



Resistência ao imipenemo em clone endémico de *Clostridium difficile* do ribotipo 017

Joana Isidro¹, Andrea Santos¹, Alexandra Nunes², Vítor Borges², Catarina Silva³, Catarina Chaves⁴, Luísa Boaventura⁴, Luísa Sancho⁵, Luís Vieira³, João Paulo Gomes², Mónica Oleastro¹

¹Laboratório Nacional de Referências de Infecções Gastrointestinais, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal;

²Unidade de Bioinformática, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal;

³Unidade de Tecnologia e Inovação, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal; ⁴Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal;

⁵Serviço de Patologia Clínica, Hospital Prof. Doutor Fernando da Fonseca, Amadora, Portugal.

Infeção por *Clostridium difficile* I

Dados ECDC

Europa (EU/EEA) 2011-2012¹

Infeção por *Clostridium difficile* (ICD) associada aos cuidados de saúde:

- 123 997 casos/ano
- 3 700 mortes/ano
- 8^a mais frequente IACS (5,4%)

Portugal

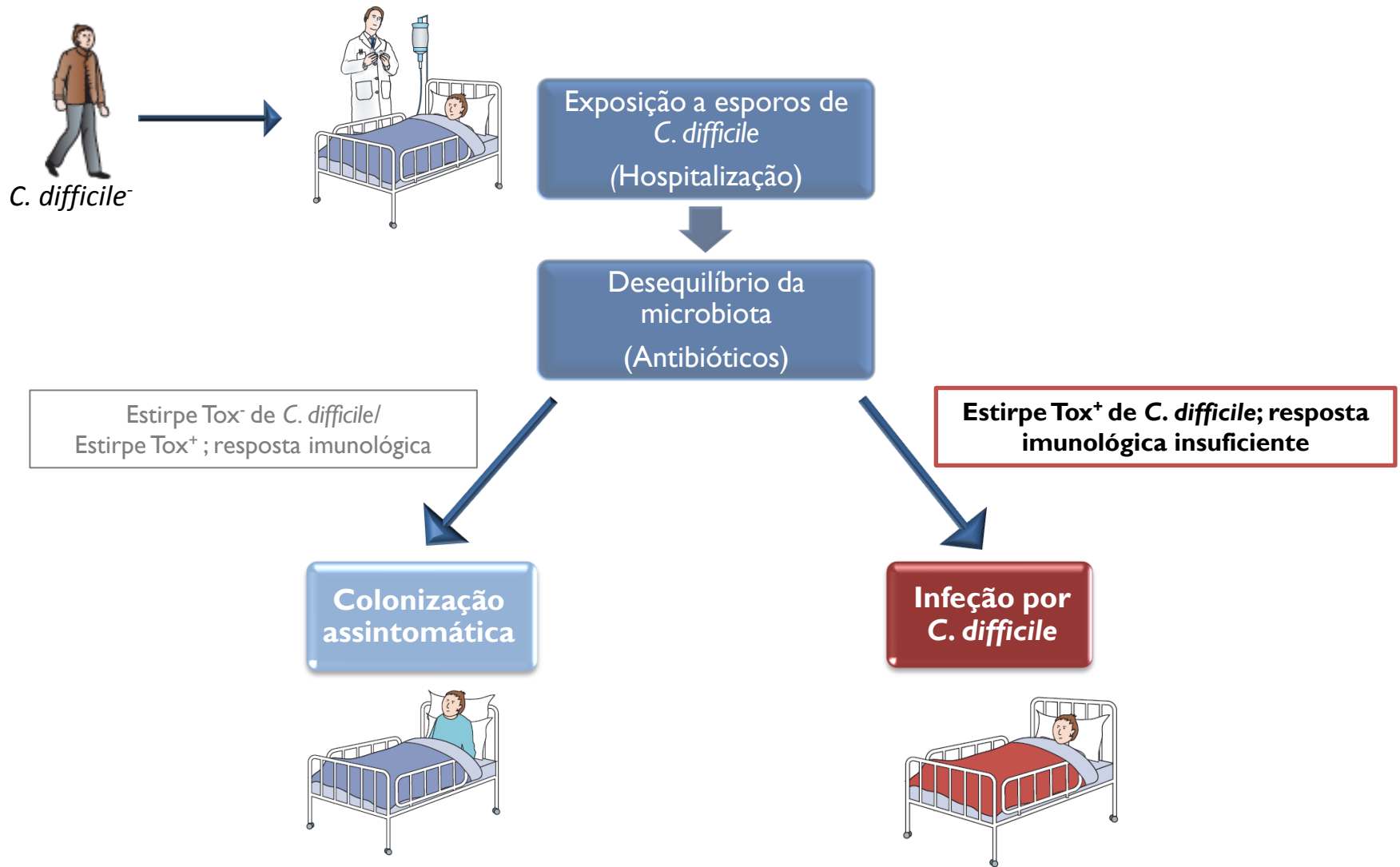
- País com maior prevalência de IACS (2011-2012)¹
- ICD representa 3,7% das IACS, 10^a infeção mais frequente (2011-2012)¹
- Maior consumidor de carbapenemos (2009-2013)²

¹European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013

²European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. ESAC-Net data. November 2015. Stockholm: ECDC; 2015.

Imagem: http://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html

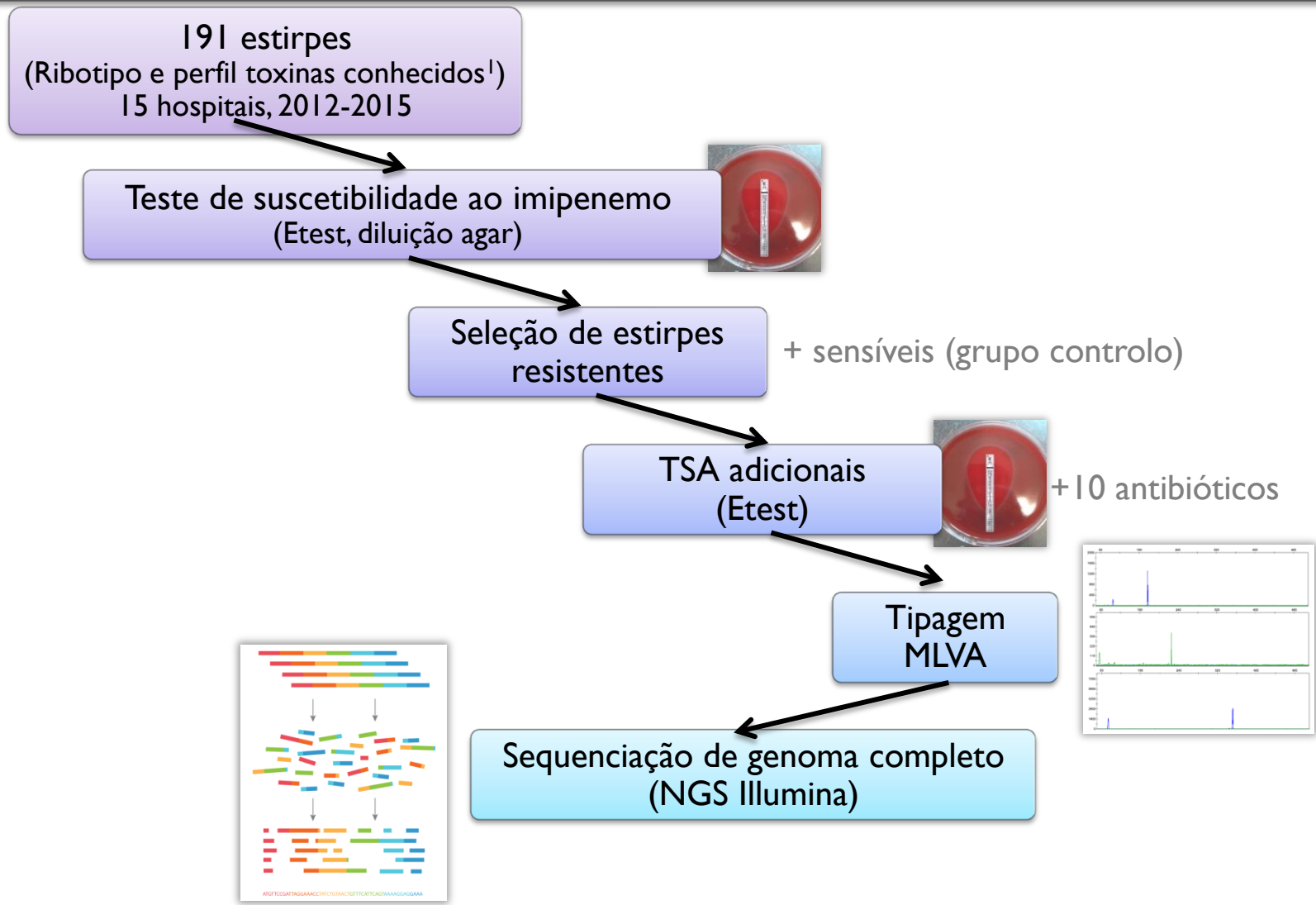
Infeção por *Clostridium difficile* II



Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526-536.

- Identificar estirpes clínicas resistentes aos carbapenemos
- Caracterizar perfil de resistência
- Identificar mecanismos de resistência
- Avaliar a proximidade genética entre estirpes

Métodos



¹Santos A, Isidro J, Silva C, et al. Molecular and epidemiologic study of *Clostridium difficile* reveals unusual heterogeneity in clinical strains circulating in different regions in Portugal. Clin. Microbiol. Infect. 2016; 22:695–700.

Imagem NGS: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_data_analysis.php

Resultados I

25 estirpes
Ribotipo 017 (ToxA⁻ToxB⁺)

22 estirpes
Resistentes ao imipenemo
Hospital A, 2012-2015

- Resistentes:
- Moxifloxacina
 - Clindamicina
 - Rifampicina
 - Tetraciclina

- Sensíveis, mas **CMI elevados**:
- Ertapenem
 - Meropenem

3 estirpes
Sensíveis ao imipenemo (controlo)
Hospital B, 2015

- Resistentes:
- Clindamicina
 - Rifampicina
 - Tetraciclina

- Sensíveis:
- Moxifloxacina
 - Ertapenem
 - Meropenem

Todas sensíveis: Metronidazole, Vancomicina, Cloranfenicol, Tigeciclina

CMI –concentração mínima inibitória

Resultados II

MLVA – Minimum spanning tree

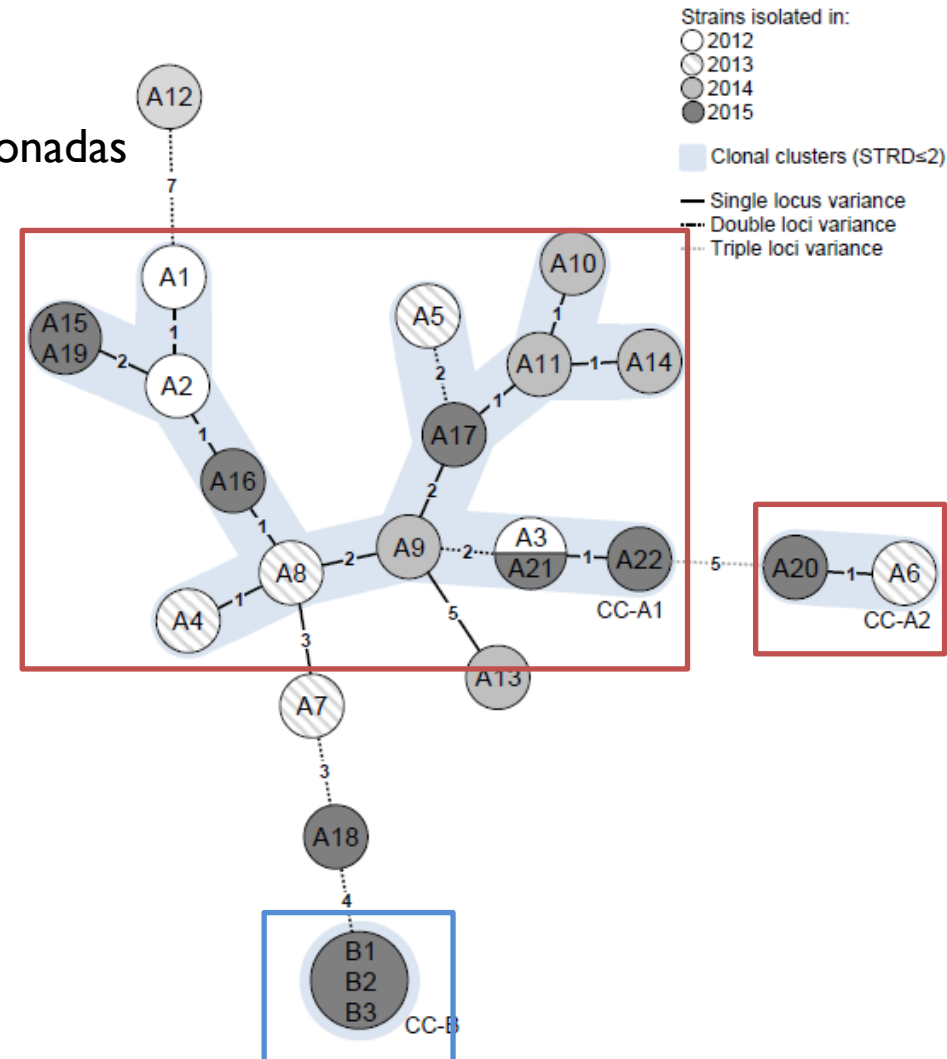
• Todas as estirpes estão geneticamente relacionadas

• 3 complexos clonais:

• **CC-A1** – 2012-2015

• **CC-A2** – 2013, 2015

• **CC-B** – 2015



Sequenciação de genoma completo

22 estirpes hospital A

×

3 estirpes hospital B

Elevada
homologia

13
SNPs

2 mutações
Penicillin- Binding
Proteins

Resistência ao
imipenemo

Resistência aos antibióticos em *C. difficile*

Genes em elementos móveis
(transferência horizontal)

ermB (clindamicina/eritromicina)

tetM (tetraciclina)

vanZ (teicoplanina)

Mutações em genes alvo

gyrA/B (fluoroquinolonas)

rpoB (rifampicina)

Resistência ao **imipenemo** em clone **multirresistente** de ***C. difficile***

Estirpes com grande proximidade genética ao longo de 3 anos

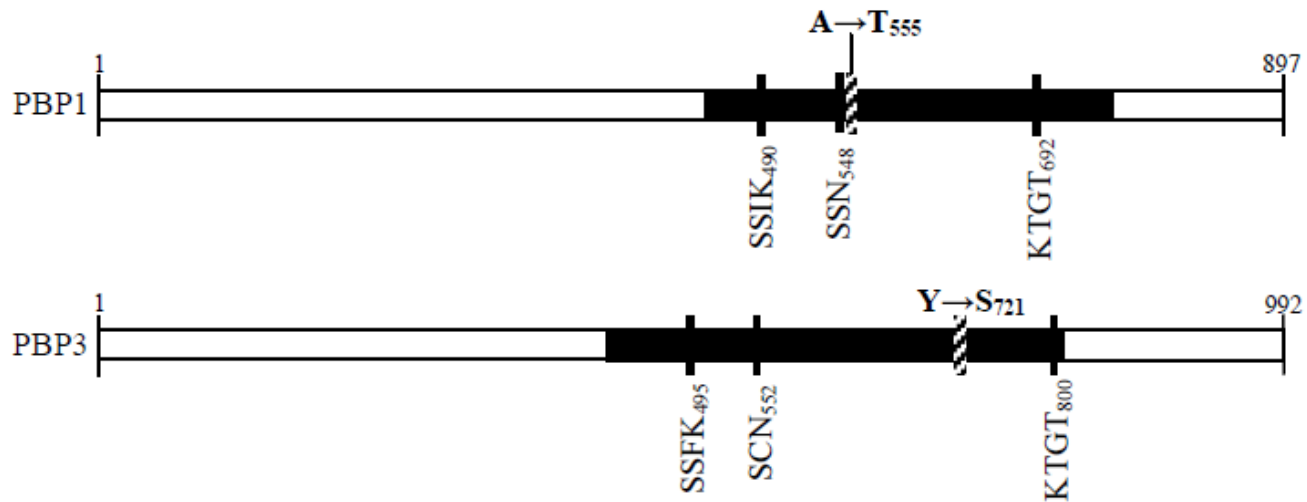
Mecanismo resistência ao **imipenemo**: **mutações em PBPs**

Período de grande consumo de **carbapenemos**

Aquisição de resistência a antibióticos de última linha

PBP - *Penicillin- Binding Proteins*

Mutações encontradas em *Penicillin-Binding Proteins*



Mutações que diferenciam as estirpes resistentes ao imipenem das sensíveis

| genome position ^a | target gene ^a | Nucleotide (nt) change ^b | | Amino acid (aa) change | | gene product |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------|------------------------|---|--------------|
| | | nt (ref. M68) | nt_Group | B_GENE_POSITION_aa | aa_Group | |
| | | | Group A | | Group A | |
| 512416 | CDM68_RS02665 | C | C578T | Ala193Val | multidrug ABC transporter permease | |
| 905394 | CDM68_RS04280 / <i>pbp1</i> | G | G1663A | Ala555Thr | penicillin-binding transpeptidase | |
| 1048151 | CDM68_RS04935 | C | T1010C | Ile337Thr | 3-isopropylmalate dehydratase large subunit | |
| 1221182 | CDM68_RS05670 / <i>pbp3</i> | G | A2162C | Tyr721Ser | penicillin-binding protein | |
| 1666351 | CDM68_RS07765 | G | G214T | Gly72* | hypothetical protein | |
| 1671129 | CDM68_RS07795 / <i>hisB</i> | T | T209C | Ile70Thr | imidazole glycerol-phosphate dehydratase | |
| 1673280 | CDM68_RS07810 | T | C474T | Ala158Ala | imidazole glycerol phosphate synthase cyclase subunit | |
| 1792079 | CDM68_RS08415 | G | A241G | Lys81Glu | hypothetical protein | |
| 1882950 | CDM68_RS08810 | C | C420T | Asp140Asp | flavodoxin | |
| 3083548 | CDM68_RS14235 | G | G421T | Gly141* | haloacid dehalogenase | |
| 4054525 | CDM68_RS18530 | C | C220T | Gln74* | SAM-dependent methyltransferase | |
| 4174650 | CDM68_RS19130 / <i>gyrA</i> | C | C245T | Thr82Ile | DNA gyrase subunit A | |
| 4255124 | CDM68_RS19545 | C | C400T | His134Tyr | phage portal, SPP1 Gp6-like family protein | |

nt, nucleotide. aa, amino acid.

^arelative to the annotation of the *C. difficile* M68 genome (accession number NC_017175).

^bThe nucleotide changes are presented in the 5' to 3' direction.

^cNon-synonymous mutations are highlighted in bold with mutations leading to putative protein truncation being represented by an asterisk (*).