

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Doenças Infecciosas e Parasitárias

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Clostridioides difficile*
ISOLADAS EM PACIENTES DE RISCO EM HOSPITAIS
PÚBLICOS DO RIO DE JANEIRO

ANDRESSA ROSÁRIO DE AZEVEDO

Rio de Janeiro
2025



CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Clostridioides difficile* ISOLADAS EM PACIENTES DE RISCO EM HOSPITAIS PÚBLICOS DO RIO DE JANEIRO

Andressa Rosário de Azevedo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina Ciências Aplicadas à Infectologia (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Eliane de Oliveira Ferreira
Prof. Dr^ª. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Rio de Janeiro
Maio/2025


CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Clostridioides difficile* ISOLADAS EM PACIENTES DE RISCO EM HOSPITAIS PÚBLICOS DO RIO DE JANEIRO

Andressa Rosário de Azevedo


Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Eliane de Oliveira Ferreira
Prof^ª. Dr^ª. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Infectologia (Doenças Infecciosas e Parasitárias).


Aprovada por:

Documento assinado digitalmente
 FERNANDA SAMPAIO CAVALCANTE
Data: 14/07/2025 11:38:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Sampaio Cavalcante

Documento assinado digitalmente
 ANA PAULA VIEIRA COLOMBO
Data: 14/07/2025 11:16:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr^ª. Ana Paula Vieira Colombo

Documento assinado digitalmente
 OTILIA HELENA LUPI DA ROSA SANTOS
Data: 14/07/2025 11:08:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr^ª. Otilia Helena Lupi da Rosa Santos

Rio de Janeiro
Maio/2025

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Eliane Ferreira, mais conhecida como Lili, por acompanhar toda a minha jornada desde a época de iniciação científica até o final do mestrado. Pelos grandes ensinamentos e por ser um exemplo de profissional.

Às professoras Fernanda Cavalcante, Ana Paula Colombo e Otilia Lupi, por terem aceitado participar da minha banca de defesa do Mestrado e contribuírem para melhorar meu trabalho.

À minha mãe, que me acompanhou dia, noite e até finais de semana fazendo experimento, me apoiando e dando forças para continuar em frente.

Ao meu irmão, que sempre se preocupa comigo e é uma fonte de inspiração.

Ao meu namorado, Lucas, que sempre apoiou meus sonhos, estudos e me incentivou a fazer ciência.

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

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento PPGDIP, CNPq, CAPES, FAPERJ e UFRJ pelo apoio financeiro.

A coisa mais bonita que podemos experimentar é o mistério. Ele é a fonte de toda verdadeira arte e ciência.

Albert Einstein

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Clostridioides difficile* ISOLADAS EM PACIENTES DE RISCO EM HOSPITAIS PÚBLICOS DO RIO DE JANEIRO

Andressa Rosário de Azevedo

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Eliane de Oliveira Ferreira
Prof. Dr^ª. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Infectologia (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Clostridioides difficile é um bacilo anaeróbico, Gram-positivo, formador de esporos e o principal agente da colite pseudomembranosa associada ao uso de antimicrobianos. Algumas cepas produzem toxinas, TcdA e TcdB, e raramente toxina binária (CDT). No Brasil, a epidemiologia de *C. difficile* é pouco estudada devido à escassez de laboratórios especializados e estudos indicam que os ribotipos mais comuns incluem RT133 e RT135. Em 2024, foi detectado um surto de *C. difficile* na UTI do Hospital Federal da Lagoa envolvendo uma cepa não toxigênica, impactando pacientes. Este estudo objetiva caracterizar cepas de *C. difficile* isoladas de amostras ambientais e de pacientes internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e no Hospital Federal da Lagoa. Foram coletadas fezes de pacientes hospitalizados com diarreia e suspeita de CDI. Após isolamento em meio seletivo (CDBA), colônias sugestivas foram identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF. A caracterização molecular incluiu identificação do ribotipo, produção de toxinas, genes de resistência e perfil de suscetibilidade. Foram identificadas 11 cepas de *C. difficile*, sete do ribotipo 010, duas do ribotipo 027 e duas com perfil não identificado no banco de dados do Laboratório de Biologia de Anaeróbios. Dentre as sete RT010, duas apresentavam o plasmídeo pCD-METRO e cinco, o gene *ermB*. Já as cepas RT027, ambas eram resistentes a eritromicina e moxifloxacina. Esses achados destacam a importância da identificação dos ribotipos circulantes e dos genes de resistência para traçar estratégias de controle da infecção, contribuindo para a segurança dos pacientes e a eficácia dos tratamentos.

Palavras-chave: *C. difficile*; CDI; Antimicrobianos; Cepas não toxigênicas; Genes de Resistência

Rio de Janeiro
Maio/2025

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF *Clostridioides difficile* STRAINS ISOLATED FROM AT-RISK PATIENTS IN PUBLIC HOSPITALS IN RIO DE JANEIRO

Andressa Rosário de Azevedo

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Eliane de Oliveira Ferreira
Prof. Dr^a. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Infectologia (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Clostridioides difficile is an anaerobic, Gram-positive, spore-forming bacillus and the main agent of pseudomembranous colitis associated with antimicrobial use. Some strains produce toxins, TcdA and TcdB, and rarely binary toxin (CDT). In Brazil, the epidemiology of *C. difficile* is poorly studied due to the scarcity of specialized laboratories and studies indicate that the most common ribotypes include RT133 and RT135. In 2024, an outbreak of *C. difficile* was detected in the ICU of Hospital Federal da Lagoa involving a non-toxigenic strain, impacting patients. This study aims to characterize *C. difficile* strains isolated from environmental samples and from patients admitted to Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Hospital Federal da Lagoa. Feces were collected from hospitalized patients with diarrhea and suspected CDI. After isolation on selective medium (CDBA), suggestive colonies were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Molecular characterization included identification of ribotype, toxin production, resistance genes and susceptibility profile. Eleven *C. difficile* strains were identified, seven of ribotype 010, two of ribotype 027 and two with a profile not identified in the Anaerobic Biology Laboratory database. Among the seven RT010 strains, two presented the pCD-METRO plasmid and five, the ermB gene. Both RT027 strains were resistant to erythromycin and moxifloxacin. These findings highlight the importance of identifying circulating ribotypes and resistance genes to design infection control strategies, contributing to patient safety and treatment efficacy.

Key-words: *C. difficile*; CDI; Antimicrobials; Non-toxigenic strains; Resistance genes

Rio de Janeiro
Maio/2025

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	2
2.1 Objetivo Principal.....	2
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1 <i>Clostridioides difficile</i>	3
3.2 Epidemiologia mundial e ribotipos circulantes.....	5
3.3 <i>C. difficile</i> e <i>One Health</i>	10
3.4 Microbiota intestinal e o desenvolvimento da CDI.....	10
3.5 Fisiopatologia da CDI e Fatores de Virulência	13
3.6 CDI recorrente (rCDI).....	19
3.7 Diagnóstico.....	20
3.8 Tratamento.....	21
3.9 Suscetibilidade a antimicrobianos e resistência em <i>C. difficile</i>	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Tipo de estudo.....	27
4.2 Período, população e local do estudo.....	27
4.3 Aspectos éticos.....	28
4.4 Critérios de Inclusão.....	28
4.5 Critérios de Exclusão.....	28
4.6 Obtenção, armazenagem e transporte das amostras de <i>Clostridioides difficile</i>	28
4.7 Isolamento e cultivo de <i>C. difficile</i>	30
4.8 Identificação do <i>Clostridioides difficile</i>	31
4.9 Espectrometria de Massas de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Tempo de Voo – MALDI-TOF MS.....	32
4.10 Caracterização molecular das cepas de <i>C. difficile</i>	32
4.10.1 Obtenção do DNA genômico.....	32
4.10.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo multiplex.....	33
4.10.3 Detecção de genes de resistência e do plasmídeo pCD-METRO.....	34
4.10.4 Análise e sequenciamento do regulador negativo da expressão de toxinas – <i>tcdC</i>	35
4.11 PCR-Ribotipagem.....	37
4.12 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	38
4.13 Ensaio de citotoxicidade.....	39
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Obtenção dos isolados.....	41
5.2 Resultado da PCR-M e Ribotipagem.....	43
5.3 Sequenciamento do gene <i>tcdC</i>	46
5.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	47
5.5 Detecção dos genes de resistência.....	48
5.6 Ensaio de Citotoxicidade.....	50

6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	60
Referências Bibliográficas.....	61
Anexo 1 - Dados coletados dos pacientes que participaram do estudo.....	72
Anexo 2 - Documento de aprovação do trabalho pelo CEP.....	81
Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TLCE).....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACG	<i>American College of Gastroenterology</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHI-PRAS	<i>Brain Heart Infusion – pre-reduced anaerobically and sterilized</i>
BI/NAP1	Cepa epidêmica do ribotipo 027
CA-CDI	<i>Community-Associated Clostridioides difficile Infection</i>
CCFA	Cicloserina-cefoxitina-frutose-agar
CCIH	Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar
CDBA	<i>Clostridioides difficile</i> Brucella Agar
CDBC	<i>Clostridioides difficile</i> Brucella Caldo
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDI	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
CDRN	<i>Clostridioides difficile</i> Ribotyping Network
CDT	<i>Clostridioides difficile</i> transferase
CDTLoc	<i>Binary Toxin Locus</i>
CPM	Colite Pseudomembranosa
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ERI	Eritromicina
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
EUA	Estados Unidos da América
FQR	Fluoroquinolone Resistance

GDH	Glutamato desidrogenase
GTD	Glicosiltransferases
HA-CDI	<i>Healthcare-Associated Clostridioides difficile Infection</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HFL	Hospital Federal da Lagoa
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IDSA	<i>Infectious Disease Society of America</i>
IMPG	Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ISR	<i>Intergenic Spacer Regions</i>
MALDITOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MOX	Moxifloxacina
M-PCR	<i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MTZ	Metronidazol
NAAT	<i>Nucleic acid amplification test</i>
NOX	NADPH Oxidase
PaLoc	<i>Pathogenic Locus</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFOR	<i>Pyruvate-ferredoxin oxidoreductases</i>
rCDI	<i>Recurrent Clostridioides difficile Infection</i>
RIF	Rifampicina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rRNA	RNA ribossomal
RT	Ribotipo

SHEA	<i>Society for Healthcare Epidemiology of America</i>
TA	Temperatura Ambiente
TcdA	Toxina A
TcdB	Toxina B
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Iniciadores utilizados na detecção dos genes da espécie *Clostridioides difficile*
- Quadro 2** Amostras de *C. difficile* isoladas neste estudo
- Quadro 3** Exemplos de ribotipos circulantes pelo mundo e suas referências
- Quadro 4** Perfil de suscetibilidade das cepas de *C. difficile* isoladas nesse estudo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de um gel de PCR-ribotipagem para tipagem de *Clostridioides difficile*.

Figura 2 - Esquema da organização do Locus de Patogenicidade (PaLoc) em cepas toxigênicas de *Clostridioides difficile*.

Figura 3 - Esquema da atividade das Toxinas A e B de *Clostridioides difficile*.

Figura 4 - Esquema ilustrativo da organização do Cdt Locus de *Clostridioides difficile*.

Figura 5 - Atividade da toxina transferase binária de *Clostridioides difficile* (CDT).

Figura 6 - Fluxograma do processo de obtenção e armazenamento das amostras.

Figura 7 - Esquema do ensaio de citotoxicidade celular.

Figura 8 - Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (M-PCR) para confirmação das amostras de *C. difficile* e detecção dos genes das toxinas.

Figura 9 - Resultado da PCR-Ribotipagem das cepas de *C. difficile* desse estudo em gel de agarose 2%.

Figura 10 - Ribotipagem por Eletroforese Capilar.

Figura 11 - Comparação do tamanho molecular das cepas CDHFL4 e CDHFL7 com o ribotipo mais provável (RT027).

Figura 12 - Sequenciamento do gene *tcdC* das cepas de *C. difficile* pertencentes ao RT027.

Figura 13 - Árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento do gene *tcdC* das cepas de *C. difficile* IzCd e HeCd pertencentes ao RT027.

Figura 14 - Detecção dos genes *ermB* nas cepas de *C. difficile* isoladas deste estudo.

Figura 15 - Detecção do plasmídeo pCD-METRO nos isolados resistentes a metronidazol.

Figura 16 - Alinhamento do gene *gyrA* e *gyrB* das cepas CDHFL4 (IzCd) e CDHFL7 (HeCd).

Figura 17 - Ensaio do efeito citotóxico em células da linhagem VERO.

1 INTRODUÇÃO

A infecção por *Clostridioides difficile* (CDI), anteriormente conhecido como *Clostridium difficile*, é uma doença que afeta principalmente o cólon, acometendo indivíduos que tenham sofrido algum tipo de desequilíbrio na comunidade microbiana que vive no intestino, em especial aqueles que fizeram uso de antimicrobianos. A doença é marcada por vários episódios de diarreia, sua manifestação clínica mais comum. Em casos mais graves, o paciente pode desenvolver a colite pseudomembranosa e evoluir para um quadro infeccioso grave de megacólon tóxico, este podendo levar o indivíduo a óbito. O ciclo de transmissão de *C. difficile* ocorre a partir da aquisição dos esporos que podem estar presentes no ambiente hospitalar, em animais e alimentos. Quando chegam no duodeno, durante um processo de disbiose, esses esporos germinam e as células vegetativas, em um ambiente disbiótico, conseguem aderir ao epitélio intestinal (enterócitos), produzindo toxinas e dando início ao quadro inflamatório. As toxinas são o principal fator de virulência da espécie, e que contribuem para o quadro infeccioso da doença. A CDI pode ser provocada por diferentes ribotipos e a sua epidemiologia varia de acordo com as regiões geográficas, fontes de isolamento e o grupo de pacientes acometidos. Embora a epidemiologia da CDI seja bem estabelecida nos países da Europa e da América do Norte, o mesmo não acontece no Brasil devido ao número limitado de laboratórios com a tecnologia necessária para o estudo dessa bactéria e poucos profissionais qualificados para trabalhar com a mesma. Desta forma, a maioria dos dados epidemiológicos de *C. difficile* no território brasileiro, principalmente no Rio de Janeiro, provém do nosso grupo de pesquisa, o Laboratório Biologia de Anaeróbios, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Quanto aos ribotipos mais comuns no Brasil, temos: RT014/020, 043, 046, 106, 132, 133, 134, 135, 136, 142, 143 e 233. Já em outros países europeus e da América do Norte, a cepa epidêmica que mais causa preocupação e surtos é a BI/NAP1, pertencente ao ribotipo 027.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Principal

Isolar e caracterizar as cepas de *Clostridioides difficile*, a partir de amostras de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) dos hospitais públicos Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e Hospital Federal da Lagoa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile (antigo *Clostridium difficile*) é um bacilo Gram-positivo anaeróbio obrigatório, móvel e formador de esporos. Este patógeno foi descrito pela primeira vez em 1935 pelos pesquisadores Hall e O'Toole após ter sido isolado de fezes de recém nascidos assintomáticos [1]. Em 2016, *Clostridium difficile* foi reclassificado como *Clostridioides difficile* com base em estudos genéticos que mostraram que essa bactéria não pertence ao mesmo grupo evolutivo do tipo original do gênero *Clostridium*. A partir de análises do gene 16S do RNA ribossomal desta bactéria, foi observado que ela está mais relacionada a outras espécies da família *Peptostreptococcaceae*, o que justificou a criação de um novo gênero, *Clostridioides*. A mudança foi feita para refletir com mais precisão sua posição filogenética, mas o novo nome foi escolhido de forma a preservar a sigla "*C. difficile*", amplamente usada em ambientes clínicos e laboratoriais, minimizando impactos práticos e comerciais [2].

C. difficile é o agente causador de infecções de importância clínica, como a diarreia e a colite pseudomembranosa associada principalmente ao uso de antimicrobianos. Esse patógeno é mais prevalente em ambientes hospitalares e, por isso, está mais associado a surtos de infecções nesses ambientes (HA-CDI), estando atualmente entre as cinco Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) mais importantes da medicina moderna [3, 4]. Apesar de classicamente *C. difficile* ser descrito como um patógeno nosocomial, atualmente, a incidência das infecções causadas pelo *C. difficile*(CDI) adquiridas na comunidade (CA-CDI) vem aumentando na América do Norte e na Europa, e isto vem provocando um aumento no número de casos (51%), no perfil dos indivíduos afetados (≤ 65 anos) com a CDI e na gravidade da doença [1, 5]. Acredita-se que esse aumento de casos na comunidade esteja acontecendo, devido a outras fontes de contaminação e transmissão, como o contato com animais selvagens e de grande porte (caprinos, suínos e ovinos); com animais domésticos (cães e gatos); por via

alimentar (tubérculos, carnes suína e bovina) e pelo ambiente, como água e solo [6, 7].

Dentre os fatores relacionados ao estabelecimento da HA-CDI, o uso de antimicrobianos de amplo espectro, como as penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, clindamicina e fluoroquinolonas, apresentam maior risco de indução da CDI. Isso porque esses medicamentos promovem o desequilíbrio na microbiota intestinal destes indivíduos [8]. Outros fatores de risco também merecem destaque e, estão associadas ao desenvolvimento da CDI, como longos períodos de hospitalização, idade avançada (≥ 65 anos), o uso de inibidores de bomba de prótons, pacientes transplantados e imunocomprometidos [1, 9, 10]. Dentre os indivíduos imunocomprometidos, os pacientes oncológicos também apresentam alta incidência da CDI, e isto se deve principalmente pelo uso de quimioterápicos e a radioterapia [11].

Com relação a CA-CDI, os pacientes tendem a ser mais jovens, com uma proporção significativa de pacientes (36%) relatando nenhuma exposição a antibióticos durante as 12 semanas anteriores ao diagnóstico. Os casos de CA-CDI estão mais associados a pacientes mais jovens (≤ 50 anos) e, um estudo retrospectivo na China revelou que casos de CDI adquiridos na comunidade tendem a ter mais casos de mortalidade e serem mais graves em comparação com a CDI clássica adquirida nos hospitais (HA-CDI). Além disso, outras condições clínicas crônicas também foram associadas ao aumento do risco de CA-CDI, como doença cardíaca, doença renal crônica e doença inflamatória intestinal [12]. Outro dado importante a ser mencionado é que, embora os casos de CA-CDI não estejam muito relacionados à exposição aos antibióticos, um estudo de caso-controle no Reino Unido entre 1994 e 2004 apontou que a exposição ao uso de inibidores de bomba de prótons foi correlacionada com o aumento do risco de CA-CDI. Além disso, em indivíduos com condições de má higiene da cavidade oral e com histórico de doenças periodontais, a disbiose da microbiota oral pode ser um reservatório para diversos patógenos humanos, incluindo *C. difficile* [13, 14]. Cepas não-toxigênicas também podem causar a CDI, principalmente na comunidade. Essas cepas apresentam fatores de virulência adicionais (flagelo, enzimas, cápsula e resistência a múltiplos antimicrobianos), que desempenham funções importantes na colonização e infecção do paciente,

principalmente em indivíduos imunossuprimidos [15,16].

3.2 Epidemiologia mundial e ribotipos circulantes

A técnica de tipagem tem um papel importante para auxiliar na classificação dos microrganismos e também ajuda a traçar ligações epidemiológicas. No caso de *C. difficile*, o método mais comum é a PCR-ribotipagem e por capilaridade, no qual as regiões espaçadoras intergênicas (ISR) entre os genes 16S e 23S da subunidade ribossomal (rRNA) são amplificadas e o padrão de tamanho molecular é usado para classificar em ribotipos (Figura 1) [17]. Na eletroforese por capilaridade o resultado do padrão de bandejamento das cepas é comparado com um banco de dados da rede Webribo (<https://webribo.ages.at/>) [18].

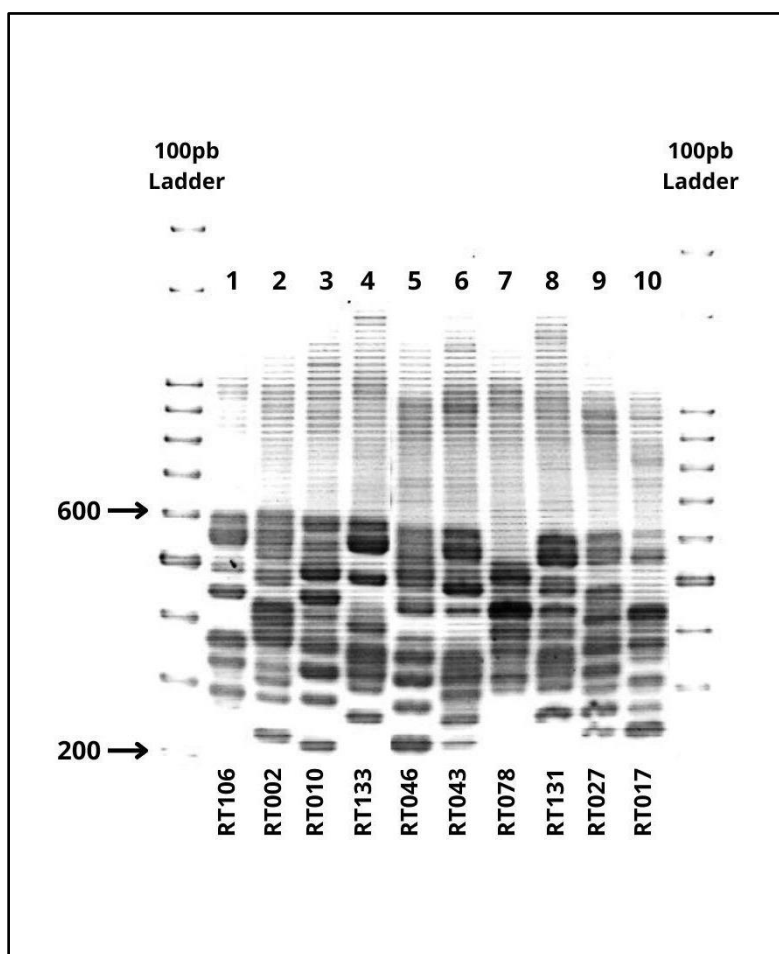


Figura 1: Exemplo de um gel de PCR-ribotipagem para tipagem de *Clostridioides difficile*. As linhas 1-10 representam os padrões de bandejamento dos ribotipos exemplificados. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 100pb Ladder (Promega). Fonte: própria autoria.

Até o momento, segundo o banco de dados da rede de ribotipagem de *C. difficile* (CDRN) no Reino Unido, há mais de 600 ribotipos identificados e espalhados pelo mundo e, a epidemiologia da espécie parece estar relacionada não somente a área geográfica, mas aos critérios de uso de antimicrobianos de cada país [19].

Por volta dos anos 2000, houve um grande aumento dos casos de CDI devido ao aparecimento de uma cepa epidêmica que, em um período curto de tempo, se espalhou pela América do Norte e Europa apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade [20]. Essa problemática foi associada à disseminação de uma cepa identificada e designada, B1/NAP1, pertencente ao RT027 e *Sequencetype* 01 pelo MLST (ST01). A sua classificação foi realizada por vários métodos de biologia molecular: análises de endonuclease de restrição (B1), *pulsedfield gel eletrophoresis* - PFGE (NAP1), PCR-ribotipagem (RT027) e multilocussequencetyping - MLST (ST01), respectivamente [21].

Alguns estudos demonstraram que talvez a principal explicação para o surgimento da cepa epidêmica RT027 tenha sido o uso excessivo de fluorquinolonas nos Estados Unidos da América (EUA) no final da década de 1990 [22]. Quando a cepa epidêmica surgiu nos EUA, análises filogenéticas mostraram que duas linhagens distintas resistentes a fluoroquinolonas (FQR) estavam circulando no país (FQR1 e FQR2). Elas compartilhavam do mesmo ancestral e apresentavam mutações similares. Essas cepas adquiriram resistência independente às fluoroquinolonas de quarta geração com a presença de uma mutação (Thr82→I) da subunidade A da DNA girase (*gyrA*) em ambas as linhagens [23, 24]. As duas linhagens epidêmicas apresentaram um padrão de disseminação global diferente, sendo a FQR1 responsável por surtos nos Estados Unidos e a FQR2 na Europa [25].

Além do RT027, há inúmeros ribotipos que também são responsáveis pelo desenvolvimento da doença. O RT106 está envolvido em surtos da CDI na Europa e nos EUA e, é caracterizado por produzir mais esporos e ser multirresistentes aos antimicrobianos, já que geralmente é resistente a pelo menos três medicamentos, como moxifloxacino, clindamicina e cloranfenicol [26, 27].

O ribotipo 010 é um tipo não toxigênico comumente encontrado em ambientes hospitalares, na comunidade (CA-CDI) e fontes animais, como cães e roedores, além de já ter sido relacionado a casos de CDI adquirida em unidades hospitalares ou na comunidade [28, 29]. Embora não produza toxinas, cepas não

toxigênicas também são conhecidas por causar CDI, principalmente na comunidade, uma vez que apresentam fatores de virulência adicionais (flagelo, enzimas, cápsula, resistência a antibióticos e outros) que desempenham funções importantes na colonização e infecção do paciente, principalmente em indivíduos oncológicos. [30, 31, 32]. Além disso, essas cepas costumam apresentar multirresistência, principalmente ao metronidazol, eritromicina e vancomicina [33].

O RT014 na maioria dos casos é listado junto com o RT020, sendo, portanto, comumente descritos como RT014/20. Isso ocorre porque o padrão de bandeamento desses ribotipos no gel de ribotipagem são difíceis de distinguir. Esses ribotipos estão associados à grande parte dos casos de CA-CDI na Austrália e nos Estados Unidos, sendo relacionados a fontes humanas e outros animais [34, 35].

Já o RT001 é um dos ribotipos mais problemáticos e epidêmicos em algumas regiões da Europa, sendo até mesmo listado como o segundo ribotipo mais prevalente em um estudo multicêntrico europeu realizado em 2008 [36, 37]. Este ribotipo geralmente é responsável por causar CDI grave principalmente em ambientes hospitalares (HA-CDI), além de ser resistentes a múltiplas antimicrobianos, como clindamicina, eritromicina, cefoxatina, levofloxacina e moxifloxacino [38].

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis quanto ao número de casos da CDI, ribotipos e suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *C. difficile* são bem escassos, principalmente por conta do número limitado de laboratórios próprios para estudo de anaeróbios e profissionais qualificados para realizar o cultivo adequado de *C. difficile*. A maioria dos estudos de epidemiologia desse patógeno no Rio de Janeiro provém do nosso grupo de pesquisa no Laboratório Biologia de Anaeróbios na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A partir disso, sabe-se que os ribotipos (RT) mais comuns de serem isolados são: RT014, 043, 046, 106, 132, 133, 134, 135, 136, 142, 143 e 233. Alguns estudos relacionados a epidemiologia da CDI no Brasil indicam que o cenário no país é bem diferente em comparação com outros países do mundo, e isso pode ser explicado por conta da maior prevalência de ribotipos exclusivos de *C. difficile* no país, como RT133 e RT135 [39]. Um estudo realizado por Alcides e colaboradores, no ano de 2007, identificou a presença de *C. difficile* em 35 amostras isoladas de pacientes pediátricos e quatro amostras provenientes do ambiente hospitalar do

Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG) na UFRJ. Os 39 isolados passaram pela etapa de tipagem e foram identificados 13 ribotipos distintos: 001, 015, 031, 043, 046, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 142 e 143. A partir deste resultado, sete desses ribotipos (132, 133, 134, 135, 136, 142 e 143) foram considerados como novos e, representaram quase 79% de todas as amostras, sendo RT133 o mais comum. Hoje sabe-se que o RT133 e RT135 são exclusivos do Brasil e no período do estudo ele foi detectado em todos os grupos de crianças examinados (pacientes internados, ambulatoriais e crianças saudáveis), enquanto que os ribotipos 015, 131, 134 e 135 estavam relacionados a crianças sintomáticas [40].

Em 2009, o RT106 foi identificado pela primeira vez por Balassiano e colaboradores no Rio de Janeiro. No estudo realizado por este grupo, foram coletadas 21 amostras de pacientes e 40 do ambiente do Hospital Evandro Chagas Fundação Oswaldo Cruz. Como principal resultado, foram isoladas seis cepas de *C. difficile*, sendo os ribotipos mais frequentes o RT106 e RT014. As cepas do ribotipo 106 apresentaram resistência a todas as fluoroquinolonas testadas, já as do ribotipo 014 eram altamente resistentes à clindamicina. Todos os isolados eram igualmente sensíveis ao metronidazol [41]. Posteriormente, em 2011, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou uma predominância do RT133 em 70 amostras de pacientes do Hospital Universitário (HUCFF) da UFRJ. Dentre os 70 pacientes analisados, a CDI foi detectada em 19 deles, e sete das oito cepas isoladas eram toxigênicas. O ribotipo 233 também foi identificado em dois pacientes participantes deste estudo. Todas as cepas estudadas apresentaram resistência a ciprofloxacina, levofloxacina e clindamicina, e demonstraram ser sensíveis a metronidazol, moxifloxacino e vancomicina. Por fim, os estudiosos estabeleceram a maior prevalência do RT133 além de verificar que houve uma infecção cruzada entre diferentes pacientes associada aos mesmos ribotipos [42].

Em um estudo mais recente, no ano de 2024, Nogueira e colaboradores analisaram 56 amostras pediátricas, coletadas no Hospital Infantil Albert Sabin localizados em Fortaleza, identificando *C. difficile* em 17 espécimes. Apesar de realizado em um único hospital, o estudo revelou uma alta taxa de CDI (30,4%) em pacientes pediátricos, com 76,4% dos casos causados por cepas toxigênicas.

Esses dados sugerem um aumento na prevalência da infecção e as análises moleculares conduzidas pelo Laboratório de Biologia de Anaeróbios da UFRJ identificaram os ribotipos predominantes: 046, 106, 002, 143, 133 e 012 [43]

Embora a cepa epidêmica do ribotipo 027 seja bastante comum nos países da Europa e América do Norte, o mesmo não acontece no Brasil. O primeiro relato da suposta presença do RT027/ST01 no território brasileiro ocorreu no ano de 2018 por Pires e colaboradores. A detecção da cepa ocorreu através do equipamento GeneXpert, porém, não foi feito seu isolamento e nem tão pouco outras análises por biologia molecular para confirmar se realmente a cepa pertencia a esse ribotipo [44]. Embora a detecção da mutação seja importante para classificar uma cepa RT027, outras análises são necessárias, como a PCR-ribotipagem por gel de agarose e por capilaridade. Isso porque outros ribotipos, como RT198, RT176 e RT244, além do 027, também pertencem ao ST1 [45, 46]. Em 2023, outro grupo de pesquisadores de Porto Alegre realizou um estudo de prevalência de *C. difficile* toxigênico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e identificaram a cepa hipervirulenta em cinco pacientes. O estudo continha duas etapas de diagnóstico, a primeira por imunoenensaio fluorescente (ECO F GDH, ECODiagnostica) e a segunda por PCR em tempo real (Xpert*C. difficile* BT, Cepheid), sendo que o kit utilizado na técnica de PCR em tempo real faz a detecção dos genes que codificam as toxinas B (*tcdB*) e binária (*cdt*), assim como a deleção de 18pb no gene *tcdC*, presente não somente no RT027, mas em outros ribotipos também. Porém, assim como o estudo realizado em 2018, não foram feitas outras análises moleculares para confirmação da cepa hipervirulenta [47]. No Quadro 3 estão destacados os ribotipos mencionados e suas respectivas referências.

Quadro 3: Exemplos de ribotipos circulantes pelo mundo e suas referências

Ribotipo	Genes das toxinas	Referência bibliográfica
RT001	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i>	[36, 37, 38]
RT010	<i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i>	[28, 29, 30, 31, 32, 33]
RT014/20	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i>	[34, 35]
RT027	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i>	[22, 23, 24]

Ribotipo	Genes das toxinas	Referência bibliográfica
RT106	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i>	[41, 42]
RT133	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i>	[42]

3.3 *C. difficile* e One Health

One Health (uma só saúde ou saúde única) é uma abordagem colaborativa e transdisciplinar que visa solucionar problemas relacionados à saúde humana, animal, vegetal e do ecossistema, uma vez que todos estão interligados [48]. O contato do ser humano com a natureza e os animais é bastante amplo, principalmente após o início da globalização, que intensificou ainda mais o movimento das pessoas e comércio de produtos, principalmente de origem animal. Como resultado de todo esse processo, houve um aumento da circulação e disseminação de doenças através das fronteiras e ao redor do globo [49].

Aplicar a estratégia de *One Health* para estudos relacionados a *C. difficile* é de suma importância para entender a epidemiologia do patógeno, uma vez que a bactéria é capaz de colonizar animais selvagens, domésticos (cães e gatos), de produção (porcos, gado, ovelhas e aves), e estar presente no ambiente, contaminando fontes de alimentos e o meio ambiente propriamente dito [50, 51]. Sendo assim, a presença de *C. difficile* em diferentes fontes sugere uma possível transmissão zoonótica e/ou antroponótica entre animais e humanos com alimentos e ambiente contaminados, atuando como canal entre os dois. A epidemiologia de *C. difficile* está em constante mudança e, é bem marcada pelo aumento da incidência e surgimento de novas cepas, principalmente as multirresistentes. Desta forma, um exemplo de vigilância ideal do patógeno utilizando a abordagem de de saúde única seria o trabalho de todos envolvidos nas áreas de saúde, mas principalmente, em conjunto com indústrias, formuladores de políticas, veterinários, clínicos e pesquisadores [52].

3.4 Microbiota intestinal e o desenvolvimento da CDI

O microbioma intestinal de mamíferos é composto por uma diversidade de organismos, como bactérias, vírus, fungos, protozoários, leveduras e bacteriófagos.

Esta comunidade microbiana começa a ser formada a partir do nascimento e vai se consolidando ao longo de cerca de 2 a 3 anos, quando finalmente atinge uma composição estável. No entanto, mesmo após se estabelecer no organismo humano, por exemplo, essa microbiota pode ser influenciada por diferentes fatores associados ao ambiente e ao estilo de vida de cada indivíduo [53]. A microbiota tem um papel fundamental na saúde e bem-estar humano, uma vez que os microrganismos pertencentes a este nicho estão intimamente relacionados a diferentes atividades metabólicas e biológicas, como por exemplo, obtenção de energia, produção de fatores de crescimento e de vitaminas, estimulação do sistema imunológico e até mesmo na resistência à colonização de outros microrganismos que possam ser prejudiciais à saúde e apresentam um potencial patogênico [54].

O uso principalmente de antimicrobianos pode induzir a um desequilíbrio da comunidade microbiana intestinal, denominada disbiose, e acarretar o desenvolvimento de doenças inflamatórias e infecções intestinais com mais facilidade, uma vez que a comunidade microbiana tem um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo [55, 56]. A disbiose é caracterizada pela alteração na função e composição dos microrganismos presentes nesse nicho, podendo ser influenciada por fatores externos (ambientais) ou até mesmo a partir do próprio hospedeiro [57]. Um exemplo do papel da microbiota que afeta diretamente o desenvolvimento de *C. difficile* no organismo humano é o metabolismo de ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários no cólon, como o taurocolato de sódio. Cerca de 5% dos ácidos biliares produzidos pelo fígado, chegam ao cólon intestinal e, através da ação de bactérias intestinais, são desconjugados para formar ácidos biliares secundários, impedindo a germinação dos esporos de *C. difficile* [58]. A partir do momento que o indivíduo apresenta um processo de disbiose intestinal, isso pode acarretar o desenvolvimento de doenças inflamatórias e infecções intestinais com mais facilidade.

Uma vez que os esporos de *C. difficile* sejam adquiridos e a disbiose esteja estabelecida, eles somente irão germinar a partir da detecção da presença de ácidos biliares primários metabolizados pelo fígado, como os taurocolatos. No caso da CDI, uma vez que a comunidade microbiana não transforma os sais biliares primários em secundários, acontece um aumento na sua concentração. Os esporos de *C. difficile* podem “perceber” o aumento dos sais biliares primários e começarem a germinar.

Isto ocorre devido a presença de receptores “germinantes” como a proteína CspC, presente na superfície dos esporos, que é sensível aos ácidos biliares e responsável por induzir o seu processo de germinação [59, 60]. A partir da sinalização para germinar, uma cascata proteolítica é induzida, resultando na degradação do peptidoglicano do esporo e posterior liberação de ácido dipicolínico de cálcio e reidratação do esporo, promovendo, portanto, a germinação e multiplicação das células vegetativas. Vale ressaltar que a capacidade de crescimento e colonização dos esporos está diretamente relacionada com o microbioma (microbiota do hospedeiro e seu metaboloma associado). O metaboloma é caracterizado pelo conjunto de pequenas moléculas, chamadas de metabolitos, que os humanos ingerem, metabolizam, catabolizam ou entram em contato que apresentam um peso molecular menor que 2000 Da. Alguns exemplos de moléculas que compõem o nosso metaboloma são: peptídeos, lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, medicamentos, toxinas, poluentes [61].

Sendo assim, as mudanças provocadas na microbiota pela ação dos antimicrobianos, irão interferir diretamente no metaboloma e, podem representar um ambiente propício à infecção por *C. difficile* [62]. Diferente dos sais biliares primários, os sais biliares secundários, produzidos por espécies presentes no microbioma, estão relacionados à resistência à colonização e também à inibição da germinação e multiplicação de *C. difficile* [63]. Além dos sais biliares primários, a presença de outras substâncias já foi documentada para que a co-germinação dos esporos de *C. difficile* possa acontecer, como a do aminoácido glicina [64]. Outros aminoácidos também podem atuar como co-germinantes, porém estes não são tão eficientes quanto a glicina. Além disso, a cepa de *C. difficile* envolvida no processo infeccioso e sua capacidade de formar esporos também é importante nesse processo.

Antes da germinação, os esporos podem aderir à mucosa intestinal, desempenhando um papel importante na persistência de *C. difficile* em indivíduos saudáveis e no aumento do risco de recidiva da CDI [65]. Quanto à produção de toxinas, está bem documentado que o nível de síntese dessas proteínas é influenciado pelas condições de crescimento e mudanças ambientais [66]. Dentre as condições ambientais, os sinais nutricionais são os que mais se destacam. Concentrações limitadas de biotina ou altos níveis de ácidos graxos de cadeia curta,

como o ácido butírico, são conhecidos por aumentar a produção de toxinas. Já os açúcares que são rapidamente metabolizados e determinados aminoácidos são capazes de reduzir bastante a síntese de toxinas. A temperatura também pode influenciar, sendo 37° C a temperatura ótima para a expressão das toxinas [67,68]. A presença de alguns antimicrobianos pode gerar um estresse celular e ser capaz de aumentar a produção de toxinas, no entanto, isto vai depender não somente da cepa de *C. difficile*, mas também do antimicrobiano utilizado, já que a resposta específica à certos medicamentos é bastante variável entre as cepas. Desta forma, a quantidade de toxinas e a sua atuação são fatores fundamentais para o desenvolvimento da CDI [69, 70].

3.5 Fisiopatologia da CDI e Fatores de Virulência

A relação entre a ocorrência da colite pseudomembranosa e o uso de antibióticos de amplo espectro, como a clindamicina e a lincomicina, ocorreram pela primeira vez na década de 1970, quando foi observado que o uso desses medicamentos, além de provocar diarreia, também provocava a colite pseudomembranosa em alguns pacientes. Outro fato que merece destaque aconteceu em 1977, quando Larson e colaboradores relataram a presença de toxinas em fezes de pacientes que apresentavam a colite pseudomembranosa. No entanto, foi apenas em 1978 que o uso de antimicrobianos, como a clindamicina, passou a ser associado a CDI [76].

A CDI é iniciada com episódios diarreicos e pode evoluir para quadros mais graves, como a colite pseudomembranosa (CPM) e o megacólon tóxico, causadas por cepas toxigênicas [71]. O megacólon tóxico se desenvolve a partir do instante que uma inflamação alcança a *muscularisproprial* (composta por músculo liso e responsável pelos movimentos de peristaltismo), provoca uma lesão neural e altera a motilidade intestinal, resultando em dilatação. Os fatores de risco para desenvolvimento desta condição, além do uso de antimicrobianos, incluem qualquer condição inflamatória grave, como doença inflamatória intestinal, colite isquêmica e colite infecciosa [72]. Além disso, quando não é resolvido cirurgicamente, o megacólon tóxico apresenta alta mortalidade [73]. No caso da CPM, a mesma é caracterizada como uma doença inflamatória grave que afeta o revestimento interno

do intestino grosso. As pseudomembranas são a principal característica desse quadro clínico, sendo definidas como uma camada de exsudato fibropurulento constituído por células inflamatórias e muco provindo de criptas inflamadas e em erupção [74, 75].

No caso de pacientes oncológicos, normalmente o sistema imunológico já se encontra comprometido por conta do tratamento intensivo a que esses indivíduos são submetidos, portanto, esses indivíduos se tornam mais vulneráveis a desenvolver a CDI. O uso de quimioterápicos no tratamento do câncer pode danificar diretamente a mucosa intestinal e causar alterações na microbiota, provocando a diarreia por danos na mucosa. Além disso, a neutropenia também faz esse grupo da população ter maior predisposição para o desenvolvimento da CDI [76, 77]. Em alguns casos, os pacientes oncológicos precisam fazer o uso de antimicrobianos por conta da incidência de IRAS no ambiente hospitalar e, portanto, isto se torna mais um fator de risco para desencadear disbiose e facilitar a colonização e infecção de *C. difficile* nesses pacientes [78, 79].

A CDI é causada principalmente por cepas toxigênicas e que produzem enterotoxinas, TcdA (toxina A) e/ou TcdB (toxina B), que levam ao quadro clínico da doença e cujos genes estão organizados em uma região cromossômica denominada *Locus* de Patogenicidade (PaLoc) (Figura 2). O PaLoc é uma região genômica que geralmente apresenta a mesma localização no cromossomo, independente da cepa. No caso de cepas não toxigênicas esta ilha genômica é substituída por uma região não codificadora muito bem conservada de 115 kb ou 75 kb [80]. Além de apresentar os genes das toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB*, respectivamente), o PaLoc também é composto por três outros genes responsáveis pela regulação e expressão das toxinas: *tcdR*, *tcdE* e *tcdC*. O gene *tcdR* codifica um fator sigma de RNA polimerase e tem como função a regulação positiva da expressão das toxinas. O *tcdE* é responsável pela codificação de uma proteína holina bacteriofágica (*fago-like*), que auxilia na secreção das toxinas. Já o *tcdC* é um gene que regula negativamente o *tcdR*; e mutações relacionadas a este gene estão ligadas a super expressão e produção das toxinas A e B [81, 82].

Uma evidência de que mutações em no gene *tcdC* podem afetar diretamente a expressão de toxinas é o estudo realizado por Soehn e colaboradores em 1998. Neste trabalho, uma cepa de *C. difficile* apresentava um rearranjo de seu PaLoc que a deixava sem o gene *tcdA* e *tcdC* funcionais, mas ainda sim era capaz de produzir a toxina B. Mesmo apresentando essas diferenças, esta cepa demonstrou ser mais citotóxica *in vitro* do que a cepa VPI10463 (uma cepa de *C. difficile* RT087) e mais patogênica em modelos animais [83, 84].

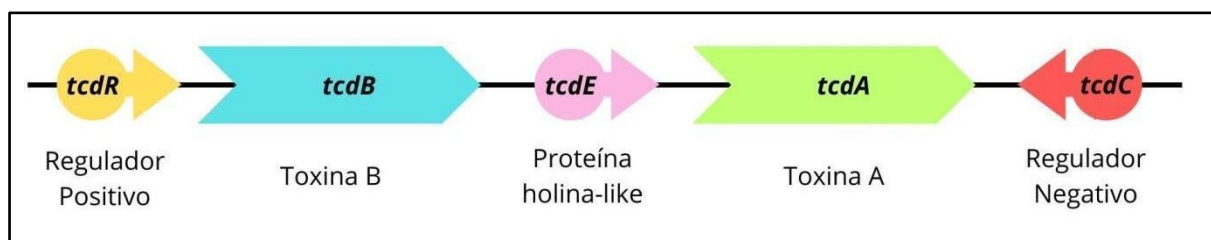


Figura 2 - Esquema da organização do Locus de Patogenicidade (PaLoc) em cepas toxigênicas de *Clostridioides difficile*. O gene *tcdR* tem como função regular positivamente a expressão de toxinas. O gene *tcdB* codifica a toxina B e o *tcdA* a toxina A. Já o gene *tcdE* codifica uma proteína do tipo holina e auxilia na secreção das toxinas. E o gene *tcdC* regula negativamente o gene *tcdR*, portanto, afeta diretamente a expressão das toxinas, impedindo ou não a sua expressão conforme a sinalização celular. Fonte: própria autoria.

As toxinas TcdA e TcdB são classificadas como toxinas do tipo AB, ou seja, há uma subunidade B que é responsável não só pela interação com a célula-alvo, mas também realiza a entrega de uma subunidade A que possui ação enzimática e atua no citosol da célula-alvo [85]. Quanto ao mecanismo de ação (Figura 3), TcdA e TcdB apresentam domínios RHO e RAC glicosiltransferases (GTDs) na porção amino terminal e catalisam uma reação de glicosilação, levando a inativação de RHO e RAC-GTPases da célula hospedeira, que são proteínas reguladoras do citoesqueleto de actina das células eucarióticas. Sendo assim, além de promover danos ao citoesqueleto, também leva à dissociação das junções célula-célula nas células epiteliais do cólon e, por consequência, acontece a perda da integridade da membrana dos enterócitos [86]. Além de conseguir atuar na célula hospedeira induzindo um processo apoptótico por meio do processo de glicosilação, a toxina B também apresenta outro mecanismo de ação. Quando esta toxina se encontra em grandes concentrações, ela pode impulsionar um processo necrótico das células epiteliais por meio da montagem

e ativação do complexo NADPH oxidase (NOX), que leva a produção de altos níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS), e isto ocorre de forma independente da atividade glicosiltransferase [87].

As toxinas A e B atuam em sinergismo, e com as duas porções afetando o enterócito no hospedeiro. O TcdA age como uma enterotoxina e TcdB como uma citotoxina, e ambas estão envolvidas no desenvolvimento da CDI [87, 88]. Isto explica a existência de cepas que apresentam somente a toxina B e ainda assim são capazes de causar a infecção e danos ao hospedeiro. Além disso, cepas A negativas e B estão associadas a casos mais graves da doença [86]. Quanto às cepas que apresentam somente a toxina A, isto não é tão comum. Porém, Monot e colaboradores identificaram pela primeira vez, em 2015, uma cepa de *C. difficile* que era positiva para toxina A e negativa para toxina B. Segundo os pesquisadores, é possível encontrar este fenótipo de *C. difficile* (A+/B-), pois o PaLoc pode apresentar tamanhos variáveis e pode estar localizado em regiões distintas do genoma. Desta forma, pode haver um PaLoc “mono-toxina”, que é composto somente pelo gene *tcdA* ou *tcdB* e explica a existência da cepa A+/B-. Além disso, Monot também sugere que o PaLoc clássico que é conhecido hoje em dia (Figura 1) pode ter sido evolutivamente o resultado da fusão de dois PaLoc do tipo “mono-toxina”, sendo caracterizado então como PaLoc “bi-toxina” [82, 90].

Ambas as toxinas ativam vias de sinalização do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e da proteína ativadora 1 (AP-1) nas células intestinais e promovem a transcrição de quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-8, levando ao recrutamento de células do sistema imune inato [91, 92]. Além disso, quando TcdB é endocitado, a acidificação dos endossomos resulta em uma alteração conformacional da toxina e formação de poros nessa estrutura, permitindo que o domínio glicosiltransferase N-terminal (GTD) do TcdB vá para o citosol. No citosol, GTD inativa proteínas da família RHO GTPase por glicosilação, causando efeitos citopáticos, caracterizados pelo arredondamento celular resultante da ruptura do citoesqueleto de actina, e efeitos citotóxicos, incluindo morte celular programada e ativação de inflamossomos [93].

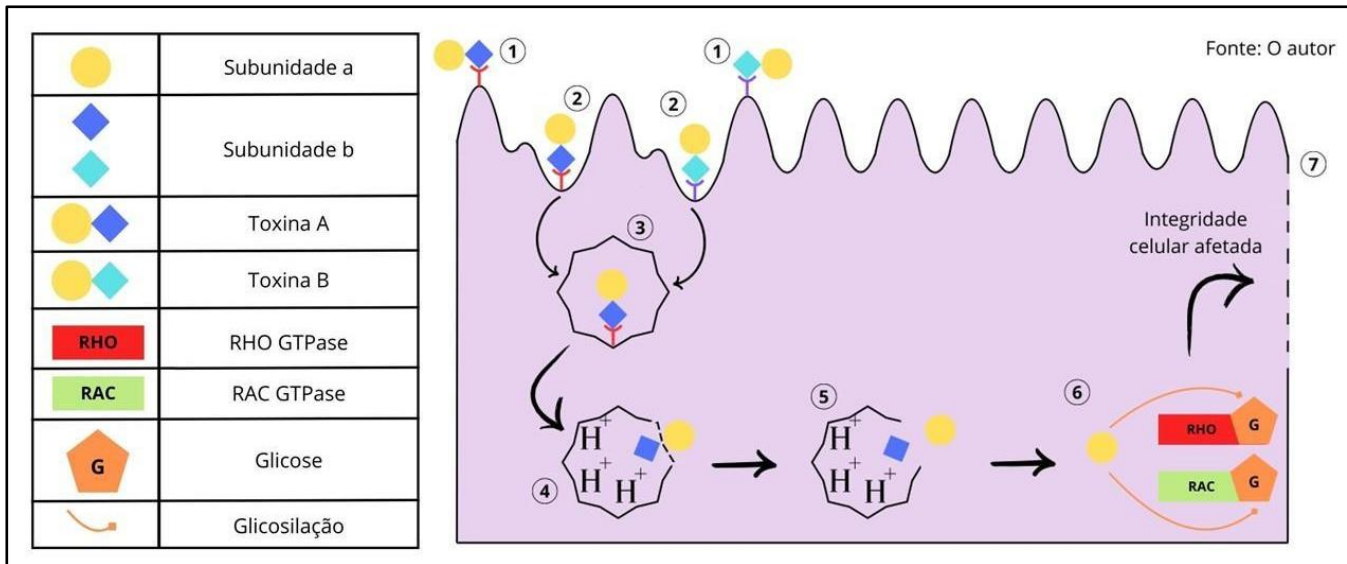


Figura 3: Esquema da atividade das Toxinas A e B de *Clostridioides difficile*. Primeiro, a subunidade B das toxinas se liga ao receptor da célula epitelial (1) e as toxinas são então endocitadas (2) e internalizadas (3). Em seguida, ocorre a acidificação do endossomo (4) resultando em uma mudança conformacional e inserção da toxina na membrana para ocorrer a liberação da subunidade com ação enzimática no citosol (5). Por fim, a subunidade A da toxina é liberada para o citosol da célula e realiza um processo de glicosilação e inativação de RHO e RAC GTPase da célula hospedeira (6), promovendo a perda das junções *tight* e afetando a integridade da membrana das células epiteliais (7). Ferramenta: Canva. Fonte: própria autoria.

Além das toxinas TcdA e TcdB, algumas cepas de *C. difficile* podem produzir uma terceira toxina, a toxina transferase binária de *C. difficile* (CDT). A CDT pertence à família de toxinas ADP ribosilante de actina que promove a despolimerização da actina e induz a formação de saliências à base de microtúbulos, além de ser produzida por um grupo restrito de cepas destabactéria que geralmente estão associadas a quadros mais graves da CDI e também a cepa epidêmica BI/NAP1 RT027 [94]. Esta toxina é composta por duas subunidades, sendo uma enzimática (CdtA) e a outra um componente de ligação (CdtB). As subunidades da toxina são codificadas pelos genes *cdtA* e *cdtB*, que estão localizados próximos a um gene que codifica uma proteína regulatória (*cdtR*) dentro do *locus*CDT (CDTLoc) (Figura 4), mas fora do PaLoc [95].

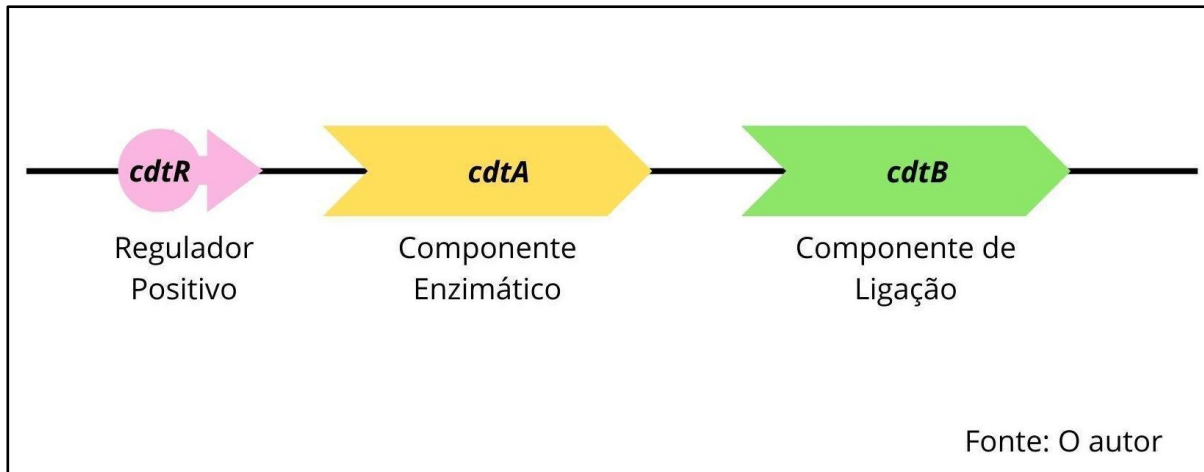


Figura 4: Esquema ilustrativo da organização do *CdtLocus* de *Clostridium difficile*. O *CdtLocus* apresenta o gene *cdtR*, um regulador positivo que controla a expressão de *cdtA* e *cdtB*. E também os genes *cdtA* e *cdtB* que codificam, respectivamente, a subunidade enzimática A e a subunidade de ligação B. Ferramenta: Canva. Fonte: própria autoria.

Quanto ao mecanismo de ação (Figura 5), a subunidade CdtB se liga na célula hospedeira e, é responsável por formar porosem endossomos acidificados da célula, além de permitir a passagem de CdtA para o citosol. Quando presente neste ambiente, a CdtA, que é uma ribosil-transferase, é capaz de ribosilar a actina presente na célula hospedeira, levando a uma interferência na polimerização destes filamentos subjacentes a membrana celular, resultando em protrusões celulares. Essas protrusões celulares são compostas por microtúbulos e formam uma espécie de rede na superfície das células epiteliais, facilitando a aderência *C. difficile* a estas células. Além disso, outra consequência relacionada à despolimerização da actina provocada pela toxina CDT é o redirecionamento da fibronectina e de outras proteínas da matriz extracelular, do lado basolateral da membrana das células para o lado apical, onde facilitam a ligação de *C. difficile* [94].

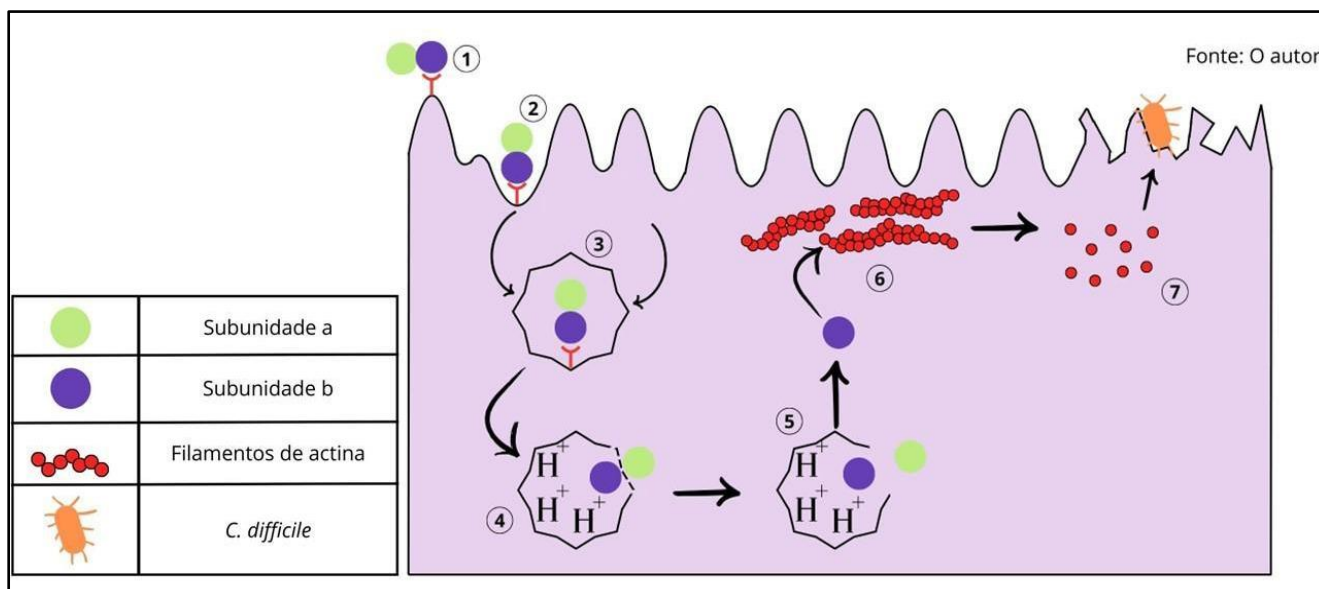


Figura 5: Atividade da toxina transferase binária de *Clostridioides difficile* (CDT). A subunidade B da toxina binária se liga ao receptor celular (1) e, é endocitada (2). Em seguida, ocorre a acidificação do endossomo (3) e assim a subunidade B consegue induzir a formação de poros (4), permitindo então a translocação da subunidade A para o citosol (5). A subunidade A atua ribosilando os filamentos de actina (6) e promove a interferência na polimerização das mesmas (7), resultando em protrusões celulares que aumentam a aderência da bactéria a célula hospedeira (8). Ferramenta: Canva. Fonte: própria autoria.

3.6 CDI recorrente (rCDI)

Um dos maiores desafios clínicos é a CDI recorrente (rCDI), pois apresenta altos índices (25%-40%) e contribui para o aumento dos custos de assistência médica, causando um grande impacto nos hospitais. A rCDI ocorre quando um indivíduo apresenta novamente os sintomas da doença dentro de oito semanas de um episódio anterior, podendo ser desencadeada pela mesma cepa (como consequência da germinação de esporos residentes que permanecem no cólon após o tratamento com antibióticos ter parado) ou ocorrer uma reinfecção por uma cepa diferente (de uma fonte ambiental, por exemplo) [96]. Estima-se que cerca de um quarto dos pacientes com CDI confirmado desenvolveram recorrência da doença e isto se deve ao fato dos pacientes apresentarem uma resposta imunológica prejudicada contra as toxinas de *C. difficile* e/ou alteração da microbiota. No entanto, a maioria dos episódios recorrentes da doença são menos graves [97]. Quanto a resposta imunológica, um estudo realizado por Amani e colaboradores identificou que, em modelos murinos de rCDI, a infecção primária com a cepa a cepa VPI 10463 de *C. difficile* não induziu uma resposta de IgG com troca de isotipo. Além disso, durante

a segunda infecção, não foi detectada a reativação de respostas de IgA ou IgG. Os autores também apontam que, embora a IgM específica contra a toxina B e a IgA da mucosa estivessem presentes, essas imunoglobulinas não protegeram contra rCDI. Em contrapartida, a resposta de IgG sérica específica para as toxinas foi protetora [98]. Outro achado importante foi que a produção de IgG sérica, IgA e IgA de mucosa específicas para toxina apresentaram proteção contra a infecção. No entanto, a presença de IgA na mucosa, apesar de eficaz, não é tão necessária, uma vez que camundongos (plgR2/2), que não possuem o receptor para transcitose de anticorpos poliméricos através do epitélio, incapazes de transportar IgA através do epitélio, também foram protegidos contra a doença associada ao *C. difficile* [99]. Esses dados sugerem que a IgG sérica é o principal anticorpo protetor contra a CDI e rCDI, enquanto a IgA pode contribuir para a proteção, mas não é essencial. A explicação plausível para os resultados contrastantes na produção de anticorpos pode ser devido à diferença na microbiota dos camundongos [100].

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento da rCDI, a idade avançada, uso de antibióticos, supressão do ácido gástrico e cepas hipervirulentas são alguns dos mais importantes [96].

Alguns pacientes que não respondem ao tratamento convencional da CDI ou já tiveram algumas recidivas da doença, são indicados a realizar o transplante de microbiota fecal. O transplante fecal consiste na restauração/repovoamento da microbiota intestinal que passou por um processo de disbiose a partir de um doador que possui uma microbiota considerada saudável. Sendo assim, este processo é realizado por meio da transferência dos microrganismos presentes nas fezes do doador saudável para o paciente com CDI [101]. Este procedimento é bastante utilizado e tem apresentando uma taxa de cura considerável, principalmente em pacientes que sofrem com a rCDI [102].

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico da CDI é feito a partir de uma amostra de fezes para detectar a presença do microrganismo ou da toxina. Ele é indicado apenas para indivíduos com sintomas sugestivos de infecção ativa, ou seja, diarreia inexplicada e de início recente

e episódios diarreicos diários maior ou igual a três fezes não formadas em 24h [103, 104].

Embora o padrão ouro para diagnóstico da CDI seja o cultivo das fezes, sua aplicação fora dos cenários de pesquisa não é prática por se tratarem de ensaios demorados. Desta forma, a demanda por respostas mais rápidas e precisas tem se tornado cada vez mais frequente nos dias de hoje [104]. Como exemplo de técnicas diagnósticas mais recentes e aplicadas na clínica, existem os imunoenaios enzimáticos (EIA), que fornecem resultados rápidos e com alta especificidade. Porém, o processamento do espécime pode afetar a sensibilidade do teste. Outra metodologia também utilizada é o teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT), cujo objetivo é aumentar o número de cópias dos genes que codificam as toxinas, tendo uma sensibilidade comparável à cultura toxigênica em laboratório. Uma terceira metodologia também aplicada é a detecção do antígeno glutamato desidrogenase (GDH), um marcador específico da presença de *C. difficile*, bastante sensível e normalmente utilizado como triagem, pois ambas as cepas toxigênicas e não toxigênicas apresentam essa enzima [105, 106]. Vale ressaltar que para confirmação do diagnóstico da CDI, segundo as Diretrizes de Prática Clínica da *Infectious Disease Society of America* (IDSA), é necessário que pelo menos dois dos testes citados sejam positivos, por conta da eventual ocorrência de falsos negativos [107]. Para auxiliar no diagnóstico, recomenda-se a colonoscopia, no qual pode ser visto se há anormalidades, desde eritema e friabilidade moderados e irregulares até colite pseudomembranosa grave. Não é recomendado fazer este tipo de exame se o paciente for assintomático, ou então, repetir o teste dentro de sete dias durante o mesmo episódio de diarreia [9, 108].

3.8 Tratamento

Para o tratamento da CDI é necessário realizar um conjunto de ações que se baseiam desde a observação dos sinais clínicos do paciente e na gravidade dos sinais e sintomas, até o resultado dos exames laboratoriais de rotina. Na maioria dos países da Europa e da América do Norte, são adotadas e recomendadas as diretrizes publicadas pela *Infectious Disease Society of America/Society for Healthcare Epidemiology of America* (IDSA/SHEA), o *American College of*

Gastroenterology (ACG) e a *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) [103]. Basicamente são adotados 3 antimicrobianos para tratar a doença: metronidazol, vancomicina e fidaxomicina (este último aprovado pelo FDA em 2011 e não disponível no Brasil) [109, 110].

O metronidazol é um antimicrobiano sintético e derivado da azomicina, um composto descoberto por volta de 1950 em culturas de *Streptomyces* spp. Esta droga tem atividade contra microrganismos anaeróbios e seu mecanismo de ação envolve uma série de reações que levam a aceleração da produção de radicais livres de oxigênio, que induzem dano ao DNA do microrganismo. Podem ser administrados via oral ou intravenosa [111, 112]. A vancomicina é um glicopeptídico e atua na parede celular bacteriana, inibindo a síntese da parede celular. Geralmente, é utilizada para tratar infecções provocadas por bactérias gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e casos mais graves de infecção por *C. difficile*. Este antibiótico é minimamente absorvido pelo trato gastrointestinal intacto e concentra-se em altos níveis no lúmen do cólon, o local de seu efeito antimicrobiano pretendido [113]. A fidaxomicina é um antibiótico da classe dos macrolídeos e foi aprovada pelo FDA dos Estados Unidos em 2011 para uso no tratamento/recidiva da CDI. Este antimicrobiano é o resultado dos produtos da fermentação de *Actinoplanes deccanensis* e *Dactylosporangium aurantiacum*, apresenta um espectro de alvos microbianos restrito e tem atividade bactericida contra *C. difficile* ao inibir a transcrição do RNA bacteriano pelas RNA polimerases, prevenindo assim a síntese de proteínas [114].

Para os casos de rCDI, além do uso da fidaxomicina, novas estratégias estão sendo aplicadas, como anticorpos monoclonais de ligação a toxinas e transplantes de microbiota fecal [115, 116]. Para os casos em que há um primeiro episódio de recorrência, a fidaxomicina é o antimicrobiano mais indicado pela maioria das diretrizes sociais [99]. A partir da segunda recorrência da doença as diretrizes IDSA/SHEA indicam um curso padrão ou estendido de fidaxomicina, um regime de vancomicina oral em dose gradual/pulsada ou um curso padrão de vancomicina oral seguido de rifaximina 400 mg três vezes ao dia por 20 dias [107].

Quando o paciente não responde ao tratamento convencional por antibióticos e já teve pelo menos duas recorrências da doença, o transplante fecal

é indicado. Este procedimento consiste na restauração da microbiota intestinal de um paciente que passou por um processo de disbiose a partir de um doador que possui uma microbiota considerada “saudável” [98]. Desta forma, o objetivo da transferência dessa microbiota para o paciente com CDI é restaurar o microbioma de forma funcional a ponto de conseguir interromper a multiplicação de *C. difficile* por meio da competição por nutrientes, produção de metabólitos/bacteriocinas e área de superfície epitelial. Um outro fator importante são as fezes do doador, que também influenciam na eficácia do tratamento, como número de doses e duração do mesmo [117].

Outro tratamento alternativo é o uso de anticorpos monoclonais, como o Bezlotoxumab, cujo objetivo é se ligar nas toxinas A e B produzidas por *C. difficile* e neutralizá-las, e seu uso juntamente com a terapia antimicrobiana contribui na diminuição significativa da recorrência da doença [118]. Porém este tratamento é muito oneroso, R\$6mil a R\$12 mil reais, dependendo do tipo de administração, endovenosa ou subcutâneo.

No Brasil, especificamente na rotina da Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), o tratamento é feito com metronidazol oral durante a fase sintomática, sem uma duração previamente definida. Quando o paciente não apresenta condições de ingestão oral, o metronidazol é administrado por via endovenosa. Em casos de agravamento do quadro clínico ou piora do paciente, é feita a associação com vancomicina oral (fonte: rotina da CCIH - HUCFF; dados não publicados).

3.9 Suscetibilidade a antimicrobianos e resistência em *C. difficile*

Segundo o Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), dentre as infecções relacionadas à assistência à saúde, as infecções gastrointestinais são um dos tipos frequentemente reportados, sendo *C. difficile* considerado o principal causador da diarreia associada ao uso de antimicrobianos e representando quase 50% dos casos indicados [119]. Apesar de certos antimicrobianos estarem mais associadas a CDI, todas as classes de antibióticos podem induzir a doença. Sendo assim, ter resistência a uma gama de antimicrobianos pode representar uma vantagem seletiva importantíssima para *C.*

difficile, já que promoveria um aumento da sua sobrevivência no ambiente e, conseqüentemente, garantiria uma melhor propagação no hospedeiro [120].

Geralmente, a suscetibilidade de *C. difficile* a antimicrobianos é definida de duas maneiras: antimicrobianos relacionados ao tratamento da CDI (metronidazol, vancomicina e fidaxomicina) e outros antibióticos [121, 122]. A rápida evolução da resistência a antimicrobianos em *C. difficile* tem se tornado uma grande preocupação para a saúde pública, principalmente porque atualmente a maioria isolados clínicos epidêmicos de *C. difficile* é resistente a múltiplos antibióticos, inclusive aqueles adotados para o tratamento da CDI [123, 124].

Os mecanismos de resistência de *C. difficile* ao metronidazol ainda estão sendo estudados e elucidados, mas a conclusão feita até o momento é que se trata de um processo multifatorial, envolvendo alterações no metabolismo, como com nitroredutases, absorção de ferro, reparo de DNA ou formação de biofilme. Em outras espécies, os relatos de resistência a metronidazol envolvem mecanismos de diminuição das taxas de crescimento e absorção do antimicrobiano, bombas de efluxo, nitroimidazol redutases (codificadas por genes *nim*), oxidoredutases de piruvato-ferredoxina modificadas (pfo ou PFOR) e vias de estresse ou mutações nos genes *hemN* e regulador de absorção férrica (gene *fur*) [125]. Em anaeróbios, o grupo nitro do metronidazol é reduzido por elétrons provenientes de cofatores como ferredoxina e flavodoxina em reações catalisadas por oxidoredutases, como a PFOR. Como resultado desta reação química, um ânion nitroimidazol instável é produzido e pode ser convertido em intermediários nitroso e hidroxilamina reativos (radicais livres) que reagem com DNA e proteínas, provocando dano e morte celular [126]. Em *C. difficile*, foi constatado em um estudo em que uma cepa não toxigênica apresentava uma concentração reduzida de PFOR, indicando que poderia ter ocorrido uma alteração da via metabólica e, portanto, os radicais livres produzidos não causariam dano ao DNA bacteriano [127]. Outro mecanismo de resistência já descrito ao metronidazol é o plasmídeo pCD-METRO. Os plasmídeos podem carregar genes de resistência aos antimicrobianos e, em relação ao pCD-METRO, ainda não se sabe quais genes são responsáveis pela resistência ao metronidazol. Porém, este plasmídeo é disseminado internacionalmente e também ocorre em tipos epidêmicos [128].

Para a vancomicina, um mecanismo de resistência bastante comum em bactérias é a presença de genes *van*, que alteram o terminal peptidoglicano D-

Ala-D-Ala e reduzem sua afinidade pela vancomicina [129]. Embora os genes *van* e ortólogos já tenham sido identificados em *C. difficile*, o mecanismo no qual a bactéria apresenta resistência à vancomicina ainda não é completamente compreendido [125]. O gene *murG* também é uma enzima associada a biossíntese da parede celular e, desvios dessa via bioquímica pode alterar também a suscetibilidade de *C. difficile* à vancomicina, assim como visto por Leeds e colaboradores, que identificaram uma mutação no gene *murG/cd2725* [130, 131]. Assim como ocorre para o metronidazol, também há um plasmídeo que pode conferir suscetibilidade reduzida à vancomicina: o pX18-498. Até onde se sabe, este plasmídeo está envolvido em algum mecanismo relacionado a manter a integridade da parede celular, uma vez que, as células de *C. difficile* que tinham plasmídeo não se romperam em comparação com as células sem plasmídeo, ambas sob a presença de vancomicina [132].

Em relação a fidaxomicina, o relato de cepas resistentes é bem raro. Em 2023, um grupo de pesquisadores fizeram um levantamento bibliográfico sobre relatos de casos de cepas de *C. difficile* resistentes a fidaxomicina e, até então, verificaram o relato de apenas três isolados clínicos com suscetibilidade reduzida à fidaxomicina [133]. Nesses casos, foram detectadas mutações no gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase bacteriana. Um fato importante a ser comentado é que ambos os antimicrobianos fidaxomicina e rifampicina inibem a transcrição bacteriana e mutações no gene *rpoB* são responsáveis pela resistência em ambos. No entanto, para a bactéria apresentar resistência aos dois antimicrobianos, é necessário mutações separadas, pois não confere proteção cruzada. Desta forma, uma mutação no gene *rpoB* que provoca redução de suscetibilidade a rifampicina, por exemplo, não necessariamente irá conferir resistência dessa mesma bactéria a fidaxomicina [120, 125].

Para outros antimicrobianos que não são utilizados para o tratamento, *C. difficile* também pode ter vantagem seletiva. As fluoroquinolonas, como moxifloxacina, são antimicrobianos bactericidas que atuam inibindo as funções das enzimas DNA girase e topoisomerase tipo IV, importantes no ciclo de replicação da bactéria. A resistência de *C. difficile* a este medicamento ocorre por meio de mutações nos genes que codificam essas enzimas alvo e fazem com que o antimicrobiano interaja menos com essas proteínas, uma vez que o sítio alvo se tornou distinto. O RT027 de *C. difficile* é um ótimo exemplo, embora não se saiba exatamente como ocorreu essa disseminação, supõe-se que o uso generalizado

deste antimicrobiano proporcionou uma disseminação global desta cepa hipervirulenta, assim como comentado no item 3.5 [134, 135]. Os macrolídeos, como a eritromicina e a clindamicina, são uma classe de antimicrobianos que promovem a inibição da síntese proteica a partir da ligação à subunidade 50S do ribossomo bacteriano. Para *C. difficile*, o mecanismo de resistência mais comum é a metilação ribossômica, como a presença de genes *erm*, principalmente o *ermB*. Os genes *erm* codificam metiltransferases de RNA ribossômico 23S codificadas que normalmente são transportados em transposons, como Tn5398, Tn6194, Tn6215 e Tn6218 [136, 137]. *C. difficile* também é intrinsecamente resistente a alguns beta-lactâmicos, como a cefalosporina, medicamento comumente prescrito. Isto ocorre porque já foi descrita uma beta-lactamase endógena de classe D, BlaCDD (codificada por CD630_04580), que hidrolisa o anel beta-lactâmico de diferentes subtipos de antimicrobianos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactamas [138].

Pelo fato do cenário da CDI ser bastante preocupante não só pelo aumento da incidência e gravidade dos casos, mas também pela emergência de cepas multirresistentes e hipervirulentas, este estudo tem o objetivo de contribuir na compreensão da epidemiologia de *C. difficile* em alguns hospitais públicos do Rio de Janeiro. Devido a preocupação com a disseminação de cepas com perfis de resistência antimicrobiana, aliada à escassez de dados epidemiológicos consolidados no país, evidencia a necessidade de investigações mais aprofundadas. Desta forma, o estudo das características genotípicas e fenotípicas de cepas toxigênicas e não toxigênicas se torna essencial para o entendimento das cepas circulantes nos hospitais, bem como para a identificação de potenciais riscos associados à colonização e infecção. Além disso, o estudo deste patógeno auxilia as autoridades de saúde a estabelecer estratégias mais eficazes de vigilância, prevenção e controle da CDI, contribuindo para o fortalecimento das ações de saúde pública e segurança hospitalar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo transversal com amostras de conveniência, desenvolvido em pacientes hospitalizados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e Hospital Federal da Lagoa (HFL).

4.2 Período, população e local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Biologia de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, pertencente à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A inclusão de casos ocorreu de outubro de 2022 a novembro de 2024 nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de dois hospitais do Estado do Rio de Janeiro: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ) e Hospital Federal da Lagoa (HFL).

O HUCFF/UFRJ é um hospital público, de nível terciário, universitário e conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS). É constituído por 3 unidades de terapia intensiva que contam com o total de 22 leitos, e um setor de hematologia que apresenta 18 leitos. Os pacientes da hematologia que precisam de internação permanecem no setor, sendo, portanto, considerado uma UTI independente. Além disso, foi aplicado um questionário para coletar informações sobre a ficha clínica dos pacientes (Anexo 1), com dados obtidos a partir do prontuário eletrônico Medtrack®. As variáveis coletadas foram: motivo da internação; quais sintomas característicos da infecção provocada por *C. difficile* foram identificadas no paciente; data do início dos sintomas; fazendo uso de antimicrobianos ou não; se tem doença de base; se teve CDI anteriormente; se faz quimioterapia; qual quimioterápico está utilizando. Também foi feita a coleta ambiental das UTIs e do setor de hematologia em estudo.

O HFL também é um hospital público, de nível terciário e conveniado ao SUS. A instituição conta com uma UTI equipada, com 12 leitos, e, durante o período da coleta de dados, enfrentava um surto de CDI. Além disso, também foi realizada a coleta de material ambiental nesta UTI.

4.3 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCFF com o número 60230021.7.0000.5257. O documento de aprovação do trabalho pelo CEP encontra-se no Anexo 2. No Anexo 3, encontra-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TLCE) utilizado para permissão por parte do paciente sobre o uso das amostras biológicas.

4.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes internados nas UTIs do HUCFF e HFL, com suspeita de CDI, fazendo uso de antimicrobianos, imunossupressores e/ou quimioterápicos e apresentando diarreia ou quadros de CPM. Pacientes com outras comorbidades, transplantados, com câncer e pós cirúrgicos, internados no setor de hematologia e com suspeita de CDI também foram incluídos no estudo. Apenas aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) tiveram suas amostras analisadas e estudadas.

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes que não estiveram internados na UTI e/ou não realizaram a assinatura do TCLE.

4.6 Obtenção, armazenagem e transporte das amostras de *Clostridioides difficile*

As amostras obtidas neste estudo foram coletadas a partir da notificação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), e após a passagem pelo setor de Microbiologia, exceto as amostras ambientais, que foram diretamente encaminhadas para o laboratório após a coleta. Além disso, os dois hospitais apresentavam perfis epidemiológicos distintos: um estava com surto de CDI (HFL), enquanto o outro (HUCFF) não apresentou uma prevalência de CDI que caracterizasse um padrão epidêmico e/ou endêmico.

A pesquisa de *C. difficile* foi realizada a partir de amostras fecais de pacientes internados nas UTIs e no setor de hematologia, que faziam uso de antimicrobianos, imunossupressores e/ou quimioterápicos, e apresentavam diarreia ou quadro clínico

compatível com CPM. As amostras fecais foram coletadas em frasco coletor estéril ou, em casos de impossibilidade de coleta das fezes, por meio *swab* retal contendo meio de transporte específico para anaeróbios (Meio Amies com carvão ativado; Plastlabor®). Após coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia de Anaeróbios no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG/UFRJ), e armazenadas à -20°C até o momento do seu processamento.

Quanto às coletas ambientais, foram feitas em locais como: superfícies de ralo, lavatório, torneira, biombos, maçaneta, interruptor, lixeira, leitos de todos os pacientes internados e sola de sapato dos profissionais que circulavam nas UTIs. Todas as amostras ambientais, após a coleta, foram levadas imediatamente para o Laboratório de Biologia de Anaeróbios, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG/UFRJ), e armazenadas à -20°C até o momento do seu processamento. É importante ressaltar que cada região ambiental citada teve uma única amostra coletada.

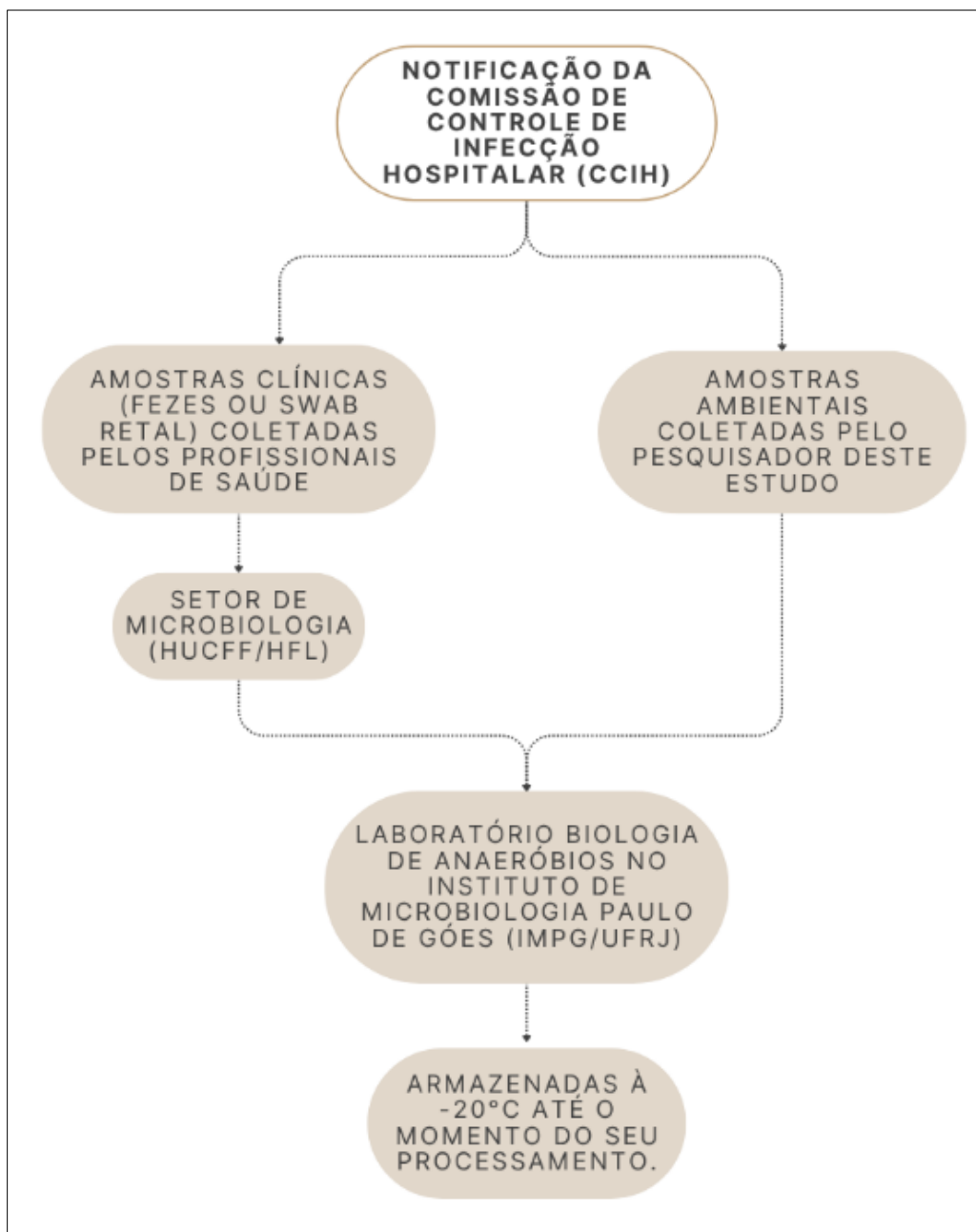


Figura 6: Fluxograma do processo de obtenção e armazenamento das amostras.

4.7 Isolamento e cultivo de *C. difficile*

Após a coleta do material clínico, todos os *swabs* contendo das amostras, sejam ambientais ou de pacientes, foram colocados no meio de cultura seletivo e diferencial *Clostridioides difficile* Brucella caldo (CDBC) (4 mL) e, em seguida, homogeneizados em *vórtex* por aproximadamente 30 segundos. Depois, as amostras foram incubadas a 37° C por 7-10 dias ou até apresentarem crescimento. Após o crescimento no meio, 50 µL das amostras foram

semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalski em placas de meio *Clostridioides difficile* Brucella ágar (CDBA) sob as mesmas condições do caldo e incubadas novamente a 37°C por até 7-10 dias. Todas as etapas de cultivo foram feitas em anaerobiose (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂). Quanto a formulação do meio CDBA, o mesmo contém: Brucellabroth (28g/L; BD BBL®, Le Pont de Claix, França), solução de menadiona a 1mg/mL (1mL/L; SigmaAldrich®, St Louis, Missouri, EUA), solução de hemina a 0,5mg/mL (1mL/L; SigmaAldrich®), solução de 20% bicarbonato de sódio (5mL/L; Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo), manitol (6g/L) e solução de 1% de vermelho neutro (3mL/L). Além disso, o meio também conta com a adição de 0,02% de taurocolato de sódio (0,2g/L; Sigma-Aldrich®) para favorecer a germinação dos esporos e os antibióticos D-cicloserina a 0,0128mg/L (10mL/L) e cefoxitina a 500mg/L (1250µL/L). O caldo CDBC é preparado da mesma maneira, porém, ao invés de utilizar o meio Brucella com ágar, utiliza-se o meio Brucella caldo.

Para o isolamento de *C. difficile*, cerca de 1 grama de fezes foi transferido para um tubo estéril contendo 1 mL de PBS 1x e, em seguida, foi realizado um choque térmico a 56°C por 1h. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex e semeadas no meio CDBA nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as placas ficaram incubadas por 7-10 dias. Além disso, para fins de triagem, as amostras fecais obtidas foram testadas no kit C diff Quik Chek complete® (Techlab) antes da realização da cultura. As amostras negativas também foram colocadas em cultura a fim de analisar a sensibilidade e especificidade do teste.

4.8 Identificação do *Clostridioides difficile*

Após a incubação no meio CDBA, observou-se o aspecto característico das colônias presentes no meio com auxílio de um microscópio estereoscópico (Zeiss, Alemanha), no aumento de 400X. Aquelas colônias que apresentaram as características morfológicas típicas da espécie, como aspecto de vidro quebrado, odor de “estrupe de cavalo” e coloração de Gram típica da espécie, bastonetes Gram positivos (Ferreira, Domingues e Uzeda, 2003), foram semeadas em meio BHI ágar (*Brain Heart Infusion* acrescido de 0,1% de cisteína, 1% de hemina e 0,1% de menadiona). Este meio foi preparado com BHI (37g/L; Oxoid®,

Basingstoke, Reino Unido), extrato de levedura (5g/L; Oxoid®), 1,5% de ágar bacteriológico (15g/L; Neogen®, Heywood, Reino Unido), solução de hemina a 0,5mg/mL (10mL/L) e solução de menadiona a 1mg/mL.

Após o crescimento, foi feita a identificação das colônias por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF MS (Bruker®) no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG/UFRJ). Como observação, vale ressaltar que as amostras foram passadas para placas com meio BHI ágar para melhor identificação por espectrometria demassas, uma vez que alguns componentes do meio de cultura CDBA dificultam a análise do MALDI-TOF MS.

4.9 Espectrometria de Massas de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Tempo de Voo – MALDI-TOF MS

Para realizar a confirmação da identificação das amostras de *C. difficile*, as colônias sugestivas serão submetidas a análise por espectrometria de massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF MS do inglês, *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time off light mass spectrometry*) ou Biotyper (Bruker®). Para isso, com o auxílio de um palito estéril, a colônia será coletada, em duplicata, em uma micro placa metálica seguido da adição de 1µL de ácido fórmico 0,1% e 1µL de matriz (*α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*). Deve-se esperar secar em temperatura ambiente (TA) e em seguida o material deve ser levado para análise, e as amostras com *score* igual ou maior que 2,0 serão confirmadas como sendo *C. difficile*.

4.10 Caracterização molecular das cepas de *C. difficile*

4.10.1 Obtenção do DNA genômico

Para obtenção do DNA genômico, as cepas foram reativadas em caldo BHI-PRAS (*Brain Heart Infusion – pre-reducedanaerobicallyandsterilized*), acrescido de cisteína (1g/L; Proquimios®, Rio de Janeiro, Brasil), hemina a 0,5mg/mL (10mL/L), menadiona a 1mg/mL e rezasurina (4mL/L) e, após 24 horas de incubação a 37°C em anaerobiose, as amostras foram semeadas em meio BHI ágar também a 37°C em anaerobiose por 48h. Em seguida, cerca de três a seis

colônias da placa foram selecionadas, coletadas com a alça microbiológica e diluídas em microtubos cônicos de 1,5mL contendo 98µL de solução de 5% de Chelex 100 preparado em água estéril (p/v) (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e 2µL de Proteinase K (20 mg/mL; Sigma-Aldrich®). Depois, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex e incubadas em banho-seco por 1h a 56°C. Ao final do tempo de incubação, as amostras foram homogeneizadas novamente no vórtex e incubadas em banho-seco a 100°C por mais 10 min. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas mais uma vez e centrifugadas a 16.000xg por 2 min a 4°C. Por fim, cerca de 90µL do sobrenadante das amostras foi transferido para novos microtubos cônicos de 1,5mL e armazenados a -20°C, até o momento do uso.

4.10.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo multiplex

As amostras que apresentaram resultado positivo para *C. difficile* pelo MALDI-TOF MS também passaram pela confirmação da espécie por meio da presença do gene *tpi* – *triosephosphate isomerase* (espécie-específica). Além disso, foi realizada a pesquisa dos genes das toxinas produzidas por *C. difficile*, as toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) e binária (*cdtAe cdtB*), bem como a análise da presença dos genes do regulador negativo TcdC (*tcdC*). Para todas as análises, foi aplicada a metodologia da reação em cadeia de polimerase do tipo multiplex (PCR-M).

Com o intuito de identificar os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*, utilizou-se como base o protocolo de Griffiths *et al.* (2010). Para o gene *cdtB* (toxina binária), realizou-se sua detecção por meio da aplicação do protocolo de Stubbset *al.* (2000). As reações de PCR para cada um dos genes foram realizadas por meio de uma PCR Multiplex e com um volume final de 25µL. Para a detecção dos genes de resistência, as reações foram feitas de forma individual e também com o mesmo volume final de 25µL. A mistura consistiu de 5µL do DNA previamente extraído, 1pmol de cada iniciador e 0,5µL Class Five Taq DNA Polimerase (NeoBio), 5µL tampão 1x da NeoBio 1,5mM de MgCl₂.

Para a etapa de amplificação dos genes foi utilizado o termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 – well ThermalCycler), de acordo com o seguinte ciclo (Stubbset *al.* 2000; Griffith *et al.*, 2010): i) PCR-Multiplex: *tcdA*, *tcdB*, *tpi*, *cdtB*–

95°C por 3 min, seguidos por 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. O tamanho esperado dos fragmentos são: 369pb (A+B+) ou 110pb (A-B+) para *tcdA*; 160pb para *tcdB*; 640pb para *tpi*; e 510pb para *cdtB* (Quadro 1).

Para a eletroforese, misturou-se 8µL dos amplicons com 1 µL do intercalante de bases *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia) e aplicado em um gel de agarose 1,5% (p/v) para serem analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1x a 100V e 400mA por cerca de 1h. No mesmo gel de agarose também se aplicou 8µL do padrão de tamanho molecular 100 pb (Promega) para fins comparativos. Ao final da corrida, o gel foi analisado sob transiluminação por luz ultravioleta (MiniBis Pro® DnrBio-Imaging System, Jerusalem, Israel).

4.10.3 Detecção de genes de resistência e do plasmídeo pCD-METRO

Para a detecção dos genes *gyrA* e *gyrB* foi utilizada a referência de Dridiet *al.* (2002) e, como controle positivo do gene, foi utilizada a cepa epidêmica de *C. difficile* NAP1/027, resistente a moxifloxacino. O volume final da mistura foi de 50µL, contendo 5µL do DNA extraído previamente no item 4.10.1, 1pmol/µL de cada iniciador, 0,6µL de GoTaq DNA polimerase (Promega) e 10µL tampão 1x da Promega. Após a amplificação, os genes *gyrA* e *gyrB* foram purificados com o kit da Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) e enviados para a plataforma de sequenciamento do Instituto de Biofísica/UFRJ. Posterior a etapa de purificação, o DNA das amostras foi dosado no Qubit segundo as recomendações do fabricante, com o intuito de obter a concentração recomendada pela Plataforma de Sequenciamento (10ng de DNA, 3,2 pmol/µL do *primer forward* – *gyrAF* e *gyrA* R; *gyrB* F e *gyrB* R), em um volume final de 7µL, utilizando água estéril para completar o volume. Após o recebimento dos arquivos, as sequências foram analisadas no programa Mega (versão 11.0.13- 1993-2025). A sequência do *gyrA* e *gyrB* da cepa CD630 (RT012) foi utilizada para comparação e detecção das mutações.

Já para o gene *ermB* e o plasmídeo pCD-METRO, foram utilizados como referência o protocolo de Farrow, Lyras e Rood (2000) e Smits *et al.* (2022), respectivamente. Como controle positivo do gene *ermB*, foi utilizada a cepa

RT078 e, no caso do plasmídeo pCD-METRO, foi utilizada a cepa VrCd (RT010), de isolado clínico de cão sintomático positivo para a presença do plasmídeo. Todos os oligonucleotídeos utilizados, assim como o tamanho do fragmento esperado, estão especificados no Quadro 1. Para a reação de PCR, o volume final utilizado foi de 25µL, e para a reação foram utilizados 5µL de DNA, 1 pmol/µL de cada de oligonucleotídeo, 0,3µL de GoTaq DNA polimerase (Promega), 5µL de tampão 5x da Promega 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs e água estéril para completar o volume [139, 140].

Para a etapa de amplificação dos genes de resistência e do plasmídeo pCD-METRO, foi utilizado o termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 – wellThermalCycler) de acordo com os seguintes ciclos: *i*) pCD-METRO – 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos; *ii*) *ermB*– 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos; *iii*) *gyrA/gyrB*– 94°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Para a eletroforese, 8µL da reação foram misturados com 1µL do intercalante de bases da LGC e aplicados em um gel de agarose 1,5% (p/v), em tampão TBE 1x a 100V e 400mA por cerca de 1h. Como referencial da eletroforese, foi utilizado o padrão de tamanho molecular 100 pb (Promega). Com o término da eletroforese, o gel foi analisado sob transiluminação por luz ultravioleta (MiniBis Pro® DnrBio-Imaging System, Jerusalém, Israel).

4.10.4 Análise e sequenciamento do regulador negativo da expressão de toxinas - *tcdC*

Para a análise da sequência do regulador negativo *tcdC* nas cepas toxigênicas, primeiramente foi feita uma reação de PCR com volume final de 50µL, contendo 5µL do DNA extraído previamente, 1pmol/µL de cada iniciador, 0,6µL de GoTaq polimerase (5U/µL) (Promega) e 10µL Taq polimerase Green GoTaq 5x (Promega). As reações de amplificação do gene *tcdC* foram realizadas em um termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 – wellThermalCycler), seguindo os

ciclos propostos por Spigaglia&Mastrantonio (2015): 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 7 minutos. O fragmento esperado é de 678pb (Quadro 1).

Uma vez detectada a presença do gene, o produto da PCR foi purificado por meio do kit comercial Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega), segundo as recomendações do fabricante. Posterior a etapa de purificação, o DNA das amostras foi dosado no Qubit segundo as recomendações do fabricante, com o intuito de obter a concentração recomendada pela Plataforma de Sequenciamento (10ng de DNA, 3,2 pmol/μL do *primer forward* – *tcdCF* e reverso *tcdCR*), em um volume final de 7μL. Após o recebimento dos arquivos, as sequências foram analisadas no programa Mega (versão 11.0.13-1993-2025). As sequências do *tcdC* das cepas R20291 (NAP1/027), CD630 (RT012) e CD196 (RT027) foram utilizadas para comparação.

Quadro 1 – Iniciadores utilizados na detecção dos genes da espécie *Clostridioides difficile*

Genes	Iniciadores 5' – 3'	Tamanho esperado do amplicon (pb)
<i>tpi-F</i>	ATGAGAAAACCTATAATTGCAG	640
<i>tpi-R</i>	TTGAAGGTTTAACTTCCACC	
<i>cdtB-F</i>	CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G	510
<i>cdtB-R</i>	AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC	
<i>tcdA-F</i>	AGA TTC CTA TAT TTA CAT GAC AAT AT	369 (A+B+)
<i>tcdA-R</i>	GTA TCA GGC ATA AAG TAA TAT ACT TT	110 (A-B+)
<i>tcdB 2-F</i>	GGA AAA GAA AAT GGA TTT ATT AA	160
<i>tcdB 2-R</i>	ATC TTT AGT TAT GAC TTT AAC ATC TTT	
* <i>tcdC-F</i>	TCTCTACAGCTATCCCTGGT	678
* <i>tcdC-R</i>	AAAATGAGGGTAACGAATTT	
pCD_MTZ_F	CCTCGTAGAATCCGGTGCAA	200
pCD_MTZ_R	TATTCCTTGCCGCTGAGGT	
<i>ermB-F</i>	AATAAGTAAACAGGTAACGTT	688
<i>ermB-R</i>	GCTCCTTGGAAGCTGTCAGTAG	
<i>gyrA-F</i>	AATGAGTGTTATAGCTGGACG	390
<i>gyrA-R</i>	TCTTTTAACTGACTCATCAAAGTT	

Genes	Iniciadores 5' – 3'	Tamanho esperado do amplicon (pb)
<i>gyrB</i> -F	AGTTGATGAACTGGGGTCTT	390
<i>gyrB</i> -R	TCAAATCTTCTCCAATACCA	

*Esses genes foram sequenciados para a detecção de mutações específicas.

4.11 PCR-Ribotipagem

Para realizar a ribotipagem e amplificar a região polimórfica espaçadora intergênica (ITS) dos genes que codificam as subunidades ribossomais 16S e 23S foram utilizados os iniciadores *forward* RIBO-1 de sequência 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3' e o reverso RIBO-2 de sequência 5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-3'. A reação de PCR teve um volume final de 25µL e utilizou-se 5,0 µL do tampão de Taq polimerase Green GoTaq 5x (Promega), 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM/mL de cada iniciador, 5µL de DNA, 0,3µL GoTaq polimerase (5U/µL) (Promega) e água estéril para completar o volume. Conforme a técnica desenvolvida por Bidet e colaboradores (1999), o tamanho dos amplicons varia entre 260 a 585 pb. A amplificação ocorreu de acordo com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 34 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min, finalizando com refrigeração a 4°C.

Os amplicons resultantes desta etapa anterior foram submetidos a uma eletroforese em tampão TBE 1x em um gel de agarose Seakem Gold (Lonza) a 2% por 3h a 85 V. Para a visualização dos produtos de amplificação, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio de 0,5µg/mL (p/v) por 30 min e lavado em água sob agitação por 30 min. Em seguida, o gel foi analisado sob transiluminação por luz ultravioleta (Gel Doc EZ Imaging, BioRad) e os amplicons comparados ao marcador de tamanho molecular de 100pb (Invitrogen). A análise do tamanho molecular foi realizada comparando-se o perfil de 43 ribotipos conhecidos e pertencentes a coleção de cultura de *C. difficile* do Laboratório de Biologia de Anaeróbios/UFRJ. A nomenclatura dos ribotipos encontrados foi designada seguindo a norma Cardiff/Leeds (001, 002, 014...). As cepas em que o perfil não foram ribotipadas com o nosso banco de dados, foram enviadas para a

Universidade de Leiden na Holanda aos cuidados do pesquisador Wiep Klass para que a ribotipagem seja realizada.

4.12 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para a realização do teste de susceptibilidade, foram selecionados os antimicrobianos vancomicina (5µg), metronidazol (5µg), moxifloxacina (5µg), eritromicina (5µg) e rifampicina (5µg), todos da marca Oxoid® (Basingstoke, UK) e mantidos a -20° C até o momento do uso. Em relação à definição da concentração mínima inibitória, utilizou-se a metodologia descrita pelos estudos de Erikstrup *et al.*, (2012) e Holst, Danielsen e Justesen (2015). Como controle positivo do teste, foi utilizado a cepa R20291 (NAP1/RT027) de *C. difficile* pertencente à coleção de cultura do Laboratório Biologia de Anaeróbios e com o perfil de susceptibilidade conhecido para cada um dos antimicrobianos testados. Antes de preparar o inóculo, as cepas foram reativadas em caldo BHI-PRAS por 24h a 37° C. Em seguida, foram semeadas em placas de ágar sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro por 48h a 37°C em jarras de anaerobiose. Após a incubação, as amostras foram diluídas em caldo Brucella, composto por Brucellabroth (28g/L), menadiona a 1mg/mL (1mL/L), hemina a 0,5mg/mL (10mL/L) e solução de bicarbonato de sódio a 2% (5mL/L), até alcançarem o tubo 1 da escala de McFarland (~3x10⁸UFC/mL). Após as cepas estarem na concentração adequada, com o auxílio de *swabs* estéreis (FirstLab®; São José dos Pinhais, Brasil), as amostras foram semeadas em novas placas de Brucella-ágar sangue, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 1% de hemina e 0,1% de menadiona, tendo o cuidado de espalhar o inóculo uniformemente pelos quatro quadrantes da placa. Em seguida, os discos foram posicionados cuidadosamente sobre o meio de cultura, respeitando uma distância mínima de 3 cm entre eles. Por fim, o material foi incubado por 24 horas em anaerobiose a 37°C. A leitura do teste é feita a partir da medição dos halos de inibição formados ao redor do disco de antimicrobiano. As amostras foram consideradas sensíveis com os seguintes halos de susceptibilidade: vancomicina (VAN) ≥ 19mm; metronidazol (MTZ) ≥ 23mm; moxifloxacina (MOX) ≥ 20mm; eritromicina (ERI) ≥ 20mm; rifampicina (RIF) ≥ 20mm. Tais valores de referência são recomendados por Poilane *et al.* (2007), Erikstrup *et al.* (2012), Holt, Danielsen e Justesen (2015) e Fraga, Nicodemo e Sampaio (2016) [141, 142, 143, 144].

4.13 Ensaio de citotoxicidade

O teste foi realizado como descrito por Pinto e colaboradores (2003), com modificações. Neste teste foram testadas as duas cepas positivas para os genes das toxinas: CDHFL4 e CDHFL7. Dois controles positivos foram utilizados como controle, a cepa BI/NAP1/RT027, positiva para as três toxinas; e a cepa 630/RT012, positiva para as toxinas A e B. As cepas foram cultivadas em meio BHI-PRAS e incubadas a 37°C por 72h em anaerobiose. Após a incubação, o meio foi centrifugado a 3000 xg e o sobrenadante filtrado por membrana de 0,22 µm para tubos estéreis. Todos os tubos foram mantidos congelados a -20 °C até o momento do uso.

Para a determinação da presença de toxinas, o sobrenadante foi misturado com meio de Eagle modificado (2,5 mM glutamina, 0,5 mM piruvato, 0,5 mM aminoácidos, 10% (v/v) soro bovino, 10,0 mM glicose e indicador fenol vermelho) (Sigma-Aldrich) em diferentes diluições (1/2 até 1/128 para avaliar quantitativamente a citotoxicidade de cada cepa), para ser aplicado em placa de 96 poços, contendo uma monocamada de células da linhagem Vero (inóculo inicial de 10⁵ células/mL) (Figura 7). A placa foi incubada a 37 °C por 24 h em uma estufa BOD com atmosfera de 5% de CO₂. As monocamadas foram observadas após 1, 2, 3, 4 e 24 h em microscópio invertido (Zeiss) com aumento de 400x. Como controles positivo e negativo foram usados, o sobrenadante de cultura de *C. difficile* ribotipo 027 (toxigênico) e meio líquido de BHI-PRAS, respectivamente. Foi considerada toxigênica, no respectivo título, a cepa em que > 50% das células Vero apresentaram arredondamento característico após 24 h de incubação. O teste foi realizado em duplicata (réplica biológica).

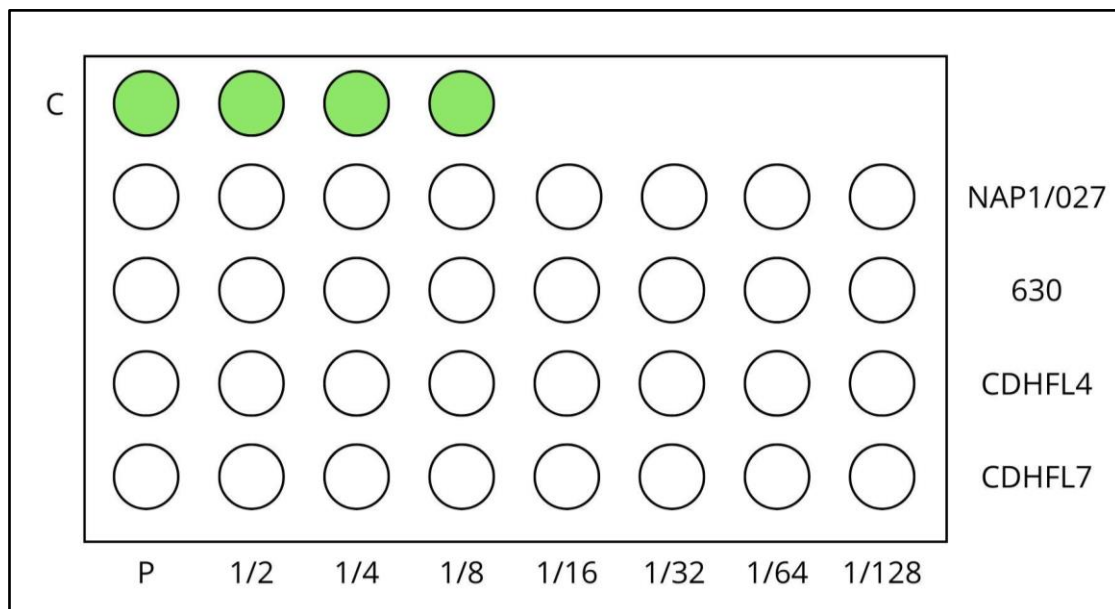


Figura 7: Esquema do ensaio de citotoxicidade celular. A linha C e os círculos em verde representam o controle negativo do ensaio, onde só há meio BHI-PRAS. A coluna P representa o sobrenadante puro. As outras colunas representam as diluições do sobrenadante. As cepas BI/NAP1 RT027 e 630 RT012 foram utilizadas como controles positivos.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos isolados

No total, foram coletadas 125 amostras fecais de pacientes internados, sendo uma amostra por paciente. Dentre esses espécimes, 42 eram provenientes do HUCFF, dos quais 14 foram obtidos no setor de Hematologia e 28 na UTI. Já em relação ao HFL, foram obtidas 83 amostras de fezes de pacientes. Para a coleta de amostras ambientais, também realizadas com *swabs* (Meio Amies; Plastlabor®), foram obtidas 232 amostras, sendo 175 do HUCFF (28 do setor de hematologia e 147 da UTI) e 57 do HFL. Nenhuma da amostra ambiental testou positivo para *C. difficile* utilizando-se a cultura em CDBB. Todas as amostras clínicas foram testadas previamente no C diff Quik Chek Complete® (Techlab) antes de serem cultivadas no meio CDBA para o isolamento de *C. difficile*. Este teste, além de indicar a presença do antígeno GDH, também indica se a amostra é toxigênica ou não. No caso deste estudo, todas as amostras positivas para a espécie no kit também foram positivas na cultura. Quanto à detecção das toxinas, o kit também se mostrou bastante sensível. Das 42 amostras coletadas no HUCFF, apenas uma foi positiva para *C. difficile* (2,3%), apresentando resultado positivo no kit rápido e na cultura. A amostra positiva foi obtida de um paciente do setor de hematologia e se tratava de um homem de 54 anos que havia passado recentemente por um transplante autólogo, estava em uso de antimicrobianos e apresentava cerca de quatro episódios de diarreia por dia. Já em relação ao HLF, das 83 amostras coletadas, 11 foram positivas para *C. difficile* (7,5%). Das 11 amostras positivas, 81,9% (9/11) apresentou perfil não toxigênico e 18,1% (2/11) apresentaram resultado positivo para as três toxinas: toxina A, toxina B e toxina binária (CDT) (Figura 8).

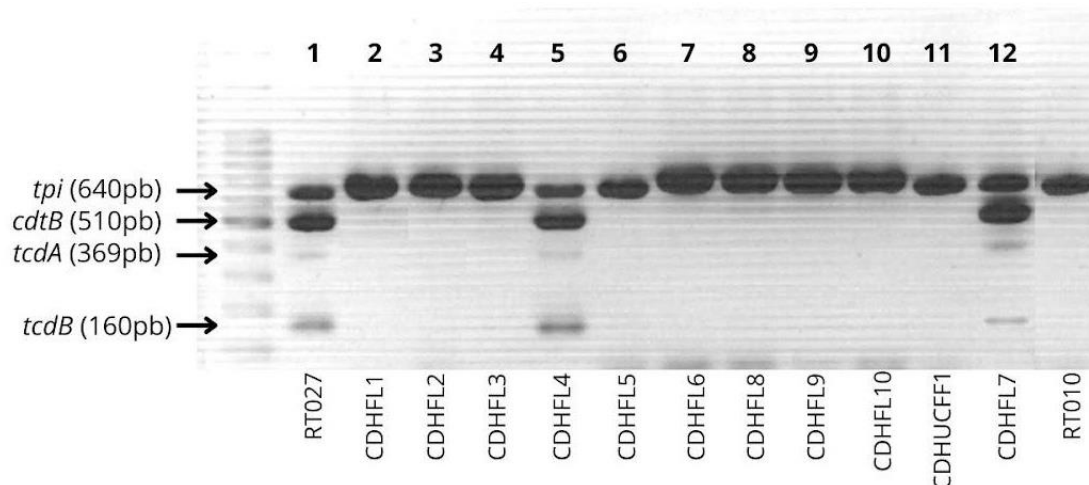


Figura 8: Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (M-PCR) para confirmação das amostras de *C. difficile* e detecção dos genes das toxinas. Linhas 2-12- cepas de *C. difficile* isoladas nesse estudo; linhas 1 e 13: cepas RT027 (A+B+CDT+) e RT010 (A-B-CDT-), utilizadas como controles das reações. O padrão de 100 pb foi utilizado como referência de tamanho molecular dos fragmentos.

Vale ressaltar que as cepas desse estudo foram nomeadas conforme o local de isolamento e em ordem de identificação, conforme pode ser visto no Quadro 2.

Quadro 2: Amostras de *Clostridioides difficile* isoladas nesse estudo

Amostras	Hospital/Setor
CDHUCFF1	HUCFF/Hematologia
CDHFL1	HFL
CDHFL2	HFL
CDHFL3	HFL
CDHFL4	HFL
CDHFL5	HFL
CDHFL6	HFL
CDHFL7	HFL
CDHFL8	HFL
CDHFL9	HFL
CDHFL10	HFL

5.2 Resultado da PCR-M e Ribotipagem

A maioria das amostras apresentou o mesmo perfil de tamanho molecular do RT010, condizente com o resultado da PCR-M (Figura 9), uma vez que o RT010 é não toxigênio. Vale ressaltar que, quando foi feita a obtenção de amostras no HFL, em outubro de 2023, a UTI estava passando por um surto de CDI e, seguindo os resultados das análises, foi identificado que a maioria das cepas pertenciam ao RT010, com exceção das cepas CDHFL6 e CDHFL10 (Figura 9), que não apresentaram um padrão de tamanho molecular semelhante com nenhuma cepa do banco de dados do Laboratório de Biologia de Anaeróbios.

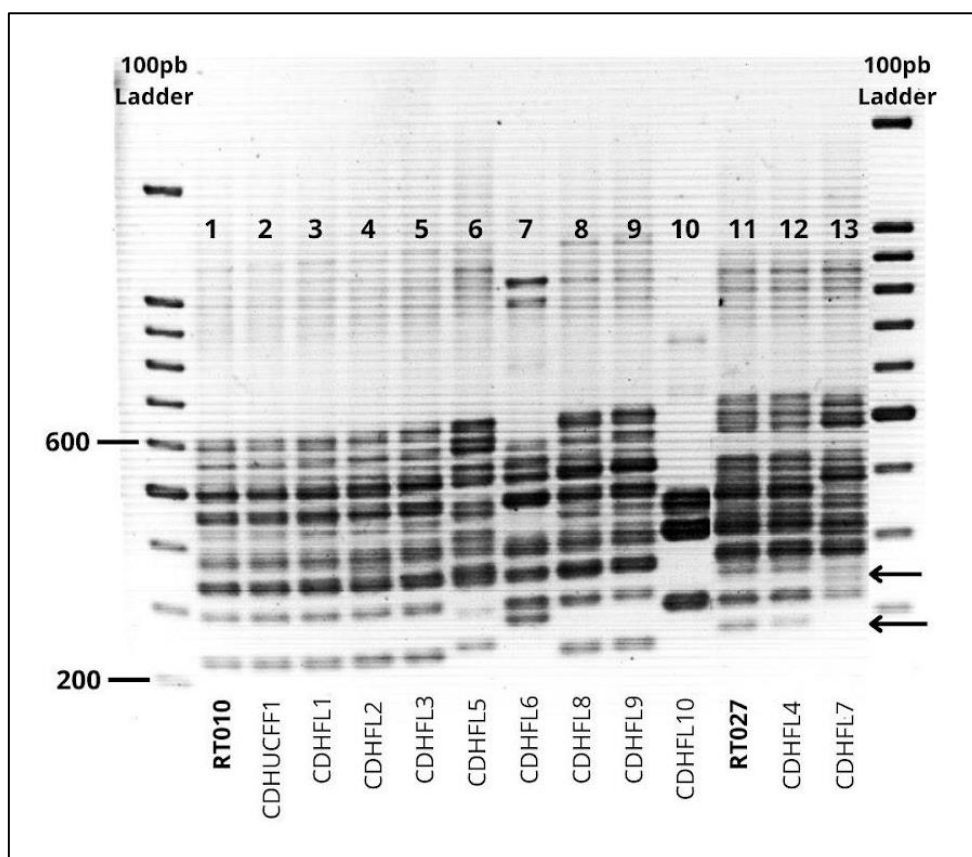


Figura 9: Resultado da PCR-Ribotipagem das cepas de *C. difficile* desse estudo em gel de agarose 2%. As linhas 1 e 12 representam as cepas RT010 (A- B- CDT-) e RT027 (A+B+CDT+), pertencentes ao banco de dados do LBA/UFRJ e utilizadas para fins comparativos do perfil da ribotipagem. Já as linhas 2 a 11, 12 e 13, representam as cepas desse estudo. A seta indica um perfil de dois tamanhos moleculares diferentes da amostra CDHFL7.

Após a detecção do surto em outubro de 2023 no HFL, outras duas amostras foram recebidas em outubro de 2024, ambas de pacientes da oncologia, adenocarcinoma intestinal e linfoma. Estas duas amostras (CDHFL4 e CDHFL7), mostraram-se toxigênicas tanto no teste rápido, quanto na PCR-M para os genes

tcdA, *tcdB* e *cdtB* (Figura 7). Na PCR-ribotipagem, a cepa CDHFL4 e CDHFL7 pertenciam ao RT027. Quanto ao perfil de tamanho molecular, a CDHFL4 era idêntica ao da R20291; enquanto que a CDHFL7 apresentou um perfil com dois tamanhos moleculares diferentes (Figura 8). A confirmação de que as cepas pertenciam ao RT027 foi feita com a ribotipagem por Eletroforese Capilar (Figura 10 e 11 A e B).

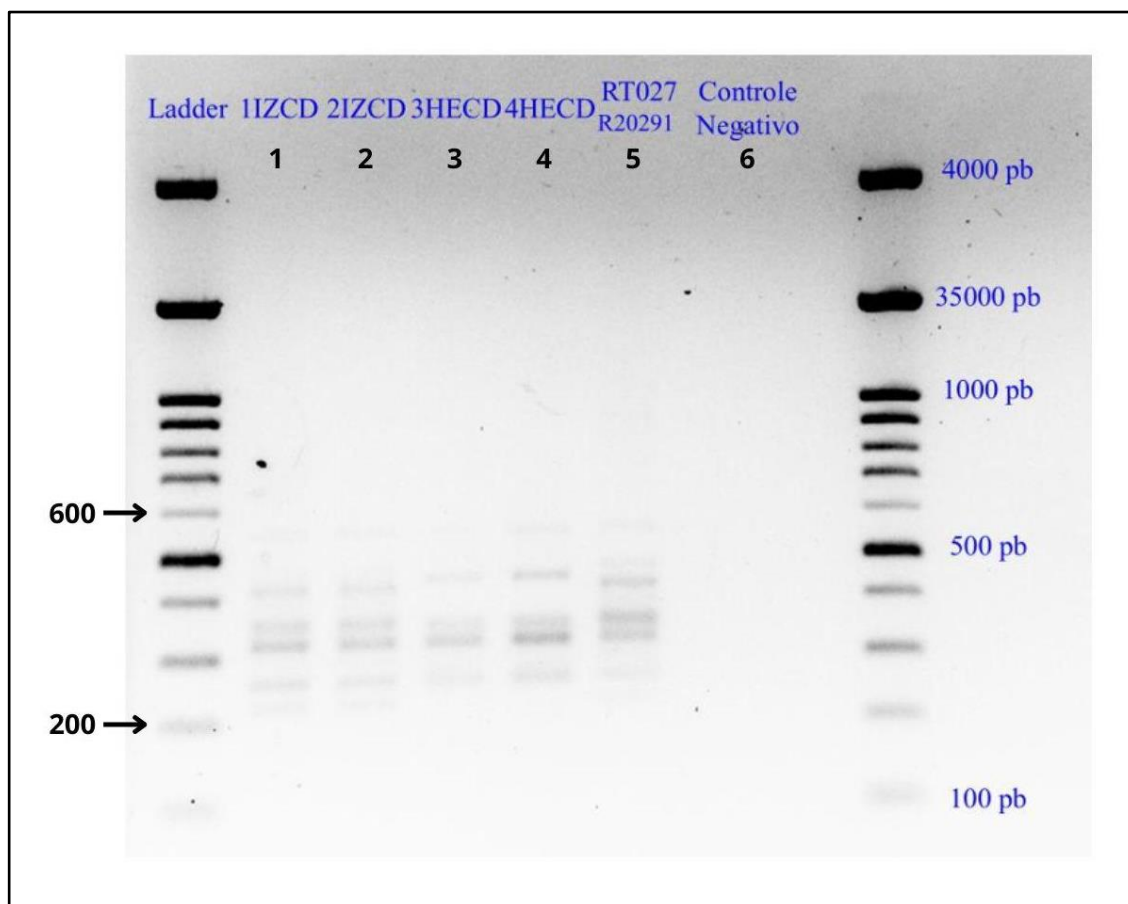


Figura 10: Ribotipagem por Eletroforese Capilar. Análise feita em duplicata. As amostras sinalizadas como 1IZCD e 2IZCD correspondem à cepa CDHFL4. Já as amostras 3HECD e 4HECD correspondem à CDHFL7. Na imagem, as duas amostras pertencem ao ribotipo 027.



Figura 11: Comparação do tamanho molecular das cepas CDHFL4 e CDHFL7 com o ribotipo mais provável (RT027). Na figura A, é apresentada a comparação entre a cepa CDHFL4 e o ribotipo RT027; na figura B, a comparação é entre a cepa CDHFL7 e o RT027. A cepa R20291 foi utilizada como controle positivo representativo do RT027. Em ambas as figuras, o campo "left side" corresponde à cepa analisada, enquanto o campo "right side" mostra a associação feita pelo banco de dados Webribo, indicando o ribotipo mais provável para a cepa em estudo. O retângulo em vermelho destaca duas regiões com diferença de tamanho molecular. A cepa CDHFL4 apresenta perfis de tamanhos moleculares idênticos aos da R2029. Já a cepa CDHFL7 exibe tamanhos distintos nessas regiões, diferença também confirmada por análise em gel de ribotipagem em agarose.

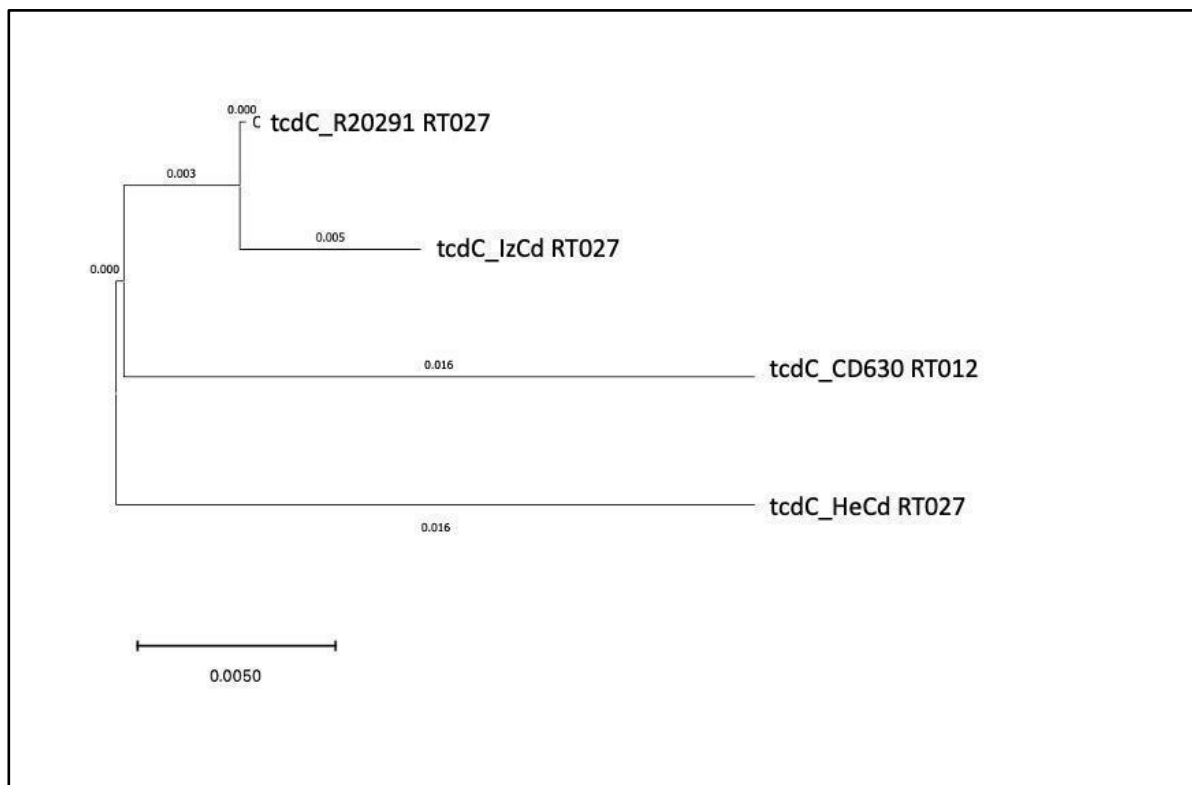


Figura 13: Árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento do gene *tcdC* das cepas de *C. difficile* IzCd e HeCd pertencentes ao RT027. A sigla IzCD representa a cepa CDHFL4, já HeCd representa a cepa CDHFL7. A cepa CDHFL4 tem um grau de identidade muito alto com a cepa R20291 (RT027). Já CDHFL7, embora também seja classificado como RT027, está um pouco mais distante da cepa epidêmica.

5.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos

Quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos (Quadro 4), todas as amostras foram sensíveis à vancomicina e rifampicina. Duas cepas (CDHFL5 e CDHFL6) apresentaram resistência à eritromicina, enquanto outras duas (CDHFL9 e CDHFL10) mostraram resistência ao metronidazol. As cepas classificadas como RT027 (CDHFL4 e CDHFL7), conforme esperado, foram resistentes tanto à eritromicina quanto à moxifloxacina.

Quadro 4: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados das cepas de *C. difficile* isoladas nesse estudo

Amostras	Antimicrobianos				
	Eritromicina	Rifampicina	Moxifloxacina	Metronidazol	Vancomicina
R20291	R	S (47mm)	R	S (24mm)	S (24mm)
CDHUCFF1	R	S (47mm)	S (24mm)	S (41mm)	S (26mm)
CDHFL1	R	S (45mm)	S (24mm)	S (40mm)	S (24mm)
CDHFL2	R	S (46mm)	S (23mm)	S (41mm)	S (25mm)
CDHFL3	R	S (42mm)	S (24mm)	S (43mm)	S (28mm)
CDHFL4	R	S (50mm)	R	S (27mm)	S (29mm)
CDHFL5	S (32mm)	S (44mm)	S (24mm)	S (40mm)	S (25mm)
CDHFL6	S (30mm)	S (21mm)	S (25mm)	S (30mm)	S (21mm)
CDHFL7	R	S (44mm)	R	S (35mm)	S (26mm)
CDHFL8	R	S (50mm)	S (24mm)	R	S (26mm)
CDHFL9	R	S (50mm)	S (24mm)	R	S (26mm)
CDHFL10	R	S (48mm)	R	S (32mm)	S (30mm)

S- Sensível; R- Resistente (sem formação de halo); A medição dos halos de inibição se encontra entre parênteses e em milímetros (mm). Parâmetros para sensibilidade: vancomicina (VAN) \geq 19mm, metronidazol (MTZ) \geq 23mm, moxifloxacino (MOX) \geq 20mm, eritromicina (ERI) \geq 20mm e rifampicina (RIF) \geq 20 mm. Referência: Poilane *et al.* (2007), Erikstrup *et al.* (2012), Holt, Danielsen e Justesen (2015) e Fraga, Nicodemo e Sampaio (2016)

5.5 Detecção dos genes de resistência

O gene *ermB* foi detectado nas cepas CDHUCFF1, CDHFL1, CDHFL2, CDHFL8, CDHFL9 e CDHFL10 (Figura 14).

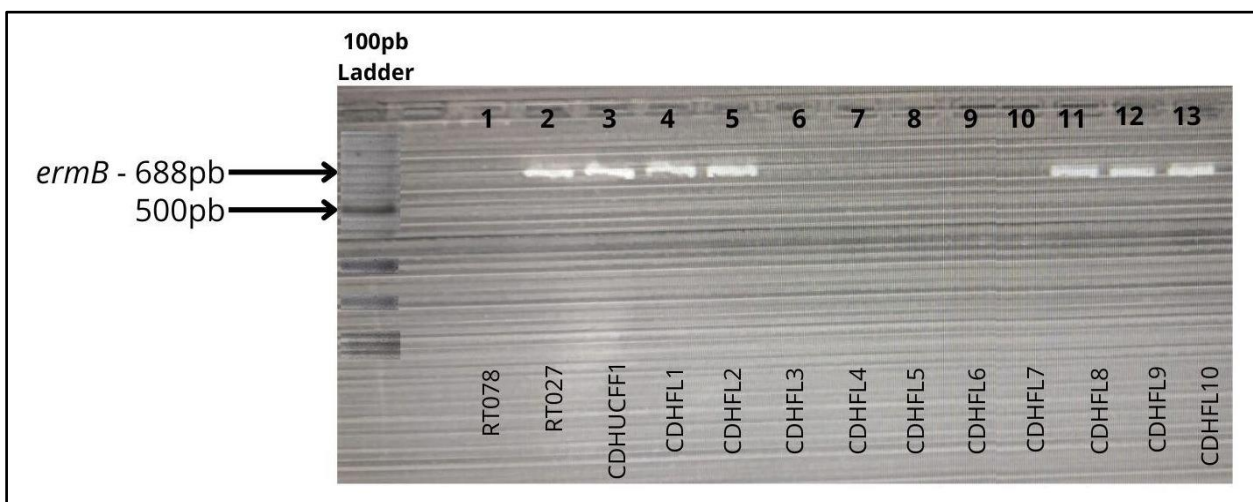


Figura 14: Detecção dos genes *ermB* nas cepas de *C. difficile* isoladas deste estudo. Nas linhas 1 e 2 estão os controles negativo (RT078) e positivo (RT027), respectivamente. Nas linhas 2-5 e 11-13 o gene *ermB* foi detectado. Já nas linhas 6-10 o resultado foi negativo.

O pCD-METRO foi encontrado em duas amostras: CDHFL8 e CDHFL9, ambas com perfil de resistência a metronidazol (Figura 15).

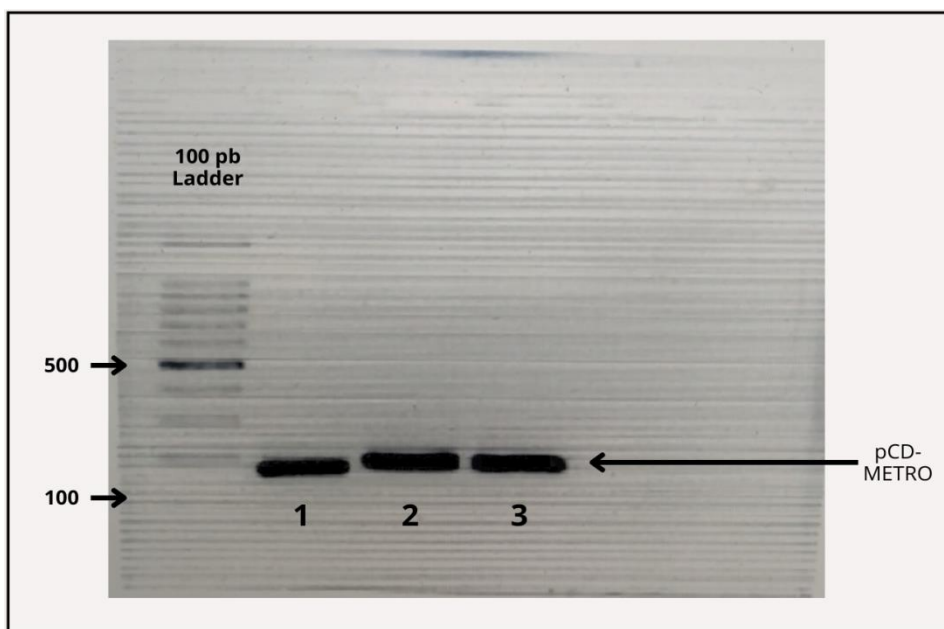


Figura 15: Detecção do plasmídeo pCD-METRO nos isolados resistentes a metronidazol. A linha 1 representa o controle positivo do estudo: VrCd, um isolado clínico de cão que apresenta o plasmídeo. A linha 2 representa a amostra CDHFL8 e a linha 3 CDHFL9.

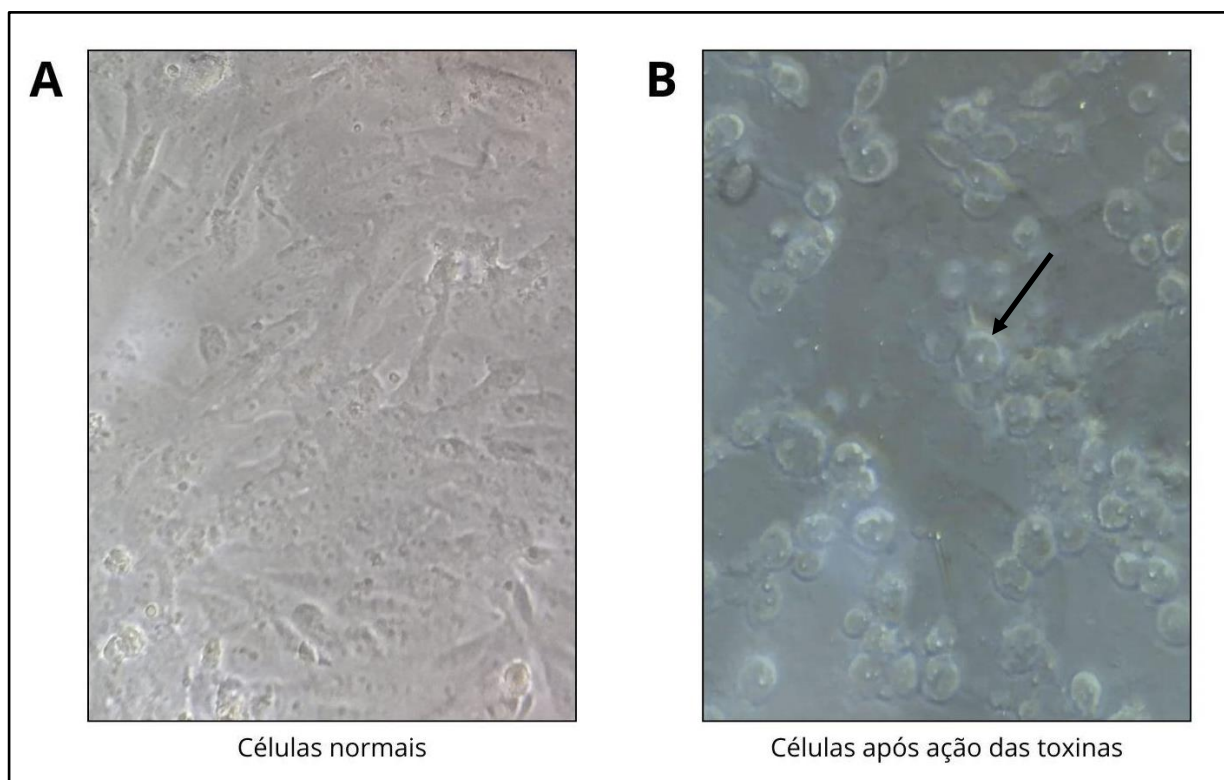


Figura 17: Ensaio do efeito citotóxico em células da linhagem VERO. A- Controle negativo mostrando a integridade da monocamada de células VERO; B- Arredondamento (seta) celular das células VERO após a ação das toxinas de *C. difficile*. Aumento: 400x. A observação foi realizada em microscópio invertido Zeiss.

6 DISCUSSÃO

A CDI é uma infecção nosocomial de grande importância clínica e é uma das principais causas de diarreia associada ao uso de antimicrobianos em ambientes hospitalares, afetando, na maioria dos casos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, como pacientes oncológicos. Apesar de ser um alvo de preocupações no ambiente hospitalar, casos de CDI na comunidade já respondem por uma alta porcentagem de casos em diversos países, uma vez que seus esporos estão amplamente disseminados no ambiente, incluindo água e alimentos contaminados.

Neste estudo, a investigação das cepas de *C. difficile* foi conduzida em dois hospitais com contextos epidemiológicos distintos: um em surto de CDI e outro sem evidências de prevalência que configurassem um padrão epidêmico ou endêmico. No HUCFF, a única cepa isolada pertencia ao RT010, classificada como não toxigênica e esteve associada à ocorrência de diarreia em um paciente submetido a um transplante autólogo. Uma limitação importante deste estudo refere-se ao tipo de amostra coletada no HUCFF, onde, majoritariamente, foram utilizados swabs retais em vez de amostras de fezes. Esse fator pode ter impactado negativamente a taxa de isolamento de *Clostridioides difficile*, uma vez que as fezes são consideradas o material ideal para a detecção do microrganismo, por apresentarem maior sensibilidade e carga bacteriana. Assim, a baixa taxa de isolamento observada nessa instituição pode estar associada a essa limitação metodológica.

Já no caso do HFL, das 11 cepas isoladas, sete também pertenciam ao RT010 e foram as responsáveis por causar o surto de CDI na UTI do hospital. Quanto as amostras ambientais, embora não tenha sido identificado isolamento de *C. difficile*, esse resultado pode ser considerado um indicativo positivo, pois provavelmente isto se deve a eficaz política de higienização adotada pelo hospital, bem como à atenção dos profissionais de saúde durante o manejo dos pacientes. Esses fatores contribuem significativamente para a redução da contaminação ambiental. Além disso, esses dados reforçam a hipótese de que os pacientes avaliados tenham adquirido a infecção na comunidade (CA-CDI) e, após um período de imunossupressão e disbiose, frequentemente associados à hospitalização e uso de antimicrobianos, houve a

proliferação de *C. difficile* e o consequente desenvolvimento da doença (CDI).

Na maioria dos casos de infecção por *C. difficile*, as cepas toxigênicas são as principais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro clínico, uma vez que a produção de toxinas promove uma série de fatores inflamatórios que resultam no aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, na destruição da lâmina própria intestinal. No entanto, por mais que as toxinas sejam o principal mecanismo que levam o indivíduo a desenvolver a CDI, alguns estudos também sugerem que cepas não toxigênicas podem estar envolvidas na manifestação clínica da infecção, principalmente em indivíduos imunocomprometidos ou que estejam fazendo uso prolongado de antimicrobianos. Em 2023, Jeon e colaboradores conduziram um estudo que identificou diferenças no comportamento clínico de pacientes infectados por cepas não toxigênicas de *C. difficile* em comparação àqueles infectados por cepas toxigênicas [145]. Neste estudo, os pacientes infectados com cepas não toxigênicas de *C. difficile* tendiam a desenvolver o quadro de diarreia fora do ambiente hospitalar, ou seja, na comunidade, ter diabetes como comorbidade subjacente, uso de até um mês de antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos e ausência de uso concomitante de inibidores da bomba de prótons. Esses achados indicam o quanto as cepas não toxigênicas podem estar envolvidas na manifestação da CDI em grupos específicos de pacientes, principalmente aqueles com a microbiota intestinal fragilizada ou em condições mais vulneráveis, como é o caso de pacientes internados em UTIs ou que estejam fazendo tratamento com quimioterápicos. Desta forma, isto pode, em parte, explicar porque cepas não toxigênicas foram capazes de provocar um surto de CDI na UTI do HFL. Em relação a condição dos pacientes do HFL, todos estavam internados, fazendo uso de antimicrobianos e, principalmente, fazendo uso de quimioterápicos, para o tratamento de algum tipo de câncer. A exposição dos indivíduos à quimioterapia também está associada ao quadro de CDI, mesmo sem a exposição a antimicrobianos [146]. O mecanismo de como os quimioterápicos aumentam o risco do paciente de desenvolver CDI ainda não é completamente conhecido, mas estima-se que, assim como os antimicrobianos, também está relacionado a alterações na microbiota intestinal e supressão da imunidade. Além disso, esses medicamentos podem ser responsáveis em provocar lesões diretamente na mucosa e, portanto, diminuir a capacidade de regeneração celular do trato gastrointestinal, já que induzem a parada mitótica e promovem a descamação epitelial [147, 148, 149].

Apesar de toda a importância dada às toxinas de *C. difficile* para o desenvolvimento do quadro infeccioso, esta bactéria apresenta outros mecanismos de virulência que também contribuem para sua patogenicidade. Dentre esses mecanismos, destacam-se o papel das adesinas de superfície celular (*S-layer*), proteínas da parede celular (CWP), proteínas de ligação à fibronectina, flagelos e a proteína de choque térmico GroEL [150]. As *S-layers* compõem a superfície da maioria das bactérias e arqueas e consistem em uma camada proteica, chamada de camada superficial ou camada S, que desempenham múltiplas funções, como proteger o microrganismo de variações de pH e estresses mecânicos e osmóticos. Quanto às funções dentro do hospedeiro, acredita-se que a camada S atue como uma “peneira molecular”, aprisionando íons e protegendo o microrganismo de peptídeos antimicrobianos e enzimas bacteriolíticas produzidas em resposta à infecção [151]. Em *C. difficile*, o principal componente da camada S é a proteína A (SlpA), que é clivada pós-traducionalmente por uma protease associada à parede celular (Cwp84) formando duas subunidades: uma de alto peso molecular e outro de baixo peso molecular. Após a clivagem, essas subunidades são secretadas na superfície celular. Outro fator importante a ser ressaltado, é que essas proteínas da camada S também são importantes no processo de reconhecimento imunológico e na resposta inflamatória [151, 152]. As proteínas CWP são um grupo de proteínas associadas à superfície celular e ficam ancoradas por meio do polissacarídeo II (PSII). Em cepas de *C. difficile*, os genes que compõem a família de proteínas CWP podem ser variados ou bem conservados, como *cwp84*, *cwp66* e *cwpV*. A proteína Cwp84, assim como citado anteriormente, além de participar do processamento da camada superficial de *C. difficile*, também consegue clivar vários componentes da matriz extracelular humana *in vitro* [153]. Já Cwp66 é o segundo principal antígeno da superfície celular do *C. difficile*, tendo um papel fundamental na adesão da bactéria, motilidade celular, resistência ao estresse, resistência a antimicrobianos e transporte de manitol [154]. Quanto a proteína CwpV, assim como Cwp84, também pode atuar em mecanismo de processamento pós-traducional e além disso apresenta função promotora de agregação em *C. difficile* [155].

Além de proteínas que aumentam a aderência de *C. difficile*, há outro mecanismo que vem sendo bastante estudado: o biofilme. A formação de biofilme ocorre a partir da agregação de comunidades de bactérias encapsuladas em uma matriz autoproduzida, conferindo uma barreira protetora contra a ação de outros

microrganismos, antimicrobianos, células do sistema imunológico do hospedeiro e até mesmo facilitam a recorrência de infecções. A composição do biofilme pode variar, mas geralmente é composta por uma matriz extracelular autoproduzida, contendo exopolissacarídeos, proteínas extracelulares e de superfície celular e DNA extracelular [156].

Apesar de ser reconhecido internacionalmente por sua hipervirulência, resistência e estar associado a surtos inúmeros com óbitos em países da América do Norte e Europa, o RT027 de *C. difficile* não faz parte da lista de ribotipos mais comuns no Brasil, sendo considerado raro. Até o momento, houve apenas dois relatos da presença deste ribotipo no território brasileiro, tendo sido detectado apenas por PCR em tempo real. Porém, somente por PCR em tempo real não é possível ter certeza que seja uma cepa do RT027, uma vez que existem cepas semelhantes a 027, chamadas "027-like", pertencentes ao mesmo clado 2 do MLST, apresentam muitas semelhanças pelo sequenciamento do genoma completo e se diferem apenas ligeiramente pela ribotipagem por PCR [157, 158, 159]. Para diferenciar essas amostras, o mais indicado é utilizar as técnicas de PCR-ribotipagem, principalmente utilizando eletroforese capilar em gel [160]. Desta forma, para confirmar os achados RT027 deste estudo, foi feito não só o sequenciamento do gene *tcdC* e dos genes *gyrA* e *gyrB*, mas também ribotipagem por capilaridade. Com a PCR-ribotipagem, é possível visualizar que ambas as amostras (CDHFL4 e CDHFL7) apresentam um perfil semelhante ao controle R20291 RT027. No entanto, a amostra CDHFL7 tem uma pequena diferença, obtendo diferença de dois tamanhos moleculares. Assim como citado anteriormente, devido à existência de cepas semelhantes ao RT027, outras análises foram realizadas para confirmar os achados, inclusive em relação à cepa CDHFL7 que apresenta uma diferença no perfil tamanho molecular.

Ainda em relação a PCR-Ribotipagem em gel de agarose, duas amostras (CDHFL6 e CDHFL10) não apresentaram um perfil condizente com o banco de dados do Laboratório de Biologia de Anaeróbios. Ambas as amostras passaram por um problema em relação a dificuldade no isolamento. Um dos principais fatores responsáveis por essa complicação foi o crescimento de colônias de *Enterococcus* spp. por cima das colônias de *C. difficile*. Tal efeito já tem sido observado em outros isolados e há alguns estudos que apontam os efeitos positivos que bactérias do gênero *Enterococcus* têm em *C. difficile*, como remodelar o ambiente metabólico e atuar como uma fonte de aminoácidos fermentáveis para *C. difficile*, incluindo leucina

e ornitina, que aumentam a performance do *C. difficile*, principalmente no intestino perturbado por antibióticos [161]. Desta forma, quando finalmente conseguimos reisolar as cepas, as mesmas seriam encaminhadas para o laboratório na UNESP, mas os resultados não chegariam a tempo para completar este estudo.

O gene *tcdC* atua como regulador negativo da produção de toxinas em *Clostridioides difficile*, e mutações em sua sequência estão ligadas à superprodução de toxinas em cepas hipervirulentas. Diversos genótipos desse gene podem ser encontrados, refletindo a variabilidade genética entre as cepas de *Clostridioides difficile* [162]. Um exemplo é a variante *tcdC-sc1* que apresenta uma deleção de 18 pares de bases (pb) nas posições 330–347, além de uma deleção de um único nucleotídeo na posição 117. Essa variante é característica de cepas epidêmicas do RT027 e está diretamente relacionada ao aumento da produção de toxinas. Outras variantes do gene *tcdC* também são descritas, como o grupo *tcdC-A*, que apresenta uma deleção de 39 pb entre as posições 341–379, juntamente com uma substituição pontual na posição 184. Essa combinação de mutações é característica do ribotipo 078 (RT078) [162, 163, 164]. No presente estudo, o sequenciamento do gene *tcdC* revelou que a cepa CDHFL4 possui um genótipo idêntico ao da cepa epidêmica RT027. No entanto, diferentemente do que se observa comumente em infecções por cepas hipervirulentas como a BI/NAP1/027, o quadro clínico do paciente infectado não evoluiu com gravidade extrema. O paciente, com 60 anos, apresentava diagnóstico de adenocarcinoma com envolvimento papilar e, após o início da quimioterapia, desenvolveu quadro de diarreia severa (mais de nove episódios diários), acompanhado de dor abdominal, náuseas e vômitos. Apesar da gravidade inicial, o paciente apresentou boa resposta ao tratamento, com estabilização do quadro clínico em 15 dias e alta hospitalar subsequente, sem relato de recorrência da infecção. Esse achado sugere que, embora o perfil genético da cepa seja compatível com o de cepas hipervirulentas, a expressão clínica da infecção pode ser modulada por fatores do hospedeiro, pela resposta ao tratamento ou até por variações fenotípicas específicas da cepa. Já para a cepa CDHFL7, a análise do gene *tcdC* revelou uma mutação dupla de 18pb que, até o momento, não foi descrita na literatura. Este isolado clínico foi obtido de um paciente oncológico de 15 anos, diagnosticado com linfoma, que apresentou um quadro grave de diarreia após o início do tratamento quimioterápico. A associação entre essa nova variação genética e a manifestação clínica grave observada no paciente levanta a hipótese de que alterações ainda não

caracterizadas no *tcdC* possam influenciar o perfil de virulência de determinadas cepas. Novos estudos genômicos e funcionais são necessários para compreender o impacto dessa mutação na regulação das toxinas e no comportamento clínico da infecção.

No teste de suscetibilidade, as cepas CDHFL4 e CDHFL7 apresentaram resistência a moxifloxacina, um antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas, e à eritromicina, apresentando um perfil de suscetibilidade semelhante ao da cepa de referência R20291, utilizada como controle positivo no experimento. A fim de identificar os mecanismos de resistência, foi feita a identificação dos genes de resistência por PCR. As amostras CDHFL8 e CDHFL9, ambas resistentes ao metronidazol, apresentaram a presença do plasmídeo pCD-METRO. Esse plasmídeo, já amplamente disseminado internacionalmente, foi anteriormente identificado em diferentes ribotipos de *Clostridioides difficile*, como RT020 e RT005, embora esteja mais frequentemente associado ao RT010, coincidindo com os resultados obtidos nas amostras analisadas [165, 166, 167]. No Brasil, a presença do pCD-METRO havia sido registrada apenas uma vez, em um isolado clínico obtido de um cão hospitalizado com quadro de diarreia [168]. No entanto, até o momento, a presença desse plasmídeo em isolados clínicos humanos não havia sido reportada no território brasileiro, tornando este estudo o primeiro a documentar tal ocorrência.

Já para as amostras resistentes a eritromicina, foi detectado o gene *ermB* em algumas das cepas (CDHUCFF1, CDHFL1, CDHFL2, CDHFL3, CDHFL8, CDHFL9 e CDHGL10), também pertencentes ao ribotipo 010. Embora tenham perfil não toxigênico, a presença de genes de resistência como o *ermB* tem um importante destaque, uma vez que essas cepas podem ser um reservatório de resistência antimicrobiana, especialmente em ambientes hospitalares onde o uso de antimicrobianos é intenso [169]. Além disso, o fato de estarem associados a elementos genéticos móveis permite a transferência horizontal de genes entre as cepas de *C. difficile* e até mesmo outras espécies bacterianas. Este achado reforça a importância do estudo epidemiológico e monitoramento das cepas não toxigênicas de *C. difficile*, não só pelo risco de colonização e desenvolvimento da CDI, como também pelo fato de contribuírem para a disseminação de genes de resistência.

Os genes *gyrA* e *gyrB* codificam as subunidades A e B da DNA girase, uma enzima importante que regula o superempacotamento do DNA. Agentes antimicrobianos inibidores desta enzima, como a moxifloxacina, podem alterar a

expressão desses genes e, conseqüentemente, levar a alterações no processo de empacotamento do DNA [170]. Desta forma, com o resultado de resistência a moxifloxacina identificada nas amostras CDHFL4 e CDHFL7, foi feito o sequenciamento dos dois genes em questão, utilizando a cepa CD630 como referência. A identificação de uma mutação pontual no gene *gyrB* da cepa CDHFL4 é relevante pois pode estar diretamente relacionada à resistência a fluoroquinolonas. Um estudo realizado por Spigaglia e colaboradores no ano de 2009 demonstrou que a substituição do aminoácido treonina por isoleucina na posição 82 (*Thr82→Ile*) em *gyrA* é comumente associada à resistência cruzada a ciprofloxacina e moxifloxacina em isolados clínicos de *C. difficile*, incluindo cepas do ribotipo 027 [171, 172]. Na literatura, até o momento, não há relatos da detecção dessa mutação em *gyrB*. No entanto, é importante ressaltar que há poucos dados elucidados quanto aos tipos de mutações em *gyrA* e *gyrB* e o que isto implica na resistência. Sendo assim, esta mutação encontrada em *gyrB*, embora não tenha relatos na literatura, é uma possibilidade que esteja relacionada ao fenótipo de resistência a moxifloxacina. Mesmo que as mutações encontradas sejam em regiões distintas, é possível fazer a associação da cepa CDHFL4 com a cepa epidêmica RT027, uma vez que apresentam o mesmo perfil de resistência. Quanto à cepa CDHFL7, embora não apresente a mutação pontual em *gyrA* comumente observada nas cepas RT027 resistentes a fluoroquinolonas, os resultados obtidos pela ribotipagem em gel de agarose e por capilaridade confirmam sua classificação como RT027. Neste caso, a resistência a moxifloxacina em CDHFL7 pode ser proveniente de outro mecanismo de resistência que não esteja associado às mutações em *gyrA* e *gyrB*, embora relatos deste tipo sejam raros e quase não são descritos na literatura [173]. A identificação de uma cepa RT027 com perfil genético distinto reforça a ideia de que há uma variabilidade genética dentro do próprio RT027, indicando que nem todas as cepas hipervirulentas compartilham os mesmos mecanismos de resistência.

Quanto ao ensaio de citotoxicidade, foi possível perceber que CDHFL4, apresenta um efeito citotóxico relevante, considerando que foram observados danos até a diluição 1/16 e a cepa controle BI/NAP1 causa dano celular 2 diluições a mais (1/64). Isto indica mais uma característica semelhante entre as duas cepas, uma vez que causam efeitos citotóxicos parecidos. Em relação a cepa CDHFL7, houve efeito citotóxico, mas não tão potente quanto a BI/NAP1 e até mesmo a cepa 630, que apresentou efeito até a diluição 1/8. Levando em consideração que a cepa CDHFL7

é pertencente ao RT027, a baixa potência de ação das toxinas não condiz com as características típicas dessa cepa epidêmica, conhecida pela superprodução de toxinas e pelos efeitos graves que estas causam no hospedeiro. No entanto, apesar do reduzido efeito citotóxico, o paciente colonizado por essa cepa apresentou um quadro clínico severo, incluindo recorrências de CDI. Esse achado pode estar relacionado ao fato de se tratar de um paciente imunocomprometido em decorrência de quimioterapia, condição que favorece a colonização bacteriana e o desenvolvimento de sintomas mais graves. Outro aspecto relevante é a diferença no tamanho molecular apresentada pela cepa CDHFL7 em comparação com a cepa epidêmica, assim como evidenciados na ribotipagem em gel de agarose e por capilaridade. Embora sejam necessários estudos adicionais para esclarecer o impacto dessa variação na produção de toxinas e em outros parâmetros fenotípicos da bactéria, é provável que tais diferenças estejam associadas à modulação da toxigenicidade.

7 CONCLUSÃO

- Um ribotipo não toxigênico, RT010, foi identificado como agente causador de surto na UTI do HFL;
- Primeiro relato do RT027 no território brasileiro, sendo confirmado por: análise do gene *tcdC*, mutações no gene *gyrB* da cepa CDHFL7, ribotipagem por gel de agarose e por capilaridade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodriguez C, Van Broeck J, Taminiau B, Delmée M, Daube G. *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*. 2016 Aug;97:59–78.
2. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. 2016 Aug;40:95–99.
3. Del Prete R, Ronga L, Addati G, Magrone R, Abbasciano A, Decimo M, et al. *Clostridium difficile*: a review on an emerging infection. *Clin Ter*. 2019;170(1):e41–e47.
4. Šuljagić V, Milenković B, Perić A, Jovanović D, Begović-Kuprešanin V, Starčević S, et al. Healthcare associated *Clostridioides difficile* infection in adult surgical and medical patients hospitalized in tertiary hospital in Belgrade, Serbia: a seven years prospective cohort study. *Libyan J Med*. 2020;15:1708639.
5. Gupta A, Khanna S. Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat. *Infect Drug Resist*. 2018;7:63–72.
6. Bauer MP, Kuijper EJ. Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29:29–35.
7. Rainha K, Fernandes Ferreira R, Trindade C, Carneiro LG, Penna B, Endres BT, et al. Characterization of *Clostridioides difficile* ribotypes in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*. 2019;58:22–29.
8. Czepiel J, Drózdź M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, et al. *Clostridium difficile* infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(7):1211–1221.
9. Elliott B, Androga G, Knight DR, Riley TV. *Clostridium difficile* infection: evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2017;49:1–11.
10. Martin JS, Monaghan TM, Wilcox MH. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13:206–216.
11. Puerta-Alcalde P, Garcia-Vidal C, Soriano A. Prevention and treatment of *Clostridium difficile* in cancer patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2023;36(6):473–480.
12. Zhou Y, He L, Chen C, Wu Z, Deng J, Yang Z, et al. Analysis of risk factors for community-acquired *Clostridioides difficile* diarrhea in children: a case-control study in Chenzhou, China. *Transl Pediatr*. 2023;12(11):2053–61.
13. Leite de Oliveira Rosa I, de Oliveira Ferreira E, Vieira Colombo AP. Molecular detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in subgingival biofilm of severe periodontitis. *Anaerobe*. 2025 Mar 15;93:102955.
14. Leite de Oliveira Rosa I, de Oliveira Ferreira E, Vieira Colombo AP. Molecular detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in subgingival biofilm of severe periodontitis. *Anaerobe*. 2025 Mar 15;93:102955.
15. Martirosian G, Szczesny A, Cohen SH, Silva J Jr. Isolation of non-toxigenic strains of *Clostridium difficile* from cases of diarrhea among patients hospitalized in a hematology/oncology ward. *Pol J Microbiol*. 2004;53(3):197–200.

16. Camorlinga M, Sanchez-Rojas M, Torres J, Romo-Castillo M. Phenotypic characterization of non-toxigenic *Clostridioides difficile* strains isolated from patients in Mexico. *Front Microbiol.* 2019;10:84.
17. Seth-Smith HMB, Biggel M, Roloff T, Hinic V, Bodmer T, Risch M, et al. Transition From PCR-Ribotyping to Whole Genome Sequencing Based Typing of *Clostridioides difficile*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Jun 1;11:681518.
18. Bogiel T, Dura A, Woźniak M, Mikucka A, Kanarek P. Usefulness of capillary gel electrophoresis-based PCR for detection of *Clostridioides difficile* strains with hypervirulent ribotypes. *Gels.* 2024;10(5):343.
19. Imwattana K, Knight DR, Kullin B, Collins DA, Putsathit P, Kiratisin P, Riley TV. *Clostridium difficile* ribotype 017 - characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):796-807.
20. Morfin-Otero R, Garza-Gonzalez E, Aguirre-Diaz SA, Escobedo-Sanchez R, Esparza-Ahumada S, Perez-Gomez HR, et al. *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Braz J Infect Dis.* 2016 Jan-Feb;20(1):8-13.
21. Guerrero-Araya E, Meneses C, Castro-Nallar E, Guzmán DM, Álvarez-Lobos M, Quesada-Gómez C, et al. Origin, genomic diversity and microevolution of the *Clostridium difficile* B1/NAP1/RT027/ST01 strain in Costa Rica, Chile, Honduras and Mexico. *Microb Genom.* 2020;6(5):e000355.
22. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet.* 2013;45:109–13.
23. Dridi L, Tankovic J, Burghoffer B, Barbut F, Petit JC. *gyrA* and *gyrB* mutations are implicated in cross-resistance to Ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002 November; 46(11): 3418-3421.
24. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology.* 2009 June; 136(6): 1913–1924.
25. Johanesen PA, Mackin KE, Hutton ML, Awad MM, Larcombe S, Amy JM, Lyras D. Disruption of the Gut Microbiome: *Clostridium difficile* Infection and the Threat of Antibiotic Resistance. *Genes (Basel).* 2015 Dec 21;6(4):1347-1360.
26. Freeman J, Vernon J, Pilling S, Morris K, Nicholson S, Shearman S, et al. The ClosER study: results from a three-year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011-2014. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Jul;24(7):724-731.
27. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet.* 2011 Jan 1;377(9759):63-73.
28. Koene MG, Mevius D, Wagenaar JA, Harmanus C, Hensgens MP, Meetsma AM, et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Aug;18(8):778-84.
29. Tkalec V, Viprey V, Davis G, Janezic S, Sente B, Devos N, et al.; COMBACTE-CDI consortium. *Clostridioides difficile* positivity rate and PCR ribotype distribution on retail potatoes in 12 European countries, January to June 2018. *Euro Surveill.* 2022 Apr;27(15):2100417.
30. Martirosian G, Szczesny A, Cohen SH, Silva J Jr. Isolation of non-toxigenic strains of *Clostridium difficile* from cases of diarrhea among patients hospitalized in hematology/oncology ward. *Pol J Microbiol.* 2004;53(3):197-200.
31. Natarajan M, Walk ST, Young VB, Aronoff DM. A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe.* 2013 Aug;22:1-5.

32. Camorlinga M, Sanchez-Rojas M, Torres J, Romo-Castillo M. Phenotypic Characterization of Non-toxicogenic *Clostridioides difficile* Strains Isolated From Patients in Mexico. *Front Microbiol.* 2019 Feb 1;10:84.
33. Leite S, Cotias C, Rainha KC, Santos MG, Penna B, Moraes RF, et al. Prevalence of *Clostridioides difficile* in dogs (*Canis familiaris*) with gastrointestinal disorders in Rio de Janeiro. *Anaerobe.* 2023 Oct;83:102765.
34. Hain-Saunders NMR, Knight DR, Bruce M, Byrne D, Riley TV. Genomic analysis of *Clostridioides difficile* recovered from horses in Western Australia. *Microorganisms.* 2023 Jul 3;11(7):1743.
35. O'Grady K, Hong S, Putsathit P, George N, Hemphill C, Huntington PG, et al. Defining the phylogenetics and resistome of the major *Clostridioides difficile* ribotypes circulating in Australia. *Microb Genom.* 2024 May;10(5):001232.
36. Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Villarreal-Treviño L, Baines SD, Camacho-Ortiz A, Garza-González E. Molecular epidemiology of predominant and emerging *Clostridioides difficile* ribotypes. *J Microbiol Methods.* 2020 Aug;175:105974.
37. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al.; ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet.* 2011 Jan 1;377(9759):63–73.
38. Baghani A, Mesdaghinia A, Kuijper EJ, Aliramezani A, Talebi M, Douraghi M. High prevalence of *Clostridioides difficile* PCR ribotypes 001 and 126 in Iran. *Sci Rep.* 2020 Mar 13;10(1):4658.
39. Ferreira TG, Moura H, Barr JR, Pilotto Domingues RMC, Ferreira EO. Ribotypes associated with *Clostridium difficile* outbreaks in Brazil display distinct surface protein profiles. *Anaerobe.* 2017 Jun;45:120-128.
40. Alcides AP, Brazier JS, Pinto LJ, Balassiano IT, Boente RF, de Paula GR, et al. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil: prevalent types of *Clostridium difficile* in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2007 Jul;92(1):53-9.
41. Balassiano IT, Miranda KR, Boente RF, Pauer H, Oliveira IC, 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.
42. Balassiano IT, dos Santos-Filho J, Vital-Brazil JM, Nouér SA, Souza CR, Brazier JS, et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011 Feb;99(2):249-55.
43. Nogueira HBR, Costa CL, Quesada-Gómez C, Pacífico DM, Ferreira EO, Leitão RFC, Brito GAC. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile* strains isolated from children and adolescents in a tertiary referral pediatric hospital in Fortaleza, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2024 May-Jun;28(3):103767.
44. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, Falci DR, Caurio CFB, Sukiennik TCT, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2018 Mar;39(3):371-373.
45. Kachrimanidou M, Baktash A, Metallidis S, Tsachouridou O, Netsika F, Dimoglou D, Kassomenaki A, Mouza E, Haritonidou M, Kuijper E. An outbreak of *Clostridioides difficile* infections due to a 027-like PCR ribotype 181 in a rehabilitation centre: Epidemiological and microbiological characteristics. *Anaerobe.* 2020 Oct;65:102252.
46. Baktash A, Corver J, Harmanus C, Smits WK, Fawley W, Wilcox MH, et al. Comparison of whole-genome sequence-based methods and PCR ribotyping for subtyping of *Clostridioides difficile*. *J Clin Microbiol.* 2022 Feb 16;60(2):e0173721.

47. Giordani L, de Melo VH, Matos WL, Monteiro SA, Bergmann J, da Silva Hellwig AH, et al. Prevalência de *Clostridioides difficile* Toxigênico em Hospital Terciário de Porto Alegre. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2023 Nov 14;27:103413.
48. Atlas RM. One Health: its origins and future. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;365:1–13.
49. Centers for Disease Control and Prevention. About One Health [Internet]. *One Health*. 2024 [cited 2024 Apr 2]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/one-health/about/index.html>
50. Hain-Saunders NMR, Knight DR, Bruce M, Riley TV. *Clostridioides difficile* infection and One Health: an equine perspective. *Environ Microbiol*. 2022 Mar;24(3):985–97. doi:10.1111/1462-2920.15898.
51. Lim SC, Knight DR, Riley TV. *Clostridium difficile* and One Health. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jul;26(7):857–863.
52. Alexiou S, Diakou A, Kachrimanidou M. The role of *Clostridioides difficile* within the One Health framework: a review. *Microorganisms*. 2025 Feb 16;13(2):429.
53. Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. *Front Immunol*. 2020 Dec 10;11:604179.
54. Wortelboer K, Nieuwdorp M, Herrema H. Fecal microbiota transplantation beyond *Clostridioides difficile* infections. *EBioMedicine*. 2019 Jun;44:716–729.
55. Theriot CM, Young VB. Interactions between the gastrointestinal microbiome and *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:445–461.
56. Belizário JE, Faintuch J. Microbiome and gut dysbiosis. *Exp Suppl*. 2018;109:459–476.
57. Ooijevaar RE, Terveer EM, Verspaget HW, Kuijper EJ, Keller JJ. Clinical application and potential of fecal microbiota transplantation. *Annu Rev Med*. 2019 Jan 27;70:335–351.
58. Weingarden AR, Chen C, Bobr A, Yao D, Lu Y, Nelson VM, et al. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Feb 15;306(4):G310–319.
59. Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, Shoshiev MS, Hagan AK, Hastie JL, et al. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. *PLoS Pathog*. 2017 Jul 13;13(7):e1006443.
60. Francis MB, Allen CA, Shrestha R, Sorg JA. Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog*. 2013 May;9(5):e1003356.
61. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D801–807.
62. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Apr 7;2:16020.
63. Lawler AJ, Lambert PA, Worthington T. A revised understanding of *Clostridioides difficile* spore germination. *Trends Microbiol*. 2020 Sep;28(9):744–752.
64. Shrestha R, Sorg JA. Hierarchical recognition of amino acid co-germinants during *Clostridioides difficile* spore germination. *Anaerobe*. 2018 Feb;49:41–47.
65. Paredes-Sabja D, Sarker MR. Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J Med Microbiol*. 2012 Sep;61(Pt 9):1208–1218.
66. Zhu S, Zhang L, Zhang C, Chen X, Chen Q, Li Z. Comparison of polymerase chain reaction ribotyping, toxinotyping and nutritional aspects of toxin production of *Clostridium difficile* strains. *Biomed Rep*. 2014 Jul;2(4):477–80.

67. Martin-Verstraete I, Peltier J, Dupuy B. The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. *Toxins (Basel)*. 2016 May 14;8(5):153.
68. Karlsson S, Lindberg A, Norin E, Burman L G, Akerlund T. Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5881–8.
69. Gerber M, Walch C, Löffler B, Tischendorf K, Reischl U, Ackermann G. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. 2008 Jun;57(Pt 6):776–783.
70. Moradi M, Mansouri S, Nakhaee N, Sarafzadeh F, Zarandi ER. Toxin A and B genes expression of *Clostridium difficile* in the sub-minimum inhibitory concentration of clindamycin, vancomycin and in combination with ceftazidime. *Iran J Microbiol*. 2020 Feb;12(1):18–24.
71. Brook I. Pseudomembranous colitis in children. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Feb;20(2):182–186.
72. Rajack F, Medford S, Naab T. *Clostridioides difficile* infection leading to fulminant colitis with toxic megacolon. *Autops Case Rep*. 2023 Nov 16;13:e2023457.
73. Crobach MJT, Vernon JJ, Loo VG, Kong LY, Péchiné S, Wilcox MH, et al. Understanding *Clostridium difficile* colonization. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Mar 14;31(2):e00021–17.
74. Tang DM, Urrunaga NH, von Rosenvinge EC. Pseudomembranous colitis: Not always *Clostridium difficile*. *Cleve Clin J Med*. 2016 May;83(5):361–366.
75. Kelly CR, Allegretti JR. Review article: gastroenterology and *Clostridium difficile* infection: past, present, and future. *Clin Infect Dis*. 2023 Dec 5;77(Suppl 6):S463–S470.
76. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*. 1978 Mar 9;298(10):531–534.
77. Toi Y, Kobayashi T, Harada T, Nakagawa T, Mori Y, Kuda T, et al. Prospective multicenter study of chemotherapy-induced *Clostridium (Clostridioides) difficile* infection in patients with lung cancer: North Japan Lung Cancer Study Group Trial 1204. *Front Oncol*. 2021 Jul 15;11:685320.
78. Peretz A, Shlomo IB, Nitzan O, Bonavina L, Schaffer PM, Schaffer M. *Clostridium difficile* infection: associations with chemotherapy, radiation therapy, and targeting therapy treatments. *Curr Med Chem*. 2016;23(39):4442–4449.
79. Neemann K, Freifeld A. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in the oncology patient. *J Oncol Pract*. 2017 Jan;13(1):25–30.
80. Saldanha GZ, Pires RN, Rauber AP, de Lima-Morales D, Falci DR, Caierão J, Pasqualotto AC, Martins AF. Genetic relatedness, virulence factors and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* strains from hospitalized patients in a multicentric study in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Sep;22:117–121.
81. Govind R, Dupuy B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002727.
82. Monot M, Eckert C, Lemire A, Hamiot A, Dubois T, Tessier C, Dumoulard B, Hamel B, Petit A, Lalande V, Ma L, Bouchier C, Barbut F, Dupuy B. *Clostridium difficile*: New insights into the evolution of the pathogenicity locus. *Sci Rep*. 2015 Oct 8;5:15023.
83. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. *tcdC* genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2007 Jan;45(1):215–21.
84. Soehn F, Wagenknecht-Wiesner A, Leukel P, Kohl M, Weidmann M, von Eichel-Streiber C, et al. Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864—implications

- for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B. *Mol Gen Genet*. 1998 May;258(3):222–32.
85. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(6):723–750.
 86. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Oct;14(10):609-620.
 87. Chumblor NM, Farrow MA, Lapiere LA, Franklin JL, Lacy DB. *Clostridium difficile* toxins TcdA and TcdB cause colonic tissue damage by distinct mechanisms. *Infect Immun*. 2016;84(10):2871–2877.
 88. Mileto S, Das A, Lyras D. 2019. Enterotoxic *Clostridia*: *Clostridioides difficile* infections. *Microbiol Spectrum*. 2019 May;7(3):GPP3-0015-2018.
 89. King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. *Future Microbiol*. 2015;10(1):1–4.
 90. Janezic S, Dingle K, Alvin J, Accetto T, Didelot X, Crook DW, et al. Comparative genomics of *Clostridioides difficile* toxinotypes identifies module-based toxin gene evolution. *Microb Genom*. 2020 Oct;6(10):mgen000449.
 91. Jefferson KK, Smith MF, Bobak DA. Roles of intracellular calcium and NF- κ B in the *Clostridium difficile* toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol*. 1999;163:5183–91.
 92. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the P2Y₆ inflammasome. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):237–41.
 93. Li Y, Xu W, Ren Y, Cheung HC, Huang P, Kaur G, et al. Plakoglobin and High-Mobility Group Box 1 mediate intestinal epithelial cell apoptosis induced by *Clostridioides difficile* TcdB. *mBio*. 2022 Oct 26;13(5):e0184922.
 94. Pilate T, Verhaegen J, Van Ranst M, Saegeman V. Binary toxin and its clinical importance in *Clostridium difficile* infection, Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Nov;35(11):1741-1747.
 95. Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annu Rev Microbiol*. 2017 Sep 8;71:281-307.
 96. Song JH, Kim YS. Recurrent *Clostridium difficile* Infection: Risk Factors, Treatment, and Prevention. *Gut Liver*. 2019 Jan 15;13(1):16-24.
 97. Castro I, Tasiar M, Calabuig E, Salavert M. Doctor, my patient has CDI and should continue to receive antibiotics. The (unresolved) risk of recurrent CDI. *Rev Esp Quimioter*. 2019 Sep;32 Suppl 2(Suppl 2):47-54.
 98. Amani SA, Shadid T, Ballard JD, Lang ML. 2020. *Clostridioides difficile* infection induces an inferior IgG response to that induced by immunization and is associated with a lack of T follicular helper cell and memory B cell expansion. *Infect Immun* 88:e00829-19.
 99. Johnston PF, Gerding DN, Knight KL. 2014. Protection from *Clostridium difficile* infection in CD4 T cell- and polymeric immunoglobulin receptor-deficient mice. *Infect Immun* 82:522–531.
 100. Naz F, Petri WA. 2023. Host Immunity and Immunization Strategies for *Clostridioides difficile* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 36(2):e0015722.
 101. Seekatz AM, Aas J, Gessert CE, Rubin TA, Saman DM, Bakken JS, Young VB. Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation. *mBio*. 2014 Jun 17;5(3):e00893-14.
 102. Mullish BH, Quraishi MN, Segal JP, McCune VL, Baxter M, Marsden GL, et al. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *Gut*. 2018 Nov;67(11):1920-1941.

103. Kelly CR, Fischer M, Allegretti JR, LaPlante K, Stewart DB, Limketkai BN, Stollman NH. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. *Am J Gastroenterol*. 2021 Jun 1;116(6):1124-1147.
104. Cymbal M, Chatterjee A, Baggott B, Auron M. Management of *Clostridioides difficile* Infection: Diagnosis, Treatment, and Future Perspectives. *Am J Med*. 2024 Jul;137(7):571-576.
105. Somily AM, Khan MA, Morshed M. The Laboratory Diagnosis of *Clostridioides difficile* Infection: An update of current laboratory practice. *J Infect Dev Ctries*. 2021 Oct 31;15(10):1364-1375.
106. Shirley DA, Tornel W, Warren CA, Moonah S. *Clostridioides difficile* Infection in Children: Recent Updates on Epidemiology, Diagnosis, Therapy. *Pediatrics*. 2023 Sep 1;152(3):e2023062307.
107. Johnson S, Lavergne V, Skinner AM, Gonzales-Luna AJ, Garey KW, Kelly CP, Wilcox MH. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. *Clin Infect Dis*. 2021 Sep 7;73(5):755-757.
108. McConnie R, Kastl A. *Clostridium Difficile*, Colitis, and Colonoscopy: Pediatric Perspective. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017 Aug;19(8):34.
109. Venugopal AA, Johnson S. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic approved for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2012 Feb 15;54(4):568-574.
110. van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, Bouza E, Hristea A, Guery B, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Dec;27 Suppl 2:S1-S21.
111. Scully BE. Metronidazole. *Med Clin North Am*. 1988 May;72(3):613-21.
112. Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Feb 1;73(2):265-279.
113. Patel S, Preuss CV, Bernice F. Vancomycin. [Updated 2024 Oct 29]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/>
114. Skinner AM, Scardina T, Kocielek LK. Fidaxomicin for the treatment of *Clostridioides difficile* in children. *Future Microbiol*. 2020 Jul;15(11):967–979.
115. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med*. 2010 Jan 21;362(3):197–205.
116. Minkoff NZ, Aslam S, Medina M, Tanner-Smith EE, Zackular JP, Acra S, et al. Fecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*). *Cochrane Database Syst Rev*. 2023 Apr 25;4(4):CD013871.
117. Porcari S, Benech N, Valles-Colomer M, Segata N, Gasbarrini A, Cammarota G, et al. Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: From microbiome to clinic. *Cell Host Microbe*. 2023 May 10;31(5):712–33.
118. Markantonis JE, Fallon JT, Madan R, Alam MZ. *Clostridioides difficile* Infection: Diagnosis and Treatment Challenges. *Pathogens*. 2024 Jan 27;13(2):118.
119. European Centre for Disease Prevention and Control. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infections. Annual epidemiological report for 2016–2017. Stockholm: ECDC; 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/clostridioides-difficile-infections-annual-epidemiological-report-2016-2017>
120. Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:137-159.

121. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.* 1998 Sep;40(1):1–15.
122. Peng Z, Jin D, Kim HB, Stratton CW, Wu B, Tang YW, Sun X. Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* 2017 Jul;55(7):1998–2008.
123. Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic resistances of *Clostridioides difficile*. *Adv Exp Med Biol.* 2024;1435:169–98.
124. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis.* 2016 Feb;3(1):23–42.
125. O'Grady K, Knight DR, Riley TV. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Dec;40(12):2459–2478.
126. Deshpande A, Wu X, Huo W, Palmer KL, Hurdle JG. Chromosomal resistance to metronidazole in *Clostridioides difficile* can be mediated by epistasis between iron homeostasis and oxidoreductases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Jul 22;64(8):e00415-20.
127. Moura I, Monot M, Tani C, Spigaglia P, Barbanti F, Norais N, Dupuy B, Bouza E, Mastrantonio P. Multidisciplinary analysis of a nontoxigenic *Clostridium difficile* strain with stable resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4957-4960.
128. Boekhoud IM, Hornung BVH, Sevilla E, Harmanus C, Bos-Sanders IMJG, Terveer EM, et al. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nat Commun.* 2020 Jan 30;11(1):598.
129. Woods EC, Wetzel D, Mukerjee M, McBride SM. Examination of the *Clostridioides (Clostridium) difficile* VanZ ortholog, CD1240. *Anaerobe.* 2018 Oct;53:108-115.
130. Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Barnes SW, Ruzin A. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jan;69(1):41-44.
131. Eubank TA, Gonzales-Luna AJ, Hurdle JG, Garey KW. Genetic Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Clostridioides difficile*: A Systematic Review. *Antibiotics (Basel).* 2022 Feb 16;11(2):258.
132. Pu M, Cho JM, Cunningham SA, Behera GK, Becker S, Amjad T, et al. Plasmid Acquisition Alters Vancomycin Susceptibility in *Clostridioides difficile*. *Gastroenterology.* 2021 Feb;160(3):941-945.e8.
133. Marchandin H, Anjou C, Poulen G, Freeman J, Wilcox M, Jean-Pierre H, et al. In vivo emergence of a still uncommon resistance to fidaxomicin in the urgent antimicrobial resistance threat *Clostridioides difficile*. *J Antimicrob Chemother.* 2023 Aug 2;78(8):1992–1999.
134. Banawas SS. *Clostridium difficile* infections: a global overview of drug sensitivity and resistance mechanisms. *Biomed Res Int.* 2018 Feb 21;2018:8414257.
135. Dilnessa T, Getaneh A, Hailu W, Moges F, Gelaw B. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2022 Jan 13;17(1):e0262597.
136. Zhao L, Luo Y, Bian Q, Wang L, Ye J, Song X, et al. High-level resistance of toxigenic *Clostridioides difficile* genotype to macrolide-lincosamide-streptogramin B in community-acquired patients in Eastern China. *Infect Drug Resist.* 2020 Jan 17;13:171–181.
137. Dureja C, Olaitan AO, Hurdle JG. Mechanisms and impact of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Curr Opin Microbiol.* 2022 Apr;66:63–72.
138. Sandhu BK, Edwards AN, Anderson SE, Woods EC, McBride SM. Regulation and anaerobic function of the *Clostridioides difficile* β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Dec 20;64(1):e01496-19.

139. Farrow KA, Lyras D, Rood JI. The macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Clostridium difficile* 630 contains two *erm(B)* genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):411–3.
140. Smits WK, Harmanus C, Sanders IMJG, Bry L, Blackwell GA, Ducarmon QR, de Oliveira Ferreira E, Kuijper EJ. Sequence-Based Identification of Metronidazole-Resistant *Clostridioides difficile* Isolates. *Emerg Infect Dis.* 2022;28:2308–11.
141. Poilane I, Bert F, Cruaud P, Nicolas-Chanoine MH, Collignon A. Évaluation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé pour le dépistage de souches de *Clostridium difficile* de sensibilité diminuée aux antibiotiques. *Pathol Biol (Paris).* 2007;55:429–33.
142. Erikstrup LT, Danielsen TKL, Hall V, Olsen KEP, Kristensen B, Kahlmeter G, Fuursted K, Justesen US. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:e266–72.
143. Holt HM, Danielsen TK, Justesen US. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:2243–6.
144. Fraga E, Nicodemo AC, Sampaio J. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. *Braz J Infect Dis.* 2016;20:476–81.
145. Jeon CH, Kim SH, Wi YM. Prevalence of non-toxigenic *Clostridioides difficile* in diarrhoea patients and their clinical characteristics. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(9):1360.
146. Abughanimeh O, Qasrawi A, Kaddourah O, Al Momani L, Abu Ghanimeh M. *Clostridium difficile* infection in oncology patients: epidemiology, pathophysiology, risk factors, diagnosis, and treatment. *Hosp Pract (1995).* 2018;46(5):266–277.
147. Khan A, Raza S, Batul SA, Khan M, Aksoy T, Baig MA, Berger BJ. 2012. The evolution of *Clostridium difficile* infection in cancer patients: epidemiology, pathophysiology, and guidelines for prevention and management. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 7(2):157-70.
148. Raza S, Baig MA, Russell H, Gourdet Y, Berger BJ. *Clostridium difficile* infection following chemotherapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2010 Jan;5(1):1-9.
149. Kamthan AG, Bruckner HW, Hirschman SZ, et al. *Clostridium difficile* Diarrhea Induced by Cancer Chemotherapy. *Arch Intern Med.* 1992;152(8):1715–17.
150. Saldanha DJB. Caracterização molecular e fatores de virulência de *Clostridium difficile* em estudo epidemiológico multicêntrico no Brasil [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS; 2019.
151. Ormsby MJ, Vaz F, Kirk JA, Barwinska-Sendra A, Hallam JC, Lanzoni-Mangutchi P, et al. An intact S-layer is advantageous to *Clostridioides difficile* within the host. *PLoS Pathog.* 2023 Jun 29;19(6):e1011015.
152. Chandra H, Kovall RA, Yadav JS, Sun X. Host immune responses to surface S-layer proteins (SLPs) of *Clostridioides difficile*. *Microorganisms.* 2023 Feb 2;11(2):380.
153. Gooyit MD, Janda KD. Modulation of the surface-layer protein of *Clostridium difficile* through Cwp84 inhibition. *ACS Infect Dis.* 2016 Jul 8;2(7):465–470.
154. Zhou Q, Rao F, Chen Z, Cheng Y, Zhang Q, et al. The *cwp66* gene affects cell adhesion, stress tolerance, and antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*. *Microbiol Spectr.* 2022 Apr 27;10(2):e0270421.
155. Reynolds CB, Emerson JE, de la Riva L, Fagan RP, Fairweather NF. The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. *PLoS Pathog.* 2011 Apr;7(4):e1002024.

156. Dawson LF, Peltier J, Hall CL, Harrison MA, Derakhshan M, Shaw HA, Fairweather NF, Wren BW. Extracellular DNA, cell surface proteins and c-di-GMP promote biofilm formation in *Clostridioides difficile*. *Sci Rep*. 2021 Feb 5;11(1):3244.
157. Knetsch CW, Terveer EM, Lauber C, Gorbalenya AE, Harmanus C, Kuijper EJ, Corver J, van Leeuwen HC. Comparative analysis of an expanded *Clostridium difficile* reference strain collection reveals genetic diversity and evolution through six lineages. *Infect Genet Evol*. 2012 Oct;12(7):1577–1585.
158. Kachrimanidou M, Baktash A, Metallidis S, Tsachouridou O, Netsika F, Dimoglou D, Kassomenaki A, Mouza E, Haritonidou M, Kuijper E. An outbreak of *Clostridioides difficile* infections due to a 027-like PCR ribotype 181 in a rehabilitation centre: Epidemiological and microbiological characteristics. *Anaerobe*. 2020 Oct;65:102252.
159. Krutova M, Nyc O, Matejkova J, Kuijper EJ, Jalava J, Mentula S. The recognition and characterisation of Finnish *Clostridium difficile* isolates resembling PCR-ribotype 027. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018 Jun;51(3):344–351.
160. Bogiel T, Dura A, Woźniak M, Mikucka A, Kanarek P. Usefulness of Capillary Gel Electrophoresis-Based PCR for Detection of *Clostridioides difficile* Strains with Hypervirulent Ribotypes. *Gels*. 2024 May 17;10(5):343.
161. Smith AB, Jenior ML, Keenan O, Hart JL, Specker J, Abbas A, Rangel PC, Di C, Green J, Bustin KA, Gaddy JA, Nicholson MR, Laut C, Kelly BJ, Matthews ML, Evans DR, Van Tyne D, Furth EE, Papin JA, Bushman FD, Erlichman J, Baldassano RN, Silverman MA, Dunny GM, Prentice BM, Skaar EP, Zackular JP. Enterococci enhance *Clostridioides difficile* pathogenesis. *Nature*. 2022 Nov;611(7937):780–6.
162. Goldenberg SD, French GL. Lack of association of *tcdC* type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. *J Infect*. 2011 May;62(5):355–62.
163. Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (*TcdC*) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3470–5.
164. Kodori M, Ghalavand Z, Yadegar A, Eslami G, Azimirad M, Krutova M, Abadi A, Zali MR. Molecular characterization of pathogenicity locus (PaLoc) and *tcdC* genetic diversity among *tcdA⁺B⁺* *Clostridioides difficile* clinical isolates in Tehran, Iran. *Anaerobe*. 2020 Dec;66:102294.
165. Smits WK, Harmanus C, Sanders IMJG, Bry L, Blackwell GA, Ducarmon QR, de Oliveira Ferreira E, Kuijper EJ. Sequence-Based Identification of Metronidazole-Resistant *Clostridioides difficile* Isolates. *Emerg Infect Dis*. 2022 Nov;28(11):2308–2311.
166. Cizek A, Masarikova M, Mares J, et al. Detection of plasmid-mediated resistance to metronidazole in *Clostridioides difficile* from river water. *Microbiol Spectr*. 2022;10(6):e0080622.
167. Finsterwalder SK, Loncaric I, Cabal A, et al. Dogs as carriers of virulent and resistant genotypes of *Clostridioides difficile*. *Zoonoses Public Health*. 2022;69(7):673–681.
168. Meireles J, Moraes RFF, Lins D, Oliveira TDS, de Carvalho EB, Rainha K, Ferreira EO. Dogs in Rio de Janeiro as reservoirs of *Clostridioides difficile* ribotypes causing CDI in humans. *Anaerobe*. 2024 Dec;90:102917.
169. Imwattana K, Kiratisin P, Riley TV, Knight DR. Genomic basis of antimicrobial resistance in non-toxigenic *Clostridium difficile* in Southeast Asia. *Anaerobe*. 2020;66:102290.
170. Hawkey, P. M. 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* 51(Suppl. 1):29–35.
171. Spigaglia P, Barbanti F, Louie T, Barbut F, Mastrantonio P. Molecular analysis of the *gyrA* and *gyrB* quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* mutants selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2463–2468.


172. Dridi L, Tankovic J, Burghoffer B, Barbut F, Petit JC. *gyrA* and *gyrB* mutations are implicated in cross-resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3418–3421.
173. Walkty A, Boyd DA, Gravel D, Hutchinson J, McGeer A, Moore D, Simor A, Suh K, Taylor G, Miller M, Mulvey MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Molecular characterization of moxifloxacin resistance from Canadian *Clostridium difficile* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Apr;66(4):419-24.

ANEXOS

Anexo 1: Dados coletados dos pacientes que participaram do estudo.

Questionário Clínico-epidemiológico (*C. difficile*) - CTI

Caracterização e prevalência de *Clostridioides difficile* em pacientes internados no CTI no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Rio de Janeiro, RJ.

 Não compartilhado 

* Indica uma pergunta obrigatória

Nome e Sobrenome:

Sua resposta

Prontuário do Paciente: *

Sua resposta

Idade: *

Sua resposta

Sexo: *

Feminino

Masculino

Tipo de material coletado: *

- Swab retal
- Fezes

Data da coleta: *

Data

dd/mm/aaaa

Data da internação CTI *

Data

dd/mm/aaaa

Motivo da internação: *

Sua resposta

Quais sintomas característicos da Infecção provocada por *Clostridioides difficile* foram identificadas no paciente: *

- Diarreia
- Dor abdominal
- Febre
- Não apresenta sintomas clássicos do quadro de CDI
- Outro:

Se apresenta os sintomas, data do início dos sintomas característicos da Infecção provocada por *Clostridioides difficile*:

Data

dd/mm/aaaa

Número de episódios diarreicos por dia, se tiver:

Sua resposta

Está fazendo uso de antimicrobianos? *

Sim

Não

Se sim, qual(is) antimicrobiano(s)?

Sua resposta

Tem alguma doença de base? *

Sim

Não

Se sim, qual?

Doença Inflamatória Intestinal (Doença de Crohn e/ou Colite Ulcerativa)

Outro:

Já teve diagnóstico de Doença associada a *Clostridioides difficile* (CDAD) anteriormente? *

Sim

Não

Se sim, qual a classificação do episódio?

Diarreia

Colite

Abdômen agudo

Faz quimioterapia? *

Sim

Não

Se sim, qual a data do último bloco de quimioterapia começado?

Data

dd/mm/aaaa

Se realiza quimioterapia, qual quimioterápico está sendo utilizado no último bloco de quimioterapia começado?

Sua resposta

Questionário Clínico-epidemiológico (*C. difficile*) - Hematologia

Caracterização e prevalência de *Clostridioides difficile* em pacientes internados com câncer hematológico no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Rio de Janeiro, RJ.

 Não compartilhado



* Indica uma pergunta obrigatória

Nome e sobrenome: *

Sua resposta

Prontuário do paciente: *

Sua resposta

Idade: *

Sua resposta

Sexo: *

Feminino

Masculino

Tipo de material coletado: *

- Swab retal
- Fezes

Data da coleta:

Data

dd/mm/aaaa

Motivo da internação: *

- Leucemia Mieloide Aguda (LMA)
- Leucemia Linfoide Aguda (LLA)
- Linfoma
- Mieloma Múltiplo (MM)
- Aplasia de Medula
- Transplante Alogênico
- Transplante Autólogo
- Outro:

Se for linfoma, qual tipo?

Sua resposta

Quais sintomas característicos da Infecção provocada por *Clostridioides difficile* * foram identificadas no paciente:

- Diarreia
- Dor abdominal
- Febre
- Outro:

Data do início dos sintomas característicos da Infecção provocada por *Clostridioides difficile*: *

Data

dd/mm/aaaa

Número de episódios diarreicos por dia: *

Sua resposta

Está fazendo uso de antimicrobianos **nesta internação?** *

- Sim
- Não

Se sim, qual antimicrobiano?

Sua resposta

Está fazendo uso de inibidores de bomba de prótons **nesta internação?** *

- Sim
- Não

Se sim, qual?

Sua resposta

Anote qual tratamento foi feito no paciente: *

Sua resposta

Tem alguma doença de base? *

- Sim
- Não

Se sim, qual?

- Doença Inflamatória Intestinal (Doença de Crohn e/ou Colite Ulcerativa)
- Outro:

Qual a data do último bloco de quimioterapia começado? *

Sua resposta

Qual quimioterápico está sendo utilizado no último bloco de quimioterapia começado? *

Sua resposta

Já teve diagnóstico de Doença associada a *Clostridioides difficile* (CDAD) anteriormente? *

Sim

Não

Se sim, qual a classificação do episódio?

Diarreia

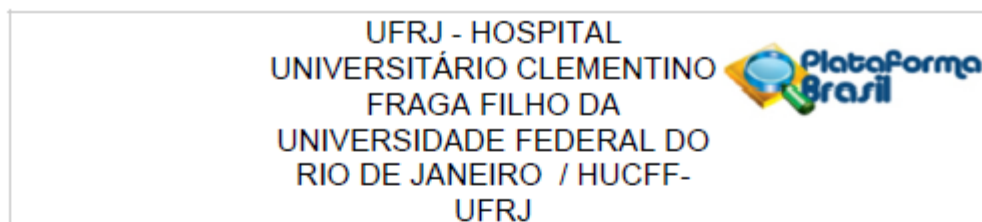
Colite

Abdômen agudo

Desfecho clínico:

Alta

Óbito

Anexo 2: Documento de aprovação do trabalho pelo CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Estudo das cepas de Clostridioides difficile isoladas de pacientes diagnosticados ou não com covid-19 internados nas UTIs dos hospitais no Rio de Janeiro

Pesquisador: Eliane de Oliveira Ferreira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 60230021.7.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - INSTITUTO DE

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 8.086.544

Apresentação do Projeto:

Protocolo 094/22.

Trata-se de emenda E1 solicitando a inclusão do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), localizado na Cidade Universitária-UFRJ como parte da pesquisa relacionada ao projeto "Estudo epidemiológico e molecular de cepas de Clostridioides difficile isoladas de pacientes diagnosticados ou não com covid-19 internados nas UTIs dos hospitais no Rio de Janeiro". A emenda se justifica pelo relato do aumento de diarreias nas UTIs neste hospital, algumas delas possivelmente relacionadas ao C. difficile; e também pelo meu recente credenciamento no programa de Pós-graduação - Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina/UFRJ, com a orientação de alunos matriculados neste programa. A Doutora Simone Aranha Nouer, Médica do HUCFF/UFRJ e Professora Associada da Divisão de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DDIP) da UFRJ, será a médica colaboradora do nosso projeto e a responsável pelas coletas realizadas nas unidades do HUCFF.

Resumo: Clostridioides difficile (Clostridium difficile) é uma bactéria anaeróbia estrita e o agente

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E, sala 35			
Bairro: Cidade Universitária		CEP: 21.941-913	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO		
Telefone: (21)3938-2480	Fax: (21)3938-2481	E-mail: cep@hucff.ufrj.br	

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO / HUCFF-
UFRJ



Continuação do Parecer: 6.066.544

Biobanco	manuseio_material_biologico.docx	01/11/2021 12:09:35	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Detalhado_pesquisa_2021.pdf	01/11/2021 11:52:19	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	manuseio_material_biologico.pdf	22/09/2021 19:43:33	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	22/09/2021 19:37:15	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamento.pdf	22/09/2021 19:32:53	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito
Outros	Antonio_pedro_UFF.pdf	26/07/2021 20:48:45	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito
Declaração de concordância	INTO.pdf	26/07/2021 20:48:24	Eliane de Oliveira Ferreira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 18 de Maio de 2023

Assinado por:
Monique Loureiro
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E, sala 35
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TLCE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro, por meio deste termo, que concordei em ser entrevistado(a) e/ou participar na pesquisa de campo referente ao projeto/pesquisa intitulado(a) Estudo epidemiológico e molecular de cepas de *Clostridioides difficile* isoladas de pacientes diagnosticados ou não com covid-19 internados nas UTIs dos hospitais no Rio de Janeiro desenvolvida(o) por Eliane de Oliveira Ferreira. Fui informado(a), ainda, de que a pesquisa é [coordenada / orientada] por Eliane de Oliveira Ferreira, a quem poderei contatar / consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone nº 21971992634 ou e-mail eliane_ferreirarj@micro.ufrj.br. Afirmo que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer ônus e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Fui informado(a) dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo, que, em linhas gerais é sobre uma pesquisa comparativa sobre a presença de uma bactéria patogênica em pacientes de UTIs infectados ou não pela COVID-19. Fui também esclarecido(a) de que os usos das informações por mim oferecidas estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde. Minha colaboração se fará de forma anônima, por meio de [descrever o tipo de abordagem (entrevista semi-estruturada / observação / aferição / exame / coleta / análise do meu prontuário / grupo, etc.) a ser gravada a partir da assinatura desta autorização.

O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelo(a) pesquisador(a) e/ou seu(s) orientador(es) / coordenador(es).

Fui ainda informado(a) de que posso me retirar desse(a) estudo / pesquisa / programa a qualquer momento, sem prejuízo para meu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

Atesto recebimento de uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Rio de Janeiro, ____ de _____ de ____

Assinatura do(a) participante: _____

Assinatura do(a) pesquisador(a): _____

Assinatura do(a) testemunha(a): _____