

Artigo de Revisão Bibliográfica
Mestrado Integrado em Medicina

CLOSTRIDIUM DIFFICILE- UMA AMEAÇA RENOVADA

Luís Filipe Pires Martins

Dra. Elsa Maria Calado
(Prof. Auxiliar Convidada de Microbiologia Médica)

Porto 2009

RESUMO

Introdução

O *Clostridium difficile* é um bacilo gram-positivo, toxigénico e principal responsável pela diarreia associada a antibióticos que abrange um espectro de diferentes manifestações, desde uma simples diarreia até situações com perigo de vida.

Objectivo

O principal objectivo desta revisão é fornecer uma actualização do conhecimento acerca deste patogéneo. Actualmente evidencia-se a necessidade premente de conjugar os novos dados epidemiológicos e microbiológicos, bem como nas áreas do diagnóstico, tratamento, prevenção e controlo, com aqueles já adquiridos. Pretende-se, assim, esclarecer e transmitir de forma fundamentada informação significativa e útil para a prática clínica.

Desenvolvimento

A doença associada ao *Clostridium difficile* acarreta elevados custos para os sistemas de saúde. O desafio do seu diagnóstico é aumentado pelas suas crescentes incidência, severidade e morbimortalidade, em parte associadas à emergência de uma estirpe hipervirulenta (NAP1/BI/027) resistente às fluoroquinolonas; pela sua recente capacidade de alcançar novas subpopulações, anteriormente consideradas de baixo risco; e pelo reconhecimento de novos factores de risco. O diagnóstico baseia-se primariamente na suspeita clínica, socorrendo-se de métodos laboratoriais imperfeitos ou endoscópicos de utilização restrita. O tratamento com metronidazole é também alvo de escrutínio pela comunidade científica devido à sua diminuída eficácia em casos mais severos, que alerta para a necessidade da estratificação da gravidade da doença e da utilização inicial

da vancomicina. Além disso, a sua alta taxa de recorrência determina a relevância de antibioterapia alternativa e de novas modalidades terapêuticas (pré/probióticos, imunoterapia e bacterioterapia). O controlo e prevenção são basilares, suportando-se em duas abordagens: o uso restritivo de antibióticos e a implementação atempada e sistemática de medidas de prevenção.

Conclusão

A infecção por *Clostridium difficile* é um problema global com várias faces, colocando desafios cada vez mais difíceis, que exigem uma constante actualização e consciência afim de reduzir o risco de doença e implementar o correcto tratamento dos pacientes.

Palavras-chave:

Antibióticos; *Clostridium difficile*; Colite; Diarreia; Estirpe (NAP1/BI7027); Infecção associada aos cuidados de saúde (IACS)

Introdução

Doença Associada ao *Clostridium difficile* (DACD)

Uma das principais complicações da antibioterapia é a diarreia. Aproximadamente ¼ dos doentes a fazer esta terapia sofrem de diarreia, especialmente aqueles com idade avançada e com estado de saúde debilitado. O agente patogénico mais frequentemente detectado é o *Clostridium difficile*, responsável por cerca de 25% das diarreias associadas a antibióticos, originando quase todas as suas manifestações graves (McFarland, 1998; e Wistrom *et al*, 2002). A infecção por *C.difficile* pode apresentar-se de várias formas: desde portador assintomático, passando por uma diarreia ligeira auto-limitada, até formas mais graves como a colite pseudo-membranosa (Hurley e Nguyen, 2002). Surge, então, o termo Doença Associada ao *Clostridium difficile* (DACD) para descrever as suas manifestações sintomáticas.

O *C.difficile* é um bacilo anaeróbio, gram-positivo, formador de esporos. Foi isolado pela primeira vez nas fezes de um recém-nascido saudável em 1935 por Hall e O'Toole. Os recém-nascidos não possuem uma microflora intestinal estabelecida, podendo estar colonizados por este agente. Contudo, raramente têm diarreia, possivelmente pela ausência do enteroreceptor para as suas toxinas, ainda não expressado no intestino imaturo.

As suspeitas iniciais de colite associada a antibióticos envolviam maioritariamente doentes cirúrgicos atribuindo-se a responsabilidade ao *S.aureus*. Só em 1974, Tedesco *et al* relacionaram o uso de antibióticos com a DACD, mediante um estudo prospectivo de 200 indivíduos, aos quais foi administrada clindamicina, onde se observou que 41 apresentaram diarreia e 20 colite pseudomembranosa. Em 1978, Bartlett *et al* identificou o *C.difficile* como a causa da colite pseudomembranosa; três anos depois foram descritas as toxinas A e B. O ensaio da citotoxina tornou-se o teste de diagnóstico padronizado e a vancomicina o tratamento recomendado.

Durante as décadas de 80 e 90, a incidência de DACD aumentou nos países desenvolvidos. Actualmente, tem-se verificado um aumento no número de

casos e da gravidade em determinadas zonas geográficas, como na América do Norte e na Europa ocidental, atribuível ao uso indiscriminado de antibióticos e à antibioterapia prolongada, assim como à emergência de uma estirpe hipervirulenta de *C.difficile* (NAP1/BI/027).

O *C.difficile* exemplifica a capacidade de patogéneos já conhecidos, emergirem com uma virulência aumentada, desafiando os cientistas a explicar o seu ressurgimento, os clínicos a repensar as suas práticas, e os peritos de saúde pública a encontrar novas medidas para limitar a sua disseminação (Bartlett, 2005).

Epidemiologia

A taxa de portadores assintomáticos de *C.difficile* na população saudável é bastante variável. Entre os recém-nascidos varia entre 15% e 70%, enquanto na população adulta, encontramos uma média de 3% na Europa, atingindo um valor de 15% no Japão. Essa taxa apresenta-se mais alta nos indivíduos hospitalizados variando entre 15% a 25% (Viscidi *et al*, 1981; McFarland *et al*, 1989; Brazier, 1998; e Mulligan *et al*, 2008). Embora a maioria dos casos de infecção sintomática por *C.difficile* ocorra num contexto hospitalar, não é negligenciável que esta também possa ser adquirida na comunidade. Segundo um estudo de Riley *et al* (1995), baseado na análise de 580 espécimes de fezes provenientes da população extra-hospitalar, detectou-se a presença de estirpes toxigénicas de *C.difficile* em 10,7% das amostras, fazendo deste agente o segundo patogéneo entérico mais prevalente, depois do *Campylobacter spp*. Um relatório recente belga sustenta que 1/3 dos casos de DACD reportados não ocorreram em ambiente hospitalar (Lambert *et al*, 2008).

No que diz respeito à transmissão desta infecção, há que salientar que, por um lado, a forma de contágio por excelência deste patogéneo é a transmissão de um doente a outro por via fecal-oral. A colonização dos doentes relaciona-se com a duração do tempo de internamento. Em 20% dos casos, esta ocorre na primeira semana de hospitalização, calculando-se que em 50% esta se dá depois da quarta semana (McFarland *et al*, 1989). Os portadores assintomáticos, hospitalizados por outros motivos, são potenciais reservatórios, podendo transmitir o *C.difficile* a doentes susceptíveis (Schroeder, 2005).

Sanitários, mobiliário do hospital, dispositivos médicos e outros instrumentos, os uniformes e o calçado constituem os reservatórios principais de disseminação deste patógeno (Johal *et al*, 2004).

Recentemente, têm-se estudado animais como fontes potenciais de transmissão da doença, identificando-se animais domésticos (cães, gatos) e outros, com um contacto próximo com o Homem (cavalos, porcos e vacas) como reservatórios do *C.difficile* (Baverud, 2002; Songer e Anderson, 2006; e Hammit *et al*, 2007).

Factores de Risco

Para a aquisição de DACD apontam-se três factores essenciais: a) perturbação da resistência à colonização do intestino, b) exposição ao *C.difficile*, c) estado imunitário do hospedeiro debilitado.

Populações com risco aumentado

Normalmente, a DACD afecta doentes idosos e debilitados. No entanto, a referência a doentes jovens sem patologia prévia, que não foram expostos a antibióticos ou a um ambiente hospitalar, levou o Center for Disease Control and Prevention (CDC) a alertar que, hoje em dia, existe um risco real de infecção por *C.difficile* em populações consideradas anteriormente de baixo risco. O único factor de risco evidente nalguns casos pediátricos foi o contacto próximo com doentes com DACD, realçando, assim, a importância da transmissão directa entre pessoas (CDC, 2005).

Idade

Estudos recentes demonstram que a DACD, é mais grave e mortal, em pessoas com mais de 65 anos (Pépin *et al*, 2004; e McDonald *et al*, 2005).

Exposição a Antibióticos

A antibioterapia, já anteriormente referida, é o principal factor risco para a DACD, estando presente em 96% dos casos. Pode ter início aos 4-9 dias

após a descontinuação da antibioterapia, e surgir até às 8 semanas (Schroeder, 2005).

Alguns antibióticos aparentam uma maior propensão a causar doença, especialmente aqueles de largo espectro de acção, contudo as tendências têm variado ao longo do tempo (Monaghan *et al*, 2009). Os mais frequentemente implicados são as fluoroquinolonas, clindamicina, cefalosporinas e penicilinas. No entanto, praticamente todos os antibióticos podem predispor à DACD, incluindo o metronidazol e a vancomicina, os preconizados no tratamento da referida doença. De modo geral, os antibióticos que mais associados à DACD são os que têm menor absorção por via oral e maior excreção hepatobiliar (Cramer *et al*, 2008).

Foi relatado um caso de colite por *C.difficile* associada ao tratamento com valaciclovir, o que destaca a possibilidade da implicação dos antivíricos na DACD (De Andrés *et al*, 2004).

O risco relativo de DACD após antibioterapia aumenta particularmente quando a estirpe é resistente ao antibiótico. Por exemplo, o uso da clindamicina foi considerado um factor de alto risco no seguimento de um surto de uma estirpe resistente a este antibiótico em várias regiões dos Estados Unidos (Gerding, 2004).

Apesar de haver um aumento generalizado na resistência do *C.difficile* aos antibióticos, actualmente a maior preocupação é a resistência da estirpe 027 às fluoroquinolonas, antibióticos amplamente usados nos cuidados hospitalares (Spigaglia e Mastrantonio, 2004).

Constituem exemplos de resistência a outros antibióticos a preocupante prevalência, em Espanha, de 6,3% da resistência ao metronidazol (Pelaez *et al*, 2002); e, nos hospitais do Reino Unido, a presença de duas estirpes, ribótipos 001 e 006, com uma resistência significativamente superior à eritromicina, imipenemo e levofloxacina, que pode explicar a sua vantagem selectiva sobre outras estirpes de *C.difficile* e, consequentemente, a sua grande prevalência (John e Brazier, 2005).

A terapia com IBP está também associada a um risco aumentado de colite recorrente por *C.difficile*, sendo que os doentes medicados têm uma probabilidade 4,17 vezes maior de sofrer recorrência (Cadle *et al*, 2007). Este facto foi explicado por Jump *et al* (2007), que detectaram a

sobrevivência da forma vegetativa de *C.difficile* no conteúdo gástrico de doentes recebendo IBP, cujo pH gástrico era superior a 5.

Além disso, detectou-se uma elevada taxa de DACD em doentes a efectuar terapêutica com anti-inflamatórios não esteróides (Risco relativo: 1,3; IC_{95%}: 1,2-1,5). Deste modo, o consumo de outros fármacos além de antibióticos pode aumentar o risco de DACD, ainda que sejam necessários novos estudos que comprovem mais claramente o seu papel.

Periparto

A incidência de DACD está a aumentar em mulheres no periparto. De 24 casos publicados, 91% das parturientes tinham feito profilaxia com antibióticos durante o parto ou para infecções bacterianas. Em 2 casos identificou-se a presença, por PCR, da estirpe 027, não havendo factores de risco adicionais. Estes casos demonstram a necessidade dos clínicos considerarem a DACD em mulheres grávidas com diarreia, mesmo não apresentando os factores de risco tradicionais (Rouphael *et al*, 2008).

Co-Morbilidades

A Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) detectou que os doentes hospitalizados com DACD tinham em média mais de 10 diagnósticos comórbidos, diminuindo para 6 o número de diagnósticos naqueles sem DACD. De acordo com esta agência, 4 dos 20 principais diagnósticos observados nos doentes com DACD eram infecções onde o antibiótico é de difícil descontinuação (sépsis, pneumonia, infecção das vias urinárias e infecção da pele).

Doentes Transplantados

Recentes estudos de casos determinaram que a DACD deve ser tida em conta como causa possível de diarreia em doentes que se submeteram a um transplante de órgão sólido, embora esta tenha constituído uma complicação raríssima no passado (Stelzmueller *et al*, 2007).

Num grupo de doentes submetidos a transplante hepático, pesquisaram-se as toxinas do *C.difficile* naqueles que desenvolveram diarreia, e 63% das

amostras foram positivas para a toxina do *C.difficile* (Kawecki *et al*, 2007). Causa significativa de diarreia em doentes transplantados cardíacos (Muñoz *et al*, 2007).

Doentes pós-cirúrgicos

No período entre 2003 e 2005, a taxa de DACD foi de 14,9‰ em intervenções cirúrgicas, cujos doentes receberam profilaxia antimicrobiana pré-operatória, representando, assim, um aumento significativo em relação aos 0,7‰ no período entre 1999 e 2002 .

A idade avançada constitui novamente um factor de risco associado a DACD, nos doentes aos quais foi administrada profilaxia per-operatória.

Em situações em que se pretenda prevenir infecções relativamente benignas ou infrequentes, e especialmente neste grupo etário, o risco da profilaxia per-operatória poderá, assim, ser superior aos seus benefícios. Mesmo em doentes cirúrgicos sem medicação, verifica-se um aumento na incidência da DACD, particularmente em doentes submetidos a intervenções cirúrgicas de urgência ou nas ressecções intestinais (Zerey *et al*, 2007).

Doença Inflamatória Intestinal

Os indivíduos com doença inflamatória intestinal (DII) têm um maior risco de desenvolver DACD. Issa *et al* (2007) conduziram um estudo retrospectivo observacional que mostrou que esta infecção nestes doentes aumentou de 1,8% em 2004 para 4,6% em 2005.

Dentro da totalidade dos casos de DACD, a proporção de doentes com DII aumentou de 7 para 16% entre 2004 e 2005. No mesmo período, mais de metade dos doentes que tinham DACD necessitaram de internamento, e 20% fizeram colectomia. O uso prolongado de imunomoduladores e o envolvimento cólico foram identificados como factores de risco independentes para desenvolver DACD no contexto de DII.

A associação entre DII e DACD pode ser derivada de diversos factores, tais como o uso de antibióticos para o tratamento de outros patogéneos gastrintestinais ou os frequentes internamentos inerentes à DII.

Uma vez que a DACD pode tanto mimetizar como precipitar um surto de DII, é essencial que os clínicos estejam atentos para identificar esta infecção e as suas possíveis complicações, até porque a corticoterapia sem antibioterapia adequada pode provocar uma deterioração da condição clínica (Issa *et al*, 2007).

Patogénese

A infecção por *C.difficile* inicia-se com a ingestão do microrganismo na sua forma vegetativa ou dos seus esporos. Estes são formas, que persistem no ambiente por períodos longos, pois são muito resistentes à erradicação. Os esporos sobrevivem à acidez gástrica, germinam no cólon na forma vegetativa, onde as estirpes toxigénicas produzem toxinas, nomeadamente A e B. A sua secreção leva à produção do factor de necrose tumoral e de interleucinas pró-inflamatórias, e ao aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo uma diarreia aquosa, colite e formação de pseudomembranas (Poutanen e Simor, 2004; Yam e Smith, 2005; Mcfarland, 2008). Os sintomas sistémicos são desencadeados pela indução de mediadores inflamatórios por parte das toxinas. Estima-se, no entanto, que 25% das estirpes de *C.difficile* não são patogénicas (Borriello, 1990).

Inicialmente crê-se que as toxinas A (TcdA) e B (TcdB) tinham acções distintas, contudo agora sabe-se que ambas são citotóxicas e enterotóxicas. Estas caracterizam-se pelo seu grande tamanho, posicionado-se entre as maiores toxinas bacterianas conhecidas (Voth e Ballard, 2005). TcdA e TcdB são membros da larga família de toxinas do *Clostridium spp.*, que inclui a toxina letal (TcsL) e hemorrágica (TcsH) do *C.sordellii*, e a toxina alfa do *C.novy* (Just *et al*, 2000).

Tanto a toxina A como a B causam morte celular pela desorganização da actina do citoesqueleto das células epiteliais cólicas (Rupnik *et al*, 2005).

A toxina A precipita uma hipersecreção de fluído intestinal e infiltração neutrofílica, causando também a apoptose das células do cólon, contribuindo para a formação de úlceras e pseudomembranas no cólon (Kim *et al*, 2005). Com apenas 15 minutos de exposição à toxina A, ocorrem lesões mitocondriais extensas (He, 2000).

Outros elementos de virulência são os factores de adesão, a hialuronidase com actividade hidrolítica e a colagenase que facilita a translocação do *C.difficile* (Hurley e Nguyen, 2002).

Histologicamente, a DACD é caracterizada por uma ulceração epitelial focal associada a um exsudado inflamatório. A explicação mais aceite desta ulceração focal são as grandes concentrações de toxinas secretadas pela bactéria junto às células epiteliais, resultando numa rápida morte das mesmas. Em contraste, as células epiteliais distantes à bactéria estariam expostas a concentrações mais baixas e à indução do factor de crescimento beta, responsável pela protecção e restituição epitelial (Johal *et al*, 2004).

Na patogénese da DACD, é essencial a interrupção da flora cólica normal (Elliot *et al*, 2007), tendo-se observado a inibição *in vivo* e *in vitro* do seu crescimento pela flora intestinal (Borriello, 1990).

O mecanismo pelo qual a flora indígena controla a colonização por *C.difficile* é conhecido por resistência à colonização. Presume-se que a flora intestinal anaeróbia seja crucial para a resistência à colonização, se bem que os componentes precisos, envolvidos neste processo, ainda não tenham sido claramente definidos.

Esta resistência pode ser comprometida por doença, pela antibioterapia ou por outros procedimentos terapêuticos, promovendo o desenvolvimento de DACD (Blondeau, 2009).

Os mecanismos não-imunológicos de defesa incluem a já mencionada inibição normal do *C.difficile* pela flora normal, a neutralização dos esporos por exposição ao ácido gástrico, e a eliminação do patogéneo e das sua toxinas através do peristaltismo intestinal. Como defesa imunológica sabe-se que a presença de IgG sérica anti-toxina A está associada à manutenção do estado de portador assintomático e aparente neutralização das toxinas do *C.difficile* (Bartlett, 2002).

Envolvimento do intestino delgado

O espectro de actuação cada vez mais alargado deste patogéneo evidencia-se pelo atingimento do intestino delgado pelo *C.difficile*. Apesar de haver, desde há três décadas, provas da colonização do intestino delgado pelo *C.difficile*, só mais recentemente surgiram casos clínicos publicados de

DACD do intestino delgado. Além de poder servir de reservatório, a doença pode ser precipitada na presença de determinados factores. Nos últimos 2 anos assistiu-se a uma explosão na publicação de artigos sobre o tema, onde se apontam como factores de risco os antibióticos, a DII e a cirurgia intestinal prévia.

Não obstante, a razão da predisposição para a DACD no delgado nos doentes com cirurgias anteriores ao cólon, ainda não foi totalmente esclarecida. Pensa-se que, após colectomia, surgem mudanças na flora bacteriana do intestino delgado, em particular no íleon terminal que é colonizado por flora bacteriana do cólon (Neut *et al*, 2002). Em doentes operados, a presença de conteúdo fecal em contacto com a mucosa do intestino delgado induz alterações metaplásicas. Isto ocorre em doentes com bolsa íleo-anal, cujo epitélio sofre modificações morfológicas, facilitando o estabelecimento da flora fecal (Mann *et al*, 2003).

Entre os doentes em que ocorreu infecção imediatamente no pós-operatório, muitos tinham previamente DACD do cólon, sugerindo a hipótese de que esta poderia ser secundária à migração do *C.difficile* para o intestino delgado.

Na base da patogénese desta situação clínica, pode estar a interacção das toxinas do *C.difficile* e um complexo de sacarase-isomaltase de algumas enzimas intestinais, que contêm receptores para as toxinas (Pothoulakis *et al*, 1996).

O compromisso de alguns mecanismos de protecção, como a acção mecânica da válvula íleo-cecal, pode facilitar o desenvolvimento da DACD no intestino delgado.

O aumento do débito através do estoma ileal posiciona-se como o sinal clínico mais comum de DACD do intestino delgado. Por vezes, é tão intenso que em determinados doentes, provocou uma insuficiência renal aguda por hipovolemia (Konda *et al*, 2008).

Aconselha-se a administração do metronidazol na presença de doença leve a moderada e da vancomicina em casos graves. Se os doentes não melhorarem às 72 horas com o metronidazol, recomenda-se a terapêutica com vancomicina (Lundeen *et al*, 2007; e Konda *et al*, 2008).

A Emergência de uma Nova Estirpe

A emergência de uma nova estirpe hipervirulenta, NAP1/BI/027, alterou a história da DACD, determinando um aumento de surtos nosocomiais e concomitante aumento da mortalidade (Blossom e McDonald, 2007). Esta nova estirpe foi isolada quer no hospitalar, quer na comunidade (Warny *et al*, 2005).

Recentemente a estirpe tornou-se epidémica e foi identificada, como já referido, em populações anteriormente consideradas de baixo risco, incluindo mulheres no péri-parto e pessoas saudáveis. Foram reconhecidos surtos de diarreia por esta nova estirpe em várias unidades hospitalares de diversos países europeus (Cramer *et al*, 2008).

A referida estirpe foi identificada em 1980, não havendo, no entanto, referências históricas que a associassem a DACD grave ou a surtos. O seu nome reflecte as suas características, determinadas por diferentes métodos de tipagem: electroforese em campo pulsado (NAP1), análise por restrição de endonucleases (BI) e PCR (027).

As características fundamentais desta estirpe emergente são a resistência às fluoroquinolonas, a produção de toxina binária e a produção aumentada de toxinas A e B (Warny *et al*, 2005).

Quanto à resistência às fluoroquinolonas, esta estirpe manifesta-se resistente a estes antibióticos *in vitro*, uma característica infrequente em estirpes anteriores a 2001. A elevada resistência às fluoroquinolonas deve-se à mutação no gene *gyrB* que codifica a girase do ADN bacteriana (McDonald *et al*, 2005).

Ultimamente, também se encontrou um alto nível de resistência à gatifloxacina e à moxifloxacina nos isolados de *C. difficile* 027. A resistência fornece uma vantagem competitiva a esta estirpe, nomeadamente em ambiente hospitalar, onde as fluoroquinolonas são amplamente usadas (Pépin *et al*, 2005).

A toxina binária tem actividade enterotóxica *in vitro* mas o seu papel na patogenicidade desta estirpe emergente ainda não está clarificado (Barbut *et al*, 2000).

Por último, existe uma produção aumentada de toxinas A e B. Esta estirpe produz 16 vezes mais toxina A e 23 vezes mais toxina B *in vitro*,

comparativamente às estirpes toxintipo 0 (Warny *et al*, 2005). Esta característica da estirpe epidémica advém da deleção parcial do tcd C, um gene no PaLoc que é responsável pela *down-regulation* da transcrição génica e subsequente produção aumentada de toxina (Rupnik *et al*, 1998). Sugere-se, ainda, que a toxina B da estirpe 027 pode ter uma capacidade de ligação diferente das outras estirpes, o que pode explicar em parte a sua maior virulência (Rupnik, 2006; e Stabler *et al*, 2008).

Apresentação Clínica e Diagnóstico

No seguimento da colonização por *C.difficile* toxigénico, os indivíduos podem-se tornar portadores ou desenvolver doença com vários graus de gravidade, desde uma diarreia não complicada, até à colite pseudo-membranosa. Os portadores assintomáticos são um reservatório importante para a transmissão nosocomial de *C.difficile*.

A DACD leve a moderada é essencialmente caracterizada por diarreia com fezes moles, não moldadas, ou aquosa e mucosa, embora raramente com sangue. Normalmente, febre e dor abdominal também pertencem a este quadro clínico. Esta apresentação da DACD torna-a mais difícil de distinguir de outras patologias intestinais, levando a atrasos tanto no seu diagnóstico como no tratamento. É essencial o diagnóstico diferencial com a DII, síndrome do cólon irritável (Knoop *et al*, 1993) ou outras diarreias infecciosas causadas quer por vírus, quer por outros patogéneos, como o *Staphylococcus aureus* (Fekety e Shah, 1993; e Song *et al*, 2008).

A forma grave caracteriza-se por dor abdominal difusa ou localizada aos quadrantes inferiores, diarreia abundante e sintomas sistémicos, tais como febre, anorexia e náusea. Na presença de íleon paralítico, quando se desenvolve a colite pseudo-membranosa, a diarreia pode mesmo ser inexistente, apresentando o doente uma distensão abdominal, cólon inflamado e dilatado ao Rx abdominal. Laboratorialmente, existe uma leucocitose marcada e uma elevação da proteína C reactiva, enquanto que os níveis de albumina são baixos. Este quadro pode incluir hipovolémia e acidose láctica (Lamontagne *et al*, 2007).

Geralmente, a infecção pela toxina do *C.difficile* está associada a doença leve a moderada, embora possa progredir para colite fulminante em 3-8%

dos casos. Outras potenciais complicações são o megacólon tóxico e a perfuração intestinal (Rubin *et al*, 1995). O diagnóstico do megacólon tóxico é clínico, baseando-se na dilatação do cólon, acompanhada de sinais sistémicos graves. O Rx abdominal mostra dilatação do intestino delgado e níveis hidro-aéreos, mimetizando um quadro de obstrução intestinal ou isquemia devido ao edema submucoso. Este quadro pode complicar-se com perfuração intestinal, apresentando o doente rigidez abdominal, defesa e sons intestinais diminuídos. Com o intuito de antecipar esta complicação, é essencial o seguimento diário com Rx abdominal destes doentes, já que os casos de megacólon tóxico estão associados a taxas de mortalidade de 24-38% (Poutanen e Simor, 2004).

Sigmoidoscopia/Colonoscopia para o diagnóstico de DACD

Perante um quadro clínico pouco consistente, o diagnóstico terá de ser estabelecido por exame endoscópico ou por testes laboratoriais específicos. Havendo uma forte suspeita clínica, na ausência de um teste laboratorial positivo ou de uma apresentação clássica da doença, a endoscopia digestiva baixa é uma ferramenta diagnóstica especialmente útil. A sua aplicação também pode ser necessária quando é requerido um diagnóstico antes dos resultados laboratoriais estarem disponíveis ou perante a ineficácia da antibioterapia. Em doentes com sintomas e sinais clássicos da doença, e com a toxina positiva nas fezes, a endoscopia não está indicada. Esta está mesmo contra-indicada no contexto de colite fulminante dado o risco de perfuração.

Na endoscopia digestiva baixa, o achado patognomónico de DACD são a presença de pseudomembranas. Estas são placas amareladas ou esbranquiçadas de diâmetro até 2cm, aderentes (não podendo ser removidas por lavagem), dispersas pela mucosa cólon-rectal intercaladas com mucosa normal. Originam-se por libertação de proteínas séricas, muco e células inflamatórias durante a formação de úlceras.

Existem outros achados inflamatórios cólicos como edema mural, eritema e friabilidade, que se revelam na Tomografia Axial Computorizada (TAC) abdominal como espessamento da parede intestinal (Bartlett e Gerding, 2008).

Diagnóstico Laboratorial

Sabendo que, a infecção pelo *C.difficile* é a causa mais comum de diarreia nosocomial, é obrigatório a sua pesquisa em qualquer doente com diarreia e antibioterapia associada. Apesar disso, este pressuposto varia conforme o hospital, verificando-se que 58% dos laboratórios hospitalares apenas executavam testes para a sua identificação quando especificamente requerido, enquanto 40,7% o faziam, mesmo sem pedido dos clínicos, desde que determinados critérios estivessem preenchidos (Barbut *et al*, 2003).

O PCR em tempo real e o exame cultural revelaram-se significativamente mais sensíveis que os ensaios imunoenzimáticos, constituindo o primeiro destes a opção mais exequível e correcta na prática clínica (Peterson *et al*, 2007). A generalidade dos testes para a detecção do *C.difficile* e das suas toxinas são imperfeitos, dando frequentemente resultados falsos positivos e falsos negativos. Estes últimos representam 29-56% dos casos, podendo ocorrer quando as amostras não são prontamente testadas ou quando não são mantidas refrigeradas até o ensaio ser realizado. Sobre os ensaios imunoenzimáticos, a taxa de falsos negativos é alta porque é necessária a existência de 100-1000 pg de toxina para a sua detecção. Quando o teste inicial é negativo, a utilização de uma série de três testes imunoenzimáticos pode aumentar a capacidade de diagnóstico até 10% (McFarland, 2008). Outro estudo promovido por Mohan *et al* (2006) revelou que menos de um 1% dos diagnósticos são modificados pela repetição dos testes, não sendo tal repetição garantia de um resultado correcto, além de não ser economicamente vantajosa. Em todo o caso, na suspeita clínica de DACD, quando um primeiro teste microbiológico é negativo, devem ser testadas múltiplas amostras, e é obrigatória a pesquisa das duas toxinas A e B, uma vez que, segundo Johnson *et al* (2001), 2% dos casos de DACD envolvem estirpes tcdA(-)tcdB. A metodologia que detecta em simultâneo a presença das duas toxinas (ELISA) é fiável, rápida, com elevadas especificidade e sensibilidade para o diagnóstico do *C.difficile* (Altindis *et al*, 2007).

Deve-se sublinhar que a grande instabilidade das toxinas do *C.difficile* aumenta as dificuldades na sua detecção. As toxinas degradam-se à temperatura ambiente, podendo tornar-se indetectáveis, 2 horas após a sua

colheita. Por isto, e pela complexidade e morosidade das técnicas de detecção, a maioria dos testes imunoenzimáticos utilizados nos laboratórios (58%) são direccionados apenas para a pesquisa da toxina A (Barbut *et al*, 2003). Assim, são deixadas de fora estirpes tcdA(-)tcdB(+), de baixa prevalência (3% no Reino Unido), responsáveis por vários surtos de doença grave (Brazier, 1999).

Por outro lado, os testes para a detecção da citotoxina são o *gold standard*, possuindo altas sensibilidade e especificidade, embora, pela sua grande exigência técnico-laboratorial, os seus resultados apenas estejam disponíveis após 24-48 horas (Schroeder, 2005). A sua importância é reforçada pela necessidade de avaliar e monitorizar a susceptibilidade antimicrobiana das estirpes.

Mesmo que sensibilidade dos ensaios de citotoxina não tenha sido superada com as melhorias na nova geração de ensaios imunoenzimáticos (sensibilidade:60-90%; especificidade:75-100%), as suas vantagens são facilmente compreendidas: proporcionam resultados em menos de 4 horas, podendo ser usados como testes de rotina, e são de extrema utilidade em unidades de saúde com laboratórios sem capacidade de executar cultura celular (Kuipers e Surawicz, 2008).

Estratificar a gravidade da DACD

A identificação dos doentes com um alto risco de desenvolver a forma grave de DACD, pode melhorar o seu prognóstico. Possíveis factores negativos de prognóstico são: leucocitose elevada, insuficiência renal, necessidade de vasopressores, e idade.

Foram também descritos vários factores associados a uma maior taxa de mortalidade a 30 dias: leucócitos >50,000x10/L, lactato sérico >5mm/L, idade >75 anos, imunossupressão, e choque requerendo vasopressores (Lamontagne *et al*, 2007).

Recorrência

Considera-se que existe recidiva ou recorrência quando reaparece a diarreia e dor abdominal entre 1 semana a 3 meses após concluída a antibioterapia.

A recorrência produz-se pela permanência do *C.difficile* ou dos seus esporos, que voltam a produzir sinais e sintomas clínicos. No entanto, deve-se esclarecer que não ocorre recorrência em todos os casos que surjam com diarreia. Assim, é necessário diferenciar recidiva de reinfecção, sendo que esta supõe a erradicação do *C.difficile*, adquirido através de novo contágio (Surawicz, 2009).

Deverá ser feito diagnóstico diferencial com outras condições clínicas como a síndrome do cólon irritável pós-infeccioso, colite microscópica e DII, uma vez que estas e outras causas devem ser investigadas após várias semanas de tratamento com metronidazol ou vancomicina sem remissão da DACD, dada a rara resistência do *C.difficile* a estes antibióticos.

A perturbação da resistência à colonização é um factor condicionador de recorrência, tendo-se verificado que os indivíduos infectados apresentam níveis diminuídos de anticorpos IgA e IgG anti-toxina B, revelando-se, assim, a importância dos factores imunitários do hospedeiro (Drudy *et al*, 2004).

Um estudo de meta-análise identificou a idade avançada, fármacos anti-ácidos e continuação da antibioterapia como factores de risco para a recorrência (Garey *et al*, 2008). A presença concomitante de DII é outro factor de risco, duplicando a taxa de recorrência na doença de Crohn e triplicando na Colite Ulcerosa (Rodemann *et al*, 2007; e Issa *et al*, 2007).

A própria existência de um caso de recorrência implica uma maior probabilidade de futuras recorrências (Surawicz, 2009). Este risco aumenta 20% após o primeiro episódio, enquanto a probabilidade de recorrência aumenta mais de 60% após uma segunda ou terceira recorrências. Esta acentuada escalada no risco de recorrência será causada em parte pela selecção de doentes com progressivamente menor imunidade protectora contra *C.difficile* (Kelly *et al*, 2008).

Tratamento

Denomina-se doença negligenciada aquela cujos recursos dispendidos em investigações médicas são muitos baixos comparados com a sua preponderância. Nos países desenvolvidos, poucas doenças com a prevalência da DACD, mantiveram a terapêutica essencialmente inalterada

desde a sua descoberta, pelo que se pode considerar uma doença negligenciada. O metronidazol e a vancomicina têm sido usados como terapia da DACD desde 1978, apesar de 25% dos doentes sofrerem pelo menos uma recorrência (Bartlett, 2002).

A percepção do *C.difficile* como patogéneo pouco agressivo levou à escassez de pesquisas no âmbito da DACD, facto revertido pela emergência da estirpe 027.

As recomendações actuais para o tratamento da DACD leve/moderada são os cuidados de suporte, a descontinuação do antibiótico implicado e deve-se evitar qualquer fármaco com actividade anti-peristáltica. Segundo Johal *et al* (2004) demonstraram que a DACD se autoresolveu em 30% dos doentes em média 4 dias após a descontinuação do antibiótico. Assim, em casos de DACD leve/moderada, pode não ser requerido o tratamento antimicrobiano específico, mas apenas a interrupção da antibioterapia.

Existem, no entanto, casos de DACD que além da descontinuação dos(s) antibiótico(s), requerem a imediata utilização de metronidazol ou vancomicina.

Antes de 2000, o metronidazol e a vancomicina provaram ter taxas de eficácia e de recorrência semelhantes. Contudo, o metronidazol foi favorecido por ser mais económico e evitar o aparecimento de bactérias resistentes à vancomicina (*Enterococcus*).

As propriedades farmacológicas do metronidazol são pouco ajustadas para o tratamento do *C.difficile*, uma vez que este agente reside no lúmen do cólon, onde o metronidazol é quase completamente absorvido, apesar destas características, é o fármaco eleito pelas "Guidelines da Society for Healthcare Epidemiology of America, Infectious Diseases Society of América" (IDSA) e CDC (Bolton e Culshaw, 1986; e Aslam *et al*, 2005).

No entanto, a vancomicina oral é o único fármaco aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para DACD. Esta possui propriedades farmacológicas ideais, para a erradicação do agente, por ser absorvida e conseguir atingir níveis no lúmen do cólon 100x superior à concentração inibitória máxima. A vancomicina oral é também preferida para tratar mulheres grávidas ou lactantes, e indivíduos com intolerância ao metronidazol (Kelly *et al*, 1994; e Bartlett, 2002).

Um estudo conduzido por Zar *et al* (2007) sugere equiparável eficácia dos dois fármacos no tratamento de DACD moderada, porém a vancomicina

apresenta maior eficácia no tratamento da DACD grave. Enquanto na DACD leve/moderada, o tratamento com metronidazol e vancomicina resultou respectivamente na cura clínica de 90% e 98% dos casos, na DACD grave, o tratamento com metronidazol e vancomicina resultou na cura clínica de 76% e 97% dos casos, respectivamente.

Outros estudos também, revelaram um aumento da ineficácia do metronidazol, especialmente na estirpe 027, e em doentes que receberam previamente antibióticos de largo espectro, calculando-se a sua taxa de insucesso em 18,2% (Musher *et al*, 2005). Além disso, os doentes que continuam com o antibiótico enquanto recebem o tratamento para a DACD têm maior probabilidade de não responderem ao metronidazol (Modena, 2006).

Com estas novas informações é necessário repensar o modo de abordar primariamente esta infecção quando ela se apresenta agressiva. A vancomicina oral surge como a escolha mais adequada para o tratamento da estirpe 027, ou na presença de factores de risco importantes, como a idade avançada, deficiência imunitária ou DII (Bartlett, 2006). A estirpe 027 produz uma quantidade de toxinas superior ao ribotipo 001 e durante mais tempo, sendo que estas características microbiológicas podem constituir a explicação para a diminuída eficácia do metronidazol, incapaz de manter concentrações óptimas no cólon, para eliminar esta estirpe. Além disso, apesar da eficácia da vancomicina não ser muito superior ao metronidazol, esta pequena diferença pode ser vital no tratamento de doentes em estado grave.

Não está provada a eficácia do metronidazol ou vancomicina como forma de prevenção do *C.difficile* em doentes que recebem antibioterapia e o tratamento com estes agentes é ineficaz em doentes portadores assintomáticos (Gerding *et al*, 2008; e Bartlett, 2008).

Tratamento para a Recorrência da DACD

Cerca de 20% a 25% dos doentes com DACD apresentam recorrência apesar de terapia específica. Segundo Barbut (2000) algumas recorrências devem-se a reinfecções por novas estirpes e, portanto, não são devidas a falhas do tratamento, entretanto as outras recorrências são atribuídas à estirpe original (48,4%).

Kelly *et al* (2008) enumeraram os factores de risco mais importantes: o uso prolongado de antibiótico, a hospitalização prolongada, a idade superior a 65 anos, a diverticulose, e as co-morbilidades.

O diagnóstico pode mostrar-se muito difícil principalmente quando se trata de doentes sem diarreia (20%).

O tratamento consiste em repetir o fármaco inicialmente utilizado, quer metronidazol ou vancomicina. A troca entre estes antibióticos ou sua utilização em doses superiores e durante mais tempo, não reduz a frequência das recorrências (McFarland *et al*, 2002; e Kelly *et al*, 2008).

Prebióticos e Probióticos

Os prebióticos são ingredientes não digeríveis que favorecem o crescimento selectivo de bactérias intestinais. Os dois prebióticos mais estudados são frutoligossacárideos, como a oligofrutose e a inulina. Estes estão presentes em vegetais como o alho, a cebola, o tomate entre outros, sendo que a oligofrutose parece diminuir as recorrências por *C.difficile* (Lewis *et al*, 2005).

Relativamente aos probióticos, a adição de leveduras da espécie *S.boulardii* ao regime terapêutico reduziu significativamente a taxa de recorrência de DACD (McFarland *et al*, 1994). A DACD recorrente pode responder melhor a baixas doses de vancomicina com *S.boulardii* num menor tempo, comparativamente a altas doses de vancomicina sem o probiótico (Surawicz, 2000).

Deve ser sublinhado o facto, de o *S.boulardii* ser geralmente bem tolerado, porém casos de fungémia fatal já foram reportados durante o tratamento (Cherifi *et al*, 2004).

A combinação de vancomicina em altas doses com *S.boulardii* é o único tratamento combinado que se mostrou significativamente capaz de reduzir a DACD recorrente, já que não há evidências suficientes que suportem o uso rotineiro dos probióticos no tratamento ou prevenção da DACD.

Bacterioterapia Fecal especialmente para a recorrência por DACD

Uma alternativa ao tratamento da doença recorrente é a bacterioterapia, a qual consiste na administração de flora fecal completa, proveniente de um indivíduo saudável, com o objectivo de restaurar a resistência à colonização. O filtrado fecal é aplicado através de sonda nasogástrica ou por colonoscopia (Aas *et al*, 2003). Borody (2000) a partir da revisão de 84 casos de "transplante" fecal em doentes com DACD recorrente grave, concluiu que 80% deles resultaram na resolução ou cura.

Não foram observados efeitos adversos associados a esta terapia (Aas *et al*, 2003).

Os mecanismos precisos do funcionamento desta terapia ainda não estão bem clarificados, uma das possíveis explicações é que o reaparecimento de espécies *Bacteroides* podem promover a restauração da flora do cólon anteriormente danificada pelos antibióticos.

Em doentes que mantêm um estado clínico grave, a bacterioterapia fecal deve ser utilizada quando todas as outras medidas terapêuticas se mostrem ineficazes (Borody *et al*, 2004).

Novas terapias alternativas

A rifaximina é um derivado semi-sintético derivado da rifamicina, sendo pouco absorvida. Tem sido usada para o tratamento da diarreia do viajante. Estudos têm mostrado bons resultados, semelhantes à vancomicina, no tratamento dos sintomas iniciais de DACD. Apresenta actividade *in vitro* contra o *C.difficile* (Bricker *et al*, 2005; e Hecht *et al*, 2007).

A nitazoxanida, uma nitrothiazolida e precursor metabólico da tizoxanida, possui um espectro amplo de actuação contra helmintas, protozoários e bactérias entéricas, incluindo o *C.difficile*. Este fármaco actua através da sua capacidade de interferir com os processos metabólicos dos anaeróbios e mostrou ser capaz de combater *in vitro* o *C.difficile*. Estudos randomizados e prospectivos mostram que este fármaco consegue resultados de cura semelhantes ao metronidazol, tendo como vantagem causar menos efeitos secundários (McVay e Rolfe, 2000; Musher *et al*, 2006; e Pankuch e Appelbaum, 2006).

Resinas de Permuta Iónica

A colestiramina e tolevamer são polímeros inertes de peso molecular elevado que se ligam às toxinas A e B. Não têm actividade antimicrobiana directa podendo facilitar a restauração da resistência do cólon. A infecção recorrente foi menos comum nos doentes que responderam ao tolevamer (3%) quando comparado com a vancomicina e metronidazol 23% e 27% respectivamente (Louie *et al*, 2006).

O tolevamer foi testado pela sua capacidade de neutralizar as toxinas produzidas pela estirpe epidémica 027 em cultura celular mostrando-se capaz de neutralizar as toxinas A e B e o efeito citopático da estirpe 027.

Imunoterapia

A imunização activa e passiva têm sido usadas para tratar doentes com múltiplas recorrências. Mais de metade dos adultos tem anticorpos circulantes contra as toxinas do *C.difficile* e um *pool* normal de imunoglobulinas pode neutralizar as toxinas A e B do *C.difficile* (Voth e Ballard, 2005). Têm sido usadas imunoglobulinas intravenosas para tratar casos de recorrência ou de infecção refractária, onde se tem obtido sucessos. Um estudo importante neste campo foi realizado por McPherson *et al*, (2006) que realizou uma revisão retrospectiva com 264 casos de doentes com *C.difficile* dos quais 14 tinham doença grave, recorrente ou refractária. Receberam imunoglobulina intravenosa após tratamento ineficaz com metronidazol ou vancomicina. Todos toleraram o tratamento sem efeitos secundários. Destes 64% responderam positivamente, estando a função intestinal normalizada, em média 10 dias após o início do tratamento (variou entre 2 e 26 dias).

O toxóide para o *C.difficile* induziu resposta para as toxinas A e B .Esta vacina parentérica que contém toxóide A e B mostrou-se segura e imunogénica em voluntários saudáveis. Num estudo, 3 doentes com múltiplos episódios de DACD recorrente foram vacinados. Verificou-se que 2 doentes exibiram um aumento de IgG anti-toxina A sérica de 3x e 4 x respectivamente e de IgG anti-toxina B de 52x e 20x respectivamente. Ambos os indivíduos desenvolveram citotoxinas neutralizantes das toxinas A

e B estando associado a uma resolução da diarreia (Sougioultzis *et al*, 2005).

Tratamento Cirúrgico

A partir do momento que se diagnostica colite fulminante, usualmente procede-se a colectomia subtotal com ileostomia. Nestes doentes, que por acréscimo desenvolvem uma leucocitose marcada, a execução da cirurgia é mais premente pois frequentemente a leucocitose precede um estado de hipotensão em que o uso de terapia vasopressora acarreta um pior prognóstico. A colectomia de emergência reduz a mortalidade em doentes com DACD fulminante segundo Lamontagne *et al* (2007), sendo uma intervenção cirúrgica tardia um dos factores que mais está associado a uma maior mortalidade colectomia subtotal. Estes dados sublinham a importância de um diagnóstico e tratamento precoces e considerar a colectomia em doentes cujo tratamento não seja eficaz e a cirurgia não esteja contra-indicada. A taxa de mortalidade com o tratamento cirúrgico varia entre 30% a 80%.No entanto, essa taxa sobe para 100% quando a cirurgia não é realizada.(Morris *et al*, 1990)

Prevenção e Controlo

O controlo e prevenção da DACD hospitalar deve ser abordado em duas grandes áreas: uma, o uso restritivo de antibióticos (prevenção primária), outra, evitar a transmissão do *C.difficile* (prevenção secundária).

Um bom programa de controlo, consiste em prescrever antibióticos por um período de curta duração, evitar sempre que possível antibióticos de amplo espectro, restringir ao máximo antibióticos intravenosos, executar uma boa monitorização e utilizar o conhecimento e ajuda dos farmacêuticos

Por norma, qualquer instituição hospitalar deve ter "guidelines" precisos e claros relativamente ao uso de antimicrobianos e deve ser restrito o seu uso durante possíveis surtos. Davey *et al*, (2005) documentaram que intervenções dirigidas para melhorar as práticas de prescrição de antibióticos no hospital, podem ser eficazes, diminuindo a resistência antimicrobiana e as taxas de infecções adquiridas no hospital.

Outra linha de combate são as medidas de higiene que devem ser implementadas e respeitadas por todos os intervenientes. Num estudo

prospectivo com 27 doentes com DACD, foi encontrado *C.difficile* em vários locais do corpo, nomeadamente na pele da região abdominal, tórax, nos braços e mãos. A contaminação da pele normalmente persiste mesmo após a resolução da diarreia. (Bobulsky 2008)

Outro estudo recente conduzido por Kuijper *et al* (2006) indicaram que 30% a 60% das enfermarias hospitalares tinham zonas contaminadas com esporos de *C.difficile*. A higiene das mãos, a limpeza do ambiente hospitalar, as barreiras de precaução para evitar a transmissão e o rastreio são os pilares no controlo da infecção hospitalar. A utilização de produtos desinfetantes contendo álcool é recomendado para o controlo da maioria dos organismos com importância epidemiológica. O álcool, contudo, não erradica os esporos do *C.difficile* (Bettin *et al*, 1994; e Boyce 2005). Apesar desta opinião generalizada existem trabalhos que divergem. Não obstante, o CDC recomenda o uso de solução alcooolizada para a higiene das mãos durante a prestação de cuidados aos doentes com *C.difficile* (McDonald, 2005).

Segundo Pittet *et al* (2004) os factores que podem contribuir para a adesão por parte dos profissionais de saúde a protocolos dirigidos para a higiene das mãos são os seguintes: a crença de estarem a desempenhar um papel modelo para outros colegas, a fácil acessibilidade às soluções de limpeza e uma atitude positiva face à higiene das mãos após o contacto com o doente. É crucial aplicar medidas de intervenção (Mah, 2006). A descontaminação do ambiente hospitalar é outro passo importante na prevenção (Pratt, 2007). É óbvio que a limpeza dos espaços e instrumentos hospitalares nunca eliminará todos os microrganismos da sua superfície e qualquer desinfecção é e será sempre temporária. No entanto, uma limpeza eficaz e regular ajudará a reduzir a carga de microrganismos (Johnson e Bryce, 2009).

A eficácia dos vários desinfetantes relativamente ao *C.difficile* tem sido alvo de debate em vários estudos, criticando ou defendendo o uso do hipoclorito de sódio (cloro) ou soluções de peróxido de hidrogénio. Segundo Fawley *et al* (2007) e Perez (2005) apenas os germicidas com cloro, quando utilizado nas doses recomendadas, foi capaz de desactivar os esporos de *C.difficile*. É preciso sublinhar que as estirpes epidémicas tem uma taxa de esporulação superior às estirpes não epidémicas.

Outra fase na prevenção e controlo da DACD são as barreiras de precaução, tal como, colocar os doentes infectados em quartos isolados ou, não sendo possível, colocá-los junto a outros doentes com DACD. No mínimo, dada a elevada contaminação ambiental provocada pelo *C.difficile*, o doente infectado deve usufruir de uma casa de banho e louça privadas. Outras medidas preventivas recomendadas são as de contacto, como o uso de bata e luvas. A prevenção e o controlo de surtos compreendem uma área de grande investigação no sentido de se conseguir evitar a transmissão deste patogéneo emergente.

Referências Bibliográficas

- Aas J, Gessert CE, Bakken JS (2003) Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis* 36:580-585.
- Al-Nassir WN, Sethi AK, Nerandzic MM, Bobulski GS, Jumo RL (2008) Comparison of clinical and microbiological response to treatment of *Clostridium difficile*-associated disease with metronidazole and vancomycin. *Clin Infect Dis* 247:56-62.
- Altindis M, Usluer S, Ciftçi H, Tunc N, Cetinkaya Z, Aktepe OC (2007) Investigation of the presence of *Clostridium difficile* in antibiotic associated diarrhea patients by culture and toxin detection methods. *Mikrobiyol Bul* 41:29-37.
- Aslam S, Hamil RJ, Musher DM (2005) Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis*. 5:549-57.
- Barbut F, Delmee M, Brazier JS, Petit JC, et al (2003) A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 9:989-96.
- Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomete V, Burghoffer B (2000) Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile* – associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:2386-8.
- Bartlett JG (2008) The Case for Vancomycin as the Preferred Drug for Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 46:1489-92.
- Bartlett JG (2002) Antibiotic associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002 346:334-9.
- Bartlett JG (2005) The New *Clostridium difficile* – What does it mean?. *N Engl J Med* 353:23
- Bartlett JG (2006) Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 145:758-764.
- Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridium. *N Engl J Med* 298:531-4.
- Baverud V (2002) *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q* 24:203.
- Bettin K, Clabots C, Mathie P, Willard K, Gerding DN (1994) Effectiveness of liquid soap vs chlorhexidine gluconate for the removal of *Clostridium difficile* from bare hands and gloved hands. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994 15:697-702.
- Blondeau J.M. (2009) What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile* diarrhoea?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63: 238-242.
- Blossom DB, McDonald LC (2007) The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 45:222-227.
- Bobulsky GS, Al-Nasir WN, R Iggs MM, Sethi AK, Donskey CJ (2008) *Clostridium difficile* skin contamination in patients with *C. difficile*-associated disease. *Clin Infect Dis* 46:447-450.
- Bolton RP, Culshaw MA (1986) Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. *Gut*. 27:1169-72;
- Borody TJ, Warren EF, Leis SM, Surace R, Ashman O, Siarakas S (2004) Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions. *J Clin Gastroenterol* 38:475-483.
- Borriello SP (1990) The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonisation of the gut. *Ann Med* 22:61-67.
- Borriello SP, Barclay FE: an in-vitro model for colonisation resistance to *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 1986;21:299-309.

- Boyce Jm, Pittet D. (2002) Guideline for hand hygiene in health care settings.Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force MMWR 51:1-45,quiz CE1-CE4.
- Brazier JS (1998) The diagnosis of Clostridium difficile associated disease. J Antimicrob Chemother 41Suppl:C29-40.
- Bricker E, Garg R, Nelson R, Loza A,Novak T, Hansen J. Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults.Cochrane Database Syst Rev.2005:CD004610. [PMID:15674956
- Cadle RM, Mansouri MD,Logan N et al (2007) Association of proton-pump inhibitors with outcomes in Clostridium difficile colitis. Am J Health Syst Pharm 64:2359-2363.
- Cherifi S, Robberecht J, Miendje Y (2004) Saccharomyces cerevisiae fungemia in an elderly patient with Clostridium difficile colitis. Acta Clin Belg 59:223-4.
- Cleary RK (1998) Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis: clinical manifestations, diagnosis and treatment. Dis C6lon Rectum 41 : 1435-1449.
- Cochrane Database Syst Rev 2005(1):CD004610 e Hecht DW, Galang MA, Sambol SP, et al. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic Clostridium difficile clinical isolates collected from 1983 to 2004.Antimicrob Agents Chemoter 2007;51:2716-9
- Cramer JP, Burchand GD, Lohse AW (2008) Old dogmas and new perspectives in antibiotic-associated diarrhea. Med Klin 103325-338;quiz 339-340.
- Davey P, Brown E, Fenelon L, Finch R, et al (2005) Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatient. Cochrane Database Syst Rev CD003543
- De Andr6s S,Ferreiro D,Ib6nez M,Ballesteros A, at al (2004) Clostridium difficile colitis associated with valaciclovir.Pharm World Sci 24:613-619.
- Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Hannan M, Kyne L (2007) Emergence and control of a fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative,toxin B-positive Clostridium difficile.Infect Control Hosp Epidemiol 28:938-940.
- Elliot B, Chang BJ, Golledge CL et al. (2007) Clostridium difficile-associated diarrhoea. Intern Med J 37: 561-8.
- Fawley WN, Underwood S, Freeman J, et al. Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic Clostridium difficile strains. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28:920-5.
- Fekety R, Shah AB (1993) Diagnosis and treatment of Clostridium difficile colitis. JAMA 269:71-75.
- Garey KW, Sethi S, Yadav Y, et al (2008) Meta-analyses to Assess Risk Factors for Recurrent Clostridium difficile infection. J Hosp Infection 70:298-304.
- Gerding DN (2004) Clindamycin,cephalosporins, fluoroquinolones, and Clostridium difficile associated-diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. Clin Infect Dis 38:646-8.
- Gerding DN, Muto CA, Owens RC (2008) Measures to control and prevent Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis 2008;46 Suppl 1:S43-S49.
- Giannasca PJ, Warny M (2004) Active and passive immunization against Clostridium difficile diarrhea and colitis.Vaccine 2004 22:848-56.
- Hall IC, O'Toole E (1935) Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe Bacillus difficile. Am J Dis Child 49:390-402.
- Hammit MC,Bueschel DM,Keel Mk et al. (2007) A possible role for Clostridium difficile in the etiology of calf enteritis. Vet Microbiol 127:342-52.

- He D, Hagen SJ, Chen M, Medina ND (2000) Clostridium difficile toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology* 119:139-150.
- Hurley BW, Nguyen CC (2002) The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Arch Intern Med* 162:2177-2184.
- Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB (2007) Impact of Clostridium difficile on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:345-351.
- Johal SS, Hammond J, Solomon K, James PD, Mahida YR (2004) Clostridium difficile associated-diarrhoea in hospitalised patients: onset in the community and hospital and role of flexible sigmoidoscopy. *Gut* 53:673-677.
- John R, Brazier JS (2005) Antimicrobial susceptibility of polymerase chain reaction ribotypes of Clostridium difficile commonly isolated from symptomatic hospital patients in the UK. *J Hosp Infect* 61:11-14.
- Johnson B, Bryce Elisabeth (2009) Hospital infection control strategies for vancomycin-resistant Enterococcus, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Clostridium difficile. *CMAJ* 180(6).
- Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ (2007) Vegetative Clostridium difficile survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and C.difficile-associated diarrhea?. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2883-2887.
- Just I, Hofmann F, Aktories K. (2000) Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 250:55-83.
- Kawecki D, Chmura A, et al (2007) Detection of Clostridium difficile in stool samples from patients in the early period after liver transplantation. *Transplant Proc* 39:2812-2815.
- Kelly, Bartlett JG (1996) Management of Clostridium difficile infection and other antibiotic-associated diarrhoeas. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8:1054-1061.
- Kim H (2005) Clostridium difficile toxin a-induced colonocyte apoptosis involves p-53 dependent p21 induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology* 129:1875.
- Knoop FC, Owens M, Crocker IC (1993) Clostridium difficile: Clinical disease and diagnosis. *Clin Microbiol Rev*;6:251-65.
- Konda A, Jamil LH, Duffy MC (2008) Clostridium difficile infection: Not only for the colon anymore. *Am J Gastroenterol* 103(s1):S96.
- Kuijper EJ, Coignard B, Tull P et al (2006) Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006 12:2-18.
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2000) Asymptomatic carriage of Clostridium difficile and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*;342:390-7.
- Lambert ML, Mertens K, Ramboer I, Delmée M, Suetens C (2009) Nation-wide prospective surveillance of Clostridium difficile infections in hospital in Belgium, July 2007-2008 June. *Euro Surveill* 14:191-69.
- Lamontagne F, Labbe AC, Haeck O, et al. (2007) Impact of emergency colectomy on survival of patients with fulminant Clostridium difficile colitis during an epidemic caused by a hypervirulent strain. *Ann Surg* 245:267-72.
- Lewis S, Burmeister S, et al. (2005) Effect of the prebiotic oligofructose on relapse of Clostridium difficile-associated diarrhea: a randomised controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:442-8.

- Louie TJ, Peppe J, Watt CK, et al. (2006) Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 43:411-20.
- Lundeen SJ, Otterson MF, Binion DG, Carman ET et al (2007) *Clostridium difficile* enteritis: an early postoperative complication in inflammatory bowel disease patients after colectomy. *J Gastrointest Surg* 11:138-42.
- Mah MW, Deshpande S, Rotschild MI (2006) Social Marketing: a behavior change technology for infection control. *Am J Infect Control* 34:52-7.
- Mann SD, Pitt J, Springall RG (2003) *Clostridium difficile* infection-an unusual cause of refractory pouchitis: report of a case. *Dis Colon Rectum* 46:267-270.
- McDonald LC (2005) *Clostridium difficile*: responding to a new threat from an old enemy. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26:672-675.
- McDonald LC (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*, 366:1079-1084.
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al (2005) An epidemic toxin gene variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 335:2433-41.
- McFarland LV (2008) Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5:40-48.
- McFarland LV (1998) Epidemiology risk factors and treatments for antibiotic associated-diarrhea. *Dig Dis* 16:292-307.
- McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM (2002) Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 97:1769-1775.
- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY et al. (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320:204-10.
- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 320:201-10.
- McFarland, Surawicz CM, Greenberg RN, et al (1994) A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *Jama* 1;271:1913-8.
- McPherson S, Rees CJ, Ellis R, Soo S, Panter SJ (2006) Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. *Dis Colon Rectum* 49:640-645.
- McVay CS, Rolfe RD (2000) In vitro and in vivo activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2254-2258.
- Modena S, Gollamudi S, Friedenber F (2006) Continuation of antibiotics is associated with failure of metronidazole for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 40:49-54.
- Mohan SS, McDermott BP, Parchuri S, et al. (2006) Lack of value of repeat stool testing for *Clostridium difficile* toxin. *Am J Med* 119:356-8.
- Monaghan T, Boswell T, Mahida R Y (2009) Recent advances in *Clostridium difficile*-associated disease. *Postgrad Med J* 85:152-162.
- Morris JB, Zollinger RM Jr, Stellato TA (1990) Role of surgery in antibiotic-induced pseudomembranous enterocolitis. *Am J Surg* 160:535-9.
- Mulligan ME (2008) *Clostridium difficile*-its role in intestinal disease. London. Academic Press-229-56.

- Muñoz P, Giannella M, Alcalá L, et al (2007) Clostridium difficile-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer?. *J Heart Lung Transplant* 26:907-914.
- Musher DM, Logan N, Hamil RJ et al. (2006) Nitazoxanida for the treatment of Clostridium difficile colitis. *Clin Infect Dis* 43:421-427.
- Neut C, Bulois P, Membré JM, Gambiez L, Colombel JF (2002) Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Chron's disease. *Am J Gastroenterol* 97:939-946.
- Pankuch GA, Appelbaum PC (2006) Activities of tizoxanida and nitazoxanida compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1112-1117.
- Pelaez T, Alcalá L. et al 2002. Reassessment of Clostridium difficile susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*;46:1647-50.
- Pépin J, Alary M, Valiquette L, Raiche E, et al (2006) Increasing risk of Relapse after Treatment of Clostridium difficile colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis*;40:1591-1597.
- Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. (2004) Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 171:466-72.
- Pépin J, Saheb N, Coulombe et al (2005) Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for Clostridium difficile-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 41:1254-60.
- Perez J, Springthorpe VS, Sattar SA (2005) Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of Clostridium difficile: relevance to environmental control. *Am J Infect Control*. 33:320-5.
- Peterson LR, Manson RU, Paule SM, Hacek DM, Robicsek A (2007) Detection of toxigenic Clostridium difficile in stool samples by real time polymerase chain reaction for the diagnosis of C. difficile-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 45:1152-1160.
- Pittet D, Simon A, Hugonnet S, et al. (2004) Hand hygiene among physicians: performance, beliefs and perceptions. *Ann Intern Med* 141:1-8.
- Pothoulakis C, Gilbert RJ, Semenza G, Hitti Y, Wilkins TD (1996) Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for Clostridium difficile toxin A. *J Clin Invest* (98):641-9.
- Pratt RJ, Pellowe CM, Wilson JA, et al. (2007) National evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. *J Hosp Infect* 65:S1-64.
- Riley TV, Cooper M, Bell B, Golledge CL (1995) Community-acquired Clostridium difficile-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 20 Suppl 2:S263-5.
- Rodemann JF, Dubberke ER, Reske KA, et al (2007) Incidence of Clostridium in inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol and Hepatol* 5:339-344.
- Rouphael NG, O'Donnel JA, Bhatnagar J et al (2008) Clostridium difficile associated- diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 198: 635.e1-635.e6.
- Rubin MS, Bodenstern LE, Kent KC (1995) Severe Clostridium difficile colitis. *Dis Colon Rectum* 38:350-354.
- Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, et al (2005) Revised nomenclature of Clostridium difficile toxins and associated genes. *J Med Microbiol* 54: 113-117.

- Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C, Delmée M (1998) A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J Clin Microbiol* 36:2240-2247.
- Schroeder MS (2005) *Clostridium difficile* –associated diarrhea. *Am Fam Physician* 71:921-928.
- Song HJ, Shim KN, Jung SA, Choi HJ, Lee MA (2008) Antibiotic-associated diarrhea: candidate organisms other than *Clostridium difficile*. *Korean J Inter Med* 23:9-15.
- Songer JG, Anderson MA (2006) *Clostridium difficile*: An important pathogen of foods animals. *Anaerobe* 12:1-4.
- Sougioultzis S, Kyne L, Pothoulakis J, et al (2005) *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 128:764-770).
- Spigaglia P, Mastrantonio P (2004) Comparative analyses of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *J Med Microbiol* 53:1129-36.
- Stabler RA, Dawson LF, Phua LT, Wren BW (2008) Comparative analysis of BI/ NAP1/ 027 hypervirulent strains reveals novel toxin B-encoding gene (*tcdB*) sequences. *J Med Microbiol* 57: 771-775.
- Stelzmueller I, Goegle H, Biebl M, Wiesmayr S et al (2007) *Clostridium difficile* in solid organ transplantation –a single center experience. *Dig Dis Sci* 52:3231-3236
- Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN et al (2000) The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *S. boulardii*. *Clin Infect Dis* 31:1012-7
- Surawicz M, Christina (2009) “Reining in Recurrent *Clostridium Difficile*- Who’s at Risk?”. *J.Gastro.* doi:10.1053.
- Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH (1974) Clindamycin-associated colitis: a prospective study. *Ann Intern Med* 81:429-33.
- Viscidi R, Willey S, Bartlett JG (1981) Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology*. 81:5-9.
- Voth DE, Ballard JD, (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanisms of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18:247:63.
- Warny M, Pepin J, Fang A, et al. (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366:1079-84.
- Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB et al (2001) Frequency of antibiotics-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* 47:43-50.