



Clostridium difficile: diversidade genética e perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos

Andrea Santos, Joana Isidro, Cláudia Júlio, Mónica Oleastro

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Infecções Gastrointestinais.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

A infeção por *Clostridium difficile* é descrita como a principal causa de diarreia relacionada com a prestação de cuidados de saúde em países desenvolvidos (1). As manifestações clínicas da doença são variadas e vão desde a diarreia ligeira a complicações graves e muitas vezes fatais, como é exemplo a colite pseudomembranosa (2). A infeção por *C. difficile* está diretamente associada à toma recente de antibióticos, que desequilibram a flora intestinal, criando assim condições favoráveis à multiplicação desta bactéria toxigenética.

Em 2004 surgiu um novo tipo genético (ribotipo) de *C. difficile*, o ribotipo 027, caracterizado pela elevada resistência às fluoroquinolonas, e que foi responsável por inúmeros surtos em vários países europeus, incluindo Portugal (3, 4).

Para além do ambiente hospitalar, *C. difficile* tem sido isolado de amostras provenientes de animais domésticos, colonizados ou infetados, e em produtos alimentares de origem animal (5). Estirpes geneticamente semelhantes a estas foram também isoladas no homem, nomeadamente os ribotipos 078, 014 e 001 (5).

A virulência da bactéria *C. difficile* é mediada pela produção em simultâneo de duas toxinas, a enterotoxina A e a citotoxina B, ambas codificadas por genes do locus de patogenicidade e cuja expressão é regulada pelo gene *tcdC*. Polimorfismos neste gene estão associadas a maiores níveis de produção de toxinas (6). Para além destas duas toxinas, algumas estirpes produzem a toxina binária, cuja função ainda não está totalmente estabelecida, mas que parece promover a adesão da bactéria às células do cólon (7).

A terapia antimicrobiana utilizada no tratamento desta infeção bacteriana tem-se mantido praticamente inalterada, sendo o metronidazol e a vancomicina os antibióticos de primeira linha, com a vancomicina como primeira escolha nos casos mais graves (2).

_Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *C. difficile* recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre julho de 2012 e dezembro de 2014.

_Materiais e métodos

Participaram no estudo 19 hospitais distribuídos pelas 5 regiões de Portugal Continental, que enviaram ao INSA amostras de fezes ou estirpes de *C. difficile* isoladas de doentes internados, com um quadro clínico de diarreia.

As estirpes foram caracterizadas a nível molecular relativamente à presença dos genes das toxinas A, B e binária, presença de mutações no gene regulador das toxinas (*tcdC*) e ribotipo. Foi também avaliada a presença do gene *ermB*, marcador da resistência aos MLS_B, macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B.

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi testada por E-test para a moxifloxacina, vancomicina, metronidazol e imipenem, sendo definida por concentrações mínimas inibitórias (CMI) de >4 mg/L, >2mg/L, >2mg/L e ≥16mg/L, respetivamente (EUCAST 2014).

_Resultados

Desde julho de 2012 até dezembro de 2014 foram estudadas 185 estirpes de *C. difficile*: 31 estirpes provenientes de 3 hospitais da região Norte; 83 estirpes de 5 hospitais da região Centro; 63 estirpes de 8 hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo; uma estirpe de um hospital no Alentejo e 7 estirpes provenientes de 2 hospitais do Algarve.

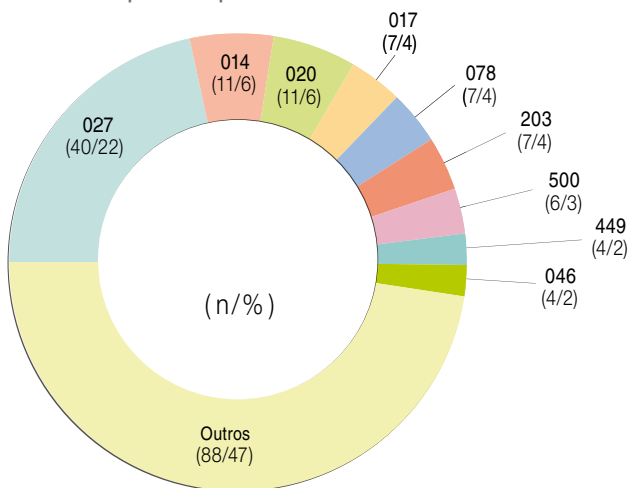
Observou-se uma grande variabilidade genética entre as 185 estirpes de *C. difficile* estudadas, com 64 ribotipos identificados. O ribotipo hipervirulento 027 foi o mais frequente, sendo responsável por 22,0% (40/185) do total de casos isolados, constituin-

artigos breves_ n. 5

do 34,9% (29/83) dos casos internados nos 5 hospitais da região Centro, 14,3% (9/63) dos casos provenientes dos 8 hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo e 25,0% (2/8) dos casos identificados nos 3 hospitais das regiões do Alentejo e Algarve. Este ribotipo não foi detetado em nenhum dos 3 hospitais da região Norte.

Para além do ribotipo 027, os ribotipos mais frequentes foram 020, 014 (6% cada) e os ribotipos 017, 078 e 203 (4% cada) (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição das 185 estirpes de *Clostridium difficile* por ribotipo.



Do total das estirpes analisadas, 95,1% (176/185) eram toxigénicas, sendo 88,6% (164/185) positivas para ambas as toxinas A e B, 6,5% (12/185) positivas apenas para a toxina B (toxA-/toxB+) e 4,3% (8/185) negativas (gráfico 2). Acrescente-se que 58,3% (7/12) das estirpes com o fenótipo toxA-/toxB+ pertenciam ao ribotipo 017. Das 185 estirpes de *C. difficile*, 54 (29,2%) eram ainda positivas para a toxina binária (gráfico 2), das quais 70,4% (38/54) pertenciam ao ribotipo 027.

Em 31,4% (58/185) das estirpes estudadas foram identificados polimorfismos no gene *tcdC*, regulador negativo da produção das toxinas A e B. Apesar de a maioria (69%; 40/58) pertencer ao ribotipo 027, também foram detetadas mutações noutras ribotipos emergentes, tais como os ribotipos 176, 078, 438 e 126.

Em relação às resistências aos antimicrobianos, globalmente, detetou-se uma frequência de estirpes resistentes à moxifloxacina de 34,1% (63/185). Em relação ao imipenem a frequência de resistên-

cia foi de 64,9% (24/37), da qual 29,8% (11/37) corresponde a homoresistência e 35,1% (13/37) a heteroresistência (gráfico 3). Para a moxifloxacina foi observada uma CMI₅₀ de 2,0mg/L e CMI₉₀ > 32mg/L, enquanto que para o imipenem verificou-se uma CMI₅₀ > 32mg/L e CMI₉₀ > 32mg/L, incluindo heteroresistências.

A frequência de estirpes resistentes ao metronidazol e à vancomicina foi de 7,1% (13/183) e 1,7% (3/183) respetivamente (gráfico 3), sendo as CMI₅₀ de 0,38mg/L e CMI₉₀ de 1,5mg/L para o metronidazol e CMI₅₀ de 0,75mg/L e CMI₉₀ de 1mg/L para a vancomicina.

Gráfico 2: Distribuição das 185 estirpes de *Clostridium difficile* quanto à presença dos genes das toxinas A, B e toxina binária.

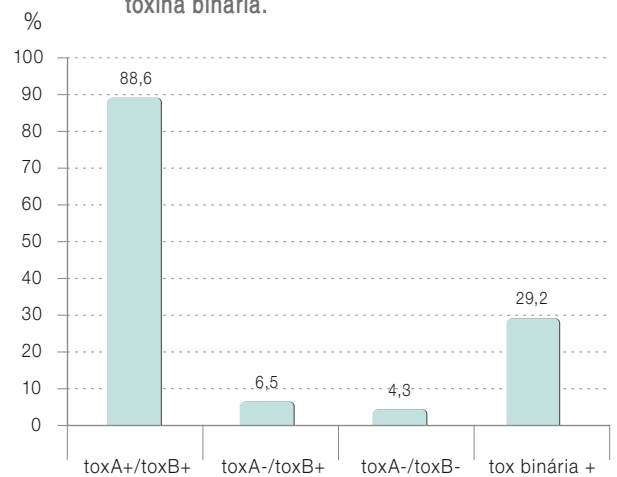


Gráfico 3: Suscetibilidade aos antimicrobianos das estirpes de *Clostridium difficile*.

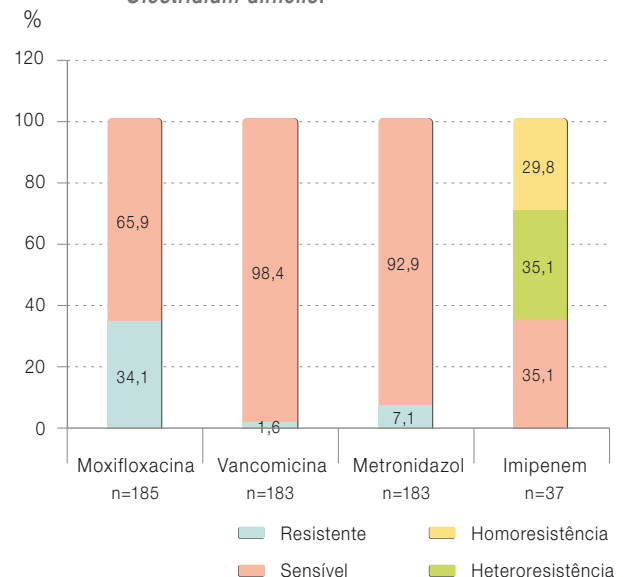




Tabela 1: Comparação da suscetibilidade aos antimicrobianos entre o ribotipo 027 e os restantes ribotipos.

	Moxifloxacina			Vancomicina			Metronidazol		
	CMI ₅₀ *	CMI ₉₀ *	Intervalo CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo CMI	CMI ₅₀ *	CMI ₉₀ *	Intervalo CMI
Ribotipo 027 (n=40)	>32	>32	>32	0,75	1	0,19-2,0	1,5	3	<0,016-16
Outros Ribotipos (n=145)	1,5	3	0,38->32	0,75	1,5	0,125-3,0	0,25	1	<0,016-6,0

CMI: concentração mínima inibitória

* Diferença significativa entre concentrações mínimas inibitórias ($P_{t-student} < 0,05$)

Comparando as resistências do ribotipo 027 com os outros ribotipos, aquele apresentou uma resistência mais elevada à moxifloxacina e uma suscetibilidade reduzida ao metronidazol, sendo a diferença para as CMI₅₀ e CMI₉₀ entre os dois grupos significativa ($P_{t-student} < 0,05$) (tabela 1). A suscetibilidade à vancomicina foi idêntica para o ribotipo 027 e restantes ribotipos (tabela 1).

O gene *ermB*, associado à resistência à clindamicina, foi identificado em 11,5% (21/182) do total de estirpes de *C. difficile* analisadas. Destas 21 estirpes, 5 (23,8%) apresentaram resistência simultânea à moxifloxacina e imipenem, sendo que 4 pertenciam ao ribotipo 017.

Discussão e conclusão

C. difficile é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, anaeróbia estrita frequentemente implicada em casos de diarreia nosocomial. A infeção é causada por estirpes toxinogénicas, embora existam naturalmente estirpes não produtoras de toxinas, capazes de colonizar os seus hospedeiros.

Em Portugal, os dados epidemiológicos referentes a esta infeção são escassos, embora nos últimos anos tenha existido um esforço de várias entidades para que seja melhor conhecida a distribuição nacional da infeção por *C. difficile*. Este trabalho é um contributo para esse conhecimento, tendo em conta a amostra de conveniência dos hospitais envolvidos, assente naqueles que, durante períodos de tempo diferentes, voluntariamente aceitaram participar no estudo.

A grande variabilidade genética de estirpes de *C. difficile* encontrada numa mesma unidade hospitalar, fora de um contexto de surto, é comum, sugerindo quer infeção hospitalar quer comunitária. Em con-

trapartida, o predomínio de um único ribotipo numa mesma unidade hospitalar, sugere uma origem nosocomial da infeção por *C. difficile*, normalmente associada a estirpes mais resistentes e, conseqüentemente, com elevada capacidade de disseminação em meio hospitalar, como pode ser exemplo o ribotipo 027, identificado na região centro do país. De acordo com a literatura, a elevada prevalência de ribotipos mais virulentos e resistentes pode ter uma implicação direta na taxa de incidência da infeção por *C. difficile* (8).

Para além do ribotipo 027, outros genótipos têm emergido ultimamente na Europa, como é o caso dos ribotipos 017 e 078, também encontrados neste estudo. Relativamente ao ribotipo 017, apesar de apenas produzir a toxina B, tem sido recentemente associado a vários surtos, com uma amplitude mundial, bem como a doença severa e elevada letalidade, o que evidencia bem a virulência deste ribotipo (9,10). Acresce ainda a elevada resistência do ribotipo 017 a vários antibióticos em simultâneo, como as fluoroquinolonas, clindamicina e imipenem, antibióticos geralmente implicados na pressão seletiva e conseqüente disseminação de estirpes resistentes.

Embora a maioria dos isolados clínicos seja habitualmente sensível aos antibióticos utilizados no tratamento da infeção por *C. difficile*, tem-se vindo a registar um aumento de casos refratários à terapêutica com estes antibióticos, sobretudo ao metronidazol (11). Também já foram descritas estirpes de *C. difficile* com suscetibilidade diminuída ao metronidazol e à vancomicina, no entanto ainda não foi possível estabelecer uma correlação entre o fenótipo de resistência da estirpe e a falência terapêutica.

Em conclusão, a elevada frequência de ribotipos mais virulentos e emergentes detetada neste estudo, aliada à elevada taxa de re-



sistência aos antimicrobianos, pode antecipar uma rápida disseminação destas estirpes em ambiente hospitalar, evidenciando a necessidade de implementação de um sistema de vigilância ativo da infeção por *C. difficile* em Portugal.

Agradecimentos

Aos laboratórios de patologia clínica dos hospitais participantes: Centro Hospitalar de Coimbra, Centro Hospitalar de Vila Conde, Centro Hospitalar do Algarve, Centro Hospitalar do Oeste, Centro Hospitalar Lisboa Central, Hospitais da Universidade de Coimbra, Hospital Beatriz Ângelo, Hospital da Guarda, Hospital de Aveiro, Hospital de Braga, Hospital de Cascais, Hospital de Cova da Beira, Hospital de Santarém, Hospital de Viana do Castelo, Hospital de Vila Franca, Hospital do Baixo Alentejo, Hospital Garcia de Orta, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca.

À doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(7):526-36.
- (2) Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(Suppl 2):1-26.
- (3) He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated Clostridium difficile. *Nat Genet*. 2013;45(1):109-13. Epub 2012 Dec 9. [LINK](#)
- (4) Oleastro M, Coelho M, Gião M, et al. Outbreak of Clostridium difficile PCR ribotype 027-the recent experience of a regional hospital. *BMC Infect Dis*. 2014;14:209. [LINK](#)
- (5) Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):529-49. [LINK](#)
- (6) Hunt JJ, Ballard JD. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of Clostridium difficile. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(4):567-81. [LINK](#)
- (7) Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, et al. Clostridium difficile binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*. 2014;5(1):15-27. Epub 2013 Oct 31. [LINK](#)
- (8) Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, et al. Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis*. 2014;14(12):1208-19.
- (9) Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, et al. Clostridium difficile ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill*. 2009;14(45): pii: 19403. [LINK](#)
- (10) Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of Clostridium difficile infection in Asia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013;2(1):21. [LINK](#)
- (11) Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of Clostridium difficile colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis*. 2005;40(11):1591-7. [LINK](#)