



EDITORIAL

Clostridium difficile: infeção e ribotipos**Clostridium difficile: Infection and ribotypes**

Helena Lomba Viana



Serviço de Gastroenterologia, Hospital Militar D. Pedro V, Porto, Portugal

O *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é uma bactéria Gram positiva, anaeróbia estrita, formadora de esporos, abundante no solo e águas estagnadas¹.

Foi descoberta pela primeira vez em 1935, mas só a partir de 1978 é que foi associada em humanos ao diagnóstico de colite pseudomembranosa²⁻⁵.

Trata-se de uma bactéria comensal do trato gastrointestinal, que coloniza o cólon em cerca de 3% dos adultos saudáveis e em 10-30% dos doentes hospitalizados. Em condições normais, a microflora intestinal inibe o crescimento de *C. difficile*. No entanto, quando o equilíbrio da flora intestinal é alterado por intermédio de antibióticos, o *C. difficile* encontra as condições propícias à sua germinação, colonização e segregação de toxinas^{5,6}.

Durante a progressão da infeção associada a *C. difficile* começa um ciclo de formação de esporos por esta bactéria, que são libertados no lúmen cólico e que posteriormente são lançados no meio ambiente. Desconhecem-se ainda os mecanismos que permitem a sobrevivência, germinação e persistência de esporos no trato intestinal^{7,8}.

O *C. difficile* produz 2 tipos de toxinas: a toxina A, a qual possui um efeito enterotóxico e citotóxico, e a toxina B, a qual tem uma forte atividade citotóxica. A atividade enterotóxica da toxina A induz a secreção aquosa intensa e o efeito citotóxico das toxinas A e B causam um aumento da permeabilidade vascular devido à destruição das ligações intercelulares e posteriormente hemorragia. Além disso, as toxinas A e B induzem a produção do fator alfa de necrose tumoral e de interleucinas pró-inflamatórias associadas à formação de pseudomembranas^{7,9,10}.

O *C. difficile* é responsável por cerca de 30% das diarreias associadas ao uso de antibióticos⁷.

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de doença associada ao *C. difficile* (DACD), para além do uso de antibióticos, nomeadamente clindamicina, ampicilina e cefalosporinas de terceira geração, temos também a considerar: hospitalização prolongada, idade superior a 65 anos, imunossuprimidos, doentes com comorbilidades, oncológicos, doentes com patologia gastrointestinal, nomeadamente doença intestinal inflamatória, gastrectomizados e doentes sujeitos a alimentação entérica^{1,7,9,11,12}. Mais recentemente o uso de inibidores da bomba de protões foi também sugerido como fator de risco^{5,12}.

O *C. difficile* pode causar sintomatologia, que varia desde uma diarreia aquosa até casos mais graves de colite pseudomembranosa, megacólon tóxico ou perfuração cólica^{1,5,7,9}. Febre, arrepios, dor abdominal localizada sobretudo no hipogastro, aumento de creatinina e leucocitose são frequentes, mas apenas detetados em menos de 50% dos doentes. Quando surge aumento do lactato sérico, falência renal, hipertensão arterial, íleo paralítico ou choque, o quadro clínico torna-se mais grave^{7,13}.

O diagnóstico de *C. difficile* é feito através de vários métodos nomeadamente: deteção direta da toxina em amostras de fezes, por vezes após a cultura das mesmas para aumentar a sensibilidade, e ensaio de neutralização de citotoxinas, métodos que demoram 3-4 dias até se obter o resultado; imunoensaio para a deteção do antigénio pelo teste da glutamato-desidrogenase (GDH), que tem alta sensibilidade mas não diferencia estirpes toxigénicas e não toxigénicas, e imunoensaio para toxina A e/ou B, que tem alta especificidade, métodos que permitem obter o resultado em minutos; ensaios moleculares para os genes codificadores de ambas as toxinas, os quais possuem alta sensibilidade e dão os resultados ao fim de algumas horas;

DOI do artigo original:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.01.002>

Correio eletrónico: helenaviana555@gmail.com

realização de colonoscopia para a detecção direta de pseudo-membranas. A combinação conjunta de vários dos métodos anteriores permite o diagnóstico de certeza da infecção^{1,5,7}.

A utilização das técnicas moleculares nos estudos epidemiológicos relativos ao *C. difficile* é muito útil na sua caracterização. Essas técnicas incluem restrição genômica, amplificação por PCR e estudo sequencial de determinadas regiões dos genes. O método de referência é a ribotipagem por amplificação por PCR, que permite comparar tamanhos de fragmentos obtidos por este método, correspondentes a regiões de ARN ribossômico. O padrão de bandas obtido define um determinado ribotipo, que facilmente é comparado entre centros de estudo^{5,6,14,15}.

Do ponto de vista epidemiológico, têm sido detetadas alterações importantes desde o final dos anos 90. Notou-se um aumento marcado do número de casos de DACD, nomeadamente nos Estados Unidos, Canadá e alguns países europeus. Estas alterações foram atribuídas ao aparecimento e disseminação de uma nova estirpe de *C. difficile* conhecida por B1/NAP1/027, a qual pertence ao ribotipo 027^{1,3,5,7,16-18}. Esta nova estirpe de *C. difficile* foi estudada intensamente e observou-se que apresenta uma maior virulência associada à presença de uma toxina binária, à mutação do gene regulador *tcdC* e à resistência às fluoroquinolonas^{16,18}.

A toxina binária é uma transferase, formada por 2 subunidades (*cdtA* e *cdtB*), que está associada a uma maior toxicidade da estirpe, porque aumenta a adesividade da dita estirpe de *C. difficile* e atua ao nível do citoesqueleto das células, provocando uma maior perda de líquidos. Desta forma, as estirpes portadoras de toxina binária estão associadas a uma maior virulência^{5,7}.

As estirpes hipervirulentas possuem uma deleção de pares de bases do gene repressor *tcdC* o que leva a um aumento significativo 3-5 vezes nos níveis de produção de toxinas, durante a fase estacionária, fator este que contribui para a elevada virulência dessas estirpes^{7,19}.

No entanto, o aumento das infeções associadas ao *C. difficile*, não pode ser só atribuído ao ribotipo 027, mas também a outros, como por exemplo o ribotipo 001, 017, 053, 078 e 106, que possuem um mecanismo similar de hiperprodução de toxinas^{5,18}.

Existem, no entanto, autores²⁰ que concluem não haver evidência que o ribotipo 027 seja mais virulento que outros ribotipos detetados por PCR, havendo por isso necessidade de mais estudos neste campo.

O tratamento indicado em caso de doença associada ao *C. difficile* inclui: em primeiro lugar suspender o antibiótico desencadeante, promover a correta hidratação e nutrição do doente, evitar o uso de opiáceos e de fármacos inibidores do peristaltismo intestinal. Os antibióticos de primeira linha a utilizar nestes doentes são o metronidazol e a vancomicina. Em caso de resistência ao metronidazol e/ou de uma maior gravidade da doença, deverá ser utilizada a vancomicina. Quando surge uma complicação mais grave, nomeadamente megacólon tóxico ou perfuração cólica, a cirurgia está indicada.

A taxa de recidiva de DACD é de cerca de 15-20%, e, nestes casos, a terapêutica é semelhante à utilizada no primeiro episódio. Após a segunda recidiva, a rifaximina e a fidaxomicina deverão ser considerados para o tratamento destes doentes. Para além da antibioterapia nos casos de

recidiva, poderá ainda ser ponderado o transplante de flora microbiana fecal e o uso de probióticos^{5,7}.

Neste número do GE Cardoso et al. apresentam um importante e original estudo sobre a determinação das diferentes estirpes de *C. difficile* num grupo de doentes com infecção causada por esta bactéria.

Tratou-se de um estudo prospetivo de doentes consecutivos com doença associada a *C. difficile*, durante um período de 18 meses, que incluiu 20 doentes. A infecção foi adquirida em contexto nosocomial em 85% dos casos e todos os doentes se encontravam a fazer antibioterapia.

Após exame cultural das fezes, todas as estirpes isoladas foram caracterizadas geneticamente, por detecção do gene *gluD*, e dos genes codificantes das toxinas A e B. Seguidamente, as estirpes foram genotipadas com determinação dos ribotipos por amplificação por PCR e separação por eletroforese capilar.

A caracterização genética confirmou que todas as estirpes eram produtoras de toxina A e em 85% dos casos de toxina B. Foi possível obter um perfil de ribotipo em 17 estirpes, não sendo nenhuma dominante. Houve 4 ribotipos detetados em 2 doentes cada, e 9 ribotipos detetados apenas em um doente cada. Durante o estudo foram isolados 3 novos perfis de ribotipo, sem homologia na base de dados europeia. A produção de toxina binária foi identificada em apenas 25% dos casos, nomeadamente nos ribotipos 027, 126, 203 e novo ribotipo 3.

Os autores concluíram no estudo apresentado não haver nenhum ribotipo dominante e também não se ter verificado associação entre a gravidade da doença e os ribotipos isolados.

O estudo apresentado é inovador e, embora tenha um número reduzido de doentes incluídos, é muito importante como alerta deste problema.

A caracterização dos diferentes ribotipos de *C. difficile* e das suas características, mais ou menos patogénicas, é determinante na orientação clínica dos doentes com DACD.

De salientar que neste estudo foi efetuada também a determinação dos ribotipos em causa por amplificação por PCR, o que permitiu ainda a descoberta de 3 novos ribotipos, desconhecidos até ao momento. Trata-se, portanto, de um grande contributo em termos científicos, uma vez que com ponto de partida neste estudo virão a ser incluídos na tabela classificativa europeia dos ribotipos já identificados de *C. difficile*.

O facto de não se ter detetado um ribotipo dominante poderá estar associado ao número limitado de doentes estudados, apenas 20, o que se apresenta como uma amostra reduzida.

Neste estudo todos os doentes reverteram o quadro clínico com antibioterapia de uma forma favorável. De salientar que não se registaram casos de DACD com critérios de gravidade e por isso não houve qualquer caso fatal a mencionar. Esta situação também poderá estar relacionada com o tamanho da amostra, bem como o facto de não ter sido possível estabelecer qualquer relação entre a gravidade da doença e os ribotipos identificados.

A importância clínica deste tema exige a necessidade de serem efetuados mais estudos sobre o assunto, uma vez que existe ainda um largo caminho a percorrer até à completa identificação dos ribotipos de *C. difficile* e das suas características específicas.

Artigo relacionado com: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.01.002>

Bibliografia

- Norén T. *Clostridium difficile* and the disease it causes. *Methods Mol Biol.* 2010;646:9–35, doi: 10.1007/978-1-60327-365-7_2.
- Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, et al. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:273–80.
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:529–49.
- Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: New challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med.* 2006;73:187–97.
- Rodríguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile* In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Abril. 2013;31:4, doi: 10.1016/j.eimc.2012.12.010.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:726–36.
- Hernández-Rocha C, Naour S, Álvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. *Rev Chilena Infectol.* 2012;29(4):434–45.
- Paredes-Sabja D, Sarker MR. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe.* 2011;17:74–84.
- Apac CG, Cubas FS. Diarrea asociada a *Clostridium difficile*: características clínicas y epidemiológicas. *Acta méd peruana abr/jun.* 2008;25:2.
- Oldfield EC. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: Risk factors, diagnostic methods, and treatment. *Rev Gastroenterol Dis.* 2004;4:186–95.
- Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol.* 2009;15(13):1554–80.
- Sanchez TH, Brooks JT, Sullivan PS, Juhasz M, Mintz E, Dworkin MS, et al., Adult/Adolescent Spectrum of HIV Disease Study Group. Bacterial diarrhea in persons with HIV infection United States, 1992–2002. *Clin Infect Dis.* 2005;4(11):1621–8.
- Bartlett JG. *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Curr Infect Dis Rep.* 2002;4:477–83.
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:431–55.
- Kachrimanidou M, Malisiovas N. *Clostridium difficile* infection: A comprehensive review. *Crit Rev Microbiol.* 2011;37:178–87.
- Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med.* 2005;353:2442–9.
- Clements AC, Magalhães RJ, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: Assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:395–404.
- Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller G. *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Eurosurveillance.* 12 November 2009, 14; 45.
- Dupuy B, Matamouros S. Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase sigma-factors. *Res Microbiol.* 2006;157:201–5.
- Morgan OW, Rodrigues B, Elston T, Verlander NQ, Brown DFJ, Brazier J, et al. Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: A case study. *Plos one.* 2008;3:e1812, doi: 10.1371/journal.pone.0001812.