgery	47 (53.4%)	7 (87.5%)	0.08
Use of H2 receptor antagonists	48 (55.2%)	2 (25.0%)	0.14
Use of proton-pump inhibitors	49 (59.0%)	5 (62.5%)	1.00
Septic shock at presentation	6 (6.8%)	3 (37.5%)	0.03

Table 2. Multivariate analysis of risk factors for *C. difficile* infection.

Variables	P value	Odds ratio	95% Confidence Interval
Septic Shock at presentation	0.01	14.6	2.09 - 102.13
Solid organ transplantation	0.04	6.1	1.04 - 35.63

4. Considerações finais

Diferentemente dos países desenvolvidos, o Brasil tem poucos dados de ICD publicados, o que limita a instalação de medidas efetivas de controle de infecção hospitalar.

Este estudo possibilitou-nos conhecer a frequência de ICD na população adulta transplantada e criticamente enferma, assim como os fatores de risco para a infecção nesses dois grupos de pacientes. Apesar de alguns fatores de risco já serem comuns a toda a população, verificamos que o paciente transplantado apresenta um maior risco de desenvolver infecção por *C. difficile*.

Este estudo fez parte de um projeto maior que objetivou também analisar três métodos diagnósticos para ICD (ELISA, PCR e cultura). Ambos os trabalhos foram enviados e aceitos em revistas, tendo sido também apresentados em congressos de Infectologia e de Controle de Infecção.

Com os resultados obtidos no estudo, documentamos a presença de casos de ICD nos dois hospitais e nos dois grupos de pacientes estudados. Esses pacientes com diagnóstico de ICD eram idosos, com mediana de 62 anos e a maioria homens; a metade desses pacientes fez uso de antibióticos previamente. Verificamos que, no grupo de pacientes com ICD, a metade deles eram pacientes transplantados de órgãos sólidos, sendo que predominou o transplante de fígado, o que corrobora os dados das publicações pesquisadas. Outro importante fator de risco verificado no estudo foi o paciente encontrar-se em estado grave, com choque séptico na coleta da amostra.

Tivemos, porém, limitações durante o estudo, incluindo a perda de dados em prontuários, limitando a análise de fatores de risco, e a ausência de um método de vigilância de ICD para acompanhamento dos casos.

O problema de infecção por *C. difficile* existe no Brasil e precisa ser mais estudado no nosso meio. Torna-se necessário um projeto futuro em ambas as instituições, como um protocolo de vigilância de ICD, treinamento dos profissionais para reconhecer os possíveis casos, através da epidemiologia e fatores de risco, e programar um fluxo para testes diagnósticos, tais como, PCR, por ser sensível e rápido, e o ELISA para detectar as toxinas A e B.

5. ANEXOS

5.1 Anexo

Projeto: Diarréia por *Clostridium difficile* em pacientes críticos e em pacientes transplantados

Pesquisadores: Renata Neto Pires, Alexandre Monteiro, Edson Moraes Rodrigues Filho, Teresa Cristina T. Sukiennik, Vinicius Daudt, Huander Felipe Andreolla, Alessandro C. Pasqualotto

Pesquisador Responsável: Alessandro C. Pasqualotto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Sr(a).:

O Sr(a) está sendo convidado para participar de um estudo por estar com diarréia. Este estudo visa melhor conhecer os casos de diarréia causados por *Clostridium difficile*, uma bactéria que pode ser transmitida dentro do hospital para outros pacientes. Hoje não dispomos de testes para identificar esta bactéria, que pode ser uma causa importante de diarréia em pacientes internados na UTI ou que realizaram algum tipo de transplante. Caso o(a) senhor(a) concorde em participar, necessitaremos colher uma amostra de suas fezes para realizar os devidos testes para a pesquisa da bactéria (Pesquisa molecular e ELISA).

O Sr(a). é livre para escolher participar ou não deste estudo, e a sua recusa não implicará nenhum prejuízo no seu tratamento. As informações obtidas estarão à sua disposição ou ao seu médico se assim o desejar. Salientamos que todos os exames realizados neste estudo serão financiados pelo projeto, o que não acarretará em custos adicionais para o paciente ou para o hospital. Preservaremos também sua identidade ao longo de todos os processos envolvidos neste estudo.

Em caso de dúvidas, o Sr(a) poderá entrar em contato com o investigador principal deste projeto, Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto, através do fone (51) 99951614. O Comitê de Ética da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre também poderá ser consultado através do fone (51) 3214 8571, caso se faça necessário.

Se o(a) Sr(a) estiver de acordo em participar desta pesquisa, formalize sua vontade através da assinatura do consentimento abaixo:

“Estou de acordo em participar deste estudo e autorizo a coleta a dos materiais biológicos acima citados bem como autorizo o acesso da equipe ao meu prontuário médico para registro das informações necessárias ao estudo”.

Assinatura do paciente: _____ Data: ____/____/20____

Assinatura da testemunha (se necessário): _____ Data: ____/____/20____

Assinatura do Pesquisador: _____ Data: ____/____/20____

5.2 Anexo



1.

DISCREPÂNCIAS ENTRE QUATRO ENSAIOS DE DETECÇÃO LABORATORIAL DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

(1)Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; (2)Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; (3)Hospital Nossa Senhora da Conceição;
(1)Monteiro, AA; (2)Pires, RN; (1)Baethgen, LF; (1)Carneiro, LC ; (1)Zandoná, MR ; (3)Lincho, CS;
(1)Trombetta, MW; (1)Tavares, RG ; (2)Filho, EMR; (1,2)Pasqualotto, AC;

Introdução: *C. difficile* (CD) é o principal agente infeccioso causador de diarreia no ambiente hospitalar. Embora diversos testes estejam disponíveis para o diagnóstico da infecção por CD, a interpretação dos resultados obtidos por diferentes ensaios pode ser de difícil tarefa. As toxinas A e B produzidas pela bactéria são os principais fatores de virulência, entretanto nem todos os CD são toxigênicos. O diagnóstico laboratorial vem sendo realizado através de imunoenaios enzimáticos (EIA) que detectam os tipos toxigenicos, mas possuem baixa especificidade e sensibilidade, por sua vez a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem demonstrado ser bastante sensível e específica, mas não detecta somente os tipos toxigenicos. Estas discrepâncias significativas no desempenho dos métodos deve ser melhor estudada, pois não existem recomendações e diretrizes consistentemente claras. **Objetivos:** neste estudo, foi analisado o desempenho e discrepâncias de quatro ensaios laboratoriais para a detecção de CD em pacientes diarreicos de dois grandes hospitais de Porto Alegre. **Material e Métodos:** para a presente avaliação foram analisados os resultados laboratoriais de 31 pacientes. Foram incluídos no estudo pacientes >18 anos admitidos nas enfermarias ou UTI do Hospital Dom Vicente Scherer (Santa Casa de Porto Alegre) ou na UTI do Hospital Nossa Senhora da Conceição e que tivessem 3 ou mais evacuações líquidas ao longo de 24 h. As metodologias utilizadas foram: detecção por imunocromatografia do antígeno para glutamato desidrogenase (*C. Diff Quik Chek Complete*), detecção por ELISA de antígeno para as toxinas A e B (*C. Diff Quik Chek Complete e Premier Toxins A&B*), além do ensaio molecular in house (PCR em tempo real) e cultura em meio seletivo para CD (*Biomeriëux*). Os resultados foram classificados nas seguintes categorias: (i) caso laboratorialmente confirmado (cepa toxigênica); (ii) caso provável de infecção (pacientes com provável cepa toxigênica ou excretor de isolado não-toxigênico) e (iii) pacientes negativos laboratorialmente. **Resultados e Conclusões:** segundo as categorias laboratoriais estabelecidas, cinco casos (16,1%) foram confirmados (PCR e/ou cultura positivos, com ELISA positivo); 16 casos (51,6%) foram classificados como casos prováveis, para os quais os métodos detectam a presença da bactéria, mas não é possível confirmar a presença da toxina (PCR e/ou cultura e/ou teste imunocromatográfico positivos, com ELISA negativo). Os demais 10 pacientes (32,3%) foram considerados negativos para a presença de CD (todos os testes negativos ou apenas ELISA positivo, sugerindo resultado falso-positivo). Os resultados encontrados para as amostras testadas neste estudo estão de acordo com a literatura, onde o teste de PCR é apontado como o mais sensível e específico para o diagnóstico da infecção por CD, possibilitando uma adoção mais acurada de medidas de controle de infecção hospitalar.

* Resumos aprovados pela Comissão Científica para apresentação no formato PÔSTER.

** O responsável pelo cadastro do trabalho no site receberá informações sobre tamanho do pôster, data e horário da apresentação através do e-mail cadastrado no site no momento do envio do trabalho resumo.

*** A numeração do trabalho corresponde ao local onde deverá fixado na área de exposição.

5.3 Anexo



36.

DIARRÉIA POR CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM PACIENTES CRÍTICOS E EM TRANSPLANTADOS

(1)Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,(2)Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre,(3)Grupo Hospitalar Conceição.

Pires, R.N.(1,2); Monteiro, A.(1); Lincho, C.S.(3); Baethgen, L.(1); Carneiro, L.C. (1); Trombetta, M.W.(1); Rodrigues, E.M. (2, 3); Pasqualotto, A. C.(1,2);

INTRODUÇÃO: Clostridium difficile é a causa mais comum de diarreia nosocomial infecciosa, podendo a infecção possuir um amplo espectro de gravidade. Uma vez no ambiente, os esporos de C. difficile são de difícil eliminação, o que pode facilitar transmissão cruzada entre hospedeiros suscetíveis, podendo também levar a surtos hospitalares. O diagnóstico rápido e acurado das infecções por C. difficile é essencial para que haja um adequado manejo dos pacientes, para a instituição de medidas de controle de infecção e para monitorização epidemiológica. **OBJETIVO:** identificar fatores de risco clínico-epidemiológicos associados ao diagnóstico de C. difficile e determinar sua incidência como agente etiológico das diarreias nosocomiais infecciosas de dois grupos de pacientes. **MATERIAL E MÉTODOS:** tratou-se de estudo prospectivo observacional multicêntrico. Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos, admitidos nas unidades de transplante e unidade de terapia intensiva de pacientes críticos que tiveram >3 evacuações líquidas ao longo de período de 24 h, a qualquer momento da internação. As variáveis analisadas foram: comorbidades, uso de opióides e laxativos, cirurgia prévia, proteção gástrica, escores de gravidade, exames laboratoriais, tratamento, complicações, recorrência de sintomas e desfecho. O diagnóstico laboratorial foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Porto Alegre, utilizando-se técnica de ELISA para a detecção da toxina. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** de 96 pacientes analisados até o momento, em 33,3% (32) foi identificada a toxina do C. difficile. A mediana de idade dos pacientes foi de 61 (19-87) anos e 65,6% eram homens. Variáveis associadas com a detecção da toxina de C. difficile incluíram o uso inibidores da bomba de prótons (em 77,4%, versus 52,8% para pacientes negativos para Clostridium; $p=0,025$), IRA (22,2% versus 6,8% no grupo Clostridium-negativo $p=0,075$), requerimento de diálise (22,2% versus 4,5%; $p=0,047$) e apresentação do quadro com choque séptico (25% versus 4,4% $p=0,023$). A mortalidade intra-hospitalar entre os pacientes diagnosticados com diarreia por Clostridium foi de 45,2%, sendo o tempo de internação hospitalar de 69 (15-339) dias (ambos sem diferença significativa em relação aos pacientes negativos para Clostridium). Apesar de preliminares, os dados confirmam os achados da literatura Internacional, demonstrando que C. difficile é responsável por um grande número dos casos de diarreia nosocomial em nosso meio. Reforça-se a importância do conhecimento de fatores epidemiológicos preditores da presença dessa condição, bem como do uso de ferramentas diagnósticas que permitam um diagnóstico rápido e preciso da diarreia por C. difficile.

* Resumos aprovados pela Comissão Científica para apresentação no formato PÔSTER.

** O responsável pelo cadastro do trabalho no site receberá informações sobre tamanho do pôster, data e horário da apresentação através do e-mail cadastrado no site no momento do envio do trabalho resumo.

*** A numeração do trabalho corresponde ao local onde deverá fixado na área de exposição.

5.4 Anexo

XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR

371 - CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM PACIENTES CRÍTICOS E EM TRANSPLANTADOS

RENATA NETO PIRES¹; ALEXANDRE MONTEIRO¹; CARLA SILVA LINCHO²; LUDMILA BAETHGEN¹; LILIAN CARNEIRO¹; MARION WIEDEMANN TROMBETTA¹; TERESA CRISTINA TEIXEIRA SUKIENNIK³; EDSON RODRIGUES³; ALESSANDRO COMARÚ PASQUALOTTO^{1,2}

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS - Brasil;

²Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre - RS - Brasil; ³Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre - RS - Brasil.

Forma de apresentação: PÔSTER

INTRODUÇÃO: *Clostridium difficile* (*Cd*) é a causa mais comum de diarreia nosocomial infecciosa, podendo possuir um amplo espectro de gravidade. Uma vez no ambiente, os esporos de *Cd* são de difícil eliminação, facilitando transmissão cruzada entre hospedeiros suscetíveis. O diagnóstico rápido e acurado das infecções por *Cd* é essencial para que haja um adequado manejo dos pacientes, para a instituição de medidas de controle e monitoramento epidemiológico. **OBJETIVO:** identificar fatores de risco clínico-epidemiológicos associados ao diagnóstico de *Cd* e determinar sua incidência como agente etiológico das diarreias nosocomiais infecciosas de dois grupos de pacientes. **METODOLOGIA:** tratou-se de estudo prospectivo observacional multicêntrico. Para isso, foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, admitidos nas unidades de transplante e de terapia intensiva que tiveram ≥ 3 evacuações líquidas ao longo de período de 24 h, a qualquer momento da internação. As variáveis analisadas foram: comorbidades, uso de opióides e laxativos, cirurgia prévia, proteção gástrica, escores de gravidade, exames laboratoriais, tratamento, complicações, recorrência de sintomas e desfecho. O diagnóstico laboratorial foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da ISCMPA, utilizando-se técnica de ELISA para a detecção da toxina. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** de 96 pacientes analisados até o momento, em 33,3% (32) foi identificada a toxina do *Cd*. A mediana de idade dos pacientes foi de 61 (19-87) anos e 65,6% eram homens. Variáveis associadas com a detecção da toxina de *Cd* incluíram o uso de inibidores da bomba de prótons (em 77,4%, *versus* 52,8% para pacientes negativos para *Clostridium* $p=0,025$), IRA (22,2% *versus* 6,8% no grupo *Clostridium*-negativo $p=0,075$), requerimento de diálise (22,2% *versus* 4,5%; $p=0,047$) e apresentação do quadro com choque séptico (25% *versus* 4,4% $p=0,023$). A mortalidade intra-hospitalar entre os pacientes diagnosticados com diarreia por *Clostridium* foi de 45,2%, sendo o tempo de internação de 69 (15-339) dias (ambos sem diferença significativa em relação aos pacientes negativos para *Clostridium*). Apesar de preliminares, os dados confirmam os achados da literatura, demonstrando que *Cd* é responsável por um grande número dos casos de diarreia nosocomial em nosso meio. Reforça-se a importância do conhecimento de fatores epidemiológicos preditores dessa condição, bem como do uso de ferramentas diagnósticas que permitam um diagnóstico rápido e preciso da diarreia por *Cd*. **Apoio Financeiro:** CNPq

5.5 Anexo

FICHA DE COLETA DE DADOS CLOSTRIDIUM HDVS 4º E 5º ANDAR

(PCTES COM 2 A 3 EPISÓDIOS DE DIARREIA AQUOSA EM 24 HORAS)

IDENTIFICAÇÃO: colar etiqueta

MOTIVO DA INTERNAÇÃO HOSPITALAR: _____

COMORBIDADES: () SIDA () Quimioterapia prévia () Radioterapia prévia () CORTICOTERAPIA () DPOC

() IRC não dialítica () IRC dialítica () Insuficiência Cardíaca Esquerda

() NEOPLASIA LOCORREGIONAL () NEOPLASIA METASTÁTICA

() SÍTIO TUMORAL SE FOR TUMOR SÓLIDO: _____

() NEOPLASIA HEMATOLÓGICA QUAL _____

() Acidente Vásculo Cerebral prévio () Acidente Vásculo Cerebral agudo () CIRROSE

() ÓRGÃO OU ÓRGÃOS TRANSPLANTADOS: _____

() IMUNOSSUPRESSORES: _____

() ATBs pré(100 dias anteriores): _____

Uso de Opioides: () Não () Sim **Uso de Laxativos:** () Não () Sim _____

Cirurgia prévia: () Não () Sim Qual e Data: _____

Proteção Gástrica: () Não () Sim: ☐ Bloq H2 ou ☐ Inibidores da Bomba de Prótons

ESCORE DE CHARLSON: _____

DIAGNÓSTICO DE CLOSTRIDIUM:

CT abdominal () Não () Sim Resultado: _____

Colonoscopia () Não () Sim Resultado: _____

ELISA – Resultado: _____ **PCR resultado:** _____ **GDH resultado:** _____

Outro Diagnóstico para a Diarreia: _____

NO MOMENTO DA COLETA DAS FEZES (REGISTRAR O QUE FOR DISPONÍVEL):

FC _____ **FR** _____ **Tax:** _____ **TAS:** _____ **TAD:** _____ **PAM:** _____ **Glic:** _____ **BT:** _____

Lactato art:_____Leucócitos:____B:_____E:____Plaquetas:____Albumina:____Ureia:_____

Creatinina:_____ Proteína C Reativa :_____

FiO2:_____pH:_____ PaO2:_____ PaCO2:_____ Na:_____ K:_____ Ht:_____

TRATAMENTO:

Tratamento Clínico () Não () Sim Antibióticos: () Metro () Vancomicina

Tratamento Cirúrgico () Não () Sim QUAL:_____

COMPLICAÇÕES: () Íleo () Choque Séptico () Ins Renal Aguda () Diálise

() Laparotomia Qual e data:_____

RECAÍDA EM 2 MESES: DIARREIA () SIM () NÃO

CLOSTRIDIUM CONFIRMADO () SIM () NÃO

PERMANÊNCIA HOSPITALAR PRÉ-DIARREIA(DIAS): _____

PERMANÊNCIA HOSPITALAR TOTAL (DIAS): _____

DESFECHO HOSPITALAR: () ALTA () ÓBITO

CAUSA MORTIS: _____

5.6 ANEXO

FICHA DE COLETA DE DADOS CLOSTRIDIUM UTI

(PCTES COM 2 A 3 EPISÓDIOS DE DIARREIA AQUOSA EM 24 HORAS)

IDENTIFICAÇÃO: colar etiqueta

MOTIVO DA INTERNAÇÃO HOSPITALAR: _____

MOTIVO DA INTERNAÇÃO NA UTI: _____

COMORBIDADES: () SIDA () Quimioterapia prévia () Radioterapia prévia () CORTICOTERAPIA () DPOC

() IRC não dialítica () IRC dialítica () Insuficiência Cardíaca Esquerda

() NEOPLASIA LOCORREGIONAL () NEOPLASIA METASTÁTICA

() SÍTIO TUMORAL SE FOR TUMOR SÓLIDO: _____

() NEOPLASIA HEMATOLÓGICA QUAL _____

() Acidente Vásculo Cerebral prévio () Acidente Vásculo Cerebral agudo () CIRROSE

() ÓRGÃO OU ÓRGÃOS TRANSPLANTADOS: _____

() IMUNOSSUPRESSORES: _____

() ATBs pré(100 dias anteriores): _____

Uso de Opioides: () Não () Sim **Uso de Laxativos:** () Não () Sim _____

Cirurgia prévia: () Não () Sim Qual e Data: _____

Proteção Gástrica: () Não () Sim: ☐ Bloq H2 ou ☐ Inibidores da Bomba de Prótons

SAPS III _____ **SAPS III PADRÃO ME** _____ **SAPS III AM LATINA ME** _____

SOFA DO 1º DIA: _____ **SCORE DE CHARLSON:** _____

DIAGNÓSTICO DE CLOSTRIDIUM:

CT abdominal () Não () Sim Resultado: _____

Colonoscopia () Não () Sim Resultado: _____

ELISA – Resultado: _____ **PCR resultado:** _____ **GDH resultado:** _____

Outro Diagnóstico para a Diarreia: _____

NO MOMENTO DA COLETA DAS FEZES (REGISTRAR O QUE FOR DISPONÍVEL):

FC_____FR_____Tax:_____TAS:_____TAD:_____PAM:_____Glic:_____BT:_____

Lactato art:_____Leucócitos:_____B:_____E:_____Plaquetas:_____

Albumina :_____Ureia:_____Creatinina:_____Proteína C Reativa :_____

FiO2:_____pH:_____PaO2:_____PaCO2:_____Na:_____K:_____Ht:_____

TRATAMENTO:Tratamento Clínico () Não () Sim **Antibióticos:** () Metro () Vanco_____Tratamento Cirúrgico () Não () Sim **QUAL:**_____**COMPLICAÇÕES:** () Íleo () Choque Séptico () Ins Renal Aguda () Diálise

() Laparotomia Qual e Data:_____

RECAÍDA EM 2 MESES: DIARREIA () SIM () NÃO

CLOSTRIDIUM CONFIRMADO () SIM () NÃO

PERMANÊNCIA NA UTI PRÉ-DIARREIA(DIAS): _____**PERMANÊNCIA NA UTI (DIAS):** _____**PERMANÊNCIA HOSPITALAR TOTAL (DIAS):** _____**DESFECHO NA UTI:** () ALTA () ÓBITO CAUSA MORTIS_____**DESFECHO HOSPITALAR:** () ALTA () ÓBITO CAUSA MORTIS_____

Catálogo na Publicação

NETO PIRES, RENATA

DIARREIA POR CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM PACIENTES
CRÍTICOS E EM PACIENTES TRANSPLANTADOS / RENATA NETO
PIRES. -- 2014.

42 f. : tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Patologia, 2014.

Orientador(a): ALESSANDRO COMARÚ PASQUALOTTO.

1. CLOSTRIDIUM DIFFICILE. 2. INFECÇÃO. 3.
EPIDEMIOLOGIA. 4. DIARREIA. I. Título.