

ARTIGO ORIGINAL

Determinação das diferentes estirpes de *Clostridium difficile* num grupo de doentes com infecção causada por esta bactéria

Cláudia Cardoso^{a,*}, Ricardo Freire^a, Jesuína Duarte^b, Mónica Oleastro^c,
Andrea Santos^c, João Carlos Rodrigues^c, Isabelle Cremers^a e Ana Paula Oliveira^a

^a Serviço de Gastreterologia, Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal

^b Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal

^c Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Recebido a 28 de agosto de 2012; aceite a 17 de janeiro de 2013

Disponível na Internet a 12 de novembro de 2013

PALAVRAS CHAVE

Clostridium difficile;
Ribotipagem;
Electroforese em gel
por capilaridade

Resumo

Introdução: Nos últimos anos tem-se verificado uma incidência crescente da doença associada a *Clostridium difficile* (DACD). A caracterização molecular das várias estirpes tem permitido o reconhecimento de determinados ribotipos da bactéria associados a uma maior virulência.

Objetivo: Isolamento e caracterização molecular das estirpes de *Clostridium difficile* responsáveis por DACD e a sua correlação clínica numa série hospitalar.

Material e métodos: Análise prospetiva de doentes consecutivos com DACD, incluídos durante um período de 18 meses. Foi realizada a colheita de dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Após exame cultural das fezes, todas as estirpes da bactéria foram caracterizadas geneticamente, por deteção do gene *gluD*, específico da espécie, e dos genes codificantes das toxinas A e B. Posteriormente, as estirpes foram genotipadas, com determinação do ribotipo, por amplificação por PCR da região intergénica RNAr16S-23S e separação por electroforese em gel por capilaridade.

Resultados: Foram incluídos 20 doentes, 65% do sexo feminino, com uma idade média de 73 anos. A maioria dos doentes adquiriu a infeção em contexto nosocomial e apresentava história de antibioterapia prévia. O diagnóstico de DACD ocorreu, em média, ao 7.º dia de internamento. Todas as estirpes foram confirmadas como sendo *Clostridium difficile*, produtoras das toxinas A e/ou B. Foi possível obter um perfil de ribotipo em 17 estirpes, não tendo sido identificada nenhuma dominante. Os ribotipos mais observados foram o R014, o R027, o R126 e o R501, cada um detetado em 2 doentes. Foram ainda isolados 3 novos perfis, sem homologia na base de dados. Não houve correlação entre a gravidade da doença e os ribotipos identificados.

Conclusões: Na nossa casuística não se isolou nenhum ribotipo dominante, observando-se 2 casos causados pela estirpe hipervirulenta R027. Não se verificou associação entre a gravidade da doença e os ribotipos isolados.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Gastreterologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: claudiamarcal@gmail.com (C. Cardoso).

KEYWORDS

Clostridium difficile;
Ribotyping;
Pulsed field gel
electrophoresis

Clostridium difficile* strain stypes determination in patients infected with this bacteria*Abstract**

Introduction: The incidence of *Clostridium difficile*- associated disease (CDAD) has increased in the last years. Molecular analysis of the different strains of this bacteria has identified specific ribotypes associated with a more severe disease.

Aim: Molecular characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from consecutive inpatients with CDAD and its correlation with clinical outcome.

Material and methods: A prospective analysis of consecutive patients with CDAD recruited during 18 months. Epidemiological, clinical and laboratory data were collected. After stool culture, the isolates were genetically characterized with primers for *gluD*, *tcdA* and *tcdB* genes. The strains were then typed by PCR ribotyping, with primers for *rRNA16S-23S* genes, and capillary gel electrophoresis analysis.

Results: 20 patients were included, 65% were female. Their mean age was 73 years. In the majority of cases the infection was nosocomial and there was a history of antibiotic therapy intake. All strains were confirmed as toxins A and/or B producing *Clostridium difficile*. Ribotypes R014, R027, R126 and R051 were the most common strains. There was no correlation between isolated strains and the severity of the disease.

Conclusions: In our series, there was a lack of association between clinical outcome of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and the several strains identified.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introdução

O *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é uma bactéria gram positiva anaeróbia que se encontra presente na flora intestinal de 3% da população adulta saudável.

Existem, no entanto, várias condições que podem afetar a flora intestinal e predispor a doença associada a *C. difficile* (DACD) no Homem.

O espectro clínico da DACD varia desde o portador assintomático (cuja prevalência atinge os 35% em doentes hospitalizados) até à colite pseudomembranosa grave com megacólon tóxico associado, cuja mortalidade se situa entre 6-30%¹⁻³.

Tradicionalmente, a DACD ocorre em contexto nosocomial, associada à utilização de antibióticos (principal factor de risco para a infeção), idade avançada e estados de imunossupressão. Existem, contudo, na literatura, casos descritos de infeção por esta bactéria em populações da comunidade consideradas de baixo risco⁴.

A sua virulência é mediada, na maioria dos casos, pela produção em simultâneo de 2 toxinas, A e B, ambas codificadas por genes do *locus* de patogenicidade, ocorrendo a sua transmissão por via fecal-oral e a sua disseminação através do contacto com doentes infetados, profissionais de saúde ou superfícies contaminadas^{5,6}.

Nos últimos anos, tem-se assistido, a nível mundial, a um aumento do número de casos de infeção por *C. difficile* associados a doença mais grave, maior resistência aos antibióticos, com mortalidade e taxa de recidivas mais elevadas. São conhecidos atualmente mais de 150 ribotipos e 24 toxinotipos da espécie⁷. A emergência de uma nova estirpe de *C. difficile*, designada de NAP1 ou ribotipo 027, tem sido implicada em vários surtos de doença grave na última década quer em contexto hospitalar quer em populações saudáveis da comunidade. A produção de níveis mais

elevados de toxinas A e B, para além de uma toxina adicional conhecida como a toxina binária, parecem conferir uma maior virulência⁸⁻¹⁰.

No Centro Hospitalar de Setúbal assistiu-se, em determinada altura, a um aumento da incidência de DACD com critérios de gravidade e com uma percentagem de recidiva mais elevada, o que motivou o início deste estudo inovador com o intuito de caracterizar as estirpes circulantes na nossa Instituição e melhorar as recomendações diagnósticas, terapêuticas e preventivas na DACD.

Objetivo

Isolamento e caracterização molecular das estirpes de *C. difficile* responsáveis por DACD e a sua correlação clínica numa série hospitalar.

Material e métodos

Análise prospetiva de doentes consecutivos com DACD, incluídos durante um período de 18 meses (março de 2010-agosto de 2011). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Hospitalar, tendo sido obtido o consentimento informado em todos os casos.

Foram incluídos doentes seguidos em internamento nos Serviços de Medicina Interna, Gastrenterologia e Nefrologia do Centro Hospitalar de Setúbal.

O diagnóstico de DACD baseou-se no quadro clínico complementado por um dos seguintes achados:

- Presença de toxinas A e/ou B nas fezes detetadas através do método de imunocromatografia (sensibilidade de 87-92%).

- Exames endoscópico e histológico com achados sugestivos de infecção.

Foram considerados critérios de gravidade da doença a presença de febre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), leucocitose > 15.000 células/mL, hipoalbuminemia *de novo* $< 3,5$ g/dL, megacólon tóxico, sépsis grave/choque séptico, perfuração intestinal e morte.

Após exame cultural das fezes em meio seletivo *Oxoid* todas as estirpes da bactéria foram caracterizadas geneticamente, por detecção do gene *gluD*, específico da espécie, e dos genes codificantes das toxinas A e B. Posteriormente, as estirpes foram genotipadas, com determinação dos ribotipos por amplificação por PCR da região intergênica RNAr16S-23S e separação por eletroforese em gel por capilaridade.

A denominação de cada estirpe foi realizada através da homologia com os padrões de migração das estirpes inseridas na base de dados europeia (<http://webribo.ages.at>), onde se encontram registados todos os ribotipos conhecidos até ao momento.

O estudo decorreu em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Resultados

Foram incluídos 20 doentes, 65% do sexo feminino, com uma idade média de 73 anos (32-89).

A infecção foi adquirida em contexto nosocomial em 85% dos casos. Todos os doentes se encontravam sob antibioterapia. As principais doenças infecciosas que motivaram a necessidade de antibioterapia foram a respiratória e a urinária (fig. 1). As classes de antibióticos mais utilizadas foram as penicilinas, carbapenems, quinolonas e cefalosporinas (fig. 2). O número médio de antibióticos por doente foi de 2.

Três doentes adquiriram a doença em ambulatório, sem fatores de risco identificados para infeção.

O diagnóstico de DACD ocorreu em média ao 7.º dia de internamento. A diarreia aquosa foi a forma de manifestação da doença em todos os casos, com um número médio de 7 dejeções/dia. As principais alterações analíticas foram a leucocitose (55%), com valores inferiores a 15.000 células/mL, e a hipoalbuminemia (85%), com um valor médio de

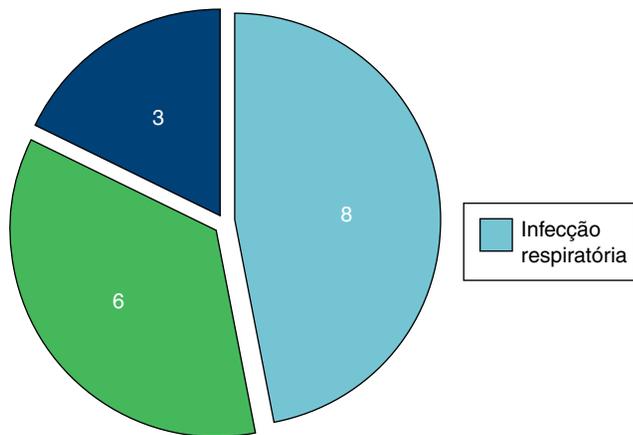


Figura 1 Pontos de partida da infeção.

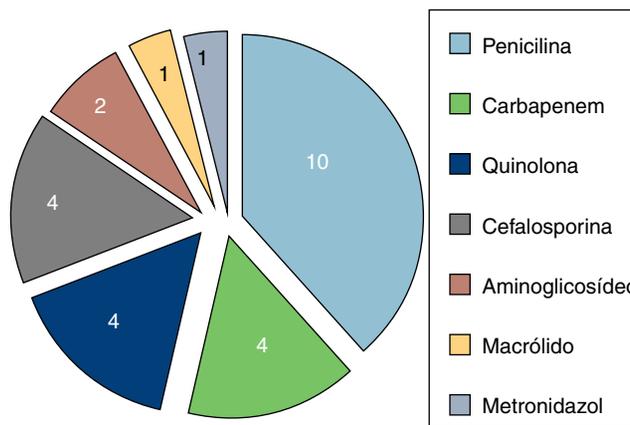


Figura 2 Classe de antibiótico.

2,7 g/dL (fig. 3). No entanto, os baixos níveis de albumina já se verificavam previamente ao início da DACD, em relação provável com as intercorrências infecciosas que motivaram o início de antibioterapia e a baixa ingestão alimentar.

Não se registaram casos de DACD com critérios de gravidade.

Todas as estirpes eram produtoras de toxina A e, na maioria dos casos, de toxina B em simultâneo.

Onze doentes foram submetidos a rectossigmoidoscopia, a qual revelou aspetos sugestivos de colite pseudomembranosa, caracterizada por placas esbranquiçadas a recobrir a mucosa do reto e/ou sigmóide, confirmada histologicamente, em 6 casos, e erosões, em 3 casos, não se verificando alterações da mucosa na extensão observada em 2 doentes.

O metronidazol foi a antibioterapia de primeira linha utilizada em todos os doentes na dose de 500 mg 8/8 h, na maioria dos casos administrada por via oral (n=16) e, na sua ausência, por via endovenosa (n=4). Dada a ausência de melhoria nas primeiras 72h em 3 doentes sob antibioterapia por via endovenosa, o esquema antibiótico foi alterado para vancomicina, com resolução do quadro (fig. 4). A duração do esquema terapêutico foi de 10 dias.

A caracterização genética confirmou que todas as estirpes eram produtoras de toxina A e, em 85% dos casos, de toxina B. A produção de toxina binária documentou-se em 25% dos casos, nomeadamente nos ribotipos 027, 126, 203 e novo ribotipo 3 (fig. 5).

Foi possível obter um perfil de ribotipo em 17 estirpes, tendo sido identificados 13 perfis distintos. Os mais frequentes foram os ribotipos 014, 027, 126 e 501, cada um detetado em 2 doentes (fig. 6).

Diarreia	100%
Dor abdominal	35%
Leucocitose	55%
Hipoalbuminemia	85%
Complicações	0%

Figura 3 Caracterização clínica/análítica.

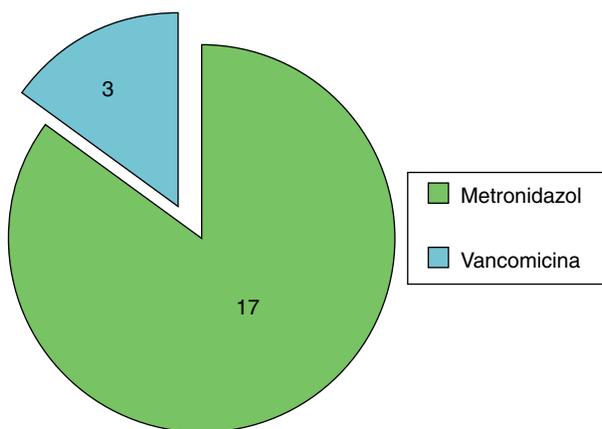


Figura 4 Antibioterapia para a DACD (n).

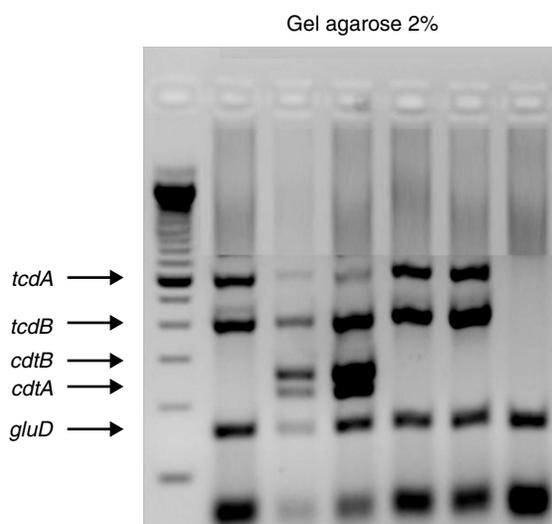


Figura 5 Perfil de migração em gel de agarose.

Foram ainda identificados 3 novos perfis de ribotipos, designados no estudo como novos ribotipos 1, 2 e 3, sem homologia na base de dados europeia e que aguardam denominação.

Discussão

A diarreia associada a *C. difficile* constitui a causa mais frequente de diarreia infecciosa nosocomial no mundo ocidental. A apresentação clínica e a gravidade da doença são variáveis, com um espectro clínico que vai desde a diarreia ligeira até à colite grave complicada de megacólon tóxico, perfuração intestinal, sépsis e morte.

A virulência da bactéria é mediada pelas enterotoxina A e a citotoxina B, ambas codificadas por genes do locus de patogenicidade e cuja expressão é regulada pelo gene TcdR, estimulador da expressão, e reprimida pelo gene TcdC^{11,12}.

Atualmente são conhecidos mais de 150 ribotipos da bactéria, mas apenas alguns são enteropatogêneos humanos. A amplificação por PCR da região intergênica RNAr16S-23S e separação por eletroforese em gel por capilaridade é o método mais utilizado a nível europeu na identificação dos

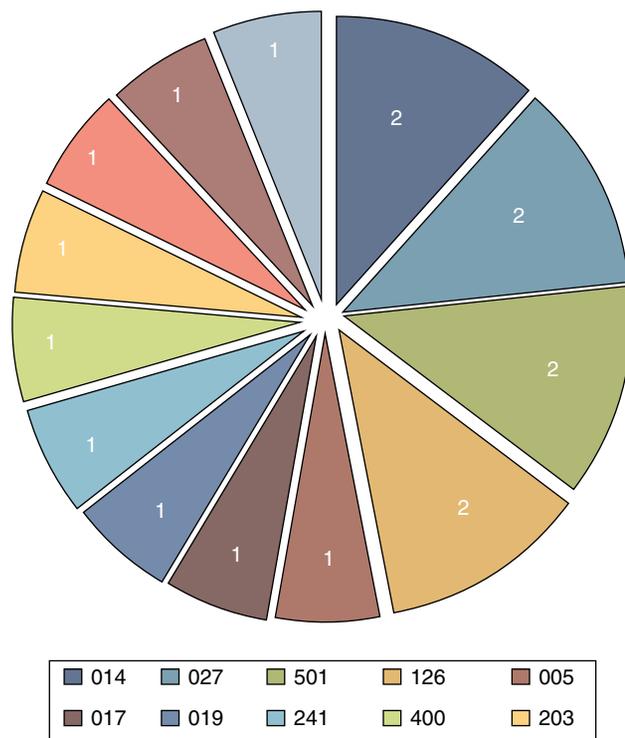


Figura 6 Ribotipos isolados.

vários ribotipos, permitindo a homologia da técnica de ribotipagem entre os vários laboratórios¹³.

Na última década, a estirpe NAP1/027 tem sido associada a surtos de doença em vários países Europeus, Canadá e Estados Unidos, caracterizados por maior gravidade do quadro clínico, com taxas de recidivas e de mortalidade mais elevadas. A presença de mutações em genes que suprimem a produção das toxinas A e B, como é o caso do gene TcdC, levando a uma maior produção de ambas, tem sido implicada na sua maior virulência^{14,10}. Para além disso, esta estirpe produz a toxina binária, que se pensa promover a adesão às células do cólon, embora o seu papel não se encontre ainda totalmente estabelecido¹⁵. A maior taxa de esporulação e a consequente promoção da disseminação e persistência no meio hospitalar, bem como a resistência às fluoroquinolonas, têm sido outras das características inerentes a esta estirpe descritas em vários estudos. Contudo, várias séries mais recentes têm sugerido que, em contexto não epidémico, esta estirpe não se associa a doença mais grave¹⁶⁻¹⁸.

A epidemiologia molecular do *C. difficile* na nossa instituição revelou ser diversa, com a identificação de 13 estirpes diferentes.

Na nossa série o ribotipo 027 foi isolado em apenas 2 casos, ambos produtores de toxina binária. Embora seja um número reduzido, os doentes infetados não apresentaram critérios de gravidade da doença, suportando a ausência de uma maior virulência desta e das restantes estirpes isoladas em contexto não epidémico.

Este é o primeiro estudo a nível nacional sobre a epidemiologia molecular da infeção por *C. difficile* numa instituição hospitalar e que permitiu identificar 3 ribotipos não conhecidos a nível mundial. Como limitações ao estudo temos a amostra reduzida de doentes incluídos. Um estudo

prospetivo multicêntrico que permitisse a inclusão de um maior número de doentes seria desejável, com o intuito de se determinar os ribotipos circulantes a nível nacional e o seu impacto clínico.

Concluindo, embora com um número reduzido de doentes incluídos, na nossa casuística não se isolou nenhum ribotipo dominante, observando-se 2 casos causados pela estirpe 027. Não se verificou associação entre a gravidade da doença e os ribotipos isolados. Foram detetados 3 novos perfis de ribotipos sem homologia na base de dados europeia e que aguardam denominação.

Responsabilidades éticas

Proteção de pessoas e animais. Os autores declaram que para esta investigação não se realizaram experiências em seres humanos e/ou animais.

Confidencialidade dos dados. Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de pacientes e que todos os pacientes incluídos no estudo receberam informações suficientes e deram o seu consentimento informado por escrito para participar nesse estudo.

Direito à privacidade e consentimento escrito. Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Bibliografia

- Bartlett JG. Clinical practice: Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2002;31:334–9.
- Akerlund T, Svenungsson B, Lagergren A, Burman LG. Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44:353–8.
- Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of CDAC: Old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:549–57.
- Johal SS, Hammond J, Solomon K, James PD, Mahida YR. *Clostridium difficile* associated diarrhoea in hospitalised patients: Onset in the community and hospital and role of flexible sigmoidoscopy. *Gut*. 2004;53:673–7.
- Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology*. 1981;81:5–9.
- Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol*. 2005;54:113–7.
- Kuiper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12 Suppl 6:2–18.
- Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3470–5.
- Popoff MC, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun*. 1988;56:2299–306.
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005;366:1079–84.
- Mani N, Dupuy B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad*. 2001;98:5844–9.
- Matamouros S, England P, Dupuy B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol*. 2007;64:1274–88.
- Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol*. 2008;57:1377–82.
- Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol*. 2008;57:685–9.
- Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog*. 2009:e1000626.
- Cloud J, Noddin L, Pressman A, Hu M, Kelly C. *Clostridium difficile* strain NAP-1 is not associated with severe disease in a non-epidemic setting. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:868–73.
- Morgan OW, Rodrigues B, Elston T, Verlander NQ, Brown DF, Brazier J, et al. Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: A case-case study. *PLoS One*. 2008;3:e1812.
- Wilson V, Cheek L, Satta G, Walker-Bone K, Cubbon M, Citron D, et al. Predictors of death after *Clostridium difficile* infection: A report on 128 strain-typed cases from a teaching hospital in the United Kingdom. *Clin Infect Dis*. 2010;50:e77–81.