

LUIZ FERNANDO VIEIRA RODRIGUES

Prevalência do *Clostridium difficile* e Associação com a Antibióticoterapia em um grupo de Indivíduos do Sul do Brasil

Dissertação de mestrado submetida ao Curso de Pós – Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Gerontologia Biomédica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Virginia Minghelli Schmitt

Porto Alegre
Dezembro 2005

Dedico este trabalho a todos aqueles que trilham o caminho de sua auto-realização, sendo apenas uma retribuição por tudo aquilo que me deram.
As relações entre quem ensina e quem aprende, repercutem sempre na aprendizagem.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que direta ou indiretamente muito me incentivaram na realização desta pós-graduação, em especial à minha colega e orientadora Prof^a. Dr^a. Virginia Minghelli Schmitt e à Prof^a. Dr^a. Valdemarina de Azevedo e Souza. Ao Laboratório Weinmann, na pessoa da Dr^a. Rejane Maria Oravec, e ao Hospital Moinhos de Vento, pelos dados obtidos. À bibliotecária Rosária Maria Lúcia Prena Geremia, pelo auxílio no desenvolvimento da dissertação. Ao Sr. Gilson Marcanth pelos trabalhos de informática. Às alunas do curso de Farmácia da PUCRS, pelo apoio na obtenção dos dados. À minha família que sempre esteve ao meu lado nas horas de estudo.

RESUMO

O *Clostridium difficile* (Cd) é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos, amplamente distribuído no ambiente hospitalar, fazendo parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais. Está associado com a colite pseudomembranosa (PMC) e outras desordens intestinais, tais como diarreia, em virtude do uso prévio de antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar retrospectivamente a prevalência da toxina A do *C. difficile* em indivíduos que realizaram exame no laboratório Weinmann no período entre junho de 2003 e dezembro de 2004. Para a pesquisa da toxina A foi utilizado o sistema Vidas®CD Toxin A II (CDA2, Biomérieux S.A.), que permite a detecção da toxina A do Cd através do método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Foram analisados 288 resultados, sendo 91 (31,6%) de origem hospitalar e 197 (68,4%) de origem ambulatorial. A prevalência de Cd nas amostras hospitalares foi de 11,0% e nas de origem ambulatorias foi de 11,7%. Nos pacientes idosos (n=139), a média de idade foi de 76,3 anos, com uma mediana de 76 anos, e prevalência de Cd de 9,4%. Entre os pacientes hospitalizados que fizeram uso de antibióticos, a prevalência de Cd foi de 11,5%. O tratamento dos pacientes

hospitalizados com um único tipo de antibiótico mostrou uma relação significativa com a positividade para Cd ($p=0,001$), quando comparado com o uso de mais de uma classe de antibióticos. Foi pesquisada uma relação entre a prevalência de Cd e presença de febre, dor abdominal, hipoalbuminemia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, leucócitos fecais e resultado de proteína C-reativa, sendo verificada uma associação estatisticamente significativa somente entre hipoalbuminemia e positividade para Cd ($p=0,048$).

Palavras-chave: Clostridium difficile, antibiótico, diarreia

ABSTRACT

Clostridium difficile (Cd), a Gram-positive, spore-forming anaerobic bacillus, is widely distributed in the hospital environment, and inhabits both human and animal gastrointestinal tract microbiota. It has been associated with outbreaks of pseudomembranous colitis (PMC) and other intestinal disorders, such as diarrhea, related with previous use of the antibiotics. The goal of this study was to retrospectively evaluate Cd toxin A prevalence in individuals tested in Weinmann Laboratory, from June 2003 to December 2004. For detection of Cd toxin A, the automated system VIDAS *C. difficile* Toxin A II (CDA2, Biomérieux S.A.) was used. It is an enzyme-linked fluorescent immunossay (ELFA) for the qualitative detection of Cd toxin A in stool specimens.

Two hundred and eighty eight results were analyzed, 91 of hospital origin (31.6%) and 197 (68.4%) out patients. Cd prevalence in samples from hospitalized patients was 11.0% and 11.7% in outpatients. Mean age of elderly patients (n=139) was 76.3 years, with a median of 76, and the Cd prevalence was 9.4%. Among hospitalized patients under antibiotics therapy, Cd prevalence was 11.5%. Patient's treatment with a single antibiotic category showed a significant

relationship with Cd positivity ($p=0.001$), when compared with use of more than one category. Association between fever, abdominal pain, hipoalbuminemia, dehydration, electrolytic imbalance, fecal leucocytes presence and protein C results were analyzed. A statistically significant association with Cd prevalence was found only for hipoalbuminemia ($p=0,048$).

Key words: Clostridium difficile, antibiotics, diarrhea

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sintomas da doença pelo <i>C.difficile</i>	09
Figura 2 - Métodos Laboratoriais para Detecção de toxina A e B de <i>C.difficile</i>	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado das análises dos pacientes hospitalizados.....	28
Tabela 2 - Resultado da análise dos pacientes idosos hospitalizados.....	31
Tabela 3 - Descrição dos resultados obtidos para o total de pacientes do estudo e para os idosos.....	32
Tabela 4 - Relação entre positividade para Cd e as variáveis analisadas.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AAD	Diarréia Associada a Antibiótico
AAC	Colite Associada a Antibiótico
Cd	<i>Clostridium difficile</i>
CDAD	Diarréia Associada ao <i>Clostridium difficile</i>
CDA2	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (Teste)
CDB	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (Teste Adicional)
CT	Tomografia Computadorizada
EIA	Enzima Imunoensaio
ELFA	Enzime Linked Fluorescence Assay
EPF	Exame Parasitológico de Fezes
PCR	Proteína C Reativa
PMC	Colite Pseudomembranosa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO GERAL	04
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04
2. REFERENCIAL TEÓRICO	05
2.1 Epidemiologia	05
2.2 Infecção pelo <i>Clostridium difficile</i>	07
2.2.1 Patogênese.....	07
2.2.2 Características Clínicas.....	08
2.2.3 Fisiopatologia.....	10
2.3 Diagnóstico laboratorial do <i>C. difficile</i> e suas toxinas	12
2.4 Tratamento da Diarréia Associada ao <i>C. difficile</i>	16
2.4.1 Tratamento da Infecção Primária.....	16
2.4.2 Tratamento de Infecções Recorrentes.....	17
2.4.3 Tratamento Cirúrgico.....	18
2.5 Prevenção	19
2.6 Novas perspectivas	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Tipo de estudo	21
3.2 Pesquisa da toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	21
3.3 Levantamento de dados	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Análise da população geral	23
4.2 Análise dos pacientes hospitalizados	24
4.3 Análise pacientes idosos	28
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUÇÃO

O *Clostridium difficile* (Cd) é um importante patógeno nosocomial, causando diarreia infecciosa em pacientes hospitalizados. A ocorrência do Cd na microbiota está na dependência da idade do paciente, de doenças intercorrentes, da história da hospitalização ou uso de antimicrobianos. Todos os antibióticos já foram associados com o desenvolvimento de diarreia associada a Cd (CDAD) e colite pseudomembranosa (PMC). Os mais comumente implicados são a clindamicina, as cefalosporinas e as ampicilinas, independente de doses, via de administração e tempo de uso.

Drogas antituberculose e antiparasitárias não estão associadas ao aparecimento da doença. Desde a descoberta da colite pseudomembranosa associada ao uso de antibiótico, em 1978, cresceu em importância a pesquisa da patogênese, epidemiologia, diagnóstico e tratamento para Cd. Este é um importante microrganismo, responsável por 15-25% das diarreias associadas a antibioticoterapia adquiridas em ambientes hospitalares, que deve ser pesquisado quando existe a suspeita de CDAD.

Estudos prospectivos têm mostrado que a transmissão do Cd usualmente acontece no hospital pela instrumentação, mãos do pessoal hospitalar ou companheiro de quarto. É um bacilo Gram-positivo, anaeróbico e formador de esporos, responsável por quase todas as infecções gastrintestinais que se seguem à terapia com antibióticos, podendo ocasionar desde uma diarreia leve até colite grave ou mesmo fatal. O microrganismo invade o revestimento intestinal e libera toxinas que induzem a diarreia, febre e dor abdominal. A microbiota do intestino grosso inibe efetivamente o Cd, possivelmente tornando os receptores do hospedeiro indisponíveis, competindo com os nutrientes ou produzindo bacteriocinas. A maioria dos clostrídios não cresce sob condições aeróbicas e as células vegetativas são mortas pela exposição ao oxigênio, mas seus esporos são capazes de sobreviver por longos períodos em exposição ao ar. Os clostrídios são bactérias que vivem virtualmente em todos os habitats anaeróbicos da natureza onde os componentes orgânicos estão presentes, incluindo solo, águas paradas e no trato intestinal de animais e do homem. Portanto, medidas devem ser adotadas para reduzir a incidência de infecções primárias e cruzadas pelo Cd, tais como preciso e rápido diagnóstico, prudente uso de antibióticos, rotina nas lavagens de mãos, desinfecção de objetos potencialmente contaminados, isolamento de pacientes infectados, e uso de luvas por ocasião do manuseio de pacientes. Pelo fato do Cd ser uma causa comum de diarreia infecciosa deverá ser sistematicamente investigado em pacientes com diarreia nosocomial.

Cepas patogênicas do Cd produzem duas toxinas: a toxina A, que provoca uma secreção fluída, inflamação e dano na mucosa intestinal em modelos animais; a toxina B, que é uma potente citotoxina em cultura de células, mas que

não é enterotóxica para animais. A maioria das cepas patogênicas produzem ambas as toxinas A e B. Estas toxinas também induzem à produção do fator de necrose tumoral e de interleucinas, que contribuem para a resposta inflamatória, e formação de pseudomembrana.

Entre os pacientes hospitalizados em uso de antibiótico, a taxa de colonização chega até 13% entre a primeira e a segunda semanas, aumentando para 50% nos pacientes com mais de quatro semanas. Todavia, a maioria dos pacientes hospitalizados permanecem assintomáticos, e somente 20% das diarreias associadas a antibióticos (AAD) sem colite são devidas ao Cd.

Este estudo se propõe a avaliar retrospectivamente a prevalência da toxina A do Cd no período entre junho de 2003 e dezembro de 2004 que realizaram exame no laboratório Weinmann.

OBJETIVO GERAL

- Determinar a prevalência do *Clostridium difficile* através da pesquisa da Toxina A nas amostras encaminhadas ao Laboratório Weinmann para a pesquisa do *Clostridium difficile*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência de *Clostridium difficile* produtor de toxina A nas amostras de indivíduos idosos.
- No caso de amostras provenientes de indivíduos hospitalizados, verificar a associação da positividade do *Clostridium difficile* com o uso de antibióticos.
- No caso de amostras de pacientes hospitalizados, verificar a associação entre a positividade do *Clostridium difficile* com os resultados de leucócitos fecais, febre, dor abdominal, hipoalbuminemia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, proteína C-reativa.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo anaeróbio, formador de esporos. Em 1893 foi descrita pela primeira vez a colite pseudomembranosa (PMC),¹ e em 1978 Bartlett e col. descreveram a associação da PMC com a produção de toxinas pelo Cd.² Desde então, o Cd tem sido associado a diversas patologias, como a diarreia associada ao antibiótico (AAD), a colite associada ao antibiótico (AAC), e a diarreia associada ao *C. difficile* (CDAD). A epidemiologia e a patogênese da infecção por Cd têm sido amplamente estudadas, permitindo uma maior compreensão sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento destas patologias.

2.1. Epidemiologia

O *C. difficile* (Cd) causa entre 300.000 e 3.000.000 de casos de diarreia nos Estados Unidos todos os anos.³ O Cd é causa de aproximadamente 25% de todos os casos de diarreia associada a antibiótico. Na maioria dos casos, nas quais o Cd não é detectado, nenhum agente etiológico é identificado. Entre os pacientes hospitalizados o risco de CDAD após terapia com clindamicina tem sido estimado de

1 para 10 e 1 para 10.000. Um recente estudo demonstrou que a clindamicina aumenta o risco de CDAD principalmente em pacientes colonizados com *Cd* resistente a clindamicina.³ No Brasil, a ocorrência de *Cd* foi analisada em amostras de fezes de 175 crianças com idade variando de 1 a 35 meses. Em um grupo de 67 crianças sem distúrbios gastrointestinais e que não estavam sob uso de agentes antimicrobianos a ocorrência do *Cd* foi de 22,5%, enquanto que num outro grupo de 28 nas mesmas condições, porém, sob tratamento com antibióticos, a ocorrência do microrganismo foi de 50%.⁴

Recém nascidos e crianças jovens comumente abrigam *Cd* em sua microbiota, mas não têm sintomas relacionados à produção de toxinas. Por razões não bem explicadas o número de portadores declina com a idade, e *Cd* toxinogênico é isolado de fezes em somente 0 a 3% de adultos saudáveis. Durante a hospitalização, contudo, a colonização frequentemente ocorre em 21% dos pacientes, e sintomas clínicos desenvolvem em cerca de 1/3 dos pacientes colonizados.³ O *Cd* forma esporos que persistem no ambiente por anos, proporcionando a contaminação hospitalar principalmente em salas ocupadas por indivíduos infectados.³

A transmissão ocorre pela via oral-fecal. Populações com alto risco para CDAD incluem pessoas idosas, pacientes com uremia, queimados, cirurgias abdominais, cesariana, e pacientes com câncer. Estes grupos estão mais expostos a infecção nosocomial e são mais susceptíveis para CDAD como resultado de suas doenças. O primeiro passo na colonização pelo *Cd* é o desequilíbrio da microbiota do colon. Dois fatores recentemente têm sido mostrados que aumentam a probabilidade de doença sintomática em pacientes que adquirem colonização no

hospital: presença da severidade de outras doenças e reduzido níveis no soro do anticorpo IgG contra a toxina. Estes estudos sugerem que pré-existindo o anticorpo anti-toxina A, pode haver amenização da severidade da doença.³

A incidência de CDAD em ambulatório de adultos tem sido estimada de 7 para 12 casos em 100.000 pessoas.^{5, 6} A incidência de AAD varia de 5% a 39% dependendo do antibiótico usado.⁷ A maioria dos casos de AAD são devidas ao antibiótico e não ao Cd. A PMC ocorre somente em 10% dos pacientes com AAD.^{7,8}

2.2. Infecção pelo *Clostridium difficile*

2.2.1 Patogênese

O primeiro passo para colonização do intestino pelo Cd é a destruição da microbiota do cólon, normalmente causada pelo uso de antibióticos ou, em casos raros, por antineoplásicos e drogas imunossupressoras. Os antibióticos mais freqüentemente associados com a infecção são a clindamicina, ampicilina, amoxicilina, e cefalosporinas, mas todos os antibióticos podem predispor os pacientes à infecção pelo Cd.³

O Cd foi primeiramente isolado em 1935, mas não foi relacionado com a diarreia associada aos antibióticos (AAD) até 1970.³ A incidência de AAD varia com a classe de antibióticos e com os fatores de risco dos pacientes. A AAD tem sido observada em uma grande variedade de populações de pacientes, como ortopédicos, obstétrico-ginecológicos, pacientes de unidade de tratamento intensivo,

e mesmo em pacientes ambulatoriais.⁹ Este tipo de diarreia tem sido relatado desde 1950, quando apareceram os antibióticos de largo espectro. As complicações do uso destes antibióticos, como a AAD, foram inicialmente consideradas leves, até a identificação da PMC, manifestação mais grave, que pode inclusive levar ao óbito.¹⁰

O Cd está associado a aproximadamente 25% de todos os casos de diarreia associada a antibióticos (AAD), caracterizando a diarreia associada ao Cd (CDAD). Na maioria dos casos de AAD em que o Cd não é detectado, nenhum agente etiológico é identificado, e a diarreia usualmente é leve, não acompanhada de dor abdominal. Os sintomas em tais casos desaparecem com a descontinuidade do antibiótico.

Os portadores assintomáticos de Cd são incomuns em adultos saudáveis (1-3%), mas comuns em pacientes debilitados ou adultos hospitalizados tratados com antibióticos de largo espectro (15-25%), incluindo pacientes que receberam antibioticoterapia pré-cirúrgica.¹² Mais de 50% dos recém-nascidos e crianças são colonizados pela bactéria¹³

2.2.2 Características Clínicas

A diarreia é efeito secundário do uso de antibióticos em mais de 3% dos adultos e crianças. Os sintomas da doença ocasionada pelo Cd são apresentados na Figura 1.

- Diarréia, 5 – 10 dias após uso de antibióticos 5-10% presença de sangue menos de 85% com muco presença de leucócitos não é específico
- Raramente náuseas e vômitos
- Dor abdominal e cãibras; raramente distensão abdominal e inchaço
- Febre, 26 – 66%
- Hipoalbuminemia acima de 24%
- Desidratação e desequilíbrio eletrolítico nos casos severos

Figura 1: Manifestações da doença pelo *C.difficile*

Fonte: *Laboratory Diagnosis of C. difficile*¹

Tipicamente, os sintomas da CDAD se apresentam de 1 a 2 semanas após o início do uso do antibiótico, e podem persistir de 1 dia a 6 semanas.¹⁴ A doença comumente se apresenta como uma diarréia profusa, aquosa ou mucóide, ocasionalmente sanguinolenta, com dor abdominal e febre baixa, podendo evoluir para um megacolon tóxico ou, nos casos mais severos, com perfuração do cólon.

14,18

Manifestações extraintestinais, como artrite, são raras.¹⁵ Desidratação, perda de eletrólitos e hipoproteinemia, podem ocorrer nos casos de doença prolongada ou severa.¹⁴ Outras complicações incluem hemorragia e sepsis. A mortalidade normalmente é baixa (2% a 5%), embora seja alta em idosos ou pacientes debilitados (10% a 20%) e em casos de colite fulminante ou megacolon tóxico (30% a 80%).^{16,17} No estudo de Morris e col., o principal fator associado ao óbito foi a demora no diagnóstico de CDAD.

O Cd comumente está associado com infecção colônica, mas em alguns pacientes (5% a 19%), pode localizar-se no cólon proximal. Estes pacientes podem apresentar abdômen agudo, ausência de diarreia, e achados normais na sigmoidoscopia. Pesquisa de Cd positiva nas fezes destes pacientes pode evitar uma cirurgia desnecessária.¹⁸ Após a recuperação clínica, os pacientes podem permanecer como portadores assintomáticos, mas na maioria não ocorre reincidência.¹⁹ Contudo, os 10 a 20% dos casos em que observou-se reincidência, foram consequência de negligência dos pacientes no seguimento do tratamento prescrito. Tais pacientes usualmente respondem bem ao novo tratamento com metronidazol ou vancomicina, mas o risco de favorecer novas recorrências pode ser de 65%.^{20,21}

2.2.3 Fisiopatologia

Em geral, o Cd não é invasivo. Raros casos de invasão do tecido intestinal têm sido relatados em crianças gravemente neutropênicas ou com leucemias, e em lactentes com doença de Hirschsprung ou imunocomprometidas.²²

Para que aconteça o desenvolvimento de CDAD é necessário que ocorram modificações, como alteração da microbiota do intestino ou da imunidade ao nível da mucosa, formação de esporos, super crescimento do Cd, ou produção de toxina.^{2,23} Com a supressão da microbiota colônica pelo uso de antibióticos, o Cd pode proliferar, quando então passa a secretar exotoxinas. Estas são responsáveis pela produção de uma colite inflamatória com sintomas clínicos de febre, dor abdominal e diarreia aquosa. A colonoscopia mostra pseudomembranas que

recobrem superfícies ulceradas, múltiplas, com 2 a 4mm de espessura, caracterizando a colite pseudomembranosa. A mucosa se apresenta friável, com inflamação e microulcerações com exsudatos. A diarreia pode ficar muco-pio-sanguinolenta e em casos de complicação a colite pode evoluir para megacólon tóxico ou perfuração.²⁴

Recém-nascidos carregam o Cd e eliminam toxinas nas fezes, mantendo-se assintomáticos. A colite pseudomembranosa é rara em recém nascidos e crianças jovens, devido à presença de anticorpos maternos, verifica-se nesta faixa etária, uma alta prevalência de anticorpos para Cd nos jovens quando comparado aos adultos.^{2,13} A imaturidade dos receptores de toxinas nos colonócitos das crianças pode ser uma das causas da menor frequência da PMC em crianças. Após os 6 meses de idade, as toxinas passam a causar sintomas durante o uso de antibióticos ou até 6 semanas após o uso ter sido descontinuado.²⁴

As mais importantes toxinas produzidas pelo Cd são a toxina A (Enterotoxina) e a toxina B (Citotoxina).^{2,12} A toxina A liga-se a receptores específicos das células da mucosa intestinal, causando destruição dos microfilamentos citoplasmáticos.

A toxina B, então, penetra na célula e danifica a mucosa, causando uma adicional toxicidade, que resulta em hemorragia, inflamação e necrose. A toxina B interfere na síntese de proteínas celulares, atrai os granulócitos, aumenta a permeabilidade capilar e peristalsi nos pacientes com doença severa.^{25,26} A inflamação pode envolver camadas mais profundas, resultando em dilatação tóxica

ou perfuração do cólon.^{12,14} A toxina B do Cd causa necrose das células epiteliais colônicas, levando a exsudação serosa para a luz intestinal. A absorção desta toxina produz as manifestações sistêmicas, de leves a graves, como febre e leucitose com mais de 15.000 células por mm³.²⁴

2.3 Diagnóstico laboratorial do *C. difficile* e suas toxinas

Os testes diagnósticos de CDAD estão baseados em uma combinação de achados clínicos, testes laboratoriais e algumas vezes endoscopia (Figura 2). Ocorrências súbitas em pacientes hospitalizados fazendo uso de antimicrobianos sugere prontamente uma investigação.²⁷ Leucócitos fecais podem ser vistos, mas a sua ausência não exclui uma colite.

Outras causas de colite devem ser excluídas no diagnóstico diferencial, incluindo colite química, colite isquêmica, e outras infecções (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, Citomegalovirus, *Escherichia coli* patogênica e *Entamoeba histolytica*).²⁸ Enterocolite estafilocócica é uma causa incomum de AAD, e é suspeitada quando cocos Gram-positivos são vistos no esfregaço de fezes com resultado negativo no teste para presença de Cd produtor de toxina A.²⁹ Enterocolite neutropênica é suspeitada quando um paciente fazendo quimioterapia desenvolve diarreia e dor abdominal na presença de neutropenia. Doença de Crohn, colite ulcerativa e Angiostrongilíase abdominal, podem ser confundidas com CDAD.³⁰

- Cultura de tecidos para Toxina B
- Elisa para Toxina A ou Toxina B ou Toxina A + B
- Látex ou imunoensaio para enzima glutamato deidrogenase (GD)
- Combinação da Toxina A + detecção de GD
- Cultura para *C.difficile* e detecção de sua Toxina/
- PCR das fezes para Toxina A ou B ou ambas
- Pesquisa de anticorpo

Figura 2: Métodos Laboratoriais para Detecção de Toxina A e B de *C.difficile*
 Fonte: *Laboratory Diagnosis of C. difficile* ¹

A detecção da toxina B pela cultura de tecidos continua sendo o principal método de diagnóstico. O teste requer uma linhagem especial de células para desenvolver a infecção e necessita um período de tempo de 48 horas para o resultado definitivo. Recentemente tem sido relatada a existência de cepas de Cd positivas para toxina A e negativas para toxina B, mas estes casos são raros.¹ A cultura para Cd tem um baixo valor preditivo, pois existem portadores assintomáticos entre os pacientes tratados com antibióticos e a possibilidade de isolamento de cepas não patogênicas que causam efeito citopático após inoculação com filtrado fecal.^{12,31,32}

O resultado é confirmado pela neutralização desse efeito com a antitoxina específica. Este é considerado o padrão ouro em virtude de sua alta sensibilidade e especificidade.³⁴ Contudo, 5% a 10% dos pacientes com (PMC) tem testes negativos para os ensaios de citotoxicidade.^{9,12}

Existem muitos testes enzimáticos (EIA) para detecção da toxina A, necessitando cerca de uma a duas horas para realizar o diagnóstico. De acordo com estudos feitos por Johnson e col na cidade de Chicago, aproximadamente 50% dos laboratórios de hospitais utilizam somente o teste de imunoensaio para detecção da toxina A no diagnóstico de Cd. O teste enzimático (ELISA) para detecção da toxina A ou B é de menor custo e mais rápido do que os teste de citotoxicidade, e por isso é preferido pela maioria das instituições.⁹

A sensibilidade é baixa, mas quando da realização do teste em duas ou três amostras seriadas de fezes, a sensibilidade aumenta para 90%, a especificidade fica em torno de 100% e existe uma alta concordância (>98%) comparado com os testes de citotoxicidade.^{32,34}

O teste de aglutinação pelo látex tem uma sensibilidade e especificidade baixas e não distingue cepas patogênicas de não patogênicas.³⁵

Dentre os testes clínicos utilizados, a radiografia abdominal pode mostrar edema na mucosa ou no íleo, e é útil para confirmar a presença de megacolon ou perfuração.³⁶ O exame pelo enema de bário tem risco de perfuração e pode levar ao megacolon, não sendo, portanto recomendado.³⁶ Tomografia computadorizada (CT) pode mostrar distensão colônica, espessamento, inflamação pericolônica, ou ar livre, e é mais valiosa nos casos severos e naqueles localizados no colon proximal.^{18,37}

A prova terapêutica com vancomicina é somente um método não invasivo para mostrar a importância clínica da toxina nas fezes. Embora os achados na

endoscopia possam ser normais em pacientes com leve CDAD, a maioria dos pacientes tem uma mucosa anormal, indo de um leve eritema ou edema para uma mucosa ulcerada, freqüentemente com exsudato nodular, podendo formar uma pseudomembrana amarelada, constituída de muco e fibrina com morte dos leucócitos e células da mucosa, característica da colite pseudomembranosa.³⁸

O diagnóstico de CDAD em crianças é difícil de ser realizado, pois nesta faixa etária eles comumente são portadores do microrganismo produtor de toxinas.⁴

Algumas cepas de Cd apresentam variações na patogenicidade relacionadas a mutações no gene que codificam a toxina A. Estas variantes foram classificadas dentro de 15 toxinotipos, através de métodos moleculares. Cepas do toxinotipo VIII são caracterizadas por uma deleção de 1,8 Kb no gene da toxina A. Estas cepas não produzem uma toxina A funcional e são indetectáveis através de métodos de imunoenensaio para a toxina, e sim somente através de métodos moleculares.⁹²

Apesar de não produzirem uma toxina A funcionante, estas variantes fenotípicas são citotóxicas. Um ensaio negativo para toxinas do Cd, imunoenensaio ou outro, não pode ser usado para a exclusão do diagnóstico de CDAD se a epidemiologia e os aspectos clínicos sejam sugestivos. Devido a estas variações fenotípicas, o corpo clínico e laboratorial devem estar atentos, pois foram relatados alguns casos fatais de colite pseudomembranosa associada com cepas de Cd negativa para toxina A.⁹²

2.4 Tratamento da Diarréia Associada ao *C. difficile*

2.4.1 Tratamento da Infecção Primária

Em pacientes com leve CDAD, somente cuidados de suporte podem ser suficientes (reidratação, isolamento entérico). A diarréia será resolvida com terapia conservadora, isto é, sem antibiótico, e em 15-23% dos pacientes.^{39,40} Agentes anti-diarréicos e narcóticos deverão ser evitados em virtude de poderem levar a uma colite severa.⁴¹ Terapia antibiótica específica deverá ser administrada quando a terapia de suporte falhar e quando os sintomas forem severos.

Em pacientes com CDAD severa, a hospitalização se faz necessária para realização de uma antibioticoterapia e hidratação intravenosa. O tratamento empírico com antibiótico deverá ser iniciado antes dos resultados dos testes quando existir suspeita de CDAD em pacientes idosos ou com doença severa,¹⁹ sendo preferida a administração oral.^{42,43}

O metronidazol é um tratamento efetivo e de baixo custo com taxas de recaídas comparáveis às da vancomicina. Em virtude do alto custo da vancomicina e cuidados para evitar o desenvolvimento de organismos resistentes, o metronidazol é indicado como o tratamento de primeira escolha.^{44,45,46} Contudo, o metronidazol tem mais efeitos adversos que a vancomicina e não é recomendável para crianças e mulheres grávidas. Além disso, na presença de resistência ao metronidazol, este deverá ser trocado pela vancomicina e vice-versa.^{47,48}

A vancomicina é um tratamento efetivo, com uma resposta de 90% a 100%, e por isto é o tratamento preferido nos casos de doença severa, apesar do custo elevado. Em virtude de que a vancomicina oral ser pobremente absorvida, altas concentrações nas fezes podem ser conseguidas sem efeitos sistêmicos adversos. Nos pacientes em que o tratamento com vancomicina falhar, a cirurgia pode ser indicada. A terapia parenteral é menos efetiva do que a oral, mas quando ela for necessária (ex: Íleo paralítico) metronidazol é recomendado, podendo ser suplementado com vancomicina via nasogástrica ou enema.^{42,43}

O tratamento com bacitracina é menos efetivo do que com vancomicina ou metronidazol.⁴⁷ O teicoplanin tem sido comparado à vancomicina como eficácia de tratamento, além de ter uma meia vida mais longa. O tratamento via oral com teicoplanin tem sido usado com sucesso na Europa, mas não está disponível nos Estados Unidos.⁴⁸

2.4.2 Tratamento de Infecções Recorrentes

O principal problema com CDAD é a recorrência em 10% a 30% dos pacientes.^{2,7} A doença recorrente usualmente responde bem sintomaticamente ao retratamento com metronidazol ou vancomicina nas doses padrão. O tratamento com a combinação de vancomicina e rifampicina tem sido usado com sucesso.⁴⁹ Outros tratamentos têm ajudado a alterar a microbiota colônica para suprimir o crescimento do Cd, por exemplo, o uso oral de *Lactobacillus* GG, enema com fezes de indivíduos saudáveis, e leveduras não patogênicas via oral (*Saccharomyces*

boulardii).^{20,50,51} Nenhum destes regimes tem demonstrado ser superior aos tratamentos tradicionais, e a escolha do tratamento mais adequado é feita nos pacientes individualmente.

2.4.3 Tratamento Cirúrgico

A cirurgia é usualmente desnecessária em pacientes com CDAD, sendo requerida em apenas 0,4% a 5,0% dos casos.^{51,52,53,54} A necessidade de cirurgia é alta somente em pacientes com doença severa.^{55,56} O desenvolvimento de doença severa está associado com a idade avançada, malignidades, insuficiência renal, doença pulmonar crônica, imunossupressão, uso de drogas antiperistálticas. Como consequência da doença severa, pode ser observado o desenvolvimento de hipoalbuminemia (albumina menor de 3g/L), e contagens altas de células brancas. A cirurgia é indicada em casos de abdômen agudo que precedem o diagnóstico de CDAD, sepsis, falhas de multiorgãos, hemorragia, dilatação tóxica, perfuração.⁵⁵ Pacientes que se apresentam com abdômen agudo podem não ter diarreia.¹⁸ Em tais pacientes, a sigmoidoscopia ou a tomografia computadorizada pode ser útil na identificação da colite.^{18,37}

Na ausência de perfuração ou abscesso, a cirurgia pode ser evitada se as condições do paciente responderem à terapia medicamentosa. Na laparotomia, muitos pacientes apresentam ascite e o cólon está freqüentemente edemacioso e distendido.⁵³ A serosa pode parecer surpreendentemente normal, apesar da severa doença da mucosa.^{53,54,55} Ressecção segmental e ileostomia ou colostomia tem sido

descrito, contudo estes procedimentos freqüentemente falham e uma cirurgia adicional normalmente é necessária, além de estarem associados com o aumento da mortalidade.^{18,54,55,57,58} Portanto, total colectomia abdominal com Ileostomia é o procedimento de escolha.

2.5 Prevenção

Os esporos do Cd podem sobreviver mais de 5 meses no ambiente, e as vias de infecção são as mãos do pessoal hospitalar ou objetos contaminados.^{59,60,61} Portanto, a prevenção tem um papel crucial no controle da doença e ela pode ser facilitada pelo uso prudente de antibiótico, lavagem freqüente das mãos, uso de luvas, desinfecção dos objetos, e isolamento dos pacientes infectados.

O tratamento de portadores assintomáticos não é recomendado, em virtude de que pode prolongar o estado de portador as quais usualmente resolve espontaneamente.⁶² Finalmente, o controle do uso indiscriminado de antibióticos, principalmente os de amplo espectro, tais como clindamicina e cefalosporinas, tem diminuído a taxa de CDAD em algumas instituições.^{63,64}

2.6 Novas perspectivas

Estão disponíveis anticorpos monoclonais e concentrados de imunoglobulinas com atividade específica contra as toxinas do Cd. A utilização destes agentes em estudos de animais tem demonstrado excelentes resultados, e pode ser útil na proteção dos pacientes com risco de adquirir a doença ou evitar

recidiva.^{65,66} Um oligossacarídeo sintético (Synsorb) pode ser útil no tratamento da CDAD, em virtude de que ele pode ligar-se e neutralizar a toxina.^{67,68} Os resultados das experiências clínicas usando estes novos agentes estão sendo aguardados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Este estudo é do tipo retrospectivo transversal, com utilização dos dados de pesquisa da toxina A produzida pelo *Clostridium difficile* (Cd) disponibilizados pelo Laboratório Weinmann.

3.2 Pesquisa da toxina A do *Clostridium difficile*

Para a pesquisa da toxina A do Cd foi utilizado o sistemas Vidas® Cd Toxin II (CDA2, biomerieux S.A.) que permite a detecção da toxina A do Cd através do método ELFA (Enzime Linked Fluorescent Assay).

Uma fração da amostra é colocada no cone que é revestido pelo anticorpo de coelho antitoxina A. A toxina A presente na amostra liga-se então a estes anticorpos. Através de lavagens sucessivas os componentes não fixados são eliminados. Anticorpos monoclonais de rato anti-*C.difficile* toxina A, marcados com fosfatase alcalina, são adicionados aos cones e ligam-se a toxina A complexada ao anticorpo de coelho antitoxina A. Uma nova etapa de lavagem permite eliminar os

componentes não fixados. O substrato (4-Metil-umbeliferil fosfato) é adicionado e sobre hidrólise por ação da fosfatase alcalina, de um produto fluorescente (4-Metil-umbeliferona). A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de toxina A presente na amostra. Os resultados são analisados automaticamente no aparelho Vidas.

3.3 Levantamento de dados

Foi organizado um banco de dados no programa Microsoft Excel, onde constavam informações sobre as amostras, como origem, idade dos pacientes e resultados da pesquisa da toxina A do Cd. No caso das amostras de origem hospitalar, foi feita uma pesquisa no prontuário, buscando dados referentes a uso de antibióticos, pesquisa de leucócitos fecais, presença de febre, dor abdominal, hipoalbuminemia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico ou proteína C reativa alterada.

As análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS versão 12.0. Para a análise das variáveis categóricas foram utilizados os testes de qui-quadrado de Pearson com correção de Yates ou teste exato de Fisher, quando necessário. As variáveis quantitativas foram comparadas através do teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram analisados 288 resultados da pesquisa da toxina A do *Clostridium difficile* (Cd) realizadas no Laboratório Weinmann durante o período de junho de 2003 a dezembro de 2004. Destas, 91 (31,6%) eram de origem hospitalar e 197 (68,4%) ambulatoriais.

4.1 Análise da população geral

Os dados sobre a idade dos indivíduos cujas amostras foram analisadas neste estudo não estavam disponíveis em 50 casos, e entre os 238 analisados, resultou uma média de 58,5 anos (0-97), com uma mediana de 65 anos.

A pesquisa da toxina A de Cd resultou positiva em 33 casos, resultando em uma positividade de 11,5%. Quando analisado o resultado de acordo com a origem das amostras, verificou-se uma positividade para Cd de 11,7% para as amostras de origem ambulatorial e de 11,0% para as de origem hospitalar.

A média de idade dos pacientes cujas amostras resultaram positivas para Cd foi 56,8 anos, e para os que resultaram negativos, 58,2.

4.2 Análise dos pacientes hospitalizados

Nos pacientes hospitalizados, foi feita uma busca nos prontuários de dados sobre a internação, resultados de exames complementares e, principalmente sobre o uso de antibióticos.

Em relação ao gênero, 38 pacientes (41,8%) eram do sexo masculino e 53 (58,2%) do sexo feminino.

A média de tempo de hospitalização foi de 34,8 dias (2-338), com mediana de 21 dias.

Analisando o motivo da internação dos pacientes que realizaram pesquisa de Cd, encontramos que em 19 pacientes (20,9%) foi diarreia e em 72 (79,1%) foram outros motivos.

Dos exames complementares que pode ter relação com diarreia verificamos que estes não eram solicitados em todos os casos.

A coprocultura foi solicitada em 45 dos 91 pacientes que realizaram pesquisa de Cd, resultando todas negativas para outras bactéria reconhecidamente patogênicas.

O exame parasitológico de fezes, realizado pelo método de sedimentação espontânea, foi solicitado em 56 pacientes, resultando somente um (1,8%) positivo para *Giardia lamblia*.

A presença de leucócitos fecais foi positiva em dois pacientes (5,3%) dos 38 pacientes em que foi realizada a pesquisa. Entre os pacientes que realizaram a pesquisa de leucócitos fecais, nenhum apresentou Cd positivo independente do resultado ($p=0,999$).

O acompanhamento das temperaturas corporais dos pacientes constava em 71 dos prontuários examinados, estavam acima da média normal (36,7 e 37,4°C) em 44 casos (62,0%), sendo que destes, 7 (15,9%) resultaram positivos para Cd ($p=0,144$).

Com relação à presença de dor abdominal, dos 38 que constavam dados nos prontuários, 21 pacientes (55,3%) relataram queixa e 17 (44,7%) não. Dos pacientes que relataram dor abdominal, 4 (19%) tinham Cd positivo ($p=0,113$).

A pesquisa de níveis séricos de albumina foi realizada em 59 pacientes. Foi observada hipoalbuminemia em 42 pacientes (71,2%), dos quais 9 tinham Cd positivo (21,4%). A relação entre positividade para Cd e hipoalbuminemia foi estatisticamente significativa ($p=0,048$).

A desidratação foi observada em 26 pacientes (57,8%) dos 45 em que foi encontrado o dado no prontuário. Dos pacientes com desidratação, 5 (19,2%) tinham Cd positivos ($p=0,681$).

O desequilíbrio eletrolítico foi observado em 25 pacientes (33,3%) dos 75 em que foi solicitada pesquisa de eletrólitos. Dos pacientes com desequilíbrio eletrolítico, 3 (12%) deram resultado positivo para Cd, enquanto que dos que não apresentaram desequilíbrio eletrolítico, 5 (10%) resultaram Cd positivos ($p=0,999$). A presença de proteína C-reativa alterada foi verificada em 32 pacientes (66,7%) dos 48 solicitados. Das positivas, 8 (25%) tinham Cd positivo ($p=0,238$).

Dos 91 pacientes hospitalizados, 61 (67,0%) fizeram uso de antibiótico, sendo 70,5% destes idosos. Dentre os pacientes que receberam antibiótico, 45,9% utilizaram apenas um tipo durante o período de hospitalização, 32,8% utilizaram 2 tipos, 19,7%, 3 tipos e 1,6%, 4 tipos. Os antibióticos utilizados foram quinolonas em 28,7% dos casos, penicilina em 20,4%, lincosamidas em 12,0%, cefalosporinas em 23,1%, macrolídeos em 0,9% e aminoglicosídeos em 14,8%. A positividade para Cd nos pacientes que utilizaram antibiótico foi de 11,5%. Dentre os pacientes que resultaram positivo para Cd, 70,0% fizeram uso de antibiótico. Dos que resultaram negativo, 66,7% foram tratados com antibiótico ($p=0,999$). Os pacientes que utilizaram mais de um tipo de antibiótico resultaram todos negativos para Cd, e entre os que utilizaram somente um tipo de antibiótico, 25% foram positivos para Cd ($p<0,001$). Nos 7 pacientes que resultaram positivos para Cd, 4 usaram quinolonas, 1 usou penicilinas, 1 usou cefalosporinas e 1, macrolídeos, tendo utilizado estes

antibióticos por um período médio de 13,29 dias ($p=0,363$). Destes 7 pacientes que fizeram uso de antibiótico e resultaram Cd positivo, 6 (85,7%) eram idosos.

Tabela 1: Resultados das análises dos pacientes hospitalizados

	n (%)	n (total)
Gênero feminino	53 (58,2)	91
Hospitalizados	19 (20,9)	91
Coprocultura positiva	0 (0)	45
EPF positivo	1 (1,8)	56
Leucócitos fecais	2 (5,3)	38
Temperatura alterada	44 (62,0)	71
Dor Abdominal	21 (55,3)	38
Hipoalbuminemia	42 (71,2)	59
Desidratação	26 (57,8)	45
Desequilíbrio eletrolítico	25 (33,3)	75
Presença Proteína C-reativa	32 (66,7)	48
Uso Antibióticos	61 (67,0)	91
Positividade para Cd	33 (11,0)	91

Dos pacientes cujo motivo de internação foi diarreia ($n=19$), 52,6% receberam antibiótico, enquanto que entre os que foram internados por outro motivo, 70,8% receberam antibiótico ($p=0,220$). Dentre os pacientes que foram internados por diarreia ($n=10$), 7 receberam somente um tipo de antibiótico, e 3 receberam 2 tipos, tendo utilizado o antibiótico durante um período médio de 12,75 dias ($p=0,290$). Dos pacientes que foram internados por outros motivos ($n=51$), 21

receberam somente um tipo de antibiótico, 17 receberam 2, 12 receberam 3 e 1 recebeu quatro, sendo o tempo de uso médio 21,62 dias. Quando observado o resultado de Cd, nos pacientes que foram internados por diarreia, a positividade foi de 10,5%, e nos internados por outro motivo, 11,1% ($p=0,999$).

Em relação ao uso de vancomicina e/ou metronidazol, nos pacientes que resultaram Cd positivo foi utilizada em 50,0% dos casos, e nos pacientes com Cd negativo, em 44,4% ($p=0,750$). Nos pacientes que foram internados por diarreia 36,8% foram tratados com vancomicina e/ou metronidazol e nos internados por outros motivos, 47,2% receberam vancomicina e/ou metronidazol ($p=0,583$). A relação entre uso de antibiótico e vancomicina e/ou metronidazol mostrou que 59,0% dos pacientes que usaram antibiótico foram tratados com vancomicina e/ou metronidazol, enquanto que nos pacientes que não usaram antibiótico, somente 16,7% foram tratados com vancomicina e/ou metronidazol ($p<0,001$).

4.3 Análises pacientes idosos

Analisando os pacientes com idade superior a 60 anos, verificamos que correspondiam a 139 (58,4%) dos indivíduos com este dado disponível ($n=238$), sendo 63 de origem hospitalar (45,3%) e 76 de origem ambulatorial (54,7%). Nestes pacientes, a positividade para Cd foi de 9,4%, enquanto que nos indivíduos com idade inferior a 60 anos, foi de 10,1%. A distribuição dos pacientes idosos hospitalizados que realizaram pesquisa de Cd de acordo com o gênero foi de 28 masculinos (44,4%) e 35 femininos (55,6%).

A idade média foi de 76,3 anos (60-97 anos), com mediana de 76 anos. O tempo médio de internação foi de 39,31 dias (93-338 dias), com mediana de 20,5 dias.

O motivo de internação dos idosos foi em 12 casos diarreia (19,0%). EPF foi realizado em 37 pacientes, sendo somente 1 positivo. A coprocultura foi solicitada 31 casos, resultando todas negativas para bactérias reconhecidamente patogênicas. A presença de leucócitos fecais foi pesquisada em 25 pacientes, e em um caso resultou positiva.

A temperatura corporal dos pacientes idosos foi acompanhada em 49 pacientes, sendo observada elevação em 26 casos (53,1%). No prontuário de 29 pacientes constava observação sobre presença de dor abdominal, sendo que 14 (48,3%) apresentaram esta queixa.

A pesquisa de albuminemia foi realizada em 43 pacientes, apresentando 31 hipoalbuminemia (72,1%). A desidratação foi relatada em 16 pacientes (51,6%) que tinham este dado disponível no prontuário (n=31). O desequilíbrio eletrolítico foi observado em 18 (34,6%) dos 52 pacientes que tinham este dado disponível. A pesquisa de proteína C reativa foi solicitada em 30 pacientes, e foi observada alteração em 21 (70,0%).

Dos 63 pacientes idosos hospitalizados, 43 (68,3%) fizeram uso de antibiótico. O tempo médio de uso de antibiótico foi de 23,17 dias (3-140 dias), com mediana de 15 dias. Dezenove pacientes fizeram uso de somente um tipo de

antibiótico durante o período de hospitalização, 14 pacientes, dois tipos de antibióticos, 9 pacientes, 3 tipos de antibióticos, e 1 paciente, 4 tipos de antibióticos. Do total de pacientes idosos que utilizaram antibióticos, 28,2% fizeram uso de quinolonas, 23,1% de penicilinas, 11,5% de lincosamidas, 23,1% de cefalosporinas, 1,3% de macrolídeos e 12,8% de aminoglicosídeos. Dos pacientes idosos hospitalizados, 27 (42,9%) receberam vancomicina e/ou metronidazol. Dos 7 pacientes que receberam antibioticoterapia e resultaram Cd-positivo, 6 eram idosos, e destes 5 receberam vancomicina.

Tabela 2: Resultado da análise dos pacientes idosos hospitalizados (> 60 anos)

	n (%)	n (total)
Gênero feminino	35 (55,6)	63
Hospitalizados diarreia	12 (19,0)	63
EPF positivo	1 (2,7)	37
Leucócitos fecais	1 (4,0)	25
Temperatura alterada	26 (53,1)	49
Dor Abdominal	14 (48,3)	29
Hipoalbuminemia	31 (72,1)	43
Desidratação	16 (51,6)	31
Desequilíbrio eletrolítico	18 (34,6)	52
Presença Proteína C-reativa	21 (70,0)	30
Uso Antibióticos	43 (68,3)	63
Positividade para Cd	63 (9,4)	139

A descrição dos resultados obtidos para o total de pacientes do estudo e para os idosos está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos resultados obtidos para o total de pacientes do estudo e para os idosos

	Geral (%)	Idosos (%)
Hospitalizados	68,4	45,3
Tempo médio de hospitalização em dias (min – max)	34,8 (2-338)	39,3 (93-338)
Mediana da idade (anos)	65	76
Uso de antibiótico	67,0	68,3
Positividade para Cd	11,5	9,4
EPF positivo	1,8	2,7
Coprocultura positiva	0	0
Presença de leucócitos fecais	5,3	4,0
Febre	62,0	53,1
Dor Abdominal	55,3	48,3
Hipoalbuminemia	71,2	72,1
Desidratação	57,8	51,6
Desequilíbrio eletrolítico	33,3	34,6
Presença Proteína C-reativa	66,7	70,0

A relação entre positividade para Cd e as variáveis analisadas está descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Relação entre positividade para Cd e as variáveis analisadas

	Positividade para Cd (%)	p
Hospitalizados	11,0	0,999
Uso de antibiótico	70,0	0,999
Idade >= 60 anos	9,4	0,999
Presença de Leucócitos fecais	0	0,999
Febre	87,5	0,144
Dor abdominal	100,0	0,133
Hipoalbuminemia	100,0	0,048
Desidratação	71,4	0,681
Desequilíbrio eletrolítico	37,5	0,999
Presença Proteína C-reativa	88,9	0,238

5. DISCUSSÃO

A colonização por Cd durante a hospitalização freqüentemente ocorre em 21% dos pacientes, e sintomas clínicos desenvolvem-se em cerca de 1/3 dos pacientes colonizados.³ A presença de Cd é comum em pacientes debilitados ou adultos hospitalizados. A prevalência encontrada neste estudo foi de 11,5%, portanto dentro das médias relatadas na literatura. A positividade das amostras quanto à sua origem foi de 11,7% para os pacientes ambulatoriais e de 11,0% para os hospitalares, não havendo uma variação significativa.

Infecções por Cd em pessoas idosas são comuns e importantes causas de morbidade e mortalidade.⁶⁹ A média de idade dos pacientes deste estudo foi de 58,04 anos (0-97 anos), com mediana de 65 anos, mostrando que a maioria dos pacientes eram idosos. A média de idade entre os pacientes que resultaram positivos e negativos para Cd foi semelhante (56,8 e 58,2 anos, respectivamente).

O Cd é comum nos pacientes hospitalizados, sendo relatadas freqüências entre 15 e 25%.⁷⁰ A transmissão é freqüente, porém normalmente permanece assintomática.⁷¹ Neste estudo, a pesquisa de Cd foi feita utilizando sistema Vidas® bioMérieux, método de enzima imunoensaio (EIA) para detecção de toxina A de Cd,

método mais utilizado na rotina de laboratório clínico para pesquisa de Cd. Foi verificada uma prevalência de 11,0%, um pouco abaixo da encontrada na literatura. A sensibilidade do teste utilizado é de 80,6%, mas falhas na detecção da enterotoxina A do Cd com este sistema podem acontecer em virtude de níveis baixos da toxina A.⁷² Halsteade e colaboradores demonstraram que a capacidade de detecção da toxina A pelo sistema Vidas® é menos sensível e levemente menos específica que os testes de citotoxicidade (80,6% e 100%, respectivamente).⁷³ Os testes de citotoxicidade, porém, são de difícil utilização na rotina dos laboratórios clínicos, pois além do elevado custo demoram mais tempo na realização do procedimento, e requerem um ambiente estéril, um teste de citotoxicidade para todas as amostras negativas no Vidas® seria praticamente impossível.⁷⁴

Komatsu e colaboradores desenvolveram um estudo em 2003, pesquisando toxina A e B de Cd em 77 pacientes hospitalizados. Os resultados mostraram que em 30 pacientes, a toxina A resultou negativa e a toxina B positiva, e em 47 pacientes ambas toxinas A e B foram positivas. Nos casos pesquisados neste estudo, seria possível que algumas amostras que resultaram negativas para Cd fizessem parte do primeiro grupo relatado por Komatsu e colaboradores, porém estas espécies de Cd toxina A-negativa e toxina B-positiva raramente são encontradas na rotina do laboratório clínico.⁷³

Se o Cd é suspeito clinicamente e a toxina A não é detectada, existe a possibilidade de uma toxina A variante, não detectável pelo sistema Vidas®, sendo necessários testes adicionais, como PCR. No entanto, a taxa de recuperação dos

genes toxi A e toxi B através de PCR e da toxina A de Cd pelo sistema Vidas® é quase a mesma, 44,9% e 46,7% respectivamente.⁷⁵

As infecções hospitalares por Cd resultam de uma maior permanência dentro do ambiente hospitalar.⁷¹ Komatsu e colaboradores, através de eletroforese em campo pulsado, demonstraram que 30 de 47 amostras positivas para Cd foram adquiridas no ambiente hospitalar.⁷⁶ Apesar da média de permanência dos pacientes hospitalizados neste estudo ter sido alta, 34,8 dias, a prevalência de Cd ficou abaixo das relatadas na literatura.

Estes resultados podem ser devidos ao fato de que algumas cepas de Cd são não-toxigênicas, não produzindo toxina A nem B, e portanto resultando negativas na pesquisa pelo sistema Vidas®. Nestes casos, a diarreia seria por outros motivos, uma vez que as toxinas de Cd é que são responsáveis pela diarreia.⁷⁷ Sabe-se que a maioria das diarreias associadas a antibióticos é devida a mudanças na fermentação bacteriana colônica de carboidratos e não é atribuível ao Cd.⁷⁸

Como as amostras de Cd de pacientes hospitalizados analisadas eram procedentes de um hospital particular que conta uma comissão de prevenção e controle da infecção hospitalar atuante, o controle de uso de antimicrobianos, bem como a desinfecção ambiental também justificariam uma taxa menor de infecção por Cd.

Nos pacientes hospitalizados deste estudo, foram analisados fatores considerados de risco para Cd, como antibioticoterapia e idade avançada (>60 anos), agentes que podem contribuir para o desenvolvimento de diarreia, como parasitas e alteração da microbiota intestinal, além de exames cujo resultado alterado está normalmente associado à infecção por Cd, como proteína C reativa e albuminemia. A presença de leucócitos fecais também foi investigada, pois é associada à enteropatia inflamatória, por exemplo, colite pseudomembranosa.⁷⁸

Neste estudo, a prevalência de infecção por Cd nos pacientes hospitalizados foi levemente maior em mulheres que em homens, 58,2 e 41,8%, respectivamente. Não existem referências na literatura sobre gênero como fator de risco para infecção por Cd, apenas esclarecendo que as diarreias pós-antibiótico estariam ligadas a fatores de risco como antibioticoterapia, hospitalização, uso de sondas entéricas e fatores imunológicos.⁷⁷

Ozaki e colaboradores demonstraram que indivíduos altamente colonizados por enterococos mais freqüentemente apresentam colonização por Cd.⁷⁹ Nos pacientes em que foi realizada coprocultura o resultado não evidenciou a presença de bactérias reconhecidamente patogênicas, como *Samonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli* invasora, porém não foi feita pesquisa específica de enterococo.

A presença de parasitas intestinais é uma causa possível de diarreia.⁸⁰ Por conseguinte, a pesquisa de patógenos entéricos deve ser realizada juntamente com a pesquisa de doença entérica. O exame parasitológico de fezes (EPF) foi

positivo somente em um paciente, mostrando presença de *Giardia lamblia*. O uso de determinados antibióticos pode induzir hipocloridria, o que predispõe o paciente a uma infecção entérica por *Giardia lamblia*.⁸¹

Um terço dos pacientes colonizados podem desenvolver colite induzida pelo Cd.⁷⁸ Esta forma de colite é a principal causa de diarreia em pacientes hospitalizados, principalmente naqueles com mais de 3 dias de hospitalização em uso de antibiótico. A presença de leucócitos fecais não é específica das diarreias pela toxina do Cd, mas sim nos casos que desenvolvem colite por Cd. Tradicionalmente, os testes para leucócitos fecais, detectam inflamação no intestino grosso ou lesão, condição esta que leva leucócitos para dentro das fezes.⁸² A presença de leucócitos fecais foi positiva em 2 pacientes dos 38 que realizaram o teste, no entanto nenhum apresentou Cd positivo. Estes dois casos provavelmente sejam outros processos inflamatórios sem a presença da colite por Cd.

A elevação da temperatura corporal pode chegar até 40°C, e quando associada a leucocitose, distensão, dor e sensibilidade abdominal sugerem infecção.⁷⁸ Em 62% dos pacientes nos quais havia registro de temperatura corporal, foi observada elevação. Destes, 7 resultaram positivos para Cd, podendo esta infecção ser responsável pela presença de febre, mas nos pacientes negativos, a febre poderia ser resultante de outros processos inflamatórios ou infecciosos.

A dor abdominal pode estar presente em várias situações clínicas, sendo a doença inflamatória crônica caracterizadas por inflamação difusa da mucosa envolvendo apenas o cólon.⁷⁸ Nos casos de colite, a dor abdominal é freqüente.

Neste estudo, dos 21 pacientes que relataram queixa de dor abdominal, 4 (19%) resultaram positivos para Cd. Dentre os que não relataram esta queixa (n=17), nenhum resultou positivo para Cd.

A hipoalbuminemia é a condição *sine qua non* da enteropatia perdedora de proteínas, incluindo a colite. Vários trabalhos verificaram que em casos de infecção por Cd a hipoalbuminemia é um dado relevante.^{83,78,84} Neste estudo, dos 59 pacientes em que foi realizada a pesquisa de níveis séricos de albumina 42 (71,2%) apresentaram hipoalbuminemia, dos quais 9 foram positivos para Cd. A relação entre a positividade para Cd e hipoalbuminemia foi estatisticamente significativa.

A diarreia, especialmente em pacientes idosos, pode levar à desidratação e ao desequilíbrio eletrolítico. A presença de diarreia e febre indica lesão tecidual colônica causada por bactéria ou toxina do Cd. Como estes microrganismos comprometem predominantemente o cólon, a diarreia é de pequeno volume (<1 litro/dia). Diarreia que persiste por mais de 14 dias não é atribuível a patógeno bacteriano (exceto Cd) e deve ser avaliada como uma diarreia crônica.⁷⁸

Nos pacientes hospitalizados deste estudo, 19 foram internados por apresentarem diarreia, e destes, 2 resultaram positivos para Cd (10,5%). Dos pacientes internados por outros motivos, 8 foram positivos para Cd (10,1%). Nas diarreias mais graves, a desidratação pode ocorrer, principalmente no idoso, alterando a atividade do cólon e aumentando a diarreia com uma perda maior de eletrólitos.

A desidratação foi observada em 16 pacientes (51,6%) dos que tinham este dado no prontuário (n=31), sendo que 5 destes apresentaram Cd positivo. O desequilíbrio eletrolítico foi observado em 37,5% dos pacientes que resultaram Cd positivo. Nos pacientes que resultaram negativos para Cd, 32,8% apresentaram desequilíbrio eletrolítico. O desequilíbrio eletrolítico é caracterizado por uma perda de eletrólitos, como sódio, potássio e água, em virtude da diarreia. Não é específico de diarreia por Cd, podendo ocorrer em várias situações que interferem com os processos fisiológicos normais, como pelo uso de antimicrobianos.

A elevação dos níveis de proteína C reativa é um marcador importante de inflamação.^{85,86} Solem e colaboradores encontraram uma associação entre níveis elevados de proteína C reativa com doença clínica ativa, inflamação endoscópica e outros biomarcadores de inflamação em pacientes com doença inflamatória do intestino.⁸⁷ Tan e colaboradores propuseram recentemente que a proteína C reativa possui uma potente ação antimicrobiana e que favoreceria uma eliminação eficiente do agente bacteriano.⁸⁸

Os resultados deste estudo mostraram que 88,9% dos pacientes que resultaram positivos para Cd apresentavam níveis alterados de proteína C reativa. Dos negativos para Cd, 61,5% apresentavam PCR alterada. Como PCR alterada é um marcador de inflamação, estes paciente que resultaram Cd negativo com PCR alterada poderiam estar desenvolvendo algum processo inflamatório não relacionado ao Cd.

A diarreia associada a antibióticos é uma ocorrência clínica comum. Ocorre durante a exposição ao antimicrobiano e cede espontaneamente após a suspensão da antibioticoterapia. É uma diarreia do tipo jejunal, aquosa, devida à fermentação bacteriana colônica de carboidratos, não sendo devida ao Cd. Quando pelo uso de antibióticos houver uma exacerbação de Cd, a diarreia pode se tornar do tipo toxigênica podendo evoluir para uma colite ocasionada pela toxina do Cd.⁸⁵ Os antibióticos que mais freqüentemente estão associados com a exacerbação do Cd são ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas e clindamicina. Os que ocasionalmente causam, são penicilinas (outras), sulfonamidas, eritromicina e quinolona. Os que raramente causam, são aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol. O Cd usualmente exibe resistência contra antibióticos beta-lactâmicos, enquanto sua sensibilidade para outras drogas pode variar.⁸⁹

O tratamento preconizado para diarreia associada a Cd é a suspensão do antimicrobiano em uso, e instauração de terapia com metronidazol, ficando a vancomicina reservada para os casos de recidivas.

Dos pacientes que resultaram Cd positivo, 70% tinham feito uso de antibiótico, e entre os que resultaram Cd negativo, 66,7%, não sendo verificada uma relação estatisticamente significativa entre uso de antibiótico e positividade para Cd. O uso de um único antibiótico durante o período de hospitalização mostrou uma relação significativa com a positividade para Cd. Os antibióticos mais utilizados isoladamente foram quinolonas cefalosporinas e penicilinas, antibióticos mais freqüentemente associados à exacerbação de Cd. Quando foram analisados os pacientes que foram internados por apresentarem diarreia, foi verificado que 52,6%

foram tratados com antibiótico, sendo que 70,0% destes receberam somente um antibiótico.

A antibioticoterapia nestes pacientes provavelmente foi administrada para tratamento de infecções não relacionadas à diarreia. Nos pacientes que foram internados por apresentarem diarreia, não foi observada uma relação significativa com a positividade de Cd.

O metronidazol e/ou vancomicina foram utilizados em 50,0% dos pacientes que resultaram Cd positivo e em 44,4% dos Cd negativo. A vancomicina é um antibiótico largamente utilizado no ambiente hospitalar, podendo os pacientes Cd negativos terem sido tratados com este antibiótico por infecções independentes da presença de Cd. Isto é reforçado pelo dado que a 59,0% dos pacientes que receberam antibiótico também foi administrado vancomicina e/ou metronidazol, enquanto que aos pacientes que não usaram outro antibiótico, somente a 16,7% foi administrada vancomicina e/ou metronidazol.

Analisando os pacientes idosos deste estudo (idade maior ou igual a 60 anos), verificamos que os resultados das diversas análises realizadas não diferiram muito em relação aos resultados gerais observados (Tabela 2). Isto deve-se provavelmente ao fato de que uma grande parte dos indivíduos estudados eram idosos, comprovado pela mediana de idade de 65 anos. O dado sobre a porcentagem de pacientes de origem hospitalar geral (68,4%) e entre idosos (45,3%) foi importante, mostrando que os pacientes idosos, mesmo não-hospitalizados, são

mais suscetíveis à diarreia após antibioticoterapia, uma vez que esta é a principal causa de solicitação de pesquisa de toxina A de Cd.⁸⁹

A elevação da temperatura corporal observada na análise geral foi mais freqüente do que em idosos. Sabe-se que a resposta imunológica do idoso às infecções é menos eficiente do que do indivíduo adulto jovem, devido à imunosenescência.^{90,91} Este fato poderia justificar a diferença observada entre a freqüência de febre entre os pacientes gerais e os idosos.

Infecções em pessoas idosas são comuns e importante causa de morbidade e mortalidade. Infecções do trato respiratório inferior, pele, tecidos moles, incluindo úlceras de decúbito, ou do trato urinário levam ao freqüente uso de antibióticos em idosos, independente de hospitalização. Os antimicrobianos mais usados nestas situações são fluorquinolonas, beta-lactâmicos (penicilina, ampicilina, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações) e aminoglicosídeos. Nos casos de infecções por *Staphylococcus aureus*, é recomendado o uso de vancomicina.⁶⁹

As quinolonas, ampicilinas e cefalosporinas fazem parte do grupo de antimicrobianos que mais freqüentemente causam exacerbação de Cd e diarreia, sendo os idosos ainda mais suscetíveis. Neste estudo, os dados sobre uso de antibiótico entre os idosos só estava disponível para os hospitalizados, sendo que 68,3% receberam antibiótico. Destes, 44,2% receberam somente um antibiótico. Os antibióticos mais utilizados foram quinolonas (28,2%), penicilinas e cefalosporinas (23,1% cada), justamente os antibióticos associados mais freqüentemente com

diarréia por Cd. A vancomicina e/ou metronidazol foi utilizado em 42,9% dos pacientes idosos (27/63), apesar de somente 6 terem apresentado resultado positivo para Cd.

Nestes pacientes, provavelmente o uso de vancomicina e/ou metronidazol foi empírico, visando combater uma possível diarréia por Cd, ou o uso de vancomicina foi para combater outra infecção do paciente, independente de Cd.

A diarréia como consequência do uso de antibióticos está associada a uma alteração de microbiota intestinal, com exacerbação de Cd. Esta infecção pode levar a alta morbidade e mortalidade especialmente em pacientes idosos. Não existe uma rotina de solicitação de pesquisa de Cd na maioria dos hospitais, pelo custo elevado do exame. O tratamento empírico com vancomicina pode ser prejudicial nos casos negativos para Cd, pois o uso deste antibiótico deveria ser restrito a bactérias resistentes a outros antimicrobianos, como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM). Nos indivíduos idosos, a diarréia por Cd pode ser perigosa, pois pode levar à desidratação e desequilíbrio eletrolítico, condições que debilitam este tipo de paciente, comprometendo sua recuperação e a evolução do tratamento.

6. CONCLUSÕES

✧ A prevalência de Cd nas 288 amostras analisadas no laboratório Weinmann, no período de junho de 2003 a dezembro de 2004, foi de 11,5%. Nas amostras de origem ambulatorial foi de 11,7% e nas de origem hospitalar, 11,0%.

✧ A prevalência de Cd nas 139 amostras de idosos analisadas no laboratório Weinmann, no período de junho a dezembro de 2004 foi de 9,4%.

✧ Nas amostras de origem hospitalar a prevalência de Cd nos pacientes que utilizaram antibióticos foi de 11,5%. O uso de um único tipo de antibiótico durante o período de hospitalização mostrou uma relação significativa com a positividade para Cd ($p < 0,001$).

✧ Dentre os resultados de diversos exames analisados (Hipoalbuminemia, exame parasitológico de fezes, leucócitos fecais, febre, dor abdominal, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, proteína C-reativa), somente hipoalbuminemia apresentou uma associação com positividade para Cd ($p = 0,048$).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gerri S. Hall. Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile*. *Advance/Laboratory*. 1999;38-41.
2. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, et al. Antibiotic Associated pseudomembranous colitis due toxin producing Clostridia. *NEJM*;1978;298:531-534.
3. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile* – associated Diarrhea: A review *Arch Intern Med*;2001;161;525-533.
4. Garcia B, Uzeda M. Ocorrência de *Clostridium difficile* nas fezes de crianças do Rio de Janeiro. *Ver Inst Med. Trop São Paulo*;1988;30:419-423.
5. Hirschhorn LR, Trnka Y, Onderdonk A, Lee MI, Plarr R. Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis*.1994;169:127-133.
6. Levy DG, Stergachis A, Mcfarland LV, et al. Antibiotic and *Clostridium difficile* Diarrhea in the ambulatory care setting. *Clin Ther*.2000;22:91-102.
7. Macfarland LV, Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotics-associated diarrheae. *Dig Dis*.1998;16:292-307.
8. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*.1992;15:573-581.

9. Fekety R, American College of Gastroenterology. Practice Parameters Committee. Guidelines for diagnosis and management of *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis. Am J Gastroenterol.1997;92:739-750.
10. Bergone-Bérézin E. Treatment and prevention of antibiotic associated Diarrhea. Intern J. Antimicrobial Agents.2000;16:521-526.
11. Cornish N. Diagnosing *Clostridium difficile* diarrhoea and Colitis. CAP today 2003;17(9):44
12. Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, et al. *Clostridium difficile* - associated diarrhea and colitis in adults: a prospective case - controlled epidemiologic study. Arch. Intern. Med.1986;146:95-100.
13. Bacon AE, Fekety R, Schaberg DR, Faix RG. Epidemiology of *Clostridium difficile* Colonization in newborns: results using a bacteriophage and bacteriocin typing system. J. Infect. Dis.1988;158:349-354.
14. Tedesco FJ. Pseudomembranous colitis: pathogenesis and therapy. Med. Clin. North Am.1982;66:655-664.
15. Hannonen P, Hakola M, Mottonen T, Oka M. Reactive oligoarthritis associated with *Clostridium difficile*. Scand J. Rheumatol.1989;18:57-60.
16. Morris JB, Zollinger RM Jr, Stellato TA. Role of surgery in antibiotic-induced pseudomembranous enterocolitis. Am J Surg.1990;160:539-539.
17. Rubin MS, Bodenstein LE, Kent KC. Severe *Clostridium difficile* colitis. Dis Colon Rectum.1995;38:350-354.
18. Drapkin MS, Worthington MG, Chang TW, Razvi AS. *Clostridium difficile* colitis mimicking acute peritonitis. Arch Surg.1985;120:1321-1322.
19. Fekety R, Silva J, Buggy B, Deery HG. Treatment of antibiotic-associated colitis with vancomycin. J antimicrob Chemother.1984;14(suppl D):97-102.

20. Suravics CM, Mcfarland LV, Elmer G, Chinn J. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. Am J Gastroenterol.1989;84:1285-1287.
21. Fekety R, Macfarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Mulligan ME. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective randomized, double blinded trial. Clin Infect Dis.1997;24:324-333.
22. Qualman SJ, Petric M, Karmali MA, Smith CR, Hamilton SR. *Clostridium difficile* invasion and toxin circulation in fatal-pediatric pseudomembranous colitis. Am J Clin Pathol.1990;94:410-416.
23. Pothoulakis C. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Eur J Gastroenterol Hepatol.1996;8:1041-1047.
24. Sabra A . Diarréia Aguda e Crônica em Pediatria.1994;4:439-440.
25. Lyerli DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins Clin Microbiol Ver.1988;1:1-18.
26. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: clinical considerations. Ver Infect Dis.1990;12(Suppl 2):S243-S251.
27. Bulusu M, Narayan S, Shetler K, Triadafilopoulos G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea. Am J. Gastroenterol.2000;95:3137-3141.
28. Fortson WC, Tedesco FJ, Drug-induced colitis: a review. Am J. Gastroenterol.1984;79:878-883.
29. Macdonald, Ward P, Harvey K. Antibiotic-associated diarrhea and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Med J Aust.1982;1:462-464.

30. Hermes DJ, Miner PB Jr. Exacerbation of ulcerative colitis. *Gastroenterology*.1991;101:254-262.
31. Gerding DN, Brazier JS. Optimal methods for identifying *Clostridium difficile* Infections. *Clin Infect Dis*.1993;16:(suppl 4):S439-S442.
32. Aldeen WE, Bingham M, Aiderzada A, Kucera J, Jense S, Carol KC. Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools. *Diag Microbiol Infect Dis*.2000;36:211-213.
33. S.M. Lipson, G. Tartora, A. Tempone, D.P. Fedorko, E.D. Spitzer Rapid Detection of *Clostridium difficile* in stool using the Vidas ® C. difficile Toxina A II Assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*.2003;117-121:(45)
34. Lyerli DM, Neville LM, Evans DT, et al. Multicenter evaluation of *Clostridium difficile* TOX A/A TEST. *J Clin Microbiol*.1998;36:184-190.
35. Lyerli DM, Ball DW, Toth J, Wilkins TD. Characterization of cross-reactive proteins detected by Culturette Brand Rapid Latex test for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*.1988;26:397-400.
36. Tedesco FJ, Stamley RJ, Alpers DH. Diagnostics features of clindamicin associated pseudomembranous colitis. *N Engl J Med*.1974;290:841-843.
37. Yankes JR, Baker ME, Cooper C, Garbutt J. CT appearance of focal pseudomembranous colitis. *J Comput Assist Tomogr*.1988;12:394-396.
38. Gebhard RL, Gerding DN, Olson MM, et al. Clinical and endoscopic findings in patients early in the course of *Clostridium difficile*-associated pseudomembranous colitis. *Am J Med*.1985;78:45-48.
39. Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT Jr, Gerdin DN. Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated diseases surveillance and treatment at the

- Minneapolis VA Medical Center. 1982-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol.*1994;15:371-381.
40. Zimmerman MJ, Bak A, Sutherland LR. Review article: treatment of *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther.*1997;11:1003-1012.
 41. Novak E, Lee JG, Seckman CE, Phillips JP, Di Santo AR. Unfavorable effect of atropine-diphenoxylate (Lomotil) therapy in lincomycin caused diarrhea. *JAMA.* 1976;235:1451-1454.
 42. Guzman R, Kirkpatrick J, Forward K, Lim F. Failure of parenteral metronidazole in the treatment of pseudomembranous colitis. *J Infect Dis.*1988;158:1146-1147.
 43. Oliva SL, Guglielmo BJ, Jacobs R, Pons VG. Failure of intravenous vancomycin and intravenous metronidazole to prevent or treat antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *J infect Dis.*1989;1154-1155.
 44. Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, et al. Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis. *Lancet.*1983;2:1043-1046.
 45. Wensch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis.*1996;22:813-818.
 46. ASHP therapeutic position statement on the preferential use of metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Am J Health Syst Pharm.*1998;55:1407-1411.
 47. Young GP, Ward PB, Bayley N, et al. Antibiotic-associated colitis due to *Clostridium difficile*: double-blind comparison of vancomycin with bacitracin. *Gastroenterology.*1985;89:1038-1045.

48. De Lalla F, Nicolini R, Rinaldi E, et al. Prospective study of oral teicoplanin versus oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Antimicrobial Agents Chemother.*1992;36:2192-2196.
49. Buggy BP, Fekety R, Silva J Jr. Therapy of relapsing *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis with the combination of vancomycin and rifampin. *J Clin Gastroenterol.*1987;9:155-159.
50. Lewis SJ, Freedman AR. Review article: the use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther.*1998;12:807-822.
51. Persky SE, Brandt LJ. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated Diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *Am J Gastroenterol.*2000;95:3283-3285.
52. Jobe BA, Grasley A, Deveney KE, Deveney CW, Sheppard BC. *Clostridium difficile* colitis: an increasing hospital - acquired illness. *Am J Surg.*1995;169:480-483.
53. Synnott K, Mealy K, Merry C, Kyne L, Keane C, Quill R. Timing of surgery for fulminating pseudomembranous colitis. *Br. J. Surg.*1998;85:229-231.
54. Lipsett PA, Samantaray DK, Tam MT, Bartlett JG, Lillemoen KD. Pseudomembranous colitis: a surgical disease?. *Surgery.*1994;116:491-496.
55. Morris LL, Villalba MR, Glover JL. Management of pseudomembranous colitis. *Am Surg.*1994;60:548-551.
56. Grundfest-Broniatowski S, Quader M, Alexander F, Walsh RM, Lavery I, Milsom J. *Clostridium difficile* colitis in the critically ill. *Dis Colon Rectum.*1996;39:619-623.

57. Medich DS, Lee KK, Simmons RL, Grubbs PE, Yang HC, Showalter DP. Laparotomy for fulminant pseudomembranous colitis. *Arch Surg.*1992;127:847-852.
58. Bradley SJ, Weaver DW, Maxwell NP, Bouwman DL. Surgical management of pseudomembranous colitis. *Am Surg.*1988;54:329-332.
59. McFarland L, Suravics CM, Stamm WE. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. Difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. *J infect Dis.*1990;162:678-684.
60. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Sila J Jr. Epidemiology of antibiotic-associated colitis: isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med.*1981;70:906-908.
61. Testore GP, Pantosti A, Cerquetti M, Badudieri S, Panichi G, GIANFRILLI PM. Evidence for cross-infection in outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a surgical unit. *J Med Microbiol.*1988;26:125-128.
62. Johnson S, Homann SR, Bettin KM, et al. Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole: a randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.*1992;117:297-302.
63. Climo MW, Israel DS, Wong ES, Williams D, Coudron P, Markwitz SM. Hospital-wide restriction of clindamycin: effect on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and cost.
64. Ludlam H, Brown N, Sule O, Redpath C, Coni N, Owen G. No antibiotic policy associated with reduced risk of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Age Ageing.*1999;28:578-580.

65. Lyerli DM, Bostwick EF, Binion SB, Wilkins TD. Passive immunization of hamsters against disease caused by *Clostridium difficile* by use of bovine immunoglobulin G concentrate. *Infect Immun.*1991;59:2215-2218.
66. Kelly CP, Pothoulakis C, Vavva F, et al. Anti-*Clostridium difficile* bovine immunoglobulin concentrate inhibits cytotoxicity and enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. *Antimicrob Agents Chemother.*1996;40:373-379.
67. Heerze LD, Kelm MA, Talbot JÁ, Armstrong GD. Oligosaccharide sequences attached to an inert support (Synsorb) as potential therapy for antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. *J Infect Dis.*1994;169:1291-1296.
68. Riegler M, Lamont J, Kuhnt-Moore S, et al. Immobilized oligosaccharides bind *Clostridium difficile* toxin B and diminish its effects in human colon (abstract). *Gastroenterology.*2000;118(suppl 2):A1366.Abstract 6214.
69. Ramirez-Ronda Ch et al. Management of urinary tract infections, decubitus ulcer and pneumonia in the aging person. *Entrez PubMed.* 2003 nov [capturado em 2004 dez 29]: [22 telas] disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/pubmed>
70. Barbut F, Petit JC. Epidemiology, risk factors and prevention of *Clostridium difficile* nosocomial infections. *Pathol Biol.*2000;48(8):745-55.
71. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. *Clin Microbiol Infect.*2001 ago7(8):405-10.
72. Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lyerly DM. Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.*2000(38):3072-3075.
73. Halsteade DC, Abid J, Gomez N, Gordon M. Multicenter comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile*. *Am Soc Microbiol.*2002(183):132.

74. Alfa MJ, Swan B, VanDekervhove B, Pang P, Harding GK. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: Comparison to triage *Clostridium difficile* panel, EIA for Tox A/B and cytotoxin assays. *Diagn Microbiol Infect Dis.*2002;43:257-263.
75. Wongwanich S, Rugdeekha S, Pongpech P, Dhiraputra C. Detection of *Clostridium difficile* toxin A and B genes from stool samples of Thai diarrheal patients by polymerase chain reaction technique. *J Med Assoc Thai.*2003 out;(10):970-5.
76. Komatsu M, Kato H, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, *et al.* High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. *Eur J Clin Microbiol Dis.*2003;22(9):525-9.
77. Pothoholakis C. Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. *Ann N Y Acad Sci.*2000;915:347-56.
78. Lawrence M, Tierney Jr, Stephen J, Maxime AP. Diagnóstico e tratamento.2004; 1:643-344.
79. Ozaki E, Kato H, Kita H, Krasawa T, Maegawa T, Koino Y, *et al.* *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. *J Med Microbiol.*2004;53(2):167-72.
80. Maraki S, Georgiladakis A, Tselentis Y, Samonis G.A 5-year study of the bacterial pathogens associated with acute diarrhea on the island of Crete, Greece, and their resistance to antibiotics. *Eur J Epidemiol.*2003;18(1):85-90.
81. Khatami SS, Mukunda B, Ravakhah K. coinfection with *Giardia lamblia* and *Clostridium difficile* after use of ranitidine. *Am J Med Sci.*2004;327(2):91-3.

82. Granville LA, Cernoch P, Land GA, Davis JR. Performance assessment of the fecal leukocyte test for inpatients. *J Clin Microbiol.*2004;42(3):1254-6.
83. Yassin SF, Fadok TMMY, Zein NN, Pardi DS. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Mayo Clin Proc.*2001;(76):725-730.
84. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile* associated diarrhea: a review. *Arch Intern Med.*2001;(161):525-533.
85. Wang AY. Prognostic value of C-reactive protein for heart diseases in dialysis patients. *Curr Opin Investigating Drugs.*2005;6(9):879-86.
86. Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental Infections and Cardiovascular diseases: A review. *J Periodontol.*2005;76(11-s):2085-2088.
87. Solem CA, Loftus EV jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11(8):707-12.
88. Tan SS, Ng PM, Ho B, Ding JL. The antimicrobial properties of C-reactive protein (CRP). *J Endotoxin Res.*2005;11(4):249-56.
89. Ackermann G, Tegner A, Cohen SH. Prevalence and association of macrolide – lincosamide – streptogramin B (MLS_B) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Jorn of Antimicrobiol.*2003;(51):599-603.
90. Bauer ME. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress.*2005;8(1):69-83.
91. Pawelec , Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious. *Immunol Rev.*2005;205:257-68.
92. Stuart J, Kent SA, Leary KJO, Merrigan MM, Sambol SP, Peterson LR, Gerding DN. Fatal pseudomembranous colitis associated with a variant *Clostridium*

difficile Strains not detected by toxin A immunoassay. An Intern Med. 135:434-438,2001.