

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**COLONIZAÇÃO POR *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* NA ADMISSÃO DE PACIENTES
NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: UM ESTUDO DE COORTE**

MARCIO FERNANDO SPAGNÓL

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**COLONIZAÇÃO POR *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* NA ADMISSÃO DE PACIENTES
NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: UM ESTUDO DE COORTE**

MARCIO FERNANDO SPAGNÓL

Orientador: Prof. Dr. Diego Rodrigues Falci

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Spagnól, Marcio Fernando
COLONIZAÇÃO POR CLOSTRIDIODES DIFFICILE NA
ADMISSÃO DE PACIENTES NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA:
UM ESTUDO DE COORTE / Marcio Fernando Spagnól. --
2019.
70 f.
Orientador: Diego Rodrigues Falci.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Clostridioides difficille. 2. Diarreia. 3.
Colite pseudomembranosa. 4. Unidade de tratamento
intensivo. I. Falci, Diego Rodrigues, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existence.

One cannot help but be in awe when he contemplates

the mysteries of eternity, of life,

of the marvelous structure of reality.

It is enough if one tries merely

to comprehend a little of this mystery each day.

Never lose a holy curiosity.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que são o motivo da atividade médica. Aos indivíduos de pesquisa que são a parte fundamental da pesquisa. A toda equipe das UTIs do Hospital Nossa Senhora da Conceição e Hospital de Clínicas de Porto Alegre que apoiaram desde o primeiro momento e não mediram esforços para auxiliar na efetivação desta pesquisa, especialmente a equipe de enfermagem que sempre esteve disposta a auxiliar em todas as etapas do processo. À Ana Paulo Librelato Pereira e Alexia Séles Martinelli sem as quais esta pesquisa não seria efetivada. A Odelta dos Santos Allende por seu inestimado trabalho e apoio na realização dos testes diagnósticos. Ao grupo formado para realização desta pesquisa, Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto, Prof. Dra. Andreza Francisco Martins, Dr. Tiago Antônio Tonietto, Gabriele Zvir Saldanha, Pedro Henrique Comerlatto. A meus colegas médicos do serviço de Medicina Interna do Hospital Nossa Senhora da Conceição pela sua eterna amizade e apoio, assim como exemplos de atuação profissional. A meus mentores durante minha carreira médica, especialmente Dr. Eduardo de Oliveira Fernandes e Dr. André Wajner. Ao Prof Dr. Diego Rodrigues Falci pela orientação durante estes 2 anos. A meus pais e irmã, Celso, Belanir e Cintia Spagnól. E finalmente àquela que sempre está a meu lado, de modo incansável, com toda a sua confiança e tolerância, minha esposa Claudine Felden.

RESUMO

Base teórica: *Clostridioides difficile* é um bacilo, anaeróbio, Gram positivo e produtor de toxinas. Estas toxinas, em alguns pacientes, irão desencadear uma síndrome diarreica que pode variar de apenas alguns episódios de fezes pastosas até colite fulminante. Estima-se uma proporção elevada de colonizados assintomáticos, que, apesar de possuírem a bactéria em seu trato digestivo, não apresentam sintomas. Não há evidências claras de qual o seu prognóstico e potencial de disseminar cepas toxigênicas.

Objetivo: Avaliar o efeito da colonização por *C. difficile* em pacientes assintomáticos na internação hospitalar e seu impacto em desfechos clínicos.

Métodos: Estudo de coorte, realizado em 2 UTIs de hospitais terciários de ensino no Brasil. Foram coletados swabs retais dos pacientes que internaram nestas UTIs no período de 21 de novembro de 2018 a 20 de dezembro de 2018 e realizada pesquisa de *C. difficile* toxigênico através de RT-PCR no momento de sua admissão. Os indivíduos foram seguidos até sua alta hospitalar ou óbito e avaliada associação da colonização com o desenvolvimento de diarreia, óbito, tempo de hospitalização, SAPS3 e outros desfechos. Além disto, as amostras foram avaliadas quanto a possibilidade de abrigarem cepas hipervirulentas.

Resultados: Foram incluídos 92 pacientes no estudo, dos quais 16 eram colonizados por *C. difficile* (17%). Durante o seguimento, do total de pacientes, 18 desenvolveram diarreia (20% da amostra). Nenhum destes teve diagnóstico de colite durante a internação. Não houve associação entre colonização por *C. difficile* e desenvolvimento de diarreia.

Desenvolvimento de diarreia e colonização não estiveram associados a mortalidade. Pacientes colonizados por *C. difficile* possuíam um escore SAPS3 maior.

Conclusão: Neste estudo, utilizando-se de um método com alta sensibilidade, observou-se uma prevalência alta de colonização por *C. difficile* em pacientes admitidos na UTI. Não houve associação entre colonização assintomática e desenvolvimento de diarreia.

Palavras chave: *Clostridioides difficile*, Diarreia, Colite pseudomembranosa, UTI.

SUMMARY

Background: *Clostridioides difficile* is a bacillus, anaerobic, Gram positive and a toxin producer. These toxins in some patients will develop a diarrheal syndrome that can range from just a few episodes of pasty stools to fulminant colitis. A high proportion of asymptomatic colonized are estimated, who, despite having the bacteria in their digestive tract, do not have symptoms. There is no clear evidence of their prognosis and potential for spreading toxigenic strains.

Objective: To evaluate the effect of *C. difficile* colonization and its impact on clinical outcomes in ICU patients.

Methods: Cohort study, conducted in 2 ICUs of tertiary teaching hospitals in Brazil. Rectal *swabs* were collected from patients admitted to these ICUs from November 21, 2018 to December 20, 2018, and toxigenic *C. difficile* was searched by RT-PCR at the time of admission. Subjects were followed until discharge or death, and the association of asymptomatic colonization with the development of diarrhea, death, length of hospitalization, SAPS3 and other outcomes was evaluated. In addition, the samples were evaluated for the possibility of harboring hypervirulent strains..

Results: Ninety-two patients were included in the study, of which 16 were colonized by *C. difficile* (17%). During follow-up, 18 patients developed diarrhea (20% of the sample). None had a diagnosis of colitis during hospitalization. There was no association between *C. difficile* colonization and diarrhea development. Diarrhea development and colonization were not associated with mortality. Patients colonized by *C. difficile* had a higher SAPS3 score.

Conclusion: In this study, using a method with high sensitivity, an elevated prevalence of *C. difficile* colonization was observed in patients admitted to the ICU. There was no association between asymptomatic colonization and development of diarrhea.

Keywords: *Clostridioides difficile*, Diarrhea, Pseudomembranous Colitis, ICU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma revisão bibliográfica..... Página 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características basais dos pacientes de acordo com o desenvolvimento do desfecho Página 56

Tabela 2 - Outros desfechos dos pacientes de acordo com o desenvolvimento ou não de diarreia Página 59

Tabela 3 – Características dos pacientes colonizados Página 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICD: Infecção por *Clostridoides difficile*

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

CCIH: Centro controle de Infecção hospitalar

ICC: Insuficiência cardíaca congestiva

IRpA: Insuficiência respiratória aguda

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HD: Hemodiálise

HDVVC: Hemodiálise Venovenosa Contínua

HNSC: Hospital Nossa Senhora da Conceição

MA: Médico assistente

NPT: Nutrição parenteral total

PPG: Programa de Pós Graduação

SCA: Síndrome coronariana aguda

SNE: Sonda nasoenteral

SR: Sala de Recuperação

UI: Unidade de Internação

UTI: Unidade de tratamento intensivo

SUMÁRIO

1. Introdução	Página 14
2. Revisão da Literatura	Página 17
3. Justificativa	Página 30
4. Objetivos	Página 32
5. Referências Bibliográficas	Página 33
6. Artigo	Página 39
7. Considerações finais	Página 62
8. Perspectivas futuras	Página 63
9. Anexos	
9.1 Aprovação comitê de ética	Página 64
9.2 Checklist STROBE	Página 69

1. INTRODUÇÃO

Clostridioides difficile (*C. difficile*) é uma bactéria gram-positiva, em formato de bacilo, anaeróbia, formadora de esporos, produtora de toxina que é transmitida entre humanos pela rota fecal oral. Seus esporos são resistentes a calor, ácido e diversos antibióticos (LEFFLER; LAMONT, 2015). Desde 1978 *C. difficile* vem sendo relacionada como principal causa de diarreia associada a antibióticos no ambiente hospitalar (BARTLETT et al., 1978). Estima-se que em 2011, apenas nos Estados Unidos, foi responsável por 453.000 infecções, estando associadas a 29.300 óbitos, além disto, 30% estavam associados a cepas hipervirulentas (LESSA et al., 2015). A infecção por *C. difficile* (ICD) é de modo geral grave com uma mortalidade relacionada à infecção de 5% e mortalidade total de 15 a 20% (BURKE; LAMONT, 2014; LESSA et al., 2015; NATARAJAN et al., 2013).

Seu sintoma central é diarreia, mediada pela toxina. A colite não se desenvolve em todos e quando ocorre é em graus variados, desde diarreia leve até colite fulminante, manifestando-se em alguns casos como constipação e chegando a complicações graves com perfuração intestinal e, não raramente, óbito (LEFFLER; LAMONT, 2015; MCDONALD et al., 2018). A maioria da literatura caracteriza ICD como a presença de diarreia (3 ou mais evacuações não formadas em 24 horas) associada a detecção de toxina ou identificação de cepa toxigênica nas fezes. Alguns estudos também utilizam a presença de diarreia e achados típicos na colonoscopia (presença de colite com pseudomembranas) (BAGDASARIAN; RAO; MALANI, 2015; MCDONALD et al., 2018). Uma deficiência desta definição é que alguns pacientes podem estar simplesmente colonizados por *C. difficile* e a diarreia ser causada por outra etiologia (dieta, antibióticos, doença inflamatória intestinal, medicações), mas acabarão sendo classificados como ICD. Tendo em vista a potencial gravidade da doença e impacto clínico global sobre a saúde do doente, o tratamento de

todos os pacientes com diarreia e toxina detectável é considerada uma conduta aceitável (MCDONALD et al., 2018). Entretanto não há consenso sobre a necessidade do rastreamento de pacientes assintomáticos.

Historicamente considera-se que indivíduos sintomáticos são as principais reservas de *C. difficile*, porém estudos recentes indicam que apenas um terço pode estar relacionado a outro caso de CDI, acredita-se que os outros possam ser devido à carreadores assintomáticos ou fatores não identificados (CLABOTS et al., 1992; RIGGS et al., 2007).

A pesquisa da cepa toxigênica pode ser feita através de imunoensaio para toxina nas fezes ou testes moleculares que identificam os genes das toxinas (BAGDASARIAN; RAO; MALANI, 2015). A cultura anaeróbia das fezes, seguido ou não por ensaio de citotoxicidade celular, teste demorado, complexo e não amplamente disponível, é considerado o padrão ouro (GILLIGAN, 2015). Testes que se utilizam da amplificação do ácido nucléico (NAAT) para detecção de cepas toxigênicas tem ganhado cada vez mais espaço na prática clínica. Eles tem demonstrado ser sensíveis e específicos para detecção tanto em pacientes sintomáticos quanto assintomáticos (ANDROGA et al., 2015). Existem diversas preparações comerciais disponíveis, que se utilizando desta técnica, possuem uma acurácia semelhante a cultura toxigênica (considerada padrão ouro), porém, em um intervalo de tempo muito menor. Alguns estudos atuais já começam a identificar uma problemática da utilização de métodos muito sensíveis para detecção de *C. difficile*, como o NAAT. A busca ativa de todos os com diarreia com este método levou a um sobrediagnóstico de CDI e conseqüente tratamento de infecção por *C. difficile* de pacientes com diarreia por outras causas muito mais simples e menos graves. Inclusive com alguns autores sugerindo que deveríamos voltar a utilizar ou associar a algoritmos diagnósticos técnicas antigas como a pesquisa de toxina por imunoensaio para firmar diagnóstico de CDI (POLAGE et al., 2015; TRUONG et al., 2017).

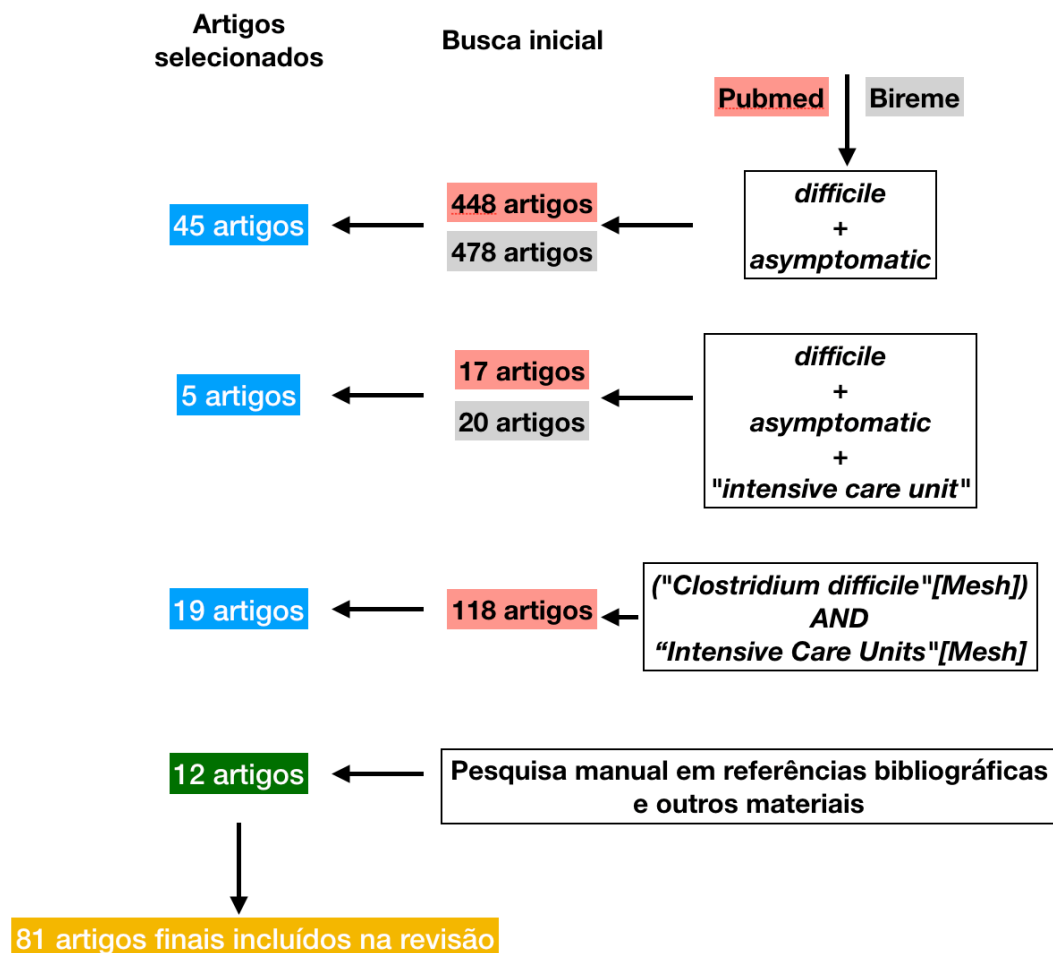
Em relação ao tratamento, está recomendado apenas para indivíduos com diarreia e toxina presente nas fezes. O tratamento de pessoas colonizadas não é recomendado pela ausência de evidências de benefício, ou mesmo de que seja uma medida efetiva para redução da transmissão em ambientes hospitalares. Do mesmo modo não deve ser realizado teste pós tratamento para documentar a erradicação pois muitos pacientes tratados com sucesso seguem eliminando esporos por semanas a meses após resolução da colite (MATHUR et al., 2014; MCDONALD et al., 2018).

2. REVISÃO DA LITERATURA

A estratégia de busca tentou selecionar estudos relacionados ao tema de portador assintomático de *C. difficile* no trato gastrointestinal, sua epidemiologia, fatores de risco e focando-se em ambiente de terapia intensiva. Foi realizada busca na base de dados Pubmed e Bireme com os termos “*Difficile*”, “*Asymptomatic*”, “*Intensive care unit*” em qualquer campo. Esta pesquisa inicial retornou 17 artigos na base de dados Pubmed e 20 na Bireme. Foi realizada uma busca mais ampla nas bases de dados com os MeSH Terms (“*Clostridium difficile*”[Mesh]) AND “*Intensive Care Units*”[Mesh] e selecionados artigos relevantes. Além disto, foram avaliadas as referências dos artigos encontrados em busca de outros relativos ao tema.

Esta revisão foi realizada em outubro de 2017 na fase de planejamento do projeto de pesquisa e atualizada em outubro de 2019 para busca de novos artigos publicados sobre o tema. Também foram incluídos outros artigos de relevância reconhecida sobre o tema *C. difficile* com informações significativas para esta revisão.

Figura 1: Fluxograma revisão bibliográfica



Estratégia de busca de referências bibliográficas nas bases de dados.

Caixas em cinza representam o número de artigos encontrados na base de dados Bireme;

Caixas em vermelho representam o número de artigos encontrados na base de dados Pubmed;

Caixas em azul indicam o número de artigos selecionados de acordo com cada combinação de termos;

Caixa em verde indica o número de artigos encontrados na busca manual;

Caixa em laranja indica o número de artigos incluídos ao final deste revisão.

A colonização assintomática por *C. difficile* é um tema em debate na literatura, com poucas evidências convincentes sobre a sua efetiva caracterização, prevalência, fatores de risco, fisiopatologia, fatores associados à evolução para colite e questionamentos até mesmo da sua efetiva associação com infecção (SHIM et al., 1998; ZACHARIOUDAKIS et al., 2015).

Até o momento sugere-se que o mecanismo inicial envolvido na colonização é o mesmo da infecção, sendo o primeiro passo na colonização, através da ingestão dos esporos, que sobrevivem ao ácido gástrico e chegam até a mucosa colônica onde irão se aderir. A partir deste ponto, vários fatores do hospedeiro e da bactéria, provavelmente nem todos identificados, irão interagir e determinar a evolução e gravidade da doença. No caso tanto de sintomáticos como assintomáticos haverá a proliferação bacteriana e a produção da toxina em graus variados resultando no espectro da doença (FURUYA-KANAMORI et al., 2015).

EPIDEMIOLOGIA DA COLONIZAÇÃO ASSINTOMÁTICA

O número de colonizados assintomáticos parece ser maior que o de ICD, porém há grandes variações, dependendo do hospedeiro, patogenicidade, fatores ambientais e possivelmente outros ainda não identificados, com estudos demonstrando prevalência de 0% a 51% (RIGGS et al., 2007; ZACHARIOUDAKIS et al., 2015).

Em 1989 foi publicado um dos primeiros estudos (MCFARLAND et al., 1989) que se propôs a avaliar o papel da colonização assintomática em ambiente hospitalar. McFarland avaliou por 11 meses 427 pacientes que internaram no *Harborville Medical Center* em Seattle, coletando *swabs* a cada 3 dias para realização de cultura. Deste modo encontrou uma taxa de colonização durante a hospitalização de 21%, com uma associação significativa com diarreia, mas não colite, e através da tipificação das amostras documentou a transmissão das cepas entre pacientes colonizados ou infectados no ambiente hospitalar.

Estudos mais antigos chegaram a propor que colonização poderia ser um fator protetor para ICD. Metanálise publicada em 1998 demonstrou que de 618 pacientes não colonizados, 3,6% desenvolveram ICD, enquanto em 192 não colonizados a taxa foi de 1% (SHIM et al., 1998). Esta análise foi questionada por nova de 2015 (ZACHARIOUDAKIS et al., 2015) que avaliou agora 8725 pacientes de 19 estudos e encontrou um risco de desenvolver colite em pacientes colonizados 5,9 vezes maior, com taxas de infecção entre colonizados de 21,8% e 3,4% nos não colonizados. A principal diferença entre estes estudos, além do número de pacientes e temporalidade, é a inclusão de pacientes colonizados por cepas não toxigênicas no mais antigo. A partir destes dados temos a hipótese de que a colonização por cepas não toxigênicas possivelmente são um fator protetor para a ICD por competir por nutrientes e acesso à mucosa intestinal (MCDONALD et al., 2018).

Esta metanálise também (ZACHARIOUDAKIS et al., 2015) resumizou as taxas de colonização assintomática encontradas nos principais estudos sobre o tema, encontrando uma prevalência estimada de 8,1%. Analisando 19 estudos em pacientes hospitalizados, a maioria utilizando-se de cultura toxigênica para o diagnóstico, as taxas variaram de zero a 24,3%.

Também chama a atenção, na metanálise mais recente (ZACHARIOUDAKIS et al., 2015), as taxas crescentes de ICD nos últimos anos, fato que parece estar relacionado ao surgimento de cepas hipervirulentas. Este achado é corroborado por estudo de *Loo et al.* que coletou *swabs* semanais de pacientes internados e os seguiu para busca de desenvolvimento de ICD (LOO et al., 2011). Dos colonizados, apenas 36% eram por cepa hipervirulenta, enquanto nos que desenvolveram diarreia foram 62%. Estes dados reforçam a importância da identificação de cepas circulantes.

Outro mecanismo proposto para as taxas de evolução colonização-infecção serem mais altas em pacientes colonizados por cepas virulentas a associa ao mecanismo imune

do hospedeiro. Alguns estudos têm tentado associar os níveis de anticorpos circulantes com menores índices de infecção, sugerindo que a colonização por cepas menos virulentas, ou não toxigênicas, levem a produção de anticorpos contra as toxinas evitando a infecção por outras cepas mais agressivas. Kyne documentou que pacientes que após a infecção tornaram-se colonizados assintomáticos possuem níveis maiores de IgG contra toxina A (KYNE et al., 2000). Além disto, Loo demonstrou que baixos níveis de anticorpos contra toxina B estiveram associados com recorrência de infecção (LOO et al., 2011, p. 20).

Até o momento não há definição do tempo de progressão do portador assintomático para ICD, alguns estudos tentam fazer esta associação para identificar qual seria o tempo de "incubação" do *C. difficile*, porém com resultados amplos, representando a complexidade dos fatores que levam o colonizado a apresentar sintomas de infecção. Além disto, há dificuldade de identificar qual foi o momento exato em que um paciente se tornou colonizado. Estudo de 2013 mostrou que alguns pacientes que desenvolveram infecção eram previamente colonizados em testes realizados 8 a 28 dias antes do surgimento dos sintomas (CURRY et al., 2013).

Hospitalização prévia é um fator claramente associado com colonização por *C. difficile*. Múltiplos estudos (LEEKHA et al., 2013; LOO et al., 2011) já encontraram esta associação que pode dever-se a vários motivos, desde uma maior exposição a esporos eliminados por outros colonizados assintomáticos conforme já descrito, até os múltiplos fatores de risco para colonização aos quais o indivíduo é exposto no ambiente hospitalar. Metanálise, já citada, estima que pacientes hospitalizados nos últimos 3 meses possuam um risco 63% maior de colonização (ZACHARIOUDAKIS et al., 2015).

Outros fatores de risco clássicos para ICD também são relacionados com a colonização, estudo canadense avaliou fatores de risco para colonização na admissão hospitalar encontrou associados, além de hospitalização nos últimos 12 meses, uso prévio de corticosteroides, ICD prévia e presença de anticorpos contra toxina B (KONG et al.,

2015). Outro estudo americano identificou como fator de risco hemodiálise crônica, além dos já descritos hospitalização prévia e uso de corticosteroides (LEEKHA et al., 2013).

A principal metanálise sobre o tema não identificou associação entre uso prévio de antibióticos com colonização, fator este classicamente associado com ICD (ZACHARIOUDAKIS et al., 2015). Este fato vem de encontro a hipótese de que fatores que alteram a microbiota intestinal ocupam um papel central no desenvolvimento da infecção (SCHÄFFLER; BREITRÜCK, 2018). Em pacientes com infecção recorrente por *C. difficile* o uso de transplante de microbiota fecal vem sendo utilizado eficientemente com base neste princípio (BAKKEN, 2009; MULLISH et al., 2018; VAN NOOD et al., 2013; WANG et al., 2016). Em pacientes com colonização assintomática não há estudos que avaliem especificamente e de modo objetivo a hipótese da alteração do microbioma intestinal como fator para evolução de colonizado assintomático para ICD.

Estudo publicado em 2019 e realizado em um único centro em Israel fez uso de RT-PCR para avaliação de colonização assintomática na admissão hospitalar (MELTZER et al., 2019). Neste estudo foram encontrados taxas de 3,4% de colonizados. Dentre estes, apenas 3,7% desenvolveram doença; Entre os pacientes não colonizados 0,2% desenvolveu a doença. Houve associação estatisticamente significativa entre colonização e infecção. Deve ser ressaltado o grande tamanho amostral, de 2368 indivíduos, dos quais apenas 3 eram colonizados e desenvolveram infecção por CD, sugerindo um baixo impacto clínico da prática de rastreamento da colonização por NAAT usando *swabs*.

DIAGNÓSTICO DE COLONIZAÇÃO / INFECÇÃO

A colonização assintomática por *C. difficile* demonstra ser um obstáculo importante para o diagnóstico efetivo de infecção pela bactéria. Múltiplos fatores podem levar pacientes a desenvolver diarreia no ambiente hospitalar, quando associados a taxas elevadas de colonização e teste muito sensíveis para a pesquisa da bactéria certamente resultam no

tratamento de colite em pacientes que possuem diarreia de outras etiologias. Levando isto em conta, a maioria dos autores (CROBACH et al., 2016; LOO et al., 2018; MCDONALD et al., 2018; SARTELLI et al., 2019) sugere que o diagnóstico de ICD seja buscado apenas em pacientes com diarreia que não pode ser claramente atribuída a outras causas (inibidor de bomba de prótons, nutrição por sonda, laxativos...) e alta probabilidade de ser causada por *C. difficile*, porém, isto pode atrasar o diagnóstico e tratamento de ICD com consequências catastróficas, tornando-se um desafio na prática clínica (CARTER; MALANI, 2019). Além disto, vários fatores associados à ICD também podem causar diarreia por si só, dificultando a criação de regras preditoras.

Existem vários métodos descritos para a detecção de *C. difficile* ou sua toxina nas fezes, porém nenhum é recomendado de modo isolado para diagnóstico de ICD por suas limitações inerentes (MCDONALD et al., 2018).

O método classicamente determinado como padrão ouro é a cultura toxigênica, que utiliza um meio de cultura seletivo após o crescimento da bactéria ainda deve ser realizado a confirmação da produção da toxina. Apesar de extremamente específico, apresenta baixa sensibilidade, necessitando de inócuos maiores. Além disto, sua complexidade técnica e tempo necessário para crescimento o tornam inviável para o uso rotineiro, mas importante para a validação de outros métodos (BAYARDELLE, 2009; BURNHAM; CARROLL, 2013; PLANCHE; WILCOX, 2011; THONNARD et al., 1996). Mais recentemente também vem sendo utilizado em cenários de pesquisa associado a técnicas de biologia molecular para adequada tipificação das cepas, com importante valor epidemiológico.

Técnicas de imunoensaio para a detecção das toxinas de *C. difficile* foram por muitos anos o principal método diagnóstico para ICD. Por serem de fácil e rápida realização, além e focados na pesquisa especificamente da toxina, possuem grande vantagem teórica. Porém, na prática clínica apresentam sensibilidade que varia de 42% (CHAPIN et al., 2011)

a 99% (MUSHER et al., 2007) quando comparados à cultura (BURNHAM; CARROLL, 2013), o que torna seu uso de modo isolado inadequado.

Imunoensaio para glutamato dehidrogenase (GDH), uma enzima metabólica do *C. difficile*, também tem sido utilizado para o seu diagnóstico. Ela é encontrada em cepas toxigênicas e não toxigênicas tornando mandatório um teste confirmatório, porém, demonstra ser um teste de triagem adequado com bom valor preditivo negativo (BURNHAM; CARROLL, 2013; NOVAK-WEEKLEY et al., 2010). Por isso, vem sendo utilizado frequentemente associado a cultura ou testes moleculares reduzindo custos com boa sensibilidade (MCDONALD et al., 2018).

Nos últimos 10 anos surgiram diversos novos testes que utilizam a amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) para a pesquisa de *C. difficile*. A grande maioria utiliza-se de um sistema fechado para amplificação, detecção, interpretação e validação dos resultados, também chamado de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) necessitando pequena interação com operador e disponibilizando resultado em poucas horas, com um preço razoável. Além disto, estes testes demonstram ótima sensibilidade e especificidade quando comparado com os métodos tradicionais para a detecção microbiológica da bactéria (GILLIGAN, 2015; GOLDENBERG et al., 2014; HALSTEAD et al., 2016; PANCHOLI et al., 2012; PETERSON et al., 2017). Estes fatores tornaram o seu uso muito atrativo com conseqüente disseminação e por vezes uso indiscriminado, inclusive em pacientes com baixa probabilidade de infecção por *C. difficile*, nos levando novamente ao tema da colonização assintomática. Com isto, tem surgido dúvidas quanto ao real valor preditivo positivo do método, no contexto de aplicação clínica em locais com prevalência baixa ou intermediária, com artigos sugerindo valores menores que 50% (DUBBERKE et al., 2011, 2015).

Com estes dados há diversos algoritmos propostos para o diagnóstico de ICD (POLAGE et al., 2015; TRUONG et al., 2017), nenhum com sensibilidade, especificidade,

valor preditivo negativo e positivos ótimos. Polage, por exemplo, avaliou pacientes com ICD que tiveram RT-PCR positivo e imunoensaio para toxina negativo, estes pacientes tiveram um curso benigno de doença e não apresentaram complicações, enquanto que pacientes que possuíam RT-PCR positivo e imunoensaio para toxina positivo apresentaram 7,6% de complicações, sugerindo esta associação como o método mais razoável (POLAGE et al., 2015).

As recomendações atuais sugerem que os centros devem individualizar seus métodos diagnósticos, levando em conta a capacidade local de realização dos exames, prevalência de infecção e características inerentes aos métodos. Também reforçam a importância da identificação correta dos pacientes para serem testados, devendo ter como pré requisito para avaliação laboratorial a presença de diarreia e a exclusão de outros fatores causais, sugerindo inclusive, que laboratórios não devam realizar pesquisa de *C. difficile* em fezes sólidas, que apesar de sua viabilidade técnica, pode levar a erros diagnósticos (CROBACH et al., 2016; MCDONALD et al., 2018). Apesar disto, estudo recente conduzido com membros do *Infectious Diseases Society of America's Emerging Infections Network* demonstrou que em populações pediátricas, 62% dos médicos utilizam RT-PCR de forma isolada e 7% realizam o teste inclusive em fezes sólidas (KOCIOLEK et al., 2019).

COLONIZADOS ASSINTOMÁTICOS COMO FONTE DE DISSEMINAÇÃO DE *C. DIFFICILE*

A disseminação de cepas entre pacientes no ambiente hospitalar vem sendo tema de debate sem haver um consenso na literatura em relação a busca ativa de colonizados assintomáticos para redução das taxas de infecção. Eles parecem ser uma importante reserva e foco de disseminação da bactéria, principalmente com o surgimento de cepas hipervirulentas, podendo eliminar esporos por diversas semanas (CLABOTS et al., 1992).

Há estudos demonstrando claramente o potencial destes pacientes disseminarem os esporos, porém em menor grau que sintomáticos (LANZAS et al., 2011). Além disto, estudos mais recentes, utilizando-se de biologia molecular, seguem demonstrando que um quarto das cepas identificadas em pacientes com ICD são relacionadas a de pacientes internados assintomáticos (CURRY et al., 2013; RIGGS et al., 2007). Outros estudos demonstram dados um pouco diferentes, sugerindo que boa parte dos que evoluem para infecção são colonizados ainda na comunidade (BLIXT et al., 2017; GONZALEZ-ORTA et al., 2019). Apesar disto, não há estudos que abordem de modo específico medidas que, se realizadas em pacientes colonizados, possam reduzir as taxas de ICD. Com isto, os *guidelines* atuais não recomendam a busca ativa da bactéria em assintomáticos, principalmente por não haver medidas que comprovadamente vão melhorar desfechos neste paciente ou reduzir a contaminação ambiental (MCDONALD et al., 2018; SARTELLI et al., 2019; SHANE et al., 2017).

COLONIZAÇÃO ASSINTOMÁTICA EM UTI

Tendo em vista a presença de inúmeros fatores de risco, o ambiente e o paciente, é esperado que a unidade de tratamento intensivo (UTI) seja um dos principais focos para colonização e infecção por *C. difficile*. Há poucos estudos especificamente neste ambiente, por isso a maioria dos dados são extrapolados de pacientes em unidades de internação (PRECHTER et al., 2017).

Encontramos apenas 3 estudos que avaliam o estado de colonizado assintomático em UTI. Em 2015, Tschudin descreveu os dados de 542 pacientes da UTI de um hospital americano, em um estudo prospectivo, utilizando de RT-PCR, demonstrou que na admissão 3,1% dos pacientes são colonizados, apenas transplantado de órgão sólido foi identificado como fator de risco para colonização e apenas 1,8% da amostra desenvolveu ICD, porém a colonização demonstrou ser um fator de risco (TSCHUDIN-SUTTER et al., 2015).

Outro estudo, na China, avaliou 360 internações em UTI, demonstrou uma taxa de colonização na admissão menor ainda, 1,7%, as taxas de infecção também foram baixas, apenas 1,1% desenvolveu ICD, dos quais nenhum era colonizado (ZHANG et al., 2016). No Kuwait, estudo que avaliou 922 pacientes que internaram em 22 UTIs demonstrou que nenhum paciente era colonizado por *C. difficile* na admissão (ROTIMI, 2003).

Chama a atenção as taxas extremamente baixas de colonização nos estudos, diferindo bastante das encontradas em pacientes internados em hospitais, estimada em 8,1% em metanálise (ZACHARIOUDAKIS et al., 2015). Tschudin, que avaliou colonização assintomática em UTI nos Estados Unidos (TSCHUDIN-SUTTER et al., 2015), gera a hipótese de que isto foi devido a baixa gravidade de seus pacientes, enquanto que na China (ZHANG et al., 2016), pode ser devido a baixa prevalência de *C. difficile* na população como um todo, por motivos ainda não claros.

Com relação aos pacientes com ICD em UTI encontramos um número maior de estudos demonstrando as taxas de infecção, predominantemente coortes retrospectivas, que nos trazem uma estimativa da dimensão da doença. Nestes estudos encontramos taxas de ICD variaram de 0,14% (SILVA et al., 2013) a 4,91% (SHAUGHNESSY et al., 2011). Metanálise sobre o tema demonstrou uma prevalência agrupada de 2% (KARANIKI et al., 2016).

Também há descrição de colonização assintomática em neonatos internados em unidades de terapia intensiva, com uma taxa de colonização de 25% (FADEN; DRYJA, 2015). O fato de neonatos possuírem maiores taxas de colonização é bem descrito na literatura e tende a cair durante o primeiro ano de vida. Portanto, nesta população deve-se ter maiores cuidados no diagnóstico da infecção, pelo grande potencial de positividade na pesquisa de *C. difficile* (MCDONALD et al., 2018).

Patel conduziu um estudo em UTIs de Illinois para validação do uso de RT-PCR no diagnóstico de colonização assintomática em amostras de *swabs* de fezes. Tendo em vista

o objetivo do estudo, não traz maiores detalhes sobre dados epidemiológicos da população, mas cita uma taxa de positividade do teste de 7,6%, devendo a taxa de colonização assintomática nesta população ter valores semelhantes (PATEL et al., 2018).

C. *DIFFICILE* NO BRASIL

No Brasil existem poucos estudos sobre o tema *C. difficile* (BALASSIANO et al., 2012). Em 2014, Monteiro e cols. Avaliaram a presença de *C. difficile* em pacientes com diarreia internados em 2 hospitais de Porto Alegre. Das 116 amostras avaliadas 11 (8,3%) foram positivas para *C. difficile*, porém, apenas uma cepa (0,9%) era toxigênica e ao realizar tipificação molecular, não mostrou tratar-se de cepa hipervirulenta (DE ALMEIDA MONTEIRO et al., 2014). Em outro estudo, Balassiano avaliou em pacientes imunossupressores, com alta probabilidade de ICD que apresentavam diarreia. Nesta população 28,5% demonstraram positividade para toxinas de *C. difficile* através de imunofluorescência (BALASSIANO et al., 2009).

Estudo de ponto prevalência realizado em 2 momentos distintos em 8 hospitais universitários no Brasil avaliou 6374 pacientes, dos quais 153 apresentavam diarreia (ponto prevalência: 24 por 1000 pacientes-dia), sendo que 19 confirmaram diagnóstico de ICD. Com estes dados conclui-se que a proporção de pacientes com ICD dentre os que desenvolveram diarreia foi de 11,8% (PIRES et al., 2019).

Recentemente alguns estudos tem objetivado realizar a caracterização das cepas circulantes no Brasil. O estudo de ponto prevalência já citado, publicou em 2018 o primeiro relato, em 2 hospitais de Porto Alegre, da identificação de cepas hipervirulentas do mesmo ramo da RT027 (PIRES et al., 2018). Outros estudos similares também encontraram evidências de germes do mesmo ramo de cepas hipervirulentas, que costumam ocorrerem como infecções mais graves, com maiores complicações e mortalidade (BALASSIANO et al., 2012, 2009; COSTA et al., 2017; DE ALMEIDA MONTEIRO et al., 2014; L. C.

PIERROTI, [s.d.]; LOPES CANÇADO et al., 2018). Diniz descreveu em 2019 a identificação de 4 germes correspondendo a novas cepas e ribotipos identificados em Minas Gerais que fazem parte do ramo 2, o mesmo das tradicionais cepas hipervirulentas RT027. Isto deixa evidente que existem cepas de maior gravidade circulando no Brasil, porém, não adequadamente caracterizadas (DINIZ et al., 2019).

3. JUSTIFICATIVA

A ICD é em alguns países a principal infecção hospitalar, com um grande potencial de morbidade e mortalidade, estando claramente relacionada a aumento do tempo de hospitalização e custos. Sua incidência parece seguir aumentando apesar de medidas instituídas (NATARAJAN et al., 2013).

Com o envelhecimento da população, evolução dos métodos diagnósticos e tratamentos, as hospitalizações tendem a ser mais prolongadas e complexas, soma-se a isso o grande uso de antibióticos de largo espectro por infecções multirresistentes cria-se o ambiente perfeito para a disseminação de *C. difficile*.

Novos métodos para a pesquisa da toxina o *C. difficile* tem se tornando cada vez mais disponíveis, aumentando a possibilidade de diagnóstico precoce, tratamento e implementação de medidas de bloqueio epidemiológico. Contrapondo-se a isso, estes novos testes podem identificar portadores assintomáticos de cepas toxigênicas de *C. difficile*, com os quais não há exata definição na literatura de como devem ser conduzidos (GILLIGAN, 2015).

Inicialmente os atuais *guidelines* (MCDONALD et al., 2018) recomendam fortemente que pacientes assintomáticos sejam excluídos da população avaliada por testes diagnósticos para *C. difficile*, porém há potencial para medidas de bloqueio epidemiológico, tratamento precoce ou até tratamento antes mesmo do desenvolvimento da doença nestes pacientes, mas para chegarmos a estas análises a literatura ainda carece de dados maiores sobre a epidemiologia e evolução para doença nesta população.

Em países em desenvolvimento há extrema escassez de dados sobre este tipo de infecção, gerando uma relativa falta de preocupação por parte das instituições de saúde pela ICD. Em relação ao Brasil existem poucos estudos sobre o tema *C. difficile* e não identificamos estudos focados especificamente em assintomáticos.

Considerando esses aspectos, são necessário estudos que avaliem a evolução de pacientes criticamente doentes que apresentam colonização assintomática por *C. difficile*, assim como sua epidemiologia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar qual o papel da colonização assintomática por *C. difficile* para o desenvolvimento de desfechos clínicos em pacientes que internam em UTIs de hospitais terciários de ensino no Sul do Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- Quantificar a prevalência de colonizados assintomáticos.
- Observar se a colonização assintomática é fator de risco para desenvolvimento de ICD.
- Avaliar fatores relacionados ao desenvolvimento de ICD em colonizados assintomáticos.
- Avaliar se a colonização assintomática é fator de risco para o desenvolvimento de outros desfechos (morte, tempo de hospitalização, reinternação em UTI).
- Quantificar prevalência de colonizados pela cepa BI/NAP1/RT027.
- Avaliar as cepas circulantes de *C. difficile* pela sua tipificação molecular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABT, Michael C.; MCKENNEY, Peter T.; PAMER, Eric G. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 609–620, 2016.

ANDROGA, Grace O. et al. Evaluation of the Cepheid Xpert C. difficile/ *Epi* and Meridian Bioscience *illumi* gene C. difficile Assays for Detecting Clostridium difficile Ribotype 033 Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 973–975, 2015.

BAGDASARIAN, Natasha; RAO, Krishna; MALANI, Preeti N. Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* in Adults: A Systematic Review. **JAMA**, [s. l.], v. 313, n. 4, p. 398, 2015.

BAKKEN, Johan S. Fecal bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile infection. **Anaerobe**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 285–289, 2009.

BALASSIANO, I. T. et al. Clostridium difficile: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 169–179, 2012.

BALASSIANO, Ilana T. et al. Characterization of Clostridium difficile strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 61–64, 2009.

BARTLETT, John G. et al. Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 778–782, 1978.

BAYARDELLE, Paul. Importance of Culture for Detection of *Clostridium* <i>difficile Toxin from Stool Samples to Report True Incidence and Mortality Related to *C. difficile* in Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 1134–1135, 2009.

BLIXT, Thomas et al. Asymptomatic Carriers Contribute to Nosocomial Clostridium difficile Infection: A Cohort Study of 4508 Patients. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 152, n. 5, p. 1031-1041.e2, 2017.

BOUZA, E. et al. Is Clostridium difficile infection an increasingly common severe disease in adult intensive care units? A 10-year experience. **Journal of Critical Care**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 543–549, 2015.

BURKE, Kristin E.; LAMONT, J. Thomas. *Clostridium difficile* Infection: A Worldwide Disease. **Gut and Liver**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–6, 2014.

BURNHAM, C. A. D.; CARROLL, K. C. Diagnosis of Clostridium difficile Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 604–630, 2013.

CARTER, Kayla A.; MALANI, Anurag N. Laxative use and testing for Clostridium difficile in hospitalized adults: An opportunity to improve diagnostic stewardship. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 170–174, 2019.

CHAPIN, Kimberle C. et al. Comparison of Five Assays for Detection of Clostridium difficile Toxin. **The Journal of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 395–400, 2011.

- CLABOTS, Connie R. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 166, n. 3, p. 561–567, 1992.
- COSTA, Cecília Leite et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, [s. l.], v. 48, p. 232–236, 2017.
- CROBACH, M. J. T. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 22, p. S63–S81, 2016.
- CURRY, Scott R. et al. Use of Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis Genotyping to Determine the Role of Asymptomatic Carriers in *Clostridium difficile* Transmission. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 57, n. 8, p. 1094–1102, 2013.
- DE ALMEIDA MONTEIRO, Alexandre et al. A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 672–674, 2014.
- DINIZ, Amanda Nádia et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anaerobe**, [s. l.], v. 56, p. 34–39, 2019.
- DUBBERKE, Erik. *Clostridium difficile* infection: The scope of the problem. **Journal of Hospital Medicine**, [s. l.], v. 7, n. S3, p. S1–S4, 2012.
- DUBBERKE, Erik R. et al. Impact of clinical symptoms on interpretation of diagnostic assays for *Clostridium difficile* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 2887–2893, 2011.
- DUBBERKE, Erik R. et al. Risk Factors for Acquisition and Loss of *Clostridium difficile* Colonization in Hospitalized Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 4533–4543, 2015.
- FADEN, Howard S.; DRYJA, Diane. Importance of asymptomatic shedding of *Clostridium difficile* in environmental contamination of a neonatal intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 887–888, 2015.
- FALECK, David M. et al. Proton Pump Inhibitors Do Not Increase Risk for *Clostridium difficile* Infection in the Intensive Care Unit. **The American Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 111, n. 11, p. 1641–1648, 2016.
- FURUYA-KANAMORI, Luis et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/15/516>>. Acesso em: 22 out. 2017.
- GILLIGAN, Peter H. Optimizing the Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. **Clinics in Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 299–312, 2015.
- GOLDENBERG, Simon D. et al. Point-of-Care Testing for *Clostridium Difficile* Infection: A Real-World Feasibility Study of a Rapid Molecular Test in Two Hospital Settings. **Infectious Diseases and Therapy**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 295–306, 2014.

GONZALEZ-ORTA, Melany et al. Are Many Patients Diagnosed With Healthcare-associated *Clostridioides difficile* Infections Colonized With the Infecting Strain on Admission? **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 10, p. 1801–1804, 2019.

HALSTEAD, Diane C. et al. A multi-laboratory comparison of two molecular methods for the detection of toxigenic *Clostridium difficile*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 10, n. 01, p. 62, 2016.

HENDERSON, Mackenzie et al. A Review of the Safety and Efficacy of Vaccines as Prophylaxis for *Clostridium difficile* Infections. **Vaccines**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 25, 2017.

KARANIKA, Styliani et al. Prevalence and Clinical Outcomes of *Clostridium difficile* Infection in the Intensive Care Unit: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Open Forum Infectious Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. ofv186, 2016.

KOCIOLEK, Larry K. et al. Healthcare provider diagnostic testing practices for identification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in children: an Emerging Infections Network survey. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 276–280, 2019.

KONG, Ling Yuan et al. Predictors of asymptomatic *Clostridium difficile* colonization on hospital admission. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 248–253, 2015.

KYNE, Lorraine et al. Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 342, n. 6, p. 390–397, 2000.

L. C. PIERROTI. Diagnosis of *Clostridium difficile* hypervirulent strain BI/NAP1/027 using Xpert C. difficile PCR assay in Brazil. In: **69th ACC Annual Scientific Meeting, Poster abstracts accepted for presentation**. [s.l: s.n.].

LANZAS, C. et al. Epidemiological Model for *Clostridium difficile* Transmission in Healthcare Settings. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 32, n. 06, p. 553–561, 2011.

LEEKHA, Surbhi et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization in a tertiary care hospital: Admission prevalence and risk factors. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 390–393, 2013.

LEFFLER, Daniel A.; LAMONT, J. Thomas. *Clostridium difficile* Infection. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 372, n. 16, p. 1539–1548, 2015.

LESSA, Fernanda C. et al. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 372, n. 9, p. 825–834, 2015.

LOO, Vivian G. et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*–associated diarrhea with high morbidity and mortality. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 23, p. 2442–2449, 2005.

LOO, Vivian G. et al. Host and Pathogen Factors for *Clostridium difficile* Infection and Colonization. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 365, n. 18, p. 1693–1703, 2011.

- LOO, Vivian G. et al. Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada treatment practice guidelines for *Clostridium difficile* infection. **Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 71–92, 2018.
- LOPES CANÇADO, Guilherme Grossi et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, [s. l.], v. 54, p. 65–71, 2018.
- MARTIN, Jessica S. H.; MONAGHAN, Tanya M.; WILCOX, Mark H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 206–216, 2016.
- MATHUR, Harsh et al. The potential for emerging therapeutic options for *Clostridium difficile* infection. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 696–710, 2014.
- MCDONALD, L. Clifford et al. An epidemic, toxin gene–variant strain of *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 23, p. 2433–2441, 2005.
- MCDONALD, L. Clifford et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/cix1085/4855916>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- MCFARLAND, Lynne V. et al. Nosocomial Acquisition of *Clostridium difficile* Infection. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 320, n. 4, p. 204–210, 1989.
- MELTZER, E. et al. Universal screening for *Clostridioides difficile* in a tertiary hospital: risk factors for carriage and clinical disease. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1127–1132, 2019.
- MORFIN-OTERO, Rayo et al. *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 8–13, 2016.
- MULLISH, Benjamin H. 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**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 1920–1941, 2018.
- MUSHER, Daniel M. et al. Detection of *Clostridium difficile* toxin: comparison of enzyme immunoassay results with results obtained by cytotoxicity assay. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 2737–2739, 2007.
- NATARAJAN, Mukil et al. A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. **Anaerobe**, [s. l.], v. 22, p. 1–5, 2013.
- NOVAK-WEEKLEY, Susan M. et al. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 889–893, 2010.

- PANCHOLI, P. et al. Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*: Comparison of the Cell Culture Neutralization, Xpert C. difficile, Xpert C. difficile/Epi, and Illumigene C. difficile Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1331–1335, 2012.
- PATEL, Parul A. et al. Validation of Active Surveillance Testing for *Clostridium difficile* Colonization Using the cobas Cdiff Test. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 4, 2018. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01553-17>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- PETERSON, Lance R. et al. Evaluation of the cobas® Cdiff test for the Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in Stool Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], p. JCM.01135-17, 2017.
- PIRES, Renata N. et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 39, n. 03, p. 371–373, 2018.
- PIRES, Renata N. et al. High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 484–485, 2019.
- PLANCHE, T.; WILCOX, M. Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 1–5, 2011.
- POLAGE, Christopher R. et al. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. **JAMA Internal Medicine**, [s. l.], v. 175, n. 11, p. 1792, 2015.
- PRECHTER, Florian et al. Sleeping with the enemy: *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. **Critical Care**, [s. l.], v. 21, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-017-1819-6>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- RAO, Krishna et al. *Clostridium difficile* Ribotype 027: Relationship to Age, Detectability of Toxins A or B in Stool With Rapid Testing, Severe Infection, and Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 233–241, 2015.
- RIGGS, M. M. et al. Asymptomatic Carriers Are a Potential Source for Transmission of Epidemic and Nonepidemic *Clostridium difficile* Strains among Long-Term Care Facility Residents. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 992–998, 2007.
- ROTIMI, V. O. Prevalent PCR ribotypes of clinical and environmental strains of *Clostridium difficile* isolated from intensive-therapy unit patients in Kuwait. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 705–709, 2003.
- SARTELLI, Massimo et al. 2019 update of the WSES guidelines for management of Clostridioides (*Clostridium*) *difficile* infection in surgical patients. **World Journal of Emergency Surgery**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://wj.es.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13017-019-0228-3>>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- SCARDINA, T. et al. *Clostridium difficile* Infection (CDI) Severity and Outcome among Patients Infected with the NAP1/BI/027 Strain in a Non-Epidemic Setting. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 36, n. 03, p. 280–286, 2015.

SCHÄFFLER, Holger; BREITRÜCK, Anne. Clostridium difficile – From Colonization to Infection. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00646/full>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

SHANE, Andi L. et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://academic.oup.com/cid/article/doi/10.1093/cid/cix669/4557073>>. Acesso em: 27 out. 2017.

SHAUGHNESSY, Megan K. et al. Evaluation of Hospital Room Assignment and Acquisition of *Clostridium difficile* Infection. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 201–206, 2011.

SHIM, Janet K. et al. Primary symptomless colonisation by Clostridium difficile and decreased risk of subsequent diarrhoea. **The Lancet**, [s. l.], v. 351, n. 9103, p. 633–636, 1998.

SILVA, Moacyr et al. Secular trends in the epidemiology of Clostridium difficile infection (CDI): relationship with alcohol gel and antimicrobial usage in a hospital. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. e418-421, 2013.

TERVEER, Elisabeth M. et al. Detection of Clostridium difficile in Feces of Asymptomatic Patients Admitted to the Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 403–411, 2017.

THONNARD, Joëlle et al. Toxin A detection on Clostridium difficile colonies from 24-h cultures. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 50–54, 1996.

TRUONG, Cynthia et al. Clostridium difficile rates in asymptomatic and symptomatic hospitalized patients using nucleic acid testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 365–370, 2017.

TSCHUDIN-SUTTER, Sarah et al. Impact of Toxigenic Clostridium difficile Colonization on the Risk of Subsequent C. difficile Infection in Intensive Care Unit Patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1324–1329, 2015.

VAN NOOD, Els et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 368, n. 5, p. 407–415, 2013.

WANG, Sinan et al. Systematic Review: Adverse Events of Fecal Microbiota Transplantation. **PloS One**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. e0161174, 2016.

ZACHARIOUDAKIS, Ioannis M. et al. Colonization with toxinogenic C. difficile upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. **The American journal of gastroenterology**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 381, 2015.

ZHANG, Xiaoxia et al. Colonization of toxigenic Clostridium difficile among ICU patients: a prospective study. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1729-2>>. Acesso em: 22 out. 2017.

6. ARTIGO

***Clostridioides difficile* colonization on admission in intensive care unit patients: a cohort study**

Marcio Fernando Spagnól¹; Alessandro Comarú Pasqualotto²; Andreza Francisco

Martins³; Pedro Henrique Comerlatto⁴; Tiago Antônio Tonietto⁵; Diego Rodrigues Falci⁶

1: Graduate in Medicine; Post-Graduation Program of Medical Sciences at Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Physician in the department of Internal Medicine, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre; RS, Brazil.

2: Doctor in Pneumology; Medical Supervisor of Molecular Biology Laboratory, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; Professor of Medicine at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; RS, Brazil.

3: Doctor in Medical Sciences, Professor in the department of Microbiology at Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil.

4: Graduate in Medicine; Physician in Intensive Care Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; RS, Brazil.

5: Graduate in Medicine, Physician in the Intensive Care Unit Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Physician in the Intensive Care Unit, Hospital Nossa Senhora da Conceição; Porto Alegre, RS, Brazil.

6: Doctor in Pathology, Professor of the Post-Graduation Program of Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Marcio Fernando Spagnól

Department of Internal Medicine; Av. Francisco Trein, 596, Porto Alegre, RS, Brazil.

marciospagnol@gmail.com

+55.51.3357.2084

Abbreviated title: **Impact of *C. difficile* colonization in ICU**

Word count: 2431

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of *C. difficile* colonization and its impact on clinical outcomes in ICU patients.

Design: Cohort study.

Setting: two ICUs of tertiary teaching hospitals in Brazil from November 21, 2018 to December 20, 2018

Methods: Rectal swabs were collected from patients admitted in the ICUs and *C. difficile* was searched by RT-PCR at the time of admission. Subjects were then followed until discharge and evaluated for the development of diarrhea, death and other outcomes.

Results: Ninety-two patients were included in the study, of which 16 were colonized by *C. difficile* (17.3%). During follow-up, 18 patients developed diarrhea (19.6% of the sample). None had a diagnosis of colitis during hospitalization. There was no association between *C. difficile* colonization and diarrhea development (colonization rates in those who developed diarrhea was 22% and in those who did not develop 16%, $p = 0.508$). Diarrhea development and colonization were not associated with mortality. Patients colonized by *C. difficile* had a higher SAPS3 score.

Conclusion: In this study, using a method with high sensitivity for detection of *C. difficile*, there was no association between asymptomatic colonization and development of diarrhea.

Keywords: *Clostridiodes difficille*, Diarrhea, Pseudomembranous Colitis, ICU.

Introduction

Since 1978 *Clostridioides difficile* (CD) has been associated as the leading cause of antibiotic-associated colitis in hospital settings¹. More recently, new concerns have occurred with the emergence of hypervirulent strains (NAP1) and resistance to conventional treatments, being associated with the spread of new outbreaks with higher mortality rates and becoming the leading cause of healthcare-associated infection in the United States (US)^{2,3}. It is estimated that in 2011, only in US, there were 453,000 CD infections, associated with 29,300 deaths, and 30% were associated with hypervirulent strains^{4(p201)}. In Brazil, a point prevalence study estimates that 11.8% hospitalized patients with diarrhea may be associated with CD⁵. The disease spectrum is extremely variable, ranging from fulminant colitis to asymptomatic colonization⁶.

Asymptomatic colonization rates in hospitals range from zero to 25%. Meta-analysis on the topic identified only history of hospitalization as an independent factor associated with its occurrence⁷. There is no consensus in the literature on how to differentiate asymptomatic colonized from bacterial carriers⁸.

Multiple studies attempt to characterize factors associated with colonization and the development of severe infections, with conflicting results. But only 3 studies specifically evaluated it in an ICU environment, showing lower than overall rates, between zero and 3.1%⁹⁻¹¹.

Recently, with the widespread of molecular biology techniques, the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) as a diagnostic method is increasing, taking into account its high sensitivity rates. However, in scenarios of low probability of disease, it may lead to the diagnosis of infections in patients who are in fact asymptomatic colonized, reducing the positive predictive value. Moreover, the potential of this technique is still poorly studied in asymptomatic colonization scenarios¹²⁻¹⁴.

Therefore, asymptomatic colonization has been a challenge in clinical practice, as a confounding factor for the diagnosis of infection, and as a potential source for toxigenic strains spreading. The environment of ICU and its patients profile have several characteristics that make it possible to be colonized or infected. Nevertheless there are few studies in this population, particularly in developing countries¹⁵.

This study aims to evaluate asymptomatic colonization rates in patients admitted to intensive care units, as well as to characterize their associated factors and clinical outcomes. In addition, it seeks to be one of the first articles to perform this assessment in a South American country, where rates of colonization, infection and characterization of circulating strains are poorly known.

Methods

We conducted a prospective cohort study in the intensive care units (ICUs) of two tertiary teaching hospitals in Brazil. This study was approved by the local ethics committees. From all individuals who consented to participate in the study, rectal swab was collected for real time polymerase chain reaction (RT-PCR) to toxigenic strains of *Clostridioides difficile*. They were then followed until death or their hospital discharge for outcomes.

Adult patients admitted from November 21, 2018 to December 20, 2018 were included. Patients with diarrhea in the first 48 hours, ICU readmission, postoperative ICU hospitalization, previous colectomy or with refused participation were excluded.

After consent, rectal swabs were collected from individuals within the first 48 hours of hospitalization. If they had bowel movements during this period, a stool sample was also planned to be collected. The samples were then sent to the molecular biology laboratory for

RT-PCR toxigenic CD search. Subjects were followed until hospital discharge and the development of diarrhea and other clinical outcomes was recorded.

Diarrhea was characterized as the presence of 3 or more bowel movements in 24 hours in patients without obvious cause and not receiving laxatives.

Clostridioides difficile search was performed by multiplex RT-PCR developed by the previously validated molecular biology laboratory¹⁶.

For the sample size calculation, we estimated a 20% prevalence of CD colonization. We estimated that colonized patients would have a 30% rate of diarrhea, and a 3% rate in non-colonized patients⁷. Based on this estimated difference, with a power of 80% and alpha=5%, we reached a number of 90 individuals.

Data were collected in a specific collection instrument, analyzes were made using JMP 9 for Mac (SAS Institute, USA). Univariate analyses were performed using Fisher's exact tests for categorical variables, Student's t for continuous variables with normal distribution and Mann-Whitney tests for those with non-normal distribution. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Ninety-two patients were included in the study. Rectal swab was collected from all of them, in addition 18 patients also had stool sample collected. Of the total, 16 patients were colonized by toxigenic CD (17% of the patients included in the study).

Of the stool samples collected, 5 were positive, all of these patients also had positive swab, demonstrating the effectiveness of swab for detecting colonization.

Table 1 describes the characteristics of patients who developed or not diarrhea. This main outcome occurred in 18 patients (19.6% of the sample). In an univariate analysis, the

following were related to the development of diarrhea: receiving parenteral nutrition before or during ICU stay, ICU admission for sepsis, albumin on ICU admission, vasopressor use, length of stay in the ICU, total length of stay and omeprazole use in ICU. The antibiotics related to the development of diarrhea were oxacillin and ampicillin-sulbactam during ICU stay.

All were followed until hospital discharge with a median length of stay of 20 days (IQR 11-38). Other outcomes of patients who developed or not diarrhea can be found in Table 2. Patients who developed diarrhea had a longer hospital stay (17 days IQR: 10-28 versus 39 days IQR: 25-64, $p < 0.0001$).

Regarding the main objective of the study, no association was found between colonization by toxigenic CD and development of diarrhea, colonization rates in those who developed diarrhea was 22% and in those who did not develop it was 16% ($p = 0.508$). No patients were observed with a diagnosis or treatment for colitis by the attending physician during follow-up. The duration of diarrhea (median 6 days, IQR 2-10 versus median 9.5 days, IQR 3.5-22, $p=0.6288$) and time between swab collection and onset of diarrhea (median 5 days, IQR 3-9 versus median 35.5 days, IQR 12-73, $p=0.1084$) were the same between not colonized and colonized who develop diarrhea. The presence of diarrhea with fever, abdominal pain, abdominal distension, hypotension or mucus also were not different between not colonized and colonized.

Characteristics of CD-colonized patients are described in table 3. The only characteristic associated with toxigenic *Clostridioides* colonization was the average SAPS3 (65.68, SD15.42 versus 76.06, SD8.72; $p = 0.0026$).

Of the positive samples, 2 were characterized as probably hypervirulent CD strains (13% of colonized and 2% of total patients). These samples were not viable for culture

probably due to the small amount of material present in the swabs. Therefore, it was not possible to further characterize on a molecular level these samples.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate asymptomatic colonization rates in South America. Our study showed that 17% of the patients admitted to the ICUs evaluated were colonized by toxigenic CD.

In hospitalized patients the colonized rates are extremely varied in the literature. One of the first studies in this subject was performed in Minneapolis and found a colonization rate of 21% in inpatient units¹⁷. The largest study that evaluated asymptomatic colonization did so in Canadian hospitals and found 4.4% colonization rates¹⁸. Published meta-analysis on the subject evaluated 19 studies with 8725 patients, showed a colonization rate of 8%, with rates ranging between zero and 24% in the evaluated studies, most of which used cultures and toxigenic documentation to characterize colonization⁷.

Data are scarce on colonization in ICU patients. Since ICU patients have multiple risk factors for colonization, including prolonged hospitalization, antibiotic use and severity factors, it is expected that they have higher rates of colonization. The main prospective study in this specifically population found rates of 3.1% in Baltimore, USA⁹, 1.7% in China¹⁰ and none in Kuwait¹¹.

Our rates were much higher than those described in ICUs in the literature. This may be mainly due to two causes: ICU colonization rates are actually higher due to their inherent factors, or, due to a particularity of our study, the method used for CD research, RT-PCR in rectal swabs, being extremely sensitive, may have significantly increased the amount of diagnosis of patients with small toxigenic germ innocuous in their digestive tract. This fact is

reinforced by the result of the culture performed in the positive samples in our study, of the 18 swab and 5 stool positive samples, only 2 were viable for culture, making evident the RT-PCR ability to detect more cases than the culture¹⁹.

At least since 1981, asymptomatic colonization has been described as a complicating factor for diagnosis of CD colitis. *George et al.* testing toxigenic cultures, described their low sensitivity and specificity for the true identification of cases where toxigenic CD are causing infections²⁰. Recent studies also corroborate this hypothesis, when asymptomatic colonization was investigated by the analysis of feces formed from cancer patients *Vaughn et al.* found 7% of patients colonized by NAAT that presented negative culture²¹.

Several factors related to the severity of the patients were found in our data as associated with the development of diarrhea, such as receiving parenteral nutrition before or during ICU stay, ICU stay for sepsis, albumin on ICU admission, vasopressor use, length of stay in the ICU, total length of stay, use in ICU of omeprazole, ampicillin-sulbactam or oxacillin. The high rate of diarrhea in ICU patients receiving omeprazole is noteworthy, fact already described in other studies that may be a confounding factor for the diagnosis of ICD²²⁻²⁴.

In our sample there was no association between CD colonization and the development of diarrhea. This may be due to several factors. Our estimates used for sample size calculation were appropriate regarding the colonization rates and the rate of development of diarrhea in colonized, but the rate of diarrhea among the non-colonized was higher and may be a limiting factor for the associative power of this study. Considering the colonization rates found of 22% in those who developed diarrhea and 16% in those who did not, we would need 2,150 individuals to find some statistical difference, which would also reduce the clinical significance of this finding.

A recent study conducted at a single center in Israel also used RT-PCR to assess asymptomatic colonization earlier, comparing to our study, when patients arrived at the hospital. In this study rates of 3.4% of colonized were found, of which only 3.7% developed disease. In this study there was statistical significance due to its large sample size of 2,368 individuals, of which only 3 were colonized and developed CD infection, suggesting a low clinical impact of colonization when diagnosed by RT-PCR in swabs²⁵.

Studies that attempted to assess factors associated with CD colonization found factors such as age, recent hospitalization, use of chemotherapy, corticosteroid use, proton pump inhibitors, H2 inhibitors, prior CD infection, chronic renal failure, antibiotic exposure^{18,26–28}. In our study all these characteristics were evaluated, and none was a predictor of colonization. However, the SAPS3 score was significantly associated. To our knowledge this is the first study to make this association.

It is noteworthy that none patient was diagnosed or treated with CD colitis despite the high colonization rate. One possible hypothesis is that the diagnosis of infection is not being made, however, all patients were followed until death or hospital discharge, there were the same mortality rates and length of hospital stay between the colonized and non-colonized.

We found a rate of 13% of probable hypervirulent strains, these strains classically present higher mortality rates demonstrating the importance of their correct identification. Like other studies, ours could not perform molecular characterization of the samples, but there is evidence that, in addition to the traditional hypervirulent strains, circulate among us other strains of this same clade^{29–33}. Recently, in the same city where our study was conducted, the presence of circulating hypervirulent strains was described, DNA sequencing was performed and classified as ST67, belonging to clade 2, associated with worse prognoses^{5,34}.

The use of NAAT alone for the diagnosis of CD infection proves to be flawed, mainly because it is related to the diagnosis of high colonization rates requiring small innocuous to demonstrate positivity, a fact well characterized by our data. Our study reinforces information from the latest CD diagnosis guidelines³⁵⁻³⁷ that do not recommend the use of RT-PCR alone for diagnosis, and recommend the use of a multistep algorithm that includes clinical presentation, rapid testing, and toxin detection. In our study, if all patients who had diarrhea and were positive on the test performed were treated, we would have treated 4 individuals, probably without clinical benefit. Despite this, there is a growing use of RT-PCR alone and in some cases even lacking adequate clinical presentation for diagnosis, a recent study conducted with members of the *Emerging Infections Network of the Infectious Diseases Society* has shown that in pediatric populations, 62% of physicians use RT-PCR alone and 7% perform the test even on solid stools¹².

There is a clear association in the literature between asymptomatic colonized patients and infection in other patients. These colonizers could be the disseminators of toxigenic strains in the hospital environment⁸. Studies comparing strains of colonized and infected patients show a clear correlation, but again, there is no data when using very sensitive methods for colonization such as RT-PCR and how the real potential of these small colonized patients has to spread CD^{16,38}.

Our study has some limitations, as already mentioned, the slight difference between the rates of diarrhea of colonized and non-colonized may have limited the power of the study. Being a prospective study, we reduced the possibility of reporting bias, but still, the diarrhea measurement depended on the registration by the care team. The fact that we used a very sensitive test to detect small innocuous certainly interfered with the study results. However, as this method is increasingly being used, we demonstrate extremely important

findings that meet the most recent recommendations. In addition, we obtained a small number of stool samples, which impede the culture and molecular characterization of strains.

Conclusions

In our study we found asymptomatic colonization rates of 17% by toxigenic CD using a sensitive method for diagnosis. Despite this rate, we did not observe cases of CD colitis and any correlation between colonization and the development of diarrhea, length of stay or death. Our results reinforce the current recommendation for diagnosis of CD infection to use multistep algorithm that includes clinical presentation, rapid testing and toxin detection. In addition, we found a high prevalence of colonization and a significant presence of hypervirulent strains in our region. These findings should be better evaluated, considering possible impacts on treatment and infection control.

Acknowledges

Financial support: This work was funded by the Research and Events Incentive Fund (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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

References

1. Bartlett JG, Moon N, Chang TW, Taylor N, Onderdonk AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*. 1978;75(5):778-782.
2. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA. The Roles of *Clostridium difficile* and Norovirus Among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1999–2007. *Clin Infect Dis*. 2012;55(2):216-223.
3. Dubberke E. *Clostridium difficile* infection: The scope of the problem. *J Hosp Med*. 2012;7(S3):S1-S4.
4. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, et al. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *N Engl J Med*. 2015;372(9):825-834.
5. Pires RN, Falci DR, Monteiro AA, et al. High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2019;40(4):484-485.
6. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(10):609-620.
7. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Pliakos EE, Ziakas PD, Mylonakis E. Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(3):381.
8. Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1).

9. Tschudin-Sutter S, Carroll KC, Tamma PD, et al. Impact of Toxigenic *Clostridium difficile* Colonization on the Risk of Subsequent *C. difficile* Infection in Intensive Care Unit Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36(11):1324-1329.
10. Zhang X, Wang X, Yang J, Liu X, Cai L, Zong Z. Colonization of toxigenic *Clostridium difficile* among ICU patients: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1).
11. Rotimi VO. Prevalent PCR ribotypes of clinical and environmental strains of *Clostridium difficile* isolated from intensive-therapy unit patients in Kuwait. *J Med Microbiol.* 2003;52(8):705-709.
12. Kociolek LK, Kutty PK, Polgreen PM, Beekmann SE. Healthcare provider diagnostic testing practices for identification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in children: an Emerging Infections Network survey. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019;40(3):276-280.
13. Dubberke ER, Han Z, Bobo L, et al. Impact of clinical symptoms on interpretation of diagnostic assays for *Clostridium difficile* infections. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2887-2893.
14. Dubberke ER, Reske KA, Seiler S, Hink T, Kwon JH, Burnham C-AD. Risk Factors for Acquisition and Loss of *Clostridium difficile* Colonization in Hospitalized Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4533-4543.
15. Pires RN, Monteiro AA, Carneiro LC, et al. *Clostridium difficile* infection in Brazil: A neglected problem? *Am J Infect Control.* 2014;42(4):459-460.

16. Kilic A, Alam MJ, Tisdell NL, et al. Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. *Ann Lab Med*. 2015;35(3):306.
17. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis*. 1992;166(3):561–567.
18. Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, et al. Host and Pathogen Factors for *Clostridium difficile* Infection and Colonization. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1693-1703.
19. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, et al. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):889-893.
20. George WL, Rolfe RD, Finegold SM. *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. *J Clin Microbiol*. 1982;15(6):1049-1053.
21. Vaughn JL, Balada-Llasat J-M, Lamprecht M, et al. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* colonization in patients admitted to the hospital for chemotherapy or haematopoietic cell transplantation. *J Med Microbiol*. 2018;67(7):976-981.
22. Park YH, Seong JM, Cho S, et al. Effects of proton pump inhibitor use on risk of *Clostridium difficile* infection: a hospital cohort study. *J Gastroenterol*. June 2019.
23. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, et al. Risk Factors for Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(4):452-460.

24. Trifan A, Stanciu C, Girleanu I, et al. Proton pump inhibitors therapy and risk of Clostridium difficile infection: Systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(35):6500-6515.
25. Meltzer E, Smollan G, Huppert A, et al. Universal screening for Clostridioides difficile in a tertiary hospital: risk factors for carriage and clinical disease. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(9):1127-1132.
26. Kong LY, Dendukuri N, Schiller I, et al. Predictors of asymptomatic Clostridium difficile colonization on hospital admission. *Am J Infect Control.* 2015;43(3):248-253.
27. Czepiel J, Drózdź M, Pituch H, et al. Clostridium difficile infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(7):1211-1221.
28. Poirier D, Gervais P, Fuchs M, et al. Predictors of Clostridioides difficile Infection Among Asymptomatic, Colonized Patients: A Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis.* July 2019.
29. Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG, et al. Molecular epidemiology of Clostridioides (previously Clostridium) difficile isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe.* 2019;56:34-39.
30. Balassiano IT, Miranda KR, Boente RF, et al. Characterization of Clostridium difficile strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe.* 2009;15(3):61-64.
31. Balassiano IT, Yates EA, Domingues RMCP, Ferreira EO. Clostridium difficile: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol.* 2012;61(2):169-179.

32. de Almeida Monteiro A, Pires RN, Persson S, Filho EMR, Pasqualotto AC. A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(6):672-674.
33. Lopes Cançado GG, Silveira Silva RO, Rupnik M, et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Anaerobe*. 2018;54:65-71.
34. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39(03):371-373.
35. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis*. February 2018.
36. Loo VG, Davis I, Embil J, et al. Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada treatment practice guidelines for *Clostridium difficile* infection. *Off J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can*. 2018;3(2):71-92.
37. Shane AL, Mody RK, Crump JA, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis*. October 2017.
38. Halstead FD, Ravi A, Thomson N, et al. Whole genome sequencing of toxigenic *Clostridium difficile* in asymptomatic carriers: insights into possible role in transmission. *J Hosp Infect*. 2019;102(2):125-134.

Tables

Table 1 - Baseline characteristics of patients included in the study, according to outcome (development of diarrhea during clinical follow-up).

	Without diarrhea 74 patients (80.4%)	Develop diarrhea 18 patients (19.6%)	p
Hospital			
Hospital1 (%)	39(52.7)	8(44.44)	0.604
Hospital2 (%)	35(47.3)	10(55.56)	
Age - mean (SD)	63.57(12.4)	59.28 (12.4)	0.183
Gender - Female (%)	36(48.65)	6(33.33)	0.297
Origin			
Inpatient (%)	23 (31.08)	4 (22.22)	0.13
Emergency (%)	42 (56.76)	8 (44.44)	
Post-anesthesia unit (%)	1 (1.35)	0	
External transfer (%)	7 (9.46)	6 (33.33)	
Other	1 (1.35)	0	
Hospitalization in the last 12 months (%)	30 (40.54)	5 (27.78)	0.42
HIV (%)	5 (6.76)	2 (11.11)	0.619
Inflammatory bowel disease (%)	1 (1.35)	1 (5.56)	0.355
Heart failure (%)	24 (32.43)	3 (11.11)	0.254
Hypertension (%)	49 (66.22)	9 (50)	0.276
Diabetes (%)	26 (35.14)	5 (27.78)	0.782
Solid Cancer (%)	13 (17.57)	4 (22.22)	0.736
Hematologic Cancer (%)	7 (9.46)	1 (5.56)	1
Parenteral nutrition previously to ICU	0	2 (11.11)	0.037
Medications used previously to ICU			
Omeprazole (%)	22 (29.73)	8 (44.44)	0.268
Ranitidine (%)	13 (17.57)	2 (11.11)	0.727
Corticosteroid (%)	12 (16.22)	1 (5.56)	0.451
Reason to admission in ICU			
Sepsis (%)	37 (50)	15 (83.33)	0.016
Respiratory failure (%)	43 (58.11)	10 (55.56)	1

Gastrointestinal bleeding (%)	2 (2.7)	0	1
Sensory alteration (%)	29 (39.19)	11 (61.11)	0.115
Acute coronary syndrome (%)	7 (9.46)	0	0.338
Exams in ICU admission			
Leukocytes - median /mm ³ (IQR)	10820 (8090-14670)	10710 (6260-28370)	0.5467
Neutrophils - median /mm ³ (IQR)	8653 (5852-11890)	9100 (5972-26660)	0.3918
Albumine - median g/dL (IQR)	3.1 (2.8-3.5)	2.45 (2.25-2.85)	0.0128
Bilirrubine - median mg/dL (IQR)	0.61 (0.3-1.38)	0.485 (0.3-1.08)	0.5051
Time between hospital admission and transfer to ICU in days - median (IQR)	1(0-4)	0(0-2)	0.1411
SAPSIII at ICU admission - Mean (SD)	64.43(15.52)	70.83(14.29)	0.1148
Antibiotics used previously to ICU			
Without use (%)	36 (48.65)	9 (50)	1
Amoxicilin-Clavulanate (%)	7 (9.46)	2 (11.11)	1
Piperacilin-Tazobactam (%)	11 (14.86)	5 (27.78)	0.295
Cephalosporine (%)	19 (26)	2 (9)	0.228
Ampicilin-Sulbactam (%)	5 (6.67)	2 (11.11)	0.619
Meropenem (%)	3 (4.05)	1 (5.56)	1
Vancomicine (%)	6 (8.11)	2 (11.11)	0.652
Clindamicin (%)	0	1 (5.56)	0.196
Colonized with toxigenic Clostridióides (%)	12 (16)	4 (22)	0.508
Medications received in ICU			
Omeprazole (%)	32 (43.24)	16 (88.89)	<0.001
Ranitidine (%)	20 (27.03)	6 (33.33)	0.574
Corticosteroid (%)	31 (41.89)	10 (24.39)	0.428
Nasoenteral tube feeding (%)	51 (77.27)	15 (83.33)	0.261
Parenteral nutrition in ICU(%)	1 (1.35)	3 (16.67)	0.023
Mechanical ventilation in ICU (%)	56 (75.68)	14 (77.78)	1
Vasopressor in ICU (%)	47 (63.51)	16 (88.89)	0.048
Time in ICU - median (IQR)	4.5(2-10)	7.5(4-24)	0.0192

Antibiotics used in ICU			
Without use (%)	24 (32.43)	2 (11.11)	0.086
Amoxicilin-Clavulanate (%)	7 (9.46)	1 (5.56)	1
Piperacilin-Tazobactam (%)	17 (22.97)	7 (38.99)	0.141
Cephalosporin (%)	20 (27)	3 (16.67)	0.545
Ampicilin-Sulbactam (%)	5 (6.76)	5 (27.78)	0.022
Oxacilin (%)	0	2 (11.11)	0.037
Meropenem (%)	13 (17.57)	7 (38.89)	0.061
Vancomicine (%)	16 (21.62)	4 (22.22)	1
Polymixin (%)	9 (12.16)	4 (22.22)	0.274
Clindamicina (%)	2 (2.7)	1 (5.56)	0.484

Table 2 - Outcomes of patients who developed or not diarrhea

	Without diarrhea 74 patients (80.4%)	Develop diarrhea 18 patients (19.6%)	p
Readmission in ICU (%)	6 (11.4)	3 (20)	0.407
Death (%)	28 (37.84)	4 (22.22)	0.276
Total time of hospitalization in days - Median (IQR)	17(10-28)	39.5(25-64)	0.0001

Table 3 - Characteristics of colonized patients.

	Total 92 patients	Colonized with CD 16 patients	p
Hospital			
Hospital1 (%)	47 (51)	9 (56.25)	0.785
Hospital2 (%)	45 (48.9)	7 (43.75)	
Age - mean (SD)	62.72 (12.21)	65.56(12.61)	0.3087
Gender			
Male (%)	50 (54.3)	11 (68.3)	0.272
Female (%)	42 (45.6)	5 (31.5)	
Hospitalization in the last 12 months (%)	35 (38.04)	5 (31.25)	0.586
Origin			
Inpatient (%)	27(29.3)	2 (12.5)	0.386
Emergency (%)	50 (54.3)	10 (62.5)	
Post-anesthesia unit (%)	1 (1)	0	
External transfer (%)	13 (14.1)	4 (25)	
Other (%)	1 (1)	0	
HIV (%)	7 (7.6)	2 (12.5)	0.601
Fecal incontinence (%)	6 (6.5)	2 (12.5)	0.279
Inflammatory bowel disease (%)	2 (2.1)	0	1
Heart failure (%)	27 (29.3)	3 (18.75)	0.379
Hypertension (%)	58 (63)	7 (43.75)	0.093
Diabetes (%)	31 (33.7)	6 (37.5)	0.775
Solid neoplasia (%)	17 (18.4)	3 (18.75)	1
Hematologic cancer (%)	8 (8.7)	0	0.342
Cirrosis (%)	10 (10.8)	3 (18.75)	0.37
Renal failure (%)	8 (8.7)	1 (6.25)	1
Medications used previously to ICU			
Omeprazole (%)	30 (32.6)	5 (31.25)	1
Ranitidine (%)	15 (16.3)	2 (12.5)	1
Corticosteroid (%)	13 (14.1)	2 (12.5)	1
Use of parenteral nutrition before ICU (%)	2 (2.1)	0	1
Reason to admission in ICU			
Sepsis (%)	52 (56.5)	10 (62.5)	0.782

Respiratory failure (%)	53 (57.6)	9 (56.25)	1
Gastrointestinal bleeding (%)	2 (2.1)	0	1
Sensory alteration (%)	40 (43.4)	9 (50)	0.59
Acute coronary syndrome (%)	7 (7.6)	2 (12.5)	0.601
Exams in ICU admission			
Leukocytes - median /mm ³ (IQR)	10820 (8010-15570)	11375 (8320-16715)	0.8552
Neutrophiles - median /mm ³ (IQR)	8726 (5852-12010)	9000 (6760-11695)	0.5742
Albumine - median g/dL (IQR)	3 (2.5-3.5)	2.4 (2.3-3)	0.2174
Bilirrubine - median mg/dL (IQR)	0.585 (0.3-1.28)	1.08 (0.31-2)	0.2026
SAPSIII - mean (DP)	65.68(15.42)	76.06(8.72)	0.0026
Previous exposure to antibiotics (%)	47 (51)	8 (50)	1
Hospitalization time in days - median(IQR)	20(11-38)	18(9.5-54)	0.211
Death	32 (34.78)	5 (31.25)	1

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nosso estudo é o primeiro a avaliar colonização assintomática no Brasil e um dos primeiros do mundo a realizar esta avaliação em UTI. Encontramos uma taxa de colonização por *C. difficile* de 17%, valores maiores do que os encontrados na literatura em UTI e em pacientes hospitalizados.
- Apesar de altas taxas colonização assintomática não houve nenhum caso de ICD na amostra, fato que pode dever-se a diversos fatores, desde a utilização de teste muito sensíveis para identificação de pequenos inócuos, até falhas no diagnóstico ou algum fator local que confira proteção contra a evolução do estado de colonizado assintomático para infectado.
- Identificamos que 13% das cepas de *C. difficile* circulantes nesta população provavelmente são hipervirulentas. Este dado soma-se a outros estudos recentes que começaram a identificar cepas com maior potencial de gravidade em nosso meio. Este achado tem importantes implicações no tratamento, prognóstico e medidas de bloqueio epidemiológico para as instituições.
- Este estudo dá mais robustez às recomendações dos *guidelines* atuais para diagnóstico de ICD, devendo-se utilizar técnicas de RT-PCR de forma isolada apenas em populações com alta probabilidade de infecção. Seu uso em populações com baixa probabilidade pré teste resultará em redução do valor preditivo positivo devido ao possível efeito confundidor da colonização assintomática.
- Identificamos pela primeira vez que o escore SAPS3 está associado com colonização assintomática. Fato já esperado, tendo em vista estudos prévios já terem demonstrado que pacientes com maior gravidade tem maiores chances de colonização, porém, nosso estudo é o primeiro a documentar esta associação.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Novos estudos são mandatários para classificar especificamente quais são as cepas circulantes em nossos hospitais.
- Devem ser testadas as hipóteses para as baixas taxas de conversão de colonizado assintomático em infectado.
- Não está claro qual o papel do colonizado assintomático como foco de disseminação de cepas toxigênicas no ambiente hospitalar.

9. ANEXOS

9.1 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Clostridium difficile, colonização assintomática em UTI e seus desfechos clínicos

Pesquisador: Diego Rodrigues Falci

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 89048218.5.1001.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.060.525

Apresentação do Projeto:

Clostridium difficile é um bacilo, anaeróbio, gram positivo, produtor de toxinas. Estas toxinas, em pacientes com certas características, irão desenvolver uma síndrome diarreica que pode variar de apenas alguns episódios de fezes pastosas até colite fulminante. Estima-se uma proporção elevada de carreadores assintomáticos na população, principalmente em ambientes de atenção à saúde. Estes colonizados poderiam ser uma fonte de disseminação da bactéria, com possível impacto em pacientes hospitalizados. Este estudo tem o objetivo de avaliar o efeito da colonização por C. difficile e seu impacto em desfechos clínicos na internação hospitalar. Será realizado um estudo de coorte em pacientes críticos avaliando a colonização por C. difficile verificada por teste molecular em pacientes admitidos a UTI. Serão avaliados a ocorrência de CDI com diarreia, o tempo de hospitalização na UTI, o uso de antibioticoterapia, a letalidade geral, e o custo estimado do paciente. Os pacientes serão acompanhados por toda a internação hospitalar.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

Avaliar qual o papel da colonização assintomática por C. difficile para o desenvolvimento de desfechos clínicos em pacientes que internam em UTI em hospitais terciários no Sul

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.060.525

do Brasil.

Objetivos específicos:

- Quantificar a prevalência de colonizados assintomáticos.
- Observar se a colonização assintomática é fator de risco para desenvolvimento de ICD.
- Avaliar fatores relacionados ao desenvolvimento de ICD em colonizados assintomáticos.
- Avaliar se a colonização assintomática é fator de risco para o desenvolvimento de outros desfechos (morte, tempo de hospitalização, reinternação em UTI).
- Quantificar prevalência de colonizados pela cepa BI/NAP1/027.
- Avaliar as cepas circulantes de *C. difficile* pela sua tipificação molecular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não são conhecidos riscos diretos pela participação nesta pesquisa, apenas possível desconforto associado à coleta do material (fezes).

Caso seja identificada a bactéria no trato digestivo do sujeito de pesquisa, o médico responsável e controle de infecção hospitalar serão informados e caberá a eles tomarem qualquer decisão. Porém, também serão alertados de que não há nenhum benefício descrito na literatura da realização de qualquer intervenção/tratamento nos casos de positividade.

Benefícios:

Não haverá benefício direto pela participação neste estudo. Porém, os dados estarão contribuindo para o melhor entendimento e tratamento de uma doença importante nos hospitais e de acordo com os resultados encontrados auxiliará o tratamento de outros doentes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda 02 submetida em 27/11/2018.

Justificativa:

"Foi incluído novo centro recrutador de pacientes para a pesquisa, o Hospital Santa Cruz, localizado no município de Santa Cruz do Sul.

Também foram incluídos novos pesquisadores apoiadores para a pesquisa.

O centro de Santa Cruz do Sul seguirá todos os procedimentos previamente descritos e encaminhará as amostras semanalmente para Porto Alegre, para isso as amostras serão congeladas conforme orientações do laboratório de microbiologia molecular mantendo-se a sua validade. Terá como responsável Marcelo Carneiro.

Encaminhamos projeto com os acréscimos grifados e subtrações taxadas."

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.060.525

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram adicionados os seguintes documentos:

- Justificativa
- Nova versão do projeto de 27/11/2018

Recomendações:

* Solicitamos que seja enviado via Notificação o Formulário de Delegação de Funções incluindo os pesquisadores adicionados que atuarão no centro HCPA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda 02 submetida em 27/11/2018 aprovada, inclui Projeto de 27/11/2018, adiciona centro participante e atualiza equipe de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1264709 E2.pdf	27/11/2018 19:44:49		Aceito
Outros	emenda.docx	27/11/2018 19:41:20	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Clostridium.pdf	27/11/2018 19:38:43	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	17/10/2018 20:42:50	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Outros	relatparcial.pdf	17/10/2018 20:40:57	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Outros	cartarespostacep15102018.docx	17/10/2018 20:35:31	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Outros	cartaalteracoescep.docx	13/09/2018 14:38:54	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	10/09/2018 15:44:02	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
Outros	projetotaxado.pdf	10/09/2018 10:45:13	Marcio Fernando Spagnol	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoconsentimentorepons.pdf	10/09/2018 10:44:28	Marcio Fernando Spagnol	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 3.060.525

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoconsentimentopct.pdf	10/09/2018 10:43:33	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	carta2.pdf	07/06/2018 17:50:13	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	carta1.pdf	07/06/2018 17:49:57	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	cartarespostacep.docx	07/06/2018 17:49:11	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	delegacaofuncoescorreto.pdf	03/05/2018 14:55:23	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	02/05/2018 12:31:53	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	instrumento.pdf	01/05/2018 11:00:04	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Usodados.pdf	01/05/2018 10:58:59	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Dadosinst.pdf	01/05/2018 10:58:45	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Materialbiologico.pdf	01/05/2018 10:58:14	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	lattesmarcio.pdf	01/05/2018 10:57:09	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	lattesgabriele.pdf	01/05/2018 10:56:42	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	lattesdiego.pdf	01/05/2018 10:56:09	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	lattesAndreza.pdf	01/05/2018 10:55:50	Marcio Fernando Spagnól	Aceito
Outros	lattesalexandro.pdf	01/05/2018 10:55:32	Marcio Fernando Spagnól	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.060.525

PORTO ALEGRE, 06 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Página 05 de 05

9.2 Checklist STROBE

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cohort studies*

	Item No	Recommendation	
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	Página 38 Página 39
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	Página 40
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	Página 41
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	Página 41
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	Página 41
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up (b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed	Página 41 NA
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	Página 42
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	Página 42
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	Página 42
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	Página 42
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	Página 42
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed (e) Describe any sensitivity analyses	Página 42 Página 42 Página 42 NA NA
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram	Página 42 Página 42 NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	Página 43 Página 43 Página 43
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time	Página 43
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	Página 43 NA NA

Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	Página 43
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	Página 44
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	Página 47
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	Página 47
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	Página 48
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	Página 49

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at <http://www.strobe-statement.org>.