

## ARTIGO DE REVISÃO

### RISCO DE CONTAMINAÇÃO POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM AMBIENTES HOSPITALARES, PATOGENICIDADE E CONTROLE

RISK OF CONTAMINATION BY *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN HOSPITAL SETTINGS, PATHOGENECITY AND CONTROL

Patricia Richieri\*

Marco Aurélio Ferreira Federige\*\*

**RESUMO** – O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo anaeróbio estrito, produtor de toxinas que danificam a parede do intestino, capaz de formar esporos, o que facilita sua transmissão e auxilia em sua sobrevivência. As doenças associadas a ele variam de colonização assintomática à colite pseudomembranosa, podendo levar ao megacólon tóxico, perfuração do intestino e óbito. A infecção por este microorganismo é principalmente de origem nosocomial e, na maioria das vezes, ocorre como consequência de antibioticoterapia, devido à perturbação da microbiota intestinal. A doença prolonga a internação dos pacientes acometidos, aumenta as taxas de morbidade e mortalidade, além de elevar os custos devido aos cuidados associados à infecção. O objetivo deste estudo foi apresentar uma revisão da literatura com relação aos mecanismos fisiopatológicos, transmissão hospitalar e controle do *Clostridium difficile*. Pôde-se concluir que a implantação de medidas preventivas, por parte dos estabelecimentos de saúde, como uso restrito de antibióticos, diagnóstico precoce e isolamento dos pacientes infectados, desinfecção adequada do ambiente e equipamentos e a educação continuada dos profissionais de saúde com relação à patogenicidade, transmissão e controle da bactéria, além da higienização correta das mãos destes profissionais, podem auxiliar no controle da transmissão deste patógeno.

**Palavras-chave:** antibioticoterapia, *Clostridium difficile*, diarreia, infecção hospitalar, TcdA, TcdB

**ABSTRACT** – *Clostridium difficile* is a strict anaerobe Gram-positive bacillus, toxin producer that damage the gut wall, capable of forming spores, which facilitates the transmission and aids in its survival. The diseases associated with it vary from asymptomatic colonization to

---

\* Pós-graduada do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada à Saúde e Indústria, Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), São Paulo, SP, Brasil. Autor para correspondência: patrichieri@hotmail.com.

\*\* Professor Especialista do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada à Saúde e Indústria, Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), São Paulo, SP, Brasil.

pseudomembranous colitis, which may lead to toxic megacolon, bowel perforation and death. Infection by this microorganism is mainly nosocomial origin and most often occurs as a consequence of antibiotic therapy due to the disruption of endogenous gut flora. The disease prolongs hospitalization of affected patients, increases the rates of morbidity and mortality, in addition increases costs due to the care of associated infection. The aim of this study was to present a review of the literature regarding the pathophysiological mechanisms, hospital transmission and control of *Clostridium difficile*. It was concluded that the implementation of preventive measures by healthcare facilities, such as restricted use of antibiotics, early diagnosis and isolation of infected patients, adequate disinfection of the environment and equipment and continuing education of health care personnel in relation of pathogenicity, transmission and control of this bacteria and the correct handwashing by these professionals may help in controlling the transmission of this pathogen.

**Key words:** antibiotic therapy, *Clostridium difficile*, diarrhea, hospital infection, TcdA, TcdB.

## INTRODUÇÃO

*Clostridium difficile* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia, em forma de bacilo, formadora de esporos e produtora de toxinas.<sup>1</sup>

A infecção por *C. difficile* é uma das principais causas de diarreia associada aos cuidados de saúde, principalmente devido à antibioticoterapia, tendo aumentado em incidência e gravidade na última década. Estima-se que 500.000 casos de infecção por este microorganismo ocorram anualmente nos Estados Unidos, com custo aproximado de três bilhões de dólares.<sup>2</sup>

A infecção pelo *C. difficile* ocorre em aproximadamente 25% de todos os casos de diarreia associada a antibióticos e é a causa mais comum das formas graves da doença, que é acompanhada por sinais sistêmicos e desenvolvimento de pseudomembranas. Uma publicação recente observou que, embora determinadas classes de antibióticos possam predispor à doença associada a este microorganismo, a exposição cumulativa a estes medicamentos ao longo do tempo aumenta o risco de posterior desenvolvimento da doença. Assim, o total de danos colaterais, devido a uma alteração induzida por antibióticos na microbiota intestinal, é um dos principais determinantes da diminuição da resistência à colonização.<sup>3</sup>

A capacidade deste microorganismo em formar esporos facilita sua transmissão e auxilia em sua sobrevivência dentro do organismo hospedeiro, além de ser responsável pela doença recorrente pós-tratamento. Os esporos são capazes de sobreviver por muito tempo, suportando condições ambientais extremas e tratamentos químicos.<sup>4</sup>

O *Clostridium difficile* é amplamente distribuído no solo e no trato intestinal de animais, além de poder ser encontrado no intestino humano, onde é carregado assintomaticamente. Suas toxinas causam danos à parede do intestino. A infecção causada por esta bactéria é principalmente associada aos cuidados de saúde, mas há um crescente reconhecimento

dos casos associados à comunidade. A prevalência da colonização assintomática por *C. difficile* varia em menos de 5% na comunidade e em mais de 20% nos pacientes que permanecem em hospitais e outros estabelecimentos de saúde.<sup>5</sup>

O espectro de doenças humanas causadas por este microorganismo varia de colonização assintomática à colite potencialmente fatal. A doença associada ao *C. difficile* geralmente se apresenta com sintomas como diarreia profusa com odor desagradável, cólicas abdominais, dor e febre, onde a microbiota intestinal normal é alterada durante ou após antibioticoterapia. A colite pseudomembranosa é a manifestação mais grave da doença. Pacientes gravemente doentes podem ter pouca ou nenhuma diarreia devido ao megacólon tóxico, onde o intestino grosso inflamado torna-se massivamente distendido com gás, ocorrendo íleo paralítico, que pode resultar da perda do tônus muscular do cólon, podendo levar à perfuração do intestino e óbito. Os principais fatores de risco ligados à doença associada ao *C. difficile* incluem exposição a antibióticos, idade avançada e hospitalização. Também podem predispor à infecção cirurgias gastrointestinais recentes e terapia imunossupressora.<sup>5</sup>

Pacientes com doença inflamatória do intestino têm risco aumentado em desenvolver infecção por *C. difficile*, além de terem piores resultados, incluindo taxas mais elevadas de colectomia, recorrência e morte.<sup>6</sup>

A infecção de origem nosocomial por esta bactéria prolonga a internação dos pacientes acometidos, aumentando também os custos, além de elevar as taxas de morbidade e mortalidade destes pacientes. O objetivo deste estudo é apresentar uma revisão bibliográfica da literatura científica disponível, com relação ao mecanismo fisiopatológico, transmissão hospitalar e controle do *Clostridium difficile*, com o intuito de evitar a transmissão do mesmo no ambiente hospitalar, através de ações adequadas para controle de sua disseminação entre os pacientes internados e conhecer os mecanismos envolvidos em sua patogenicidade.

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **Patogenicidade**

O *Clostridium difficile* coloniza o intestino grosso de seres humanos e de mamíferos domésticos e selvagens. As cepas existentes podem ser toxigênicas e não-toxigênicas, mas somente as toxigênicas desencadeiam doença em humanos.<sup>7</sup>

Este microorganismo é pertencente ao filo firmicutes.<sup>8</sup>

Esta bactéria anaeróbia estrita forma colônias não hemolíticas rizoides em placas de ágar sangue e seu odor característico é descrito como odor de “celeiro de cavalos”. É

catalase, indol e urease negativos, sendo também negativo para lipase e lecitinase em ágar gema de ovo.<sup>9</sup>

A infecção pelo *Clostridium difficile* está quase sempre associada a um transtorno da flora endógena intestinal, o que permite que a bactéria se propague e cause doença. Embora alguns estudos tenham mostrado que o tratamento prévio com ciprofloxacina, clindamicina, penicilina e cefalosporinas estão mais frequentemente associados com a doença, a utilização de quase todos antibióticos pode levar à infecção. Outros fatores associados com um aumento no risco de infecção por esta bactéria incluem idade avançada, doença crônica subjacente, hospitalização recente, cirurgias gastrointestinais e alimentação enteral.<sup>10</sup>

Dois prováveis fatores que aumentam a chance de doença recorrente são a resposta imunológica inadequada às toxinas do patógeno e a perturbação persistente da microbiota intestinal.<sup>11</sup>

A bactéria é adquirida pela ingestão de seus esporos, normalmente transmitidos a partir de outros pacientes, através das mãos dos profissionais de saúde ou através do ambiente.<sup>12</sup>

Os esporos do *C. difficile* passam pelo sistema digestivo e se estabelecem no cólon, onde encontram ambiente propício para adotar sua forma vegetativa.<sup>13</sup>

O processo patogênico tem início com a germinação dos esporos do *C. difficile* e a multiplicação das formas vegetativas. O microorganismo adere à mucosa através de suas adesinas e penetra, auxiliado por seus flagelos e pela secreção de protease, iniciando, assim, a primeira fase do processo denominado colonização.<sup>4</sup>

O patógeno produz uma remodelação de sua superfície celular mediante expressão de fatores não toxigênicos auxiliares de virulência, permitindo uma eficiente colonização da superfície do cólon. O *C. difficile* é coberto por uma série de proteínas superficiais, dentro das quais, a de maior relevância, é a proteína *surface-layer* (SLP), que promove a aderência ao epitélio intestinal e poderia ajudar na evasão do sistema imune.<sup>14</sup>

As proteínas *surface-layer* são também um subconjunto de uma ampla classe de moléculas referidas como proteínas de parede celular (CWPs). A Cwp84 é uma molécula que tem atividade enzimática contra proteínas do hospedeiro e pode funcionar como uma exoenzima, facilitando a patogênese. As SLPs são antígenos imunodominantes que modulam a resposta inflamatória durante a infecção. A flagelina, componente estrutural do eixo flagelar da bactéria, também é uma potente ativadora da resposta imune inata. Para estabelecer infecção, *C. difficile* precisa resistir a uma variedade de defesas imunitárias inatas do hospedeiro, incluindo a presença de peptídeos antimicrobianos produzidos pelos tecidos no intestino. Para isso, a bactéria emprega um mecanismo, a d-alanilação do ácido

teicóico. Além disso, também foi identificado um conjunto de genes que codificam uma histidina quinase e um transportador ABC, que conferem resistência a múltiplos peptídeos antimicrobianos, além de fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF), que detectam e respondem a estes peptídeos.<sup>8</sup>

A segunda fase do processo é a produção de toxinas que catalisam a glicosilação e consequente inativação de Rho-GTPases (Rho, Rac e Cdc42 são pequenas proteínas reguladoras do citoesqueleto de actina de células eucarióticas), levando à desorganização do citoesqueleto e à morte celular.<sup>4</sup>

A patogenicidade é dependente da presença de uma ou ambas as toxinas estreitamente relacionadas com a produção de diarreia, chamadas toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB). Todas as cepas toxigênicas contêm TcdB, com ou sem a presença de TcdA. Estas duas toxinas compartilham um mecanismo molecular comum de ação: inativação de Rho GTPases através de glicosilação enzimática de um resíduo de treonina conservada. Esta via conduz à despolimerização da actina e morte celular, além de estimular uma cascata inflamatória que exacerba danos teciduais, diarreia e colite pseudomembranosa. Uma terceira toxina patogênica, a toxina binária, é produzida por algumas cepas de *C. difficile*. Esta toxina aumenta a virulência da bactéria através de ribosilação irreversível da adenosina difosfato da actina, induzindo a formação protrusões nos microtúbulos da célula hospedeira, que facilitam a adesão do microorganismo.<sup>7</sup>

Algumas variantes de TcdB tiveram a especificidade de substrato alterada e têm como alvo proteínas Rap e Ras ao invés de Rac.<sup>8</sup>

A glicosilação das Rho GTPases também causa a perda da função de barreira do epitélio intestinal. As toxinas também estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) a partir de células epiteliais e células imunológicas residentes da mucosa, as quais causam influxo de neutrófilos e conduzem a uma maior destruição do revestimento intestinal. O influxo de neutrófilos no sangue periférico (leucocitose) correlaciona-se com mau prognóstico, o que sugere que uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro é responsável por grande parte da doença associada ao *C. difficile*.<sup>15</sup>

Para produzir os efeitos tóxicos, TcdA e TcdB devem ser internalizadas nas células alvo, através de endocitose, sendo que o primeiro passo é a união ao receptor celular, essencial no processo de entrada na célula. Acredita-se que o receptor para TcdA é um carboidrato Gal- $\beta$ ,(1,4)-GlcNac. O receptor para TcdB ainda não está bem definido. As toxinas A e B são codificadas pelos genes *tcA* e *tcB*, respectivamente, que estão localizados em um locus conhecido como PaLoc (locus patogênico), e se expressam de forma eficiente durante a fase logarítmica tardia e estacionária de crescimento em resposta a estímulos

externos. Outros três genes localizados no PaLoc codificam um regulador positivo de expressão dos genes das toxinas (TcdR), um regulador negativo (TcdC) e TcdE, que codifica uma proteína que facilita a secreção das toxinas A e B, permitindo que estas atravessem a parede celular da bactéria (exotoxinas). A toxina binária (CDT – *C. difficile* transferase) é codificada em um locus separado do PaLoc e consiste em dois componentes independentes: um componente enzimático (CDTa) e um componente de transporte (CDTb), que facilita a translocação de CDTa nas células alvo.<sup>4</sup>

Acredita-se que cada toxina tem tropismo por diferentes sítios na célula hospedeira. A toxina A se liga de maneira mais eficaz ao lado apical da célula, enquanto que a toxina B se liga melhor a um receptor, ainda desconhecido, na zona basolateral celular. Em animais, a toxina A pode se ligar ao trissacarídeo Gal1( $\alpha$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4) GlcNac, enquanto que, em humanos, foi proposto que a glicoproteína gp96 seria o receptor para aderência da toxina A à célula. Uma estirpe hipervirulenta foi caracterizada como BI/NAP/027/toxinotipo III, cujas principais características são: deleção no gene *tcdC*, através do qual não se pode controlar a expressão dos genes, levando à superprodução toxigênica; hiperprodução de toxina binária; resistência à fluoroquinolonas.<sup>13</sup>

Farrow et al. (2013) sugerem que TcdB é capaz de induzir necrose independente de enzima nas células do cólon. Segundo o estudo, a morte celular induzida pela TcdB depende de montagem do complexo NADPH oxidase (NOX) da célula epitelial do hospedeiro e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo caracterizada por necrótica. Assim, durante o processo de entrada de TcdB nos endossomos, ocorreria a ativação de Rac1, em resposta à toxina, e consequente recrutamento e montagem do complexo NOX, ocorrendo produção intracelular de ROS, que se acumularia em níveis elevados, sendo letal para a célula. A montagem de NOX dependente de Rac ocorreria durante o processo de entrada de TcdB nos endossomos e, posteriormente, com a entrega do domínio glicosiltransferase, ocorreria a inativação de Rac1 pela atividade desta enzima.<sup>2</sup>

Segundo Rocha et al. (2012), os esporos do *C. difficile* somente germinam em presença de ácido cólico ou derivados (ácido taurocólico) e certos aminoácidos (como L-glicina e L-histidina). Outra família de sais biliares, como o ácido quenodesoxicólico, atua como inibidora de germinação. A antibioticoterapia, ao alterar a microflora intestinal encarregada de metabolizar os sais biliares primários, produziria um aumento significativo nos níveis de ácido cólico e derivados que, juntamente com uma redução da microflora competitiva, permitiria que os esporos do *C. difficile* germinem, proliferem, colonizem os nichos vazios e liberem suas toxinas que produzem o quadro clínico da doença.<sup>14</sup>

Foi proposto que pacientes com doença recorrente associada a este patógeno têm sua microbiota endógena suficientemente alterada, de tal forma que a resistência à

colonização por esta bactéria não é restaurada após o tratamento dirigido contra ela e que estes pacientes possuem uma redução marcante da diversidade microbiana de sua microbiota. Certas bactérias do intestino produzem agentes antimicrobianos que inibem diretamente o crescimento do *C. difficile*, característica que fica prejudicada pela ação da antibioticoterapia.<sup>3</sup>

Os mecanismos de defesa inata contra a infecção pelo *C. difficile* incluem a flora endógena microbiana, a barreira de muco, as células epiteliais intestinais e o sistema imunológico da mucosa. As toxinas têm múltiplos efeitos sobre todas estas defesas, incluindo a estimulação da liberação de múltiplos mediadores pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, peptídeos neuro-imunes) e o recrutamento e ativação de uma variedade de células do sistema imunológico inato. A marca da infecção por esta bactéria é uma resposta inflamatória intensa. Estudos sugerem que, embora a resposta imune adaptativa (na forma de anticorpos contra toxinas e antígenos não toxina) possa ter efeito benéfico na evolução da infecção, respostas imunológicas inatas podem aumentar o grau da doença através do início e propagação de cascata inflamatória.<sup>10</sup>

A instalação de um processo inflamatório intenso resulta em quadro disabsortivo e em translocação bacteriana, devido à destruição da lâmina própria do intestino.<sup>16</sup>

Além disso, as toxinas A e B ativam os nervos entéricos, provocando elevada produção de neuropeptídeos, incluindo substância P (SP) e neurotensina, e produzem elevada secreção de cloreto em células epiteliais do intestino, com consequente secreção de fluídos e diarreia. Ambas as toxinas, ao inativar as proteínas Rho, também bloqueiam a fagocitose das células vegetativas bacterianas, contribuindo para sua persistência no hospedeiro. Todos estes fatores contribuem para a morte das células epiteliais, degradação do tecido conjuntivo, que associados ao muco e uma acentuada presença de células inflamatórias, resulta na formação de pseudomembranas.<sup>14</sup>

Wu et al. (2013) verificaram que, apesar de ambas as toxinas (A e B) diminuírem a motilidade dos linfócitos T, somente TcdA, e não TcdB, diminui a quimiotaxia destas células, efeitos que podem dificultar o início das respostas imunes adaptativas, incluindo a diferenciação de células B, prejudicando a produção de anticorpos protetores. A TcdA leva a um aumento da produção de quimiocinas, que pode causar aumento da infiltração de neutrófilos nos tecidos do intestino, além de poder mediar diretamente o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção durante colite pseudomembranosa.<sup>17</sup>

A habilidade do *C. difficile* em causar enterite é baseada em duas características: resistência à colonização e resposta imune a esta bactéria. O intestino grosso é protegido de patógenos invasores pela flora residente, que fornece resistência contra colonização, através de competição por nutrientes essenciais e por locais de fixação na parede intestinal.

Antibióticos perturbam a microflora e diminuem a resistência à colonização. A redução dos filos bacteroidetes e firmicutes por antibióticos parece ser particularmente importante na fisiopatologia do *C. difficile*. A flora fecal do recém-nascido e da criança carece de resistência à colonização. Como resultado, 60% a 70% das crianças saudáveis são portadoras assintomáticas deste microorganismo durante os primeiros 12 meses de vida. Durante este estado de portador, a imunoglobulina G sérica (IgG) e imunoglobulina A (IgA) aparecem e protegem contra subsequente doença associada ao *C. difficile*. Estes anticorpos podem persistir e se ligar às toxinas da bactéria no lúmen, prevenindo diarreia e colite.<sup>7</sup>

A IL-8, em particular, provavelmente desempenha um papel fundamental na patogênese da doença por estar envolvida no recrutamento e ativação dos neutrófilos, os quais estão presentes em grandes quantidades nos locais de inflamação. Um polimorfismo no gene IL-8 tem sido associado com a suscetibilidade à doença recorrente.<sup>18</sup>

Estima-se que até 33% dos pacientes apresentarão recidiva da doença após o primeiro episódio de infecção e 45% após um segundo episódio. Uma diminuição acentuada no filo bacteroidetes pôde ser observada em pacientes com infecções recorrentes.<sup>8</sup>

Um estudo, realizado por Pettit et al. (2014), comprovou que o gene *spo0A* do *C. difficile* é um regulador transcricional global que controla esporulação, virulência e fenótipos metabólicos, coordenando a adaptação do patógeno a uma grande variedade de interações com o hospedeiro.<sup>19</sup>

Pesquisadores sugeriram que estirpes não toxigênicas podem conter algum outro fator de virulência, como adesina, enzima, cápsula, flagelo, resistência a antibióticos, entre outros, que podem desempenhar um papel na colonização e desenvolvimento de doença. A relevância clínica da toxina binária foi adicionalmente enfatizada pela descoberta de estirpe de *C. difficile* não toxigênica (que não produzem toxina A nem B) que produz toxina binária.<sup>20</sup>

Várias hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar o fato de que recém-nascidos se infectam com o *C. difficile*, mas não sofrem a doença: o colostro da mãe pode conter anticorpos que ajudam a neutralizar as toxinas; as células intestinais fetais são muito menos sensíveis ao efeito das toxinas do que as células intestinais dos adultos; recém-nascidos podem não ter receptores específicos para a ligação das toxinas aos enterócitos.<sup>13</sup>

Outra hipótese é de que os receptores do epitélio intestinal de crianças possam estar mascarados por uma espessa camada de muco, uma vez que mucinas inativam diretamente as toxinas de *C. difficile*.<sup>21</sup>

Os inibidores de bomba de prótons têm sido associados à infecção pelo *C. difficile* em vários estudos recentes. No entanto, outros estudos não mostraram esta associação e o

mecanismo pelo qual estes inibidores poderiam promover a infecção por esta bactéria não foram elucidados.<sup>22</sup>

Já em outro estudo, realizado por Barletta et al. (2013), os pesquisadores concluíram que o uso destes medicamentos pode contribuir consideravelmente para o desenvolvimento de doença associada ao *C. difficile* adquirida em hospitais e que existem três níveis de risco caracterizados pela duração da terapia com este tipo de medicação.<sup>23</sup>

Um estudo, conduzido por Bacci et al. (2011), observou que a taxa de mortalidade é mais alta após a infecção com estirpes que possuem genes para a toxina binária juntamente com as toxinas A e B, que é o caso do *C. difficile* ribotipo 027, porém esta característica é independente do ribotipo PCR. Estirpes que possuem genes codificantes para toxinas A e B, mas não para a toxina binária, mostraram risco de mortalidade menor. Assim, *C. difficile* PCR ribotipo 027 não deve ser mais considerado o único ribotipo associado à doença grave.<sup>24</sup>

Uma pesquisa, feita por Baban et al. (2013), confirmou que existem diferenças significativas entre as diferentes estirpes de *C. difficile*, como o fato de existirem cepas toxigênicas flageladas e não flageladas, e que este fato é importante para estudos de fenômenos em várias cepas, antes que conclusões gerais sejam tiradas.<sup>25</sup>

## **TRANSMISSÃO E CONTROLE NO AMBIENTE HOSPITALAR**

O *Clostridium difficile* é adquirido de forma exógena. Sugere-se que os principais reservatórios de infecção sejam indivíduos colonizados ou infectados e ambientes contaminados, tais como hospitais e instalações de cuidados crônicos. O alto custo dos cuidados associados à infecção por este patógeno destaca a necessidade urgente de melhorar o controle de infecção hospitalar e as práticas de prevenção.<sup>26</sup>

A transmissão deste microorganismo se dá via fecal-oral, pessoa a pessoa, através de fômites e instrumentos hospitalares, uma vez que os esporos são resistentes à aplicação de desinfetantes comerciais.<sup>16</sup>

Os esporos (forma infectante) podem persistir em fômites e superfícies no ambiente por meses. A doença ocorre, com frequência, em pacientes em unidades de cuidados de saúde, onde os antibióticos são prescritos e pacientes sintomáticos, uma fonte importante de transmissão, estão concentrados. As principais recomendações para a prevenção de infecção associada ao *C. difficile* incluem a administração restrita ou criteriosa dos antibióticos, a detecção precoce e confiável da infecção, o isolamento de pacientes sintomáticos e a redução da contaminação, pela bactéria, de superfícies do ambiente, dentro dos locais de cuidados de saúde. O uso de antibióticos aumenta o risco de

desenvolvimento de infecção associada ao *C. difficile* de sete a dez vezes enquanto o paciente está tomando a medicação, e durante um mês após sua suspensão, e em cerca de três vezes mais nos dois meses subsequentes. O uso de luvas e sua troca entre contato com pacientes é o melhor método comprovado para prevenir contaminação das mãos com a bactéria proveniente de pacientes sintomáticos. Recomenda-se o uso de desinfetantes registrados, que contenham declaração no rótulo de ter propriedade esporicida para *C. difficile*, para a limpeza física do ambiente.<sup>27</sup>

Pacientes com infecção sintomática são a principal fonte de transmissão. Estes pacientes eliminam grande número de esporos nas fezes, resultando em contaminação de sua pele, roupas, roupas de cama e superfícies do ambiente que estejam próximas a eles, criando o chamado verniz fecal. As mãos dos profissionais de saúde servem como importante vetor para a transmissão de esporos, a partir destes sítios, para pacientes suscetíveis. Os pacientes também podem adquirir os esporos através de contato direto com superfícies contaminadas ou equipamentos. A presença de esporos diminui significativamente durante o tratamento, com a cessação da diarreia e a diminuição da concentração destes nas fezes. Portanto, as práticas básicas recomendadas para prevenção se concentram na redução do risco de transmissão pelos pacientes sintomáticos. Estas recomendações incluem manter os pacientes infectados sob precauções de contato até que a diarreia se resolva e desinfetar os quartos e equipamentos portáteis após a alta dos pacientes, com um agente esporicida (como hipoclorito de sódio). Pacientes infectados e não diagnosticados, nem isolados, podem contribuir para a transmissão da bactéria. O uso de testes para diagnóstico com sensibilidade elevada pode ser benéfico como medida de controle, pois pacientes cuja infecção permanece não detectada por métodos de ensaio menos sensíveis (como imunoenensaio enzimático para detecção de toxina) muitas vezes disseminam números consideráveis de esporos. Portadores assintomáticos podem contribuir para transmissão.<sup>28</sup>

É desejável que pacientes com infecção por *C. difficile* sejam isolados para prevenir a transmissão a outros pacientes, porém a disponibilidade limitada de quartos individuais em alguns estabelecimentos pode levar à administração de casos de infecção em enfermarias abertas. Estima-se que um paciente com infecção pelo *C. difficile* pode excretar entre  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^7$  de bactéria por grama de fezes. A contaminação do ambiente com estes esporos ocorre em nada menos que 34% a 58% dos locais apesar da limpeza, sendo as superfícies dos fômites mais frequentemente contaminadas. Um estudo sugere que existe risco evidente de contaminação por *C. difficile* através do ar, especialmente em pacientes com sintomas ativos da infecção e afirma que é justificável o uso de quartos individuais para pacientes com suspeita ou com infecção comprovada e que o isolamento destes pacientes

deve ser feito o mais rápido possível, após o aparecimento da diarreia e antes do diagnóstico laboratorial ser confirmado.<sup>29</sup>

A exposição recente a indivíduos assintomáticos, particularmente em um estabelecimento de cuidados de saúde, também representa uma fonte potencial para muitos casos de infecção atualmente inexplicáveis e uma área potencial para intervenção. Entre 4% e 15% dos adultos saudáveis podem estar assintomaticamente colonizados. Assim, como portadores assintomáticos fazem parte de um grupo de pacientes relativamente grande, eles ainda podem ter um papel importante na transmissão.<sup>30</sup>

Quartos hospitalares ocupados por pacientes assintomáticos podem ter altas taxas de contaminação (29%). Portadores têm sido envolvidos na propagação global de cepas hipervirulentas.<sup>31</sup>

Estudos sugerem que existem múltiplas outras fontes potenciais de transmissão, como água, animais de fazenda ou de estimação e alimentos.<sup>32</sup>

Um estudo, realizado por Rahimi et al. (2014), indicou a importância potencial de alimentos, incluindo carne de búfalo, como fonte de transmissão de *C. difficile* para seres humanos. Neste estudo, a bactéria foi isolada de amostras de carne crua de boi, carne de vaca, carne de cabra, carne de ovelha e carne de búfalo, adquiridas não embaladas, em açougues no Irã. A manutenção da higiene no abate, monitoramento microbiológico regular de carcaças, implementação de boas práticas de fabricação e um sistema de segurança alimentar são essenciais para minimizar os riscos ao consumidor. A fonte de *C. difficile* em produtos alimentares é incerta. A contaminação da carne pode ser devido à bactéria residente no trato gastrointestinal de animais, mas também pode originar das mãos das pessoas que trabalham em matadouros, dos equipamentos de processamento de carne ou do ambiente durante o processo de abate.<sup>33</sup>

A hipótese de que os alimentos podem ser uma possível fonte de exposição ao *C. difficile* foi levantada, mas evidências para confirmar ou refutar esta hipótese estão incompletas. Em estudos recentes, esta bactéria foi isolada de alimentos destinados ao varejo para consumo humano nos Estados Unidos, no Canadá e na Europa e de produtos cárneos destinados ao consumo por animais de estimação, o que evidencia uma preocupação sobre a aquisição de origem alimentar deste patógeno, através do consumo ou manuseio de produtos contaminados.<sup>34</sup>

A transmissão pode ser minimizada com o uso de luvas e aventais, lavagem adequada das mãos com água e sabão, uso cuidadoso e limpeza apropriada de equipamentos compartilhados entre pacientes (como equipamentos para medir pressão arterial, termômetros e estetoscópios) e uso de soluções de limpeza bactericidas.<sup>35</sup>

Os esporos são resistentes aos efeitos bactericidas do álcool, portanto, a higiene das mãos com produtos à base de álcool, após os cuidados de portadores assintomáticos, pode aumentar sua contribuição para a transmissão do patógeno.<sup>36</sup>

A radiação ultravioleta C (UV-C) mata uma variedade de espécies bacterianas. O dispositivo *Tru-D Rapid Room Disinfection* é uma tecnologia de descontaminação de quarto, totalmente automatizada e móvel, que utiliza radiação UV-C para matar patógenos. Este dispositivo reduz significativamente a contaminação pelo *C. difficile* em superfícies do ambiente de laboratório (bancadas) e em quartos de pacientes hospitalizados.<sup>37</sup>

Enquanto o dispositivo de UV-C (230-280nm) tem algumas vantagens potenciais em relação a outras estratégias de desinfecção, ciclos que são eficazes para matar os esporos desta bactéria requerem aproximadamente 45 minutos e os pacientes não podem estar no quarto durante seu uso. O espectro de radiação far-UV (185-230nm) poderia potencialmente atingir doses letais de radiação em menos tempo. O *Sterilray Disinfection Wand (Healthy Environment Innovations, Inc.)* é um dispositivo móvel portátil que utiliza a radiação far-UV para matar patógenos e tem sido proposto que este pode ser usado para tratar superfícies em salas ocupadas por pacientes. Porém, a presença de matéria orgânica diminui a eficácia da radiação far-UV e pode limitar a utilidade desta tecnologia nos serviços de saúde.<sup>38</sup>

Um estudo, conduzido por Vincent et al. (2013), identificou que a depleção da família *Clostridiales Incertae Sedis XI*, residente da microbiota, é um fator associado ao risco do desenvolvimento da infecção em pacientes hospitalizados. Esta nova importante descoberta pode, eventualmente, levar à elaboração de intervenções dirigidas à microbiota para prevenção do desenvolvimento da infecção em pacientes de alto risco.<sup>39</sup>

Uma pesquisa avaliou a esporulação e suscetibilidade de três PCR ribotipos – 012, 017 e 027 – a quatro classes de desinfetantes: agentes liberadores de cloro (CRAs - *chlorine releasing agents*), peroxigênios, compostos quaternários de amônio (QAC – *quaternary ammonium compounds*) e biguanidas. O PCR ribotipo 017 apresentou a maior frequência de esporulação sob estas condições de teste. Os biocidas oxidantes e CRAs foram os mais eficazes na descontaminação de células vegetativas e esporos de *C. difficile* e a eficácia dos CRAs foi concentração dependente, independentemente do ribotipo. No entanto, houveram diferenças observadas na suscetibilidade dos PCR ribotipos, independente das concentrações testadas para Virkon (peroxigênio), Newgenn (QAC), Proceine 40 (QAC) e Hibiscrub (biguanida). Para Steri7 (QAC) e Biocleanse (QAC), a diferença observada entre os desinfetantes foi dependente do ribotipo e da concentração. O agente oxidante Perasafe (peroxigênio) foi consistentemente eficaz em todos os três ribotipos em concentrações variadas.<sup>40</sup>

Ferreira (2012) testou três cepas de *C. difficile* (ribotipos: 027, 133 e 135) para atividade esporicida dos desinfetantes Virkon (peroxigênio), Cloro Rio (agente liberador de cloro ativo), Riohex (biguanida), Cidex Opa (aldeído) e Peresal (peroxigênio). Concluiu-se que Cidex Opa e Cloro Rio poderiam ser usados para desinfecção hospitalar para eliminação de esporos desta bactéria. Virkon apenas diminuiu a concentração dos esporos. Quanto ao Peresal, este se mostrou eficiente na eliminação de esporos do ribotipo 133, porém houve apenas redução dos esporos das cepas dos ribotipos 135 e 027. Já o Riohex não exerceu atividade esporicida significativa a nenhuma das cepas testadas.<sup>41</sup>

Como estratégia adicional para prevenir a infecção, a educação dos profissionais de saúde e da administração hospitalar sobre quadro clínico, transmissão e epidemiologia da doença associada ao *C. difficile* deve ser incentivada. Quanto aos produtos de limpeza para controle ambiental, para reduzir o número de esporos no ambiente, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomenda a utilização de agentes liberadores de cloro após a limpeza meticulosa para remover matéria orgânica. O uso de liberadores de cloro, produtos à base de hipoclorito ou peróxido de hidrogênio, em quartos expostos a esporos pode reduzir o número destes dentro do ambiente, auxiliando na redução do risco de recorrência e disseminação da doença. A evidência é mais forte para produtos de maiores concentrações de agentes desinfetantes (por exemplo, 5000mg/L de cloro livre ou 7% peróxido de hidrogênio).<sup>42</sup>

Recomenda-se que os testes laboratoriais sejam realizados somente em amostras de fezes diarreicas (com exceção dos pacientes com íleo paralítico) e em pacientes maiores de um ano, além disso, não devem ser examinadas amostras de pacientes assintomáticos. Também não é necessário realizar provas microbiológicas para confirmar cura (uma vez cessado os sintomas), bem como, não se recomenda a repetição de provas durante o mesmo episódio diarreico, por ter valor limitado. As técnicas de diagnóstico microbiológico disponíveis são: ensaios de citotoxicidade celular (técnica trabalhosa e demorada); cultura toxigênica (é o mais sensível, mas muito demorado); detecção de glutamato desidrogenase; imunoensaios enzimáticos para detecção de toxinas A e B (são os mais utilizados) e amplificação de ácidos nucleicos (PCR).<sup>4</sup>

Os níveis de toxina nas fezes podem se correlacionar com a gravidade da diarreia, sendo assim, pacientes infectados podem apresentar resultados negativos por imunoensaio enzimático, por apresentarem baixos níveis de toxina no trato intestinal, porém, estes também podem disseminar esporos. Desta forma, o uso de testes de diagnóstico com maior sensibilidade, como os métodos baseados em PCR, poderia ser benéfico para os esforços de controle da infecção, enquanto que imunoensaios enzimáticos para detecção de toxinas,

por apresentarem pouca sensibilidade, não devem ser escolhidos como teste único para o diagnóstico da doença.<sup>43</sup>

Após confirmação do diagnóstico, as estratégias básicas de tratamento envolvem: suspensão da administração do antibiótico anterior à doença, correção de eventuais desequilíbrios de fluídos e eletrólitos, evitar agentes antiperistálticos, iniciar precaução de contato e iniciar tratamento com antibióticos se houver evidência de colite, diarreia persistente pós-suspensão dos antibióticos ou se o antibiótico anterior precisar ser continuado devido doença coexistente.<sup>35</sup>

O tratamento com inibidores de bomba de prótons e outros antiácidos também deve ser suspenso. Os antibióticos que podem ser utilizados no tratamento são: metronidazol, vancomicina, teicoplanina e fidaxomicina. Outros tratamentos incluem o uso de nitazoxanida, rifaximina, probióticos, imunoglobulina G (antitoxina A e B), anticorpos monoclonais contra toxinas A e B, além de transplante fecal e, em casos extremos, colectomia.<sup>4</sup>

Também podem ser administradas resinas permutadoras de ânions (que se ligam às toxinas da bactéria, promovendo sua excreção) e tinidazol.<sup>35</sup>

Vacinas com base em toxinas A e B inativadas estão atualmente em desenvolvimento.<sup>7</sup>

Muito pouco se sabe sobre a ocorrência de casos de infecção pelo *C. difficile* nos países da América Latina, uma vez que existem poucos estudos publicados. Uma das publicações mais importantes nesta área ocorreu em 2010, onde foi descrito, por Quesada-Gómez et al., pela primeira vez, o isolamento da cepa 027/BI/NAP-1 de pacientes com doença associada ao *Clostridium difficile*, em um hospital na Costa Rica. A detecção desta cepa em um país latino-americano destaca o problema da disseminação desta bactéria em todo o mundo. Deve ser apenas uma questão de tempo antes que esta estirpe hipervirulenta seja detectada em outros países da América Latina.<sup>44</sup>

A tentativa de controlar este patógeno e as doenças causadas por ele pode necessitar da atuação de grandes conjuntos de disciplinas, como as áreas de diagnóstico microbiológico, enfermagem, gestão hospitalar e controle de infecção, farmacologia, patogênese microbiana, biologia do genoma, ecologia microbiana e desenvolvimento de terapêuticas, para ajudar os médicos a mitigar seus efeitos.<sup>9</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos mecanismos de patogenicidade, mais estudos são necessários para sua elucidação, tanto no que diz respeito ao microorganismo em si e suas diferentes

estirpes, quanto no que se refere à interação de seus fatores de virulência e as respostas imunológicas inata e adaptativa do hospedeiro, de forma a permitir o estabelecimento de medidas mais eficazes para o controle da doença associada ao *C. difficile*. Quanto à transmissão hospitalar e controle do patógeno, a prescrição criteriosa de antibiótico aos pacientes, a detecção da infecção e isolamento precoce dos doentes, a utilização de testes de diagnóstico com sensibilidade elevada, a desinfecção adequada do ambiente e dos equipamentos utilizados e a educação continuada dos profissionais de saúde com relação à patogenicidade, transmissão e controle da bactéria, além da higienização adequada das mãos destes profissionais, são medidas que se mostram eficientes no controle da transmissão do *C. difficile* em ambientes de cuidados de saúde. Mais estudos são necessários para elucidar outras possíveis fontes de infecção, como água e alimentos. No Brasil, dados epidemiológicos, incluindo incidência e disseminação deste patógeno, são escassos, o que reforça a necessidade da implantação de medidas preventivas, por parte dos hospitais, para evitar a ocorrência de possíveis surtos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Spadão FS. Aspectos clínicos e biológicos da diarreia por *Clostridium difficile* em pacientes hematológicos e transplantados de medula óssea [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012 [acesso em 2014 abr 23]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-13062012-114923/pt-br.php>
2. Farrow MA, Chumbler NM, Lapierre LA, Franklin JL, Rutherford SA, Goldering JR, et al. *Clostridium difficile* toxin B-induced necrosis is mediated by the host epithelial cell NADPH oxidase complex. PNAS [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 26]; 110(46): 18674-18679. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/early/2013/10/24/1313658110.full.pdf>
3. Britton RA, Young VB. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. Trends Microbiol [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 03]; 20(7): 313-319. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3408078/pdf/nihms-378874.pdf>
4. Pérez M, Hurtado AI, Couto I, Gutiérrez JM, Seoane L, Suárez JM, et al. Abordaje multidisciplinario de la infección por *Clostridium difficile*. Rev. chil. Infectol. [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 26]; 30(2): 165-185. Disponível em: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182013000200008](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200008)
5. Murphy J. *Clostridium difficile*: an overview. Int J Infect Control [Internet]. 2009 [acesso em 2014 mai 03]; 5(2): [3]. Disponível em: <http://www.ijic.info/article/view/3626/3161>
6. Nitzan O, Elias M, Chazan B, Raz R, Saliba W. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and implications in treatment. World J Gastroenterol [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 27]; 19(43): 7577-7585. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837256/pdf/WJG-19-7577.pdf>

7. Burke KE, Lamont JT. Clostridium difficile infection: a worldwide disease. Gut Liver [Internet]. 2014 [acesso em 2014 mai 27]; 8(1): 1-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916678/pdf/gnl-8-1.pdf>
8. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozi M, Viswanathan VK. Clostridium difficile infection: Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 26]; 3(2): 121-134. Disponível em: <http://www.landesbioscience.com/journals/gutmicrobes/2011GUTMICROBES0053R.pdf>
9. Dubberke ER, Haslam DB, Lanzas C, Bobo LD, Burnham CAD, Gröhn YT, et al. The ecology and pathobiology of Clostridium difficile infections: an interdisciplinary challenge. Zoonoses Public Health [Internet]. 2011 [acesso em 2014 mai 03]; 58(1): 4-20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3668351/pdf/nihms464777.pdf>
10. Madan R, Petri Jr WA. Immune responses to Clostridium difficile infection. Trends Mol Med [Internet]. 2012 [acesso em 2014 abr 23]; 18(11): 658-666. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500589/pdf/nihms415474.pdf>
11. Cho SM, Lee JJ, Yoon HJ. Clinical risk factors for Clostridium difficile-associated diseases. Braz J Infect Dis [Internet]. 2012 [acesso em 2014 abr 24]; 16(3): 256-261. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702012000300007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702012000300007&script=sci_arttext)
12. Lessa FC, Gould CV, McDonald C. Current status of Clostridium difficile infection epidemiology. Clin Infect Dis [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 27]; 55(2): 65-70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388017/pdf/cis319.pdf>
13. Zea JW, Salazar CL. Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. Infectio [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 12]; 16(4): 211-222. Disponível em: <http://zl.elsevier.es/es/revista/infectio-351/enfermedad-asociada-clostridium-difficile-prevalencia-diagnostico-laboratorio-90187878-revisiones-2012>
14. Rocha CH, Naour S, Lobos MA, Sabja DP. Infecciones causadas por Clostridium difficile: una visión actualizada. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 12]; 29(4): 434-445. Disponível em: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v29n4/art11.pdf>
15. Shen A. Clostridium difficile toxins: mediators of inflammation. J Innate Immun [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 27]; 4(2): 149-158. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388264/pdf/jin-0004-0149.pdf>
16. Silva Jr M. Recentes mudanças da infecção por Clostridium difficile. Einstein [Internet]. 2012 [acesso em 2014 abr 24]; 10(1): 105-109. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-45082012000100023&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082012000100023&nrm=iso&tlng=pt)
17. Wu D, Joyee AG, Nandagopal S, Lopez M, Ma X, Berry J, et al. Effects of Clostridium difficile toxin A and B on human T lymphocyte migration. Toxins [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 26]; 5(5): 926-938. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=855EA1CD830BD5CE01277329D7822D37?doi=10.1.1.361.9067&rep=rep1&type=pdf>

18. Pruitt RN, Lacy DB. Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 27]; 2(28): [14]. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/MARLENA/Desktop/fcimb-02-00028.pdf>
19. Pettit LJ, Browne HP, Yu L, Smits WK, Fagan RP, Barquist L, et al. Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism. *BMC Genomics* [Internet]. 2014 [acesso em 2014 mai 26]; 15(160): [15]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-15-160.pdf>
20. Stojanovic P, Kocic B, Stojanovic M, Miljkovic-Selimovic B, Tasic S, Miladinovic-Tasic N, et al. Clinical importance and representation of toxigenic and non-toxigenic *Clostridium difficile* cultivated from stool samples of hospitalized patients. *Braz. J. Microbiol* [Internet]. 2012 [acesso em 2014 abr 24]; 43(1): 215-223. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822012000100023&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822012000100023&script=sci_arttext)
21. Sun XP, Savidge T, Feng H. The enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. *Toxins* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 abr 24]; 2(7): 1848-1880. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/MARLENA/Desktop/toxins-02-01848-v2.pdf>
22. Nerandzic MM, Pultz MJ, Donskey CJ. Examination of potential mechanisms to explain the association between proton pump inhibitors and *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009 [acesso em 2014 mai 12]; 53(10): 4133-4137. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764230/pdf/0252-09.pdf>
23. Barletta JF, El-Ibiary SY, Davis LE, Nguyen B, Raney CR. Proton pump inhibitors and the risk for hospital-acquired *Clostridium difficile* infection. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 jun 22]; 88(10): 1085-1090. Disponível em: [http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(13\)00564-8/abstract](http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(13)00564-8/abstract)
24. Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KEP. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 [acesso em 2014 mai 03]; 17(6): [15]. Disponível em: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/6/10-1483\\_article.htm#suggestedcitation](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/6/10-1483_article.htm#suggestedcitation)
25. Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non epidemic and an epidemic strain. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 03]; 8(9): [12]. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0073026&representation=PDF>
26. Rubin MA, Jones M, Leecaster M, Khader K, Ray W, Huttner A, et al. A simulation-based assessment of strategies to control *Clostridium difficile* transmission and infection. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 27]; 8(11): [11]. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0080671&representation=PDF>
27. Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: preventing *Clostridium difficile* infections [Internet]. [Atlanta]: U.S. Department of Health and Human Services; 2012 [acesso em 2014 mai 27]. [6 p]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6109.pdf>

28. Donskey CJ. Preventing transmission of *Clostridium difficile*: is the answer blowing in the wind?. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 mai 26]; 50(11): 1458-1461. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/50/11/1458.full.pdf+html>
29. Best EL, Fawley WN, Parnell P, Wilcox MH. The potential for airborne dispersal of *Clostridium difficile* from symptomatic patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 jun 09]; 50(11): 1450-1457. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/50/11/1450.full.pdf>
30. Eyre DW, Griffiths D, Vaughan A, Golubchik T, Acharya M, O'Connor L, et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonisation and onward transmission. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 12]; 8(11): [12]. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0078445>
31. Yakob L, Riley TV, Paterson D, Clements ACA. *Clostridium difficile* exposure as an insidious source of infection in healthcare settings: an epidemiological model. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 27]; 13(376): [8]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-13-376.pdf>
32. Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 mai 27]; 369(13): 1195-1205. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1216064>
33. Rahimi E, Jalali M, Weese JS. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health* [Internet]. 2014 [acesso em 2014 jun 9]; 14(119): [4]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2458-14-119.pdf>
34. Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen?. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 mai 12]; 51(5): 577-582. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/51/5/577.long>
35. Yoo J, Lightner AL. *Clostridium difficile* infections: what every clinician should know. *Perm J* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 mai 27]; 14(2): 35-40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912081/>
36. Lanzas C, Dubberke ER, Lu Z, Reske KA, Gröhn YT. Epidemiological model for *Clostridium difficile* transmission in health-care settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2011 [acesso em 2014 mai 27]; 32(6): 553-561. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645005/pdf/nihms-464779.pdf>
37. Nerandzic MM, Cadnum JL, Pultz MJ, Donskey CJ. Evaluation of an automated ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens in hospital rooms. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 mai 12]; 10(197): [8]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-10-197.pdf>
38. Nerandzic MM, Cadnum JL, Eckart KE, Donskey CJ. Evaluation of a hand-held far-ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2012 [acesso em 2014 mai 12]; 12(120): [6]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-12-120.pdf>

39. Vincent C, Stephens DA, Loo VG, Edens TJ, Behr MA, Dewar K, et al. Reductions in intestinal Clostridiales precede the development of nosocomial *Clostridium difficile* infection. *Microbiome* [Internet]. 2013 [acesso em 2014 abr 23]; 1(18): [11]. Disponível em: <http://www.microbiomejournal.com/content/pdf/2049-2618-1-18.pdf>
40. Dawson LF, Valiente E, Donahue EH, Birchenough G, Wren BW. Hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotypes exhibit resistance to widely used disinfectants. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [acesso em 2014 mai 26]; 6(10): [7]. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0025754&representation=PDF>
41. Ferreira TG. Efeito de desinfetantes hospitalares sobre células vegetativas e esporos de ribotipos de *Clostridium difficile* isolados exclusivamente no Brasil [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2012 [acesso em 2014 abr 23]. Disponível em: [http://www.btdt.ndc.uff.br/tde\\_arquivos/49/TDE-2012-07-10T111711Z-3291/Publico/thais.PDF](http://www.btdt.ndc.uff.br/tde_arquivos/49/TDE-2012-07-10T111711Z-3291/Publico/thais.PDF)
42. McLeod-Glover N, Sadowski C. Efficacy of cleaning products for *C difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Can Fam Physician* [Internet]. 2010 [acesso em 2014 mai 27]; 56(5): 417-423. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868609/pdf/0560417.pdf>
43. Guerrero DM, Chou C, Jury LA, Nerandzic MM, Cadnum JC, Donskey CJ. Clinical and infection control implications of *Clostridium difficile* infection with negative enzyme immunoassay for toxin. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2011 [acesso em 2014 mai 26]; 53(3): 287-290. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/53/3/287.full.pdf>
44. 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* [internet]; 2012 [acesso em 2014 jun 25]; 61(2): 169-179. Disponível em: <http://jmm.sgmjournals.org/content/61/2/169.full.pdf+html>.