



Diagnóstico laboratorial da infecção por *C. difficile* (CDI)

A detecção de C. difficile e suas toxinas deve ser realizada sistematicamente em casos de diarreia associada a tratamento médico ou em caso de diarreia inexplicada.

Clostridium difficile (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbia oportunista que foi recentemente reclassificada como *Clostridioides difficile*. É agente causal de infecção em pacientes com alteração na microbiota intestinal, principalmente hospitalizados, mas está cada vez mais sendo reconhecido em pacientes que não estão diretamente vinculados ao uso de antibióticos. Acredita-se que a infecção em pacientes não hospitalizados seja sub diagnosticada.

A infecção grave por *C. difficile* (CDI) é caracterizada por lesões inflamatórias e a formação de pseudomembranas no cólon, que pode levar a megacólon tóxico, perfuração intestinal, sepse, choque e morte. O aumento do número de casos tem sido associado a novos fatores de risco. A transmissão ocorre pela rota fecal - oral de esporos.

Os **fatores de risco** para infecções por *C. difficile* (CDI) são a idade acima de 65 anos, hospitalização prévia, antibioticoterapia recente (em particular cefalosporinas de terceira geração, amoxicilina-clavulanato, clindamicina e novas fluoroquinolonas), imunossupressão e inibidores da bomba de prótons.

O que define se um paciente apresenta um **quadro de CDI** é a presença de sintomas (geralmente diarreia) e um exame positivo para toxinas de *C. difficile* ou isolamento do *C. difficile* toxigênico, ou achados colonoscópicos ou histopatológicos que revelam colite pseudomembranosa.

Os diferentes **métodos laboratoriais** estão direcionados a diferentes alvos de detecção e incluem:

Cultura para cepa toxigênica (TC): Detecta a presença de uma cepa de *C. difficile* toxigênica. É considerado o método padrão-ouro e utilizado para avaliar novos métodos moleculares. Porém o tempo de resposta deste método é muito longo para diagnóstico de rotina (2 a 5 dias).

Ensaio de citotoxicidade (CTA): Realizado nas fezes, é o método de referência para a detecção de toxinas livres (principalmente toxina B). Este método consiste em inocular um filtrado de fezes em uma cultura de células e observar um efeito citopático específico (CPE) (arredondamento celular) após 1 ou 2 dias de incubação a 36±1°C, seguido de avaliação da especificidade do CPE por neutralização com anticorpos. O ensaio possui boas sensibilidade e especificidade, mas atualmente é usado por um número muito limitado de laboratórios devido à falta de padronização (tipo de células utilizadas, diluição de amostras de fezes, período de incubação).

Testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT): realizados por método de PCR em tempo real, estão disponíveis em diferentes plataformas, dependendo do volume de exames. De fato, esses métodos não detectam toxinas livres nas fezes, mas apenas os genes que codificam as toxinas. O alvo da maioria dos NAATs é o gene responsável pela codificação da toxina B (gene tcdB). Os NAATs são muito sensíveis (sensibilidade média de 96% - IC 95% = 0,93-0,98), comparáveis à cultura, e têm um VPN elevado. A limitação seria um diagnóstico aumentado de CDI devido a portadores assintomáticos da cepa toxigênica ou pedido inadequado de teste (por exemplo, paciente sem diarreia). Além destes, a variação genética em genes tcdB ou tcdA que poderia levar a falsos resultados negativos. As diretrizes de sociedades científicas internacionais não recomendam o uso de NAAT como teste autônomo para diagnóstico de CDI, mas sim como teste de triagem, devido ao seu alto valor preditivo negativo, e associado a um teste de toxina mais específico.

EIA ou ensaio de imuno-cromatografia para a glutamato desidrogenase (GDH): A GDH é uma enzima altamente conservada e detectada em todas as cepas de *C. difficile*, portanto marca a presença do antígeno associado à parede microorganismo, mas não indica se a cepa é toxigênica. O ensaio possui elevado valor preditivo negativo (80% a 100%) e um teste negativo geralmente descarta a infecção. O teste positivo deve ser confirmado com a pesquisa de toxinas. Porém, se o teste for aplicado em uma população com baixa prevalência, exemplo 10%, e o considerarmos um VPN de 99%, um exame de fezes positivo será descartado em 10, caso seja usado isoladamente como *screening*.

Enzimaimunoensaio, EIA ou imunocromatografia para detecção de toxinas A e B livres nas fezes: As toxinas A e B são os mais importantes determinantes de virulência da doença. Essas toxinas são responsáveis por sintomas de infecção e estão presentes nas fezes de pacientes infectados com diarreia.

Muitos EIA e testes comerciais em membrana, estão disponíveis e fornecem resultados rápidos. Embora inicialmente considerado como tendo uma sensibilidade de 98%, estudos posteriores mostraram uma sensibilidade mais baixa, entre 45% (toxina A) e 60% (toxina B), mas um valor preditivo positivo entre 90% (toxina A) e 100% (toxina B). Atualmente, o consenso geral é que a pesquisa isolada de toxinas não deve ser utilizada como um teste de triagem.

Fatores pré-analíticos

O critério de aceitação e rejeição de amostras é fator primordial. Apenas fezes líquidas ou não formadas, isto é, amostras tomando a forma do recipiente, devem ser processadas para evitar a identificação de portadores assintomáticos. Um critério visual é a escala Bristol, como segue na figura abaixo.

Escala visual para aspecto das fezes - Escala Bristol



Para o ensaio de toxinas, as fezes podem ser refrigeradas por um período máximo de 3 dias. Se o teste atrasar, os espécimes devem ser congelados.

Não se recomenda a testagem das fezes de crianças com menos de 1-2 anos de idade com diarreia, pois o portador assintomático é muito comum nesta população. Acima de 2 anos, testar se a diarreia é persistente e associada ao uso de antibióticos, em caso de surtos ou Hirschprung.

Swabs não podem ser utilizados, exceto para cultura, teste de NAAT e estudos epidemiológicos.

Fezes para cultura devem ser processadas em duas horas após a coleta, pois, se refrigeradas, a viabilidade dos esporos reduz muito.

Estratégias de diagnóstico baseadas em algoritmos

Nenhum teste deve ser utilizado isoladamente para o diagnóstico, devido ao baixo valor preditivo positivo em população de baixa prevalência. Por esse motivo, as diretrizes de sociedades científicas internacionais sugerem uma combinação de testes em dois passos, Primeiro, um teste com alto valor preditivo negativo (ou seja, um teste altamente sensível) que classifica de forma confiável os pacientes como não-CDI. Opções: GDH EIA ou NAAT.

Em caso de resultado positivo, realizar um segundo teste com um alto valor preditivo positivo (isto é, um teste altamente específico). Opção: toxina A / B. Pacientes com um resultado positivo no segundo teste podem ser classificados com segurança como CDI. Pacientes com o segundo teste negativo para toxinas devem ser clinicamente avaliados: podem ser verdadeiramente infectados (nível abaixo do limite de detecção do ensaio da toxina - EIA) ou ser portadores de uma cepa toxigênica.

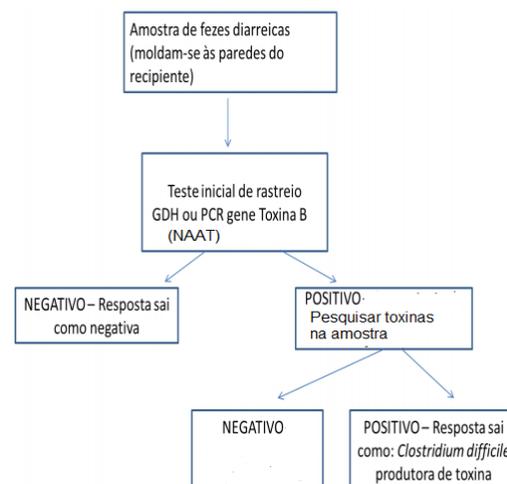
Se o GDH foi o teste inicial, então um terceiro passo opcional pode ser realizado por TC ou NAAT para distinguir as cepas toxigênicas das não toxigênicas. Devido ao sub diagnóstico de uma condição clínica grave, a detecção de *C. difficile* e suas toxinas deve ser realizada sistematicamente nos casos de diarreia associada a cuidados de saúde ou em caso de diarreia inexplicada. A correta utilização dos testes fornece uma boa complementariedade entre sensibilidade e especificidade, permitindo uma boa identificação da infecção e diferenciação do portador assintomático, na maioria dos casos.

Resumo das Recomendações:

Testes laboratoriais em varias etapas:

1. Rastrear amostras - O teste de dois passos pode consistir em GDH ou NAAT para rastrear amostras, seguido de EIA toxina A / B se o teste de rastreio for positivo.
2. O teste de três etapas pode consistir em imunoenensaio para glutamato desidrogenase (GDH) e toxinas A e B, seguido por NAAT para resultados discrepantes.

Nota: Teste laboratorial não recomendado: EIA toxina A / B como teste autônomo devido à baixa sensibilidade



Recomendações:

1. Testar apenas pacientes que são clinicamente prováveis de ter CDI.
2. Realizar apenas testes de diagnóstico em amostras de fezes diarreicas. Fezes diarreicas são aquelas que tomam a forma do recipiente.
3. Desencorajar repetir teste durante o mesmo episódio de diarreia.
4. Não realizar teste de cura, pois o ensaio pode ser positivo após a cura clínica.
5. Consultar um especialista em pediatria antes de testar crianças com menos de 2 anos de idade.
6. Combinar o uso de testes laboratoriais para um diagnóstico eficaz.
O NAAT realizado como teste independente, sem considerar os sintomas clínicos, pode resultar em um diagnóstico excessivo da doença.

Referências

1. Gateau C, Couturier J, Coia J, Barbut F. (in press) How to: Diagnose infection caused by Clostridium difficile. Clin Microbiol Infect. (2018).
2. Avila, M. B., Avila, N. P., & Dupont, A. W. Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Clostridium Difficile Infection. F1000Research, 2016;5:118.
3. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM) a. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. 2013;57(4):e22-e121
4. Riddle MS, DuPont HL, Connor BA ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults. Am J Gastroenterol. 2016;111:602-22.

Assessoria Científica Lab Rede

Uma publicação do:

LabRede®

WWW.LABREDE.COM.BR

LABORATÓRIO PRÓ-EXAME

Rua XV de Novembro, 190, Centro, Taubaté – (12)3621-2331 (12)99778-6844

Horário de atendimento: segunda a sexta-feira de 07:00 às 18:00 e aos sábados de 07:00 às 12:00

www.proexame.com.br

lab@proexame.com.br