

Isabel Cristina Eiras Cordeiro

Clostridium difficile - infeção e opções terapêuticas

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Isabel Cristina Eiras Cordeiro

Clostridium difficile - infeção e opções terapêuticas

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Isabel Cristina Eiras Cordeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011147006, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 2 de setembro de 2016.

(Isabel Cristina Eiras Cordeiro)

A Orientadora

(Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues)

A Aluna

(Isabel Cristina Eiras Cordeiro)

AGRADECIMENTOS

“São memórias de um tempo que vai terminar,
Chega ao fim o momento de um último olhar”

In Balada do Amanhecer

É impossível terminar esta etapa da minha vida sem agradecer àqueles que tornaram tudo isto possível.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio, carinho, compreensão e por tornarem possível alcançar este objetivo.

Ao Mário Rui, por estar sempre ao meu lado.

Aos amigos de sempre, por compreenderem as minhas ausências e aos amigos da faculdade, por todos os momentos partilhados, por me acompanharem nestes melhores anos das nossas vidas.

À minha orientadora, a Professora Doutora Sara Domingues, por toda a ajuda, disponibilidade e interesse demonstrado.

A todos os professores, por todos os conhecimentos que me transmitiram.

A Coimbra.

ÍNDICE

LISTA DE ACRÓNIMOS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT	8
1. Introdução: Clostridium difficile, o que é?.....	9
2. Fatores de virulência.....	10
2.1. Produção de toxinas.....	10
2.2. Flagelos e Motilidade	11
2.3. Enzimas proteolíticas e fatores de adesão.....	11
3. Estirpe NAPI/027/BI.....	12
4. Patogênese	13
5. Infecção por Clostridium difficile.....	14
5.1. CDI ligeira a moderada.....	15
5.2. CDI severa.....	15
5.3. Infecção recorrente	15
6. Diagnóstico	16
7. Fatores de risco de Infecção por Clostridium difficile.....	17
7.1. Uso de Antibióticos.....	18
8. Prevenção da infecção	19
9. Tratamento	20
9.1. Terapêutica antibacteriana.....	20
9.1.1. Metronidazol e Vancomicina.....	20
9.1.2. Fidaxomicina	21
9.1.3. Resistência aos antibacterianos	21
9.2. Terapêutica microbiana	22
9.2.1. Probióticos	22
9.2.2. Transplante da Microbiota Fecal	22

9.3. Tratamento cirúrgico	26
9.4. Imunoterapia	26
CONCLUSÃO	27
BIBLIOGRAFIA	28

LISTA DE ACRÓNIMOS

ADP – Adenosina difosfato

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

CDI – Infecção por *Clostridium difficile*

CDT – *Clostridium difficile* transferase

CPM – Colite pseudomembranosa

EUA – Estados Unidos da América

GTPases – Guanosinas-trifosfatases

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

IgG – Imunoglobulina G

NAPI/027/BI – do inglês *Clostridium difficile* North American Pulsovar I, polymerase chain reaction ribotype 027 and restriction endonuclease analysis group BI

PaLoc – Locus de patogenicidade

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

TMF – Transplante da microbiota fecal

RESUMO

Atualmente a infecção por *Clostridium difficile* (CDI) é a principal causa de diarreia associada aos cuidados de saúde, sendo frequentemente associada ao uso de antibióticos. As manifestações clínicas da CDI podem variar, desde colonização assintomática, diarreia ligeira a síndromes mais graves, como colite pseudomembranosa e colite fulminante, com elevada morbidade e mortalidade.

Com o surgimento da estirpe hipervirulenta NAPI/027/BI aumentaram os casos de doença severa assim como de recorrências. O aumento do número de infecções recorrentes é um dos principais problemas associados ao tratamento padrão com metronidazol e vancomicina. O transplante da microbiota fecal (TMF) surge como uma alternativa eficaz para o tratamento da infecção recorrente por *C. difficile*.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*; Infecção por *C. difficile*; Colite Pseudomembranosa; Transplante da microbiota fecal.

ABSTRACT

Currently, the *Clostridium difficile* infection (CDI) is the leading cause of diarrhea associated with healthcare and is often associated with the use of antibiotics. The clinical manifestations of CDI may vary from asymptomatic colonization, mild diarrhea to severe syndromes such as pseudomembranous colitis and fulminant colitis, with high morbidity and mortality.

With the appearance of the hypervirulent strain NAPI / 027 / BI cases of severe illness have increased as well as recurrence. The rise of number of recurrent infections is one of the main problems associated with standard treatment with metronidazole and vancomycin. Fecal microbiota transplantation (TMF) appears as an effective alternative to the treatment of recurrent *C. difficile* infection.

Key-words: *Clostridium difficile*; *C. difficile* infection; Pseudomembranous Colitis; Fecal microbiota transplantation.

I. Introdução: Clostridium difficile, o que é?

Clostridium difficile [Tabela 1] é um bacilo anaeróbico Gram-positivo [Figura 1] que infeta e coloniza o intestino grosso. É uma bactéria produtora de toxinas que provocam inflamação intestinal e caracteriza-se também pela sua capacidade de formar esporos, existindo assim na forma vegetativa e na forma esporulada (Champoux *et al.*, 2003).

Foi pela primeira vez isolado em 1935 por Hall e O'Tolle a partir de fezes de recém-nascidos saudáveis, sendo denominado de “*Bacillus difficilis*” devido à dificuldade de crescimento em cultura. Contudo só em 1978 é considerado um agente patogénico humano, sendo descrito o seu papel relacionado com colite pseudomembranosa (CPM) e diarreias associadas ao uso de antibióticos (Hunt and Ballard, 2013).

A primeira sequência completa de genoma de uma estirpe de *C. difficile* foi publicada em 2006 pelo Instituto Sanger no Reino Unido (Knight *et al.*, 2015).

Tabela 1: Classificação científica de *C. difficile* (Champoux *et al.*, 2003)

Classificação Científica	
Reino	Bactéria
Filo	Firmicutes
Classe	Clostridia
Ordem	Clostridiales
Família	Clostridiaceae
Género	Clostridium
Espécie	<i>Clostridium difficile</i>

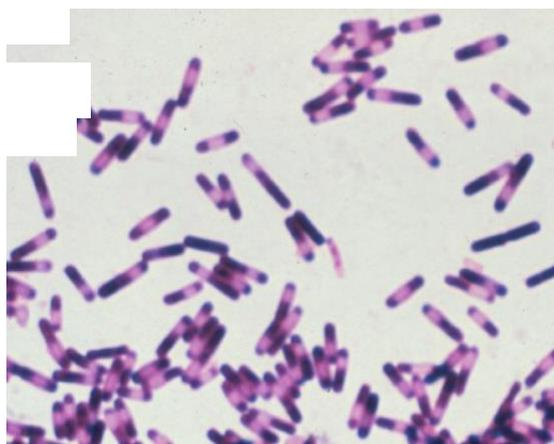


Figura. 1: Imagem microscópica de *C. difficile* sob coloração de Gram (Medscape, 2016)

Antes da década de 2000, a taxa de infecção por *C. difficile* não variava muito de ano para ano. No entanto, nos últimos 15 anos, o número total de casos relatados aumentou drasticamente em cerca de 25% por ano, assim como a sua gravidade. Este aumento está associado ao surgimento de uma nova estirpe de *C. difficile* – a estirpe NAPI/027/BI (Peniche, Savidge and Dann, 2013; To and Napolitano, 2014).

C. difficile é, atualmente, um importante agente patogénico, colocado em 2013, pelos Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA), na categoria de “urgente” no que se refere a resistências antimicrobianas (Drekonja *et al.*, 2014). Origina um espectro de doenças intestinais, desde diarreia ligeira a CPM e colite fulminante, e está associado a uma mortalidade significativa (Bassetti *et al.*, 2012).

2. Fatores de virulência

2.1. Produção de toxinas

O *locus* de patogenicidade (*PaLoc*) de *C. difficile* é uma região genómica de 19,6 Kb que contem cinco genes: *tcdR*, *tcdB*, *tcdE*, *tcdA* e *tcdC*. O *tcdR* atua como regulador positivo. O TcdR liga-se a regiões promotoras a montante dos genes *tcdA* e *tcdB*, levando à transcrição destes genes que codificam as toxinas A e B, respetivamente. O gene *tcdC* atua como regulador negativo, inibindo a transcrição dos genes codificadores das toxinas. O gene *tcdE* codifica uma proteína porina, com a função de abrir poros na membrana citoplasmática que permite a libertação das toxinas pelo microrganismo (Hunt and Ballard, 2013).

A produção de toxinas é o principal aspeto responsável pela patogenicidade de *C. difficile*, sendo as toxinas A e B responsáveis pela diarreia e inflamação.

As duas toxinas são glicosiltransferases, com estrutura semelhante, e são libertadas durante a fase de crescimento tardio do microrganismo no seu estado vegetativo. Estas ligam-se às células hospedeiras e são internalizadas; atuam no citoplasma, alterando as proteínas envolvidas na transdução de sinais, havendo perturbação das vias de sinalização celulares, particularmente aquelas que envolvem o citoesqueleto de actina. Ambas as toxinas atuam incorporando glucose em determinadas guanosinas-trifosfatases (GTPases), como as proteínas Rho. Estas GTPases, entre outras funções, regulam processos envolvidos na manutenção da barreira epitelial e formação do citoesqueleto, intervindo também na fagocitose e produção de citocinas. Assim, a glicosilação das GTPases leva à degradação do citoesqueleto de actina, um aumento da permeabilidade da membrana, perda da função de barreira, citotoxicidade e morte da célula do hospedeiro (Carroll and Bartlett, 2011).

A toxina A é uma enterotoxina, provoca o arredondamento das células e a rutura das *tight-junctions* intercelulares, alterando a permeabilidade da membrana intestinal e originando secreção de fluidos. É também um potente inibidor da síntese de proteínas e ativa macrófagos e mastócitos. Desta forma, causa dano nas microvilosidades intestinais podendo ocorrer completa erosão da mucosa (Hunt and Ballard, 2013; Carroll and Bartlett, 2011).

A toxina B é uma citotoxina e as suas ações a nível do citoesqueleto e das *tight junctions* resultam numa diminuição da resistência transepitelial, acumulação de fluido e destruição do epitélio intestinal.

As duas toxinas atuam sinergicamente promovendo a libertação de citocinas inflamatórias, como a interleucina IL8 que contribui para a quimiotaxia de neutrófilos,

aumentando a lesão da mucosa. Os efeitos da intoxicação das células e tecidos do hospedeiro são imediatos. Outros mediadores inflamatórios também libertados, estimulam o sistema nervoso entérico e os neurónios sensoriais, promovendo o influxo de células inflamatórias e a secreção de fluido (Hunt and Ballard, 2013; Carroll and Bartlett, 2011; Peniche *et al.*, 2013).

Algumas estirpes produzem uma toxina binária, também denominada *Clostridium difficile transferase* (CDT), que atua como gene regulador e está presente nas estirpes mais virulentas; contudo o seu papel na virulência ainda não está totalmente compreendido. Esta toxina é constituída por um componente de ligação e um componente enzimático e apresenta atividade de ADP ribosiltransferase, que origina a desorganização do citoesqueleto das células (Denève *et al.*, 2009).

2.2. Flagelos e Motilidade

Os flagelos são fatores de colonização importantes, embora a sua expressão flagelar e o seu fenótipo de motilidade sejam variáveis entre as diferentes estirpes. As bactérias flageladas apresentam maior mobilidade, alcançando mais rapidamente as células-alvo. Por outro lado, foram identificados genes no *Locus flagelar* que codificam proteínas envolvidas na ligação aos tecidos (Hunt and Ballard, 2013).

2.3. Enzimas proteolíticas e fatores de adesão

Outros fatores que interferem na virulência são a produção de enzimas proteolíticas como a hialuronidase e a colagenase, que participam na destruição do tecido conjuntivo. Estas enzimas contribuem para a patologia e também para a nutrição de *C. difficile*. Também as proteínas de superfície e da parede celular são consideradas fatores de virulência, pois facilitam a adesão da bactéria às células epiteliais intestinais (Hunt and Ballard, 2013).

3. Estirpe NAPI/027/BI

Algumas estirpes de *C. difficile* apresentam maior virulência. Entre elas encontram-se a NAPI/ribotipo 027, ribotipo 078, ribotipo 106, ribotipo 018 e ribotipo 056. Destas, a estirpe mais estudada é a NAPI/027 (F. van Nispen tot Pannerden, Verbon and Kuipers, 2011).

Em 2005, houve um aumento da taxa de infecção por *C. difficile* nos hospitais. Através da análise molecular, foi identificada uma nova estirpe como causa de um grande número de casos de infecção por *C. difficile*. Esta estirpe foi caracterizada como *C. difficile North American pulsovar I (NAPI), PCR ribotype 027, and restriction endonuclease analysis group BI (NAPI/027/BI)* (Bassetti et al., 2012).

O surgimento desta estirpe está associado ao excessivo uso de fluoroquinolonas (To and Napolitano, 2014).

C. difficile NAPI/027/BI apresenta uma mutação no gene *tcdC*, resultando numa sobreprodução das toxinas A e B. Além disto, a hiperprodução de toxinas também está relacionada com a cinética acelerada que a estirpe apresenta e ao facto de a síntese de toxinas ocorrer tanto na fase estacionária como na fase exponencial, ao contrário do que acontece nas estirpes comuns, em que a síntese só ocorre na fase estacionária (Bassetti et al., 2012).

Outra razão da hipervirulência de NAPI/027/BI é a produção da toxina binária CDT. A maior taxa de esporulação, tanto na ausência como na presença de agentes de limpeza sem cloro, contribui para uma melhor sobrevivência e disseminação desta estirpe no ambiente (Bassetti et al., 2012).

Esta estirpe, para além de ser hipervirulenta, apresenta elevada resistência aos antibióticos, nomeadamente metronidazol, fluoroquinolonas e eritromicina (Bassetti et al., 2012).

Clinicamente, os doentes manifestam casos mais graves de infecção por *C. difficile* com mais casos de recorrências, megacólon tóxico, choque séptico e um aumento da mortalidade.

4. Patogénese

A transmissão de *C. difficile* ocorre, normalmente, por via fecal-oral, pessoa-a-pessoa, através da ingestão de esporos e/ou células vegetativas, contudo a transmissão de esporos através do ar também pode ocorrer (Pannerden, Verbon and Kuipers, 2011; To and Napolitano, 2014).

As fontes de infecção são representadas pelos indivíduos doentes e pelos portadores assintomáticos, que eliminam esporos do bacilo nas fezes. A nível hospitalar verifica-se a contaminação do ambiente próximo do doente infetado e a transmissão ocorre, maioritariamente, via profissionais de saúde (Pereira, 2014).

As células vegetativas, geralmente, são destruídas por ação do ácido gástrico. Os esporos conseguem sobreviver e germinam no intestino delgado por ação dos ácidos biliares (To and Napolitano, 2014).

Nesta fase as bactérias flageladas migram para o cólon, onde se multiplicam, especialmente quando há alterações da flora intestinal devido ao uso prévio de antibióticos. Através de adesinas e enzimas proteolíticas de superfície, a bactéria adere e penetra na mucosa intestinal, iniciando a segunda fase da patogénese: a produção de toxinas.

As toxinas A e B são consideradas o principal fator de virulência. Promovem a libertação de vários mediadores inflamatórios dando origem a uma resposta inflamatória em cascata, com penetração de macrófagos, mastócitos e neutrófilos para o local de infecção. Contribuem também para a desorganização do citoesqueleto do enterócito, tendo como consequência a destruição do epitélio intestinal e a alteração da permeabilidade da mucosa. O resultado final é o desenvolvimento de diarreia e/ou CPM (Bassetti *et al.*, 2012; To and Napolitano, 2014). A figura 2 representa de forma resumida as fases de desenvolvimento da infecção.

A patogénese é condicionada pelo grau de virulência da estirpe, contudo fatores relacionados com o hospedeiro, tais como o sistema imunitário e o grau de perturbação da flora comensal, apresentam grande importância (Pereira, 2014).

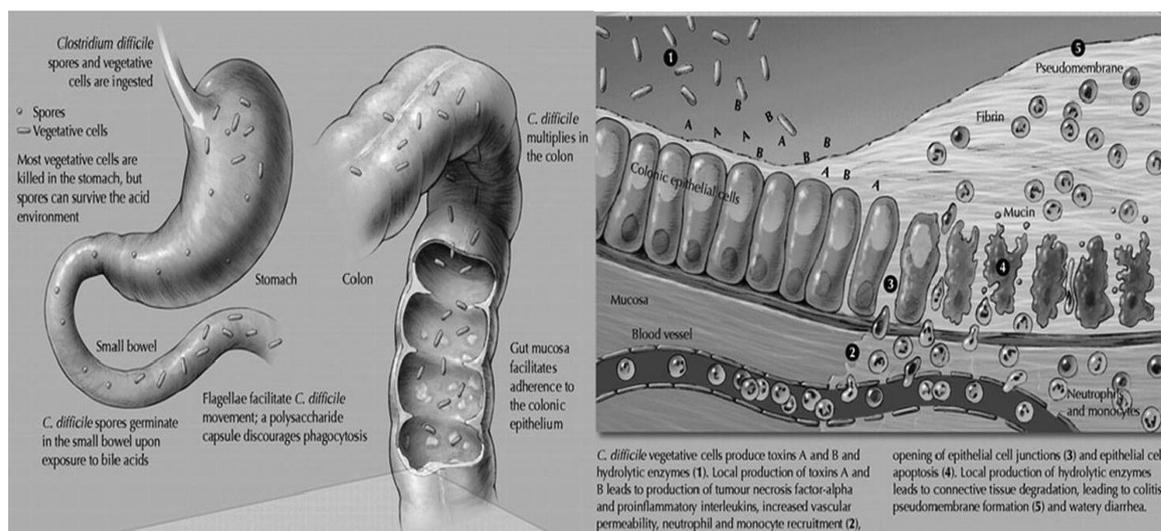


Figura. 2: Patogênese da infecção por *C. difficile* (To and Napolitano, 2014)

5. Infecção por *Clostridium difficile*

A infecção por *C. difficile* (CDI) é uma doença intestinal mediada por toxinas, sendo as infecções extraintestinais raras.

O período de incubação da bactéria é de 2 a 3 dias (Pereira, 2014) e as manifestações clínicas da CDI podem variar, desde colonização assintomática, diarreia ligeira a síndromes mais graves, incluindo dor abdominal, febre e leucitose. (Farooq et al., 2015; Bassetti et al., 2012).

C. difficile pode colonizar o intestino quando a microbiota intestinal normal está alterada ou ausente. A exposição do hospedeiro às toxinas induz a produção de anticorpos, principalmente imunoglobulinas G (IgG), contra as toxinas. Esta resposta imunológica tem relação direta com a evolução para o estado de portador assintomático ou para estados de doença. Desta forma, não havendo uma resposta imunológica suficiente, desenvolve-se a infecção sintomática. Quando existe resposta imunológica com produção de IgG, os indivíduos podem tornar-se portadores assintomáticos ou reverter para o estado de não colonizados (Pereira, 2014).

Os portadores assintomáticos apresentam toxinas de *C. difficile* nas fezes ou uma cultura positiva para *C. difficile* mas não desenvolvem sintomatologia (Van Nispen tot Pannerden et al., 2011). Estes funcionam como reservatórios da bactéria, servindo de fonte de infecção aos indivíduos suscetíveis. O estado de portador assintomático deve-se à resposta imunitária do hospedeiro (Farooq et al., 2015).

Existe doença associada a *C. difficile* quando há combinação de sintomas clínicos com a presença de toxinas de *C. difficile* e/ou CPM. (Pereira, 2014).

5.1. CDI ligeira a moderada

As CDIs ligeiras a moderadas constituem a maioria dos casos sintomáticos e a principal manifestação clínica é a diarreia (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011).

Nestes casos, a diarreia é leve, o doente apresenta menos de 10 evacuações por dia, e é aquosa, às vezes com presença de muco e sangue. A diarreia é acompanhada por cólicas abdominais, febre moderadamente intensa e leucocitose (<15000 leucócitos/ μ L).

Cerca de 60% dos doentes apresentam melhorias em 10 dias (Pereira, 2014).

5.2. CDI severa

As infeções severas variam de diarreia com mais de 10 evacuações por dia a CPM com risco de vida. Os doentes apresentam febre constante acima de 38,5°C, desidratação e distúrbios eletrolíticos acentuados (Pereira, 2014).

A CDI severa está associada, principalmente, a CPM, onde há inflamação intensa e formação de uma camada de detritos inflamatórios na superfície da mucosa, conhecida como pseudomembrana. Esta é um exsudado fibrinoso contendo fibrina, leucócitos necróticos, muco e restos celulares epiteliais. Normalmente aparecem também micro-abcessos e ulcerações (Farooq *et al.*, 2015).

A evolução destes casos pode ocorrer de forma rápida – colite fulminante –, ou demorar alguns dias com agravamento progressivo. Complicações incluem perfuração intestinal, megacólon tóxico, sépsis, choque séptico e morte (Farooq *et al.*, 2015).

5.3. Infeção recorrente

A infeção recorrente define-se como sendo o reaparecimento de sintomas após uma CDI que respondeu ao tratamento, não existindo infeção por uma estirpe diferente. Muitos doentes desenvolvem múltiplas recorrências (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011).

A infeção recorrente é devida à capacidade de formação de esporos que não são afetados pela terapia antibacteriana e resistem a condições extremas, permitindo a sobrevivência da bactéria. Quando há condições favoráveis, tanto endógenas como exógenas, os esporos germinam e as células vegetativas multiplicam-se, iniciando-se um novo ciclo de infeção (Bassetti *et al.*, 2012).

Sendo estes esporos capazes de resistir à maioria dos antimicrobianos são a causa principal das infecções recorrentes. Nestes casos, a estirpe vai aumentando a resistência aos antibióticos utilizados nos tratamentos prévios (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011).

As recorrências ocorrem quando não se verifica restauração da microbiota entérica e os esporos persistem no intestino e são mais comuns em indivíduos que não produzem níveis adequados de IgG antitoxina A, desenvolvendo uma resposta imune deficiente (Bassetti *et al.*, 2012).

6. Diagnóstico

Uma vez que *C. difficile* é a principal causa de diarreia associada ao uso de antibacterianos, é importante fazer-se o diagnóstico em todos estes casos.

Uma vez que o diagnóstico de CDI é, geralmente, baseado na história clínica de diarreia, em combinação com testes laboratoriais, é necessário um diagnóstico microbiológico rápido e preciso.

Sendo as toxinas A e B o principal fator de patogenicidade, o teste laboratorial de pesquisa destas toxinas tem substituído os testes de cultura. A pesquisa das toxinas por ensaios imunoenzimáticos é muito utilizado por ser rápido e barato, contudo falsos-negativos devem ser confirmados por outros testes (Bassetti *et al.*, 2012; Pereira, 2014).

A cultura de *C. difficile* em meio seletivo CCFA (agár cicloserina-cefoxitina-frutose) ou CCEY (agár gema de ovo-cicloserinacefoxitina) é o método mais sensível, contudo não é muito específico pois não diferencia estirpes toxigênicas de não toxigênicas (Bassetti *et al.*, 2012; Pereira, 2014).

O ensaio de citotoxicidade em cultura é considerado o *gold standard*. Consiste na inoculação de filtrado de uma suspensão de fezes numa cultura de células e observação do efeito citopático como consequência da desorganização do citoesqueleto celular. Contudo, é um ensaio demorado e por esta razão pouco usado na prática clínica (Bassetti *et al.*, 2012; Pereira, 2014).

A deteção de ácidos nucleicos por reação de polimerização em cadeia (PCR) é também um método preferido pela sua sensibilidade, especificidade e rapidez. Esta técnica baseia-se na pesquisa dos genes que codificam as toxinas A e B (Bassetti *et al.*, 2012; Pereira, 2014).

Outro teste realizado é a pesquisa da enzima glutamato desidrogenase (GDH) específica de *C. difficile*. Contudo, esta enzima está presente tanto em estirpes toxigênicas

como não toxigênicas, sendo necessário outro teste de pesquisa das toxinas (Bassetti *et al.*, 2012; Pereira, 2014).

O diagnóstico clínico da diarreia associada à CDI pode ser feito por colonoscopia ou retoscopia. A CPM também pode ser diagnosticada através da biópsia das pseudomembranas por sigmoidoscopia ou colonoscopia. Contudo, privilegiam-se os exames laboratoriais devido às possíveis complicações destes exames clínicos (Bassetti *et al.*, 2012).

7. Fatores de risco de Infecção por *Clostridium difficile*

Têm sido identificados vários fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do primeiro episódio de CDI, sendo o mais importante a utilização prévia de antibacterianos (To and Napolitano, 2014; Bassetti *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2015).

Outros fatores incluem (Bassetti *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2015):

- Hospitalização e duração da hospitalização;
- Idade avançada (>65 anos);
- Existência de doenças graves;
- Estados de imunossupressão: utilização de fármacos imunossupressores, antineoplásicos, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH);
- Cirurgia gastrointestinal;
- Medicação gastrointestinal (supressão do ácido gástrico: utilização de antagonistas H₂, e inibidores da bomba de prótons; fármacos que alteram a motilidade intestinal);
- Alimentação entérica;
- Ventilação artificial.

Para a CDI recorrente, os principais fatores de risco identificados são: a idade avançada, hospitalização, a presença de co-morbidades, o uso de antiácidos, o uso de fluoroquinolonas, recorrência prévia e a duração dos primeiros episódios.

Sendo a CDI uma infecção, maioritariamente, nosocomial, esta tem uma taxa de prevalência maior quando aumenta o número de doentes com mais de 65 anos, imunocomprometidos e com co-morbidades, quando aumenta a utilização de antibacterianos de elevado risco (antibacterianos mais associados ao desenvolvimento de CDI) [Tabela 2] e há emergência de estirpes hipervirulentas, quando existe uma inadequada desinfecção do ambiente hospitalar, quando os doentes infetados não são adequadamente

isolados, assim como quando existe uma deficiente higiene das mãos dos profissionais de saúde (Bassetti et al., 2012).

7.1. Uso de Antibióticos

A microbiota intestinal, para além de apresentar funções metabólicas e imunológicas, é responsável por oferecer resistência à colonização por bactérias não comensais, demonstrando função protetora, sendo essencial para prevenir a infecção por *C. difficile*. Geralmente, quando a flora intestinal está em equilíbrio, não há desenvolvimento de infecção. Situações de disbiose, ou seja, situações em que a flora intestinal está alterada, favorecem o aparecimento de infecções oportunistas (Zanella Terrier et al., 2014).

A terapia com antibióticos tem um papel importante no desenvolvimento de infecção por *C. difficile* por alterar a flora intestinal normal, o que favorece a multiplicação da estirpe patogénica, tanto de origem endógena como exógena, e a colonização do intestino (Zanella Terrier et al., 2014; Wiuff, Murdoch and Coia, 2014). Os antibióticos mais implicados são os de largo espetro, que possuem um largo impacto na microbiota intestinal (Bassetti et al., 2012). Cerca de 90% dos indivíduos que desenvolvem CDI realizaram anteriormente terapia antibacteriana (Zanella Terrier et al., 2014).

C. difficile, sendo uma bactéria formadora de esporos, resiste facilmente aos tratamentos antimicrobianos, conseguindo sobreviver e, uma vez que a flora comensal está debilitada, facilmente desenvolve infecção. Por outro lado, tem sido demonstrado que vários antibióticos, incluindo fluoroquinolonas e cefalosporinas [Tabela 2], promovem a germinação dos esporos de *C. difficile*, o crescimento das células vegetativas e a produção de toxinas, estando associados a um risco mais elevado de desenvolvimento de infecção. O risco aumenta também com a dose, a duração do tratamento e com a utilização de associações de antibióticos (Bassetti et al., 2012).

Tabela 2: Associação entre o risco de colonização por *C. difficile* e determinados antibacterianos (Bassetti et al., 2012).

Risco de colonização por <i>C. difficile</i>	Antibacterianos
Alto	Cefalosporinas de 2 ^a e 3 ^a geração, fluoroquinolonas, clindamicina
Médio	Macrólidos, amoxicilina/ampicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico
Baixo	Aminoglicosídeos, vancomicina, trimetoprim, tetraciclina, penicilinas

8. Prevenção da infeção

Sendo a transmissão pessoa-a-pessoa a via mais comum, as mãos dos profissionais de saúde e fómites ambientais têm um papel importante na transmissão de bactérias e esporos (To and Napolitano, 2014).

Os esporos de *C. difficile* são muito resistentes à dessecação, a químicos e à temperatura, sendo dificilmente destruídos por procedimentos padrão de desinfecção (To and Napolitano, 2014). São também altamente transmissíveis, contaminando o meio próximo dos doentes infetados e conseguem persistir durante meses ou mesmo anos no ambiente. Por estas razões são a principal fonte de surtos da doença a nível hospitalar (Wiuuff et al., 2014).

O melhor modo de prevenir a transmissão é evitar a disseminação: é importante uma correta higienização das mãos, com água e sabão, e o uso de materiais e equipamentos descartáveis (To and Napolitano, 2014; Wiuff et al., 2014).

Por outro lado, uma vez que, a infeção por *C. difficile* é a principal causa de doença associada ao uso de antibióticos, é necessário limitar o uso destes (To and Napolitano, 2014; Wiuff et al., 2014). Otimizar o uso de antimicrobianos através da implementação de boas práticas clínicas - Antibioterapia *Stewardship* - é essencial para evitar o aparecimento de estirpes resistentes, assim como para controlar e prevenir a CDI. A Antibioterapia *Stewardship* pretende assegurar a utilização adequada de antibióticos, otimizando a escolha do antibiótico, a dose, a via de administração e a duração do tratamento e diminuir o número de doentes tratados desnecessariamente (Wiuuff et al., 2014).

9. Tratamento

Segundo as *guidelines* da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas, a medida fundamental para o tratamento de CDI é a interrupção da terapêutica antibacteriana concomitante, para ser possível o restabelecimento da flora intestinal normal (Bassetti *et al.*, 2012). É também importante garantir a reposição adequada de líquidos e eletrólitos e descontinuar fármacos antiperistálticos/antidiarreicos para que as toxinas sejam eliminadas (To and Napolitano, 2014).

Estas medidas podem ser suficientes para a resolução de uma infecção ligeira mas, na presença de casos mais graves, ou quando o antibiótico não pode ser interrompido, é necessário uma terapêutica direcionada para *C. difficile*, usualmente, terapêutica antibacteriana.

9.1. Terapêutica antibacteriana

9.1.1. Metronidazol e Vancomicina

O metronidazol é a primeira escolha para o tratamento de CDI ligeira a moderada, estando a vancomicina, devido ao preço mais elevado e ao risco de emergência de estirpes de *Enterococcus* e *Staphylococcus* vancomicina-resistentes, reservada para casos mais graves (To and Napolitano, 2014).

O metronidazol é um derivado 5-nitroimidazólico muito ativo em bactérias anaeróbias. Atua como bactericida: depois de penetrar na bactéria, os produtos resultantes da sua redução ligam-se ao ADN bacteriano e impedem a sua replicação, levando à morte celular. As doses recomendadas para adultos são de 500 mg, *per os*, três vezes por dia ou 250 mg, *per os*, quatro vezes por dia, durante 10 a 14 dias (Pereira, 2014; Moura, Guimarães and Soares da Silva, 2006).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico com atividade bactericida sobre bactérias Gram-positivas. Atua inibindo a síntese da parede celular por impedir a incorporação de ácido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina na molécula de peptidoglicano. As doses recomendadas para adultos são: 125 mg, 250 mg ou 500 mg (dependendo da gravidade de CDI), via oral, de 6 em 6 horas, durante 10 a 14 dias (Pereira, 2014; Moura, Guimarães and Soares da Silva, 2006).

9.1.2. Fidaxomicina

A fidaxomicina é um antibiótico macrocíclico com eficácia semelhante à vancomicina oral na CDI, apresentando eficácia superior em casos de infecção pela estirpe NAPI/027/BI (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011). Contudo, devido ao elevado custo do tratamento, é pouco utilizado.

Tem ação bactericida, atuando a nível da inibição da ARN polimerase bacteriana. Apresenta espectro de atividade estreito, não sendo eficaz contra bactérias Gram-negativas, fungos ou protozoários, ajudando a preservar a flora comensal e assim diminuir as recorrências. A terapêutica recomendada é 200 mg duas vezes por dia (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011; Bassetti *et al.*, 2012).

9.1.3. Resistência aos antibacterianos

No geral, a terapêutica antibacteriana falha sempre que o microrganismo desenvolve mecanismos de resistência que lhe permite sobreviver na presença do antimicrobiano.

Para além da resistência a macrólidos/lincosamidas/estreptograminas B (MLSB), à tetraciclina, fluoroquinolonas e ao cloranfenicol, já foram identificadas estirpes que apresentam resistência ao metronidazol e também à vancomicina, que ainda são utilizados como tratamento padrão.

A multirresistência pode dever-se a diferentes mecanismos, como a acumulação de genes que codificam a resistência a diferentes antibióticos ou mutações genómicas que alteram o local alvo de atuação do antibiótico (Spigaglia, Barbanti and Mastrantonio, 2011).

Outro aspeto responsável pela resistência de *C. difficile* é a sua capacidade de produzir esporos que resistem aos tratamentos antimicrobianos (Vindigni, Broussard and Surawicz, 2013).

O tratamento antimicrobiano da infecção recorrente apresenta taxas de sucesso entre os 30% e os 80% dependendo do número de recorrências, do fármaco e da duração do tratamento. Estas taxas de resposta sub-ótimas conduziram à investigação de outras formas de tratamento (Drekonja *et al.*, 2014).

9.2. Terapêutica microbiana

Uma vez que a alteração da flora intestinal facilita a infecção por *C. difficile*, a erradicação do mesmo pode ser conseguida pela restauração da flora comensal. A terapêutica microbiana é considerada como o método mais eficaz na prevenção de recorrências da CDI. Assim surge o tratamento com base em probióticos e o transplante da microbiota fecal (Basseti et al., 2012).

9.2.1. Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos (leveduras e bactérias não patogénicas, tais como *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*) utilizados para restaurar a flora fisiológica do trato intestinal (Basseti et al., 2012).

Ao colonizarem a mucosa, inibem a adesão de espécies patogénicas, competem pelos nutrientes, bloqueiam a produção de toxinas e estimulam a imunidade local, dificultando, desta forma, a colonização por estirpes patogénicas como *C. difficile* (Van Nispen tot Pannerden et al., 2011).

Contudo, os probióticos apresentam menos diversidade que a flora comensal normal, sendo, por esta razão, a instilação de fezes saudáveis uma melhor opção de tratamento no caso de CDI (Drekonja et al., 2014).

9.2.2. Transplante da Microbiota Fecal

A primeira evidência do uso do conteúdo fecal em medicina foi relatada na China, no século IV. Foi administrada uma suspensão de fezes humanas a indivíduos com intoxicação alimentar ou diarreia grave, e o resultado foi positivo. Este tratamento foi utilizado durante muitos anos, denominando-se “*sopa amarela*” (Vindigni et al., 2013; Cohen et al., 2015).

A sua primeira aplicação, em tempos mais recentes, foi em 1958 nos EUA, em doentes com CPM. Estes foram tratados com enemas fecais e apresentaram uma rápida resolução dos sintomas (Vindigni et al., 2013; Cohen et al., 2015).

O primeiro relato de TMF na infecção por *C. difficile* foi publicado em 1983 (Cohen et al., 2015) e até 2003 realizaram-se apenas alguns transplantes esporádicos (Bella, Gouliouris and Petrosillo, 2015).

Nos casos de infecção recorrente, o TMF é uma opção de tratamento bastante efetiva, demonstrando mais de 90% de eficácia na erradicação de *C. difficile*, tendo este sido já aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Cohen et al., 2015; Pannerden et al., 2011).

O objetivo do TMF é restabelecer a flora intestinal normal de forma a interromper o ciclo de recorrências (Vindigni *et al.*, 2013).

Num estado de homeostase gastrointestinal, a flora comensal evita a colonização/crescimento de microrganismos patogênicos. No entanto, a antibioterapia provoca danos na microbiota, permitindo a *C. difficile* dominar e causar doença. O TMF reintroduz a flora comensal normal e recupera o equilíbrio, permitindo a supressão de *C. difficile* e repondo a resistência à colonização por agentes patogênicos [Figura 3] (Cohen *et al.*, 2015).

Por outro lado, o TMF diminui a permeabilidade do intestino através do aumento da produção de ácidos gordos de cadeia curta, diminuindo assim a gravidade da CDI. O aumento da produção de ácidos gordos de cadeia curta ajuda a manter a integridade da barreira epitelial (Cohen *et al.*, 2015).

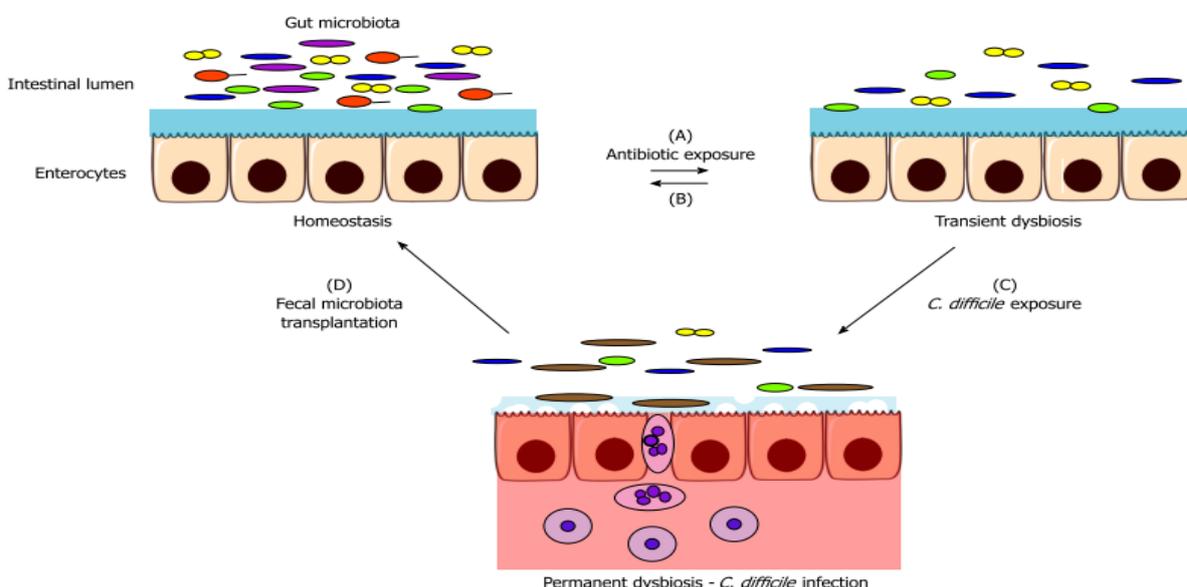


Figura. 3: Perturbação da microbiota intestinal por antibióticos originando CDI e efeito do transplante da microbiota fecal (Zanella Terrier *et al.*, 2014)

- A- Uso de antibióticos e destruição de bactérias sensíveis reduzindo a resistência à colonização por patogênicos oportunistas;
- B- Na ausência de infecção oportunista, a flora intestinal recupera a sua homeostase
- C- Infecção por *C. difficile* provoca disbiose persistente;
- D- TMF restabelece a diversidade microbiota e a resistência à colonização por agentes patogênicos, o que permite eliminar as bactérias oportunistas.

O TMF baseia-se na instilação de uma suspensão líquida de fezes de um indivíduo saudável no trato gastrointestinal do doente, pois desta forma são repostos todos os constituintes de uma flora saudável (Drekonja *et al.*, 2014). É um método relativamente rápido e com efeito persistente (Bassetti *et al.*, 2012).

9.2.2.1. Indicações

A maioria das *guidelines* indica o TMF nas seguintes situações (Kelly *et al.*, 2015):

- CDI recorrente: três ou mais episódios de CDI ligeira a moderada sem resposta durante 6 a 8 semanas de tratamento com vancomicina ou antibiótico alternativo (fidaxomicina) ou pelo menos 2 episódios de CDI que resultaram em hospitalização associada a morbilidade significativa;
- CDI Moderada: sem resposta à terapia padrão durante pelo menos uma semana;
- CDI grave (ou fulminante): sem resposta à terapia padrão em 48 horas.

9.2.2.2. Seleção de dadores

Os potenciais dadores devem ser rastreados para o risco de agentes infecciosos, como VIH, vírus da hepatite B e C, *Salmonella*, *Shigella* e *C. difficile* (Cohen *et al.*, 2015).

São também critérios de exclusão: o uso de antibióticos ou agentes imunossupressores nos 3 meses anteriores; história de doença inflamatória intestinal; síndrome do intestino irritável; síndrome metabólico; história de neoplasia ou doença infecciosa; obstipação, diarreia ou pólipos intestinais; cirurgia gastrointestinal; comportamento sexual de alto risco, uso de drogas ilícitas, tatuagem ou piercing nos 6 meses anteriores (Zanella Terrier *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2015).

É discutido o facto de o dador dever ou não ser familiar do doente, no entanto estudos recentes demonstram não haver diferenças significativas tanto a nível de eficácia como de segurança (Zanella Terrier *et al.*, 2014).

9.2.2.3. Procedimento

Atualmente ainda não existe um protocolo padronizado para o TMF, apenas recomendações gerais do *Fecal Microbiota Transplantation Workgroup* (Zanella Terrier *et al.*, 2014):

- O dia antes do TMF, os doentes devem ser submetidos a uma lavagem intestinal para reduzir a microbiota anormal e permitir a implantação mais eficaz da microbiota do dador;
- As fezes do dador devem ser recolhidas, normalmente, 6 horas antes do transplante;
- Antes da infusão, as fezes têm que ser processadas: são suspensas em diluentes, (geralmente água ou uma solução salina) e posterior filtração para remover os materiais brutos;
- A administração pode ser feita via gastrointestinal superior, endoscopia ou sonda nasoduodenal/nasojejunal, ou pela via gastrointestinal inferior, por colonoscopia ou

enemas. A utilização de enemas apresenta uma melhor relação custo-eficácia e segurança.

A quantidade de fezes a utilizar não foi padronizada, contudo o transplante com mais de 50 g parece estar associado a uma taxa de eficácia mais elevada. Normalmente, a suspensão é administrada dentro de 6 a 8 horas após a doação, no entanto, fezes congeladas foram utilizadas com resultados comparáveis. Os benefícios da utilização de fezes congeladas incluem a capacidade de padronizar amostras fecais e a criação de um banco de fezes para garantir a disponibilidade de material para vários transplantes (Camarota *et al.*, 2014).

9.2.2.4. Segurança

O TMF é um procedimento seguro na maioria dos doentes e foi, recentemente, demonstrada a sua segurança em indivíduos imunocomprometidos (Bella *et al.*, 2015).

Após o procedimento, podem ocorrer sintomas relacionados com alterações do trânsito intestinal, nomeadamente, cólicas abdominais, diarreia, aumento de flatulência, inchaço e obstipação que desaparecem após alguns dias (Vindigni *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2015).

Contudo, não existem estudos que permitam esclarecer sobre as consequências a longo prazo. A principal preocupação relaciona-se com a investigação da possível relação causal entre a flora intestinal e certas doenças como a obesidade, diabetes, doença inflamatória do intestino e síndrome do intestino irritável (Cohen *et al.*, 2015).

É necessário realizar estudos de longo prazo de acompanhamento e com um maior número de doentes para avaliar os riscos adicionais mediados pela microbiota transplantada (Cohen *et al.*, 2015).

9.2.2.4. Questões futuras

O TMF tem provado ser um tratamento seguro e eficaz para CDI recorrente. No entanto, algumas questões ainda precisam ser resolvidas: se esta terapia deve ser usada como tratamento de primeira linha na apresentação inicial de CDI ou só nas recorrências? Qual o modo mais eficaz de transplante? Os dadores devem ser familiares ou não? Deve-se utilizar material fresco ou congelado? (Zanella Terrier *et al.*, 2014).

A aceitação do TMF por parte dos doentes também é variável, apenas sendo bem aceite em situações em que a antibioterapia falha. O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica ótima é o desafio atual, para desta forma aumentar a aceitação do mesmo (Zanella Terrier *et al.*, 2014).

É necessário desenvolver um método normalizado e mais aceitável para transplantar a microbiota intestinal. Desta forma, torna-se esta terapia disponível para um maior número de pessoas e, talvez, se transforme num tratamento de primeira linha para CDI (Cohen *et al.*, 2015).

9.3. Tratamento cirúrgico

A cirurgia é raramente indicada, sendo necessária em apenas 0,4% a 5% dos casos. Esta é reservada para complicações da doença, tais como a colite fulminante (65% a 100% dos casos), a não resposta ao tratamento médico, megacólon tóxico e casos de perfuração. (Trudel, 2007).

A taxa de mortalidade global de intervenção cirúrgica varia entre 25% a 70%, sendo maior em doentes imunocomprometidos e idosos (Trudel, 2007).

A operação de escolha é a colectomia subtotal com ileostomia final (Trudel, 2007).

9.4. Imunoterapia

A imunização ativa, através da vacinação, poderá ser custo-efetiva dado o aumento da incidência de casos de doença, a elevada taxa de recorrências e morbidade significativa (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011).

Atualmente existem duas vacinas em fase de testes clínicos: uma desenvolvida pelo Instituto Sanofi-Pasteur, que consiste numa mistura de toxinas A e B inativadas; e a segunda, desenvolvida pela Intercell, é uma proteína de fusão recombinante que contém uma parte do domínio de ligação ao recetor das toxinas A e B (To and Napolitano, 2014).

Clinicamente ainda não há evidências significativas da eficácia das vacinas, pois não existem estudos alargados (Van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2011).

A imunização passiva, através da administração intravenosa de IgG anti-toxina A tem sido usada “*off-label*” no tratamento de CDI recorrente, uma vez que esta está relacionada com a resolução da infecção (To and Napolitano, 2014).

CONCLUSÃO

A CDI é condicionada por vários fatores, sendo estes relacionados com a estirpe patogénica, com o hospedeiro e com o ambiente. Desta forma, são condicionantes da infecção, os fatores de virulência da estirpe e o perfil de resistência aos antibióticos, assim como o estado de disbiose e de deficiência imunitária do hospedeiro. Além disso, a contaminação do meio pelos esporos é fundamental ao desenvolvimento da infecção.

Os esporos, além de estarem na origem da infecção, estão, fortemente, relacionados com o desenvolvimento da CDI recorrente, dada a sua capacidade de resistir ao tratamento antimicrobiano. A infecção recorrente cria assim a necessidade de desenvolver outro tipo de tratamentos, nomeadamente cirúrgicos, microbiológicos e imunológicos.

A escolha do tratamento a utilizar depende da gravidade da CDI, do estado clínico do doente e do tratamento em episódios anteriores.

O TMF surge como uma alternativa para o tratamento das recorrências, tendo sido demonstrada a sua eficácia a nível do restabelecimento da flora comensal normal e da resistência à colonização por *C. difficile*. Contudo, é necessário desenvolver procedimentos padronizados e que apresentem maior aceitação pelos doentes. Além disso, ainda faltam dados de segurança a longo prazo relacionados com doenças possivelmente mediadas pela flora intestinal. Além disso, é fundamental apostar em medidas de prevenção da infecção, quer a nível da transmissão quer limitando fatores de risco, como o uso de antibióticos. Desta forma, poderá evitar-se o surgimento de novos casos bem como a emergência de novas estirpes hipervirulentas, diminuindo-se os gastos relacionados com os cuidados de saúde.

BIBLIOGRAFIA

BASSETTI, M. *et al.* - Epidemiology , diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** 10 (2012) 1405–1423.

BELLA, S. Di; GOULIOURIS, T.; PETROSILLO, N. - Fecal microbiota transplantation (FMT) for *Clostridium difficile* infection: focus on immunocompromised patients. **Journal of infection and chemotherapy.** 21 (2015) 230–237.

CAMMAROTA, G. *et al.* - Fecal Microbiota Transplantation: A New Old Kid on the Block for the Management of Gut Microbiota-related Disease. **J. Clin Gastroenterol.** 48 (2014) 80–84.

CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. - Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. **Annu Rev. Microbiol** (2011) 501–521.

CHAMPOUX, J. J. *et al.* - Sherris Medical Microbiology - An Introduction to Infectious Diseases. 4th edition. McGraw-Hill (2003) 322–325.

COHEN, N. A. *et al.* - Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. **IMAJ.** 17 (2015) 510–514.

DENÈVE, C. *et al.* - New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 33 (2009) S24–S28.

DREKONJA, D. *et al.* - Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium Difficile* Infection: A Systematic Review of the Evidence (2014)

FAROOQ, P. D. *et al.* - Pseudomembranous colitis. **Disease-a-month.** 61 (2015) 181–206.

HUNT, J. J.; BALLARD, J. D. - Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. **Microbiology and molecular biology reviews.** 77 (2013) 567-581.

KELLY, C. R. *et al.* - Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. **Gastroenterology**. 149 (2015) 223–237.

KNIGHT, D. R. *et al.* - Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. **Clinical microbiology reviews**. 28 (2015) 721–741.

MEDSCAPE - *C. difficile* Infected Almost Half a Million in Single Year, atual. 2016. [Consult. 12 jun. 2016]. Disponível em:
WWW:URL:http://img.medscape.com/news/2015/cdc_150225_c_difficile_800x600.jpg.

MOURA, D.; GUIMARÃES, S.; SOARES DA SILVA, P. - Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. 5ª edição ed. Porto : Porto Editora (2006) 638–749.

PENICHE, A. G.; SAVIDGE, T. C.; DANN, S. M. - Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. **Current opinion in infectious diseases**. 26 (2013) 447–453.

PEREIRA, N. G. - Infecção pelo *Clostridium difficile*. **JBM**. (2014) 27–49.

SPIGAGLIA, P.; BARBANTI, F.; MASTRANTONIO, P. - Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. 66 (2011) 2227–2234.

TO, K. B.; NAPOLITANO, L. M. - *Clostridium difficile* infection: update on diagnosis, epidemiology, and treatment strategies. **Surgical infections**. 15 (2014) 490–502.

TRUDEL, J. L. - *Clostridium difficile* colitis. **Clinics in colon and rectal surgery**. 20 (2007) 13–17.

VAN NISPEN TOT PANNERDEN, C. M.; VERBON, A.; KUIPERS, E. J. - Recurrent *Clostridium difficile* infection: what are the treatment options? **Drugs**. 71 (2011) 853–868.

VINDIGNI, S. M.; BROUSSARD, E. K.; SURAWICZ, C. M. - Alteration of the intestinal microbiome : fecal microbiota transplant and probiotics for *Clostridium difficile* and beyond. **Expert Rev. Gastroenterol . Hepatol**. 7 (2013) 615–628.

WIUFF, C.; MURDOCH, H.; COIA, J. E. - Control of *Clostridium difficile* infection in the hospital setting. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** 12 (2014) 457–469.

ZANELLA TERRIER, M. C. *et al.* - Recurrent *Clostridium difficile* infections: the importance of the intestinal microbiota. **World journal of gastroenterology.** 20 (2014) 7416–7423.