



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**CECÍLIA LEITE COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO COMPARATIVO DE UMA NOVA CEPA DE**  
***Clostridioides difficile* ISOLADA DE UM HOSPITAL ONCOLÓGICO DE**  
**FORTALEZA, CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2017**

**CECÍLIA LEITE COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO COMPARATIVO DE UMA NOVA CEPA DE  
*Clostridioides difficile* ISOLADA DE UM HOSPITAL ONCOLÓGICO DE  
FORTALEZA, CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e tecidual.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Co Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

**FORTALEZA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C871c Costa, Cecília Leite.

Caracterização e estudo comparativo de uma nova cepa de *Clostridioides difficile* isolada de um hospital oncológico de Fortaleza, Ceará / Cecília Leite Costa. – 2017.  
101 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profª. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

Coorientação: Profª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

1. *Clostridioides difficile*. 2. Fatores de virulência. 3. MLST Clado 2. I. Título.

CDD 611

---

**CECÍLIA LEITE COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO COMPARATIVO DE UMA NOVA CEPA DE  
*Clostridioides difficile* ISOLADA DE UM HOSPITAL ONCOLÓGICO DE  
FORTALEZA, CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e tecidual.

Aprovada em: 20/12/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dra Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup> Dra Eliane de Oliveira Ferreira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Prof<sup>a</sup> Dra Lucia Libanez Bessa C. Braga  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra Debora Castelo Branco de S. C. Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de aprendizado e formação profissional.

A Universidad da Costa Rica que proporcionou a realização de algumas análises essenciais para esse estudo.

Ao Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, que proporcionou a realização desse estudo.

A CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu filho Bernardo, que nasceu durante o meu doutorado e mudou minha vida por completo com o maior amor do mundo e que me faz todos os dias querer ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo em todos os meus projetos.

Ao meu irmão Diego Costa, a minha cunhada Vanessa Costa e minha sobrinha Bellinha pelo apoio, amizade e companheirismo de todas as horas.

A Prof<sup>ª</sup> Gerly Anne pela excelente orientação e por ser tão acessível, amável e sempre acreditar e incentivar o meu trabalho com sugestões para a realização e melhoria do estudo.

A Prof<sup>ª</sup> Cibele Carvalho por sempre ser tão dedicada nas suas orientações e por todos os conselhos dados. E como já havia dito é um exemplo de ética e profissionalismo pra mim.

Ao Dr. Carlos Quesada-Gómez pela paciência e por ter sido o meu mestre no meu aprendizado na pesquisa de *C. difficile* e Dr. César Rodriguez por todos os ensinamentos e apoio na pesquisa de *C. difficile*.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof<sup>ª</sup> Débora Castelo Branco, Prof<sup>ª</sup> Eliane Ferreira, Prof<sup>ª</sup> Lúcia Libanez e Prof. Vivaldo Moura Neto pelo tempo dedicado ao meu estudo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas que somaram conhecimentos na minha vida.

Ao Olavo Moraes pela amizade e pela colaboração para a realização desse estudo.

A Catarina Reis, amiga que ganhei para a vida toda, agradeço por todo apoio e companheirismo.

Aos colegas da turma de doutorado, principalmente Josy e Deizy, pela amizade e por todos os momentos compartilhados durante todo o doutorado.

Aos amigos do laboratório de Bacteriologia, Bruno, Chryster e Fábio, por todos os momentos de companheirismo e descontração.

A todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização desse estudo.

## RESUMO

*Clostridioides difficile* é um bacilo Gram positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos, produtor de toxinas e que representa a principal causa de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos. O objetivo desse estudo foi caracterizar uma nova cepa de *C. difficile* (ICC45) isolada de um paciente internado em um hospital oncológico de Fortaleza e comparar com as cepas ATCC 700057 (não toxigênica) e NAP1/027 (R20291 e LIBA5756 cepas hipervirulentas). As cepas isoladas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ do ICC) foram processadas para identificação fenotípica e análise de detecção dos genes das toxinas e do fragmento do gene *tpi* por PCR. A sensibilidade das cepas isoladas a oito antimicrobianos foi determinada por meio de *E-test*. Análises de identificação molecular das cepas foram realizadas por meio de PFGE, PCR ribotipagem e toxinotipagem. Adicionalmente foi realizado o sequenciamento completo, tipagem de sequência Multilocus (MLST), a expressão gênica relativa dos fatores de virulência estudados e a expressão protéica das toxinas A e B, por meio de *Western Blotting* da cepa ICC45 em comparação com a NAP1/027. Em todos os isolados do HHJ do ICC foram detectados os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*. O domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) foi detectado na cepa ICC45, mas não foram observadas deleções no gene *tcdC* em nenhum dos isolados. Três isolados do HHJ do ICC apresentaram o mesmo genótipo e ribotipo, NAP4/014-020 e mesmo toxinotipo XVIII. À cepa ICC45 foi atribuído um novo PCR ribotipo e novo pulsotipo e foi classificada como ST41 do MLST Clado 2 e toxinotipo IXb. ICC-45 codifica uma TcdB variante. Ao contrário da NAP1/027, que também pertence ao MLST Clado 2, a ICC-45 é sensível às fluoroquinolonas e não possui superprodução das toxinas A e B em 24 horas de cultivo. A expressão gênica relativa dos genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* e *tcdC* foi maior na cepa ICC45. ICC45 exibiu a expressão aumentada de *fliA* ( $p < 0,0001$ ) em comparação a NAP1 e ATCC. *fliC* e *fliD* foram expressos somente pela cepa ICC45. A cepa ICC45 também mostrou maior expressão de *spo0A* ( $p < 0,0002$ ) e *cwp84* ( $p < 0,0001$ ) em comparação com NAP1 e ATCC. A expressão aumentada dos genes desses fatores de virulência por ICC45 pode ter contribuído para a gravidade da doença da paciente e para a lesão tecidual e o processo inflamatório semelhante a NAP1 em modelo animal, anteriormente descrito. Os dados aqui apresentados ressaltam a importância do estudo da situação epidemiológica e do surgimento de novas cepas de *C. difficile* em unidades hospitalares brasileiras.

**Palavras-chave:** *Clostridioides difficile*. Fatores de virulência. Toxina A. Toxina B variante. MLST Clado 2.



## ABSTRACT

*Clostridioides difficile* is a strictly anaerobic, spore-forming, toxin-producing Gram positive bacillus which is recognized to be the major cause of nosocomial diarrhea associated with antibiotic therapy. The aim of this study was to characterize a new strain of *C. difficile* (ICC45) isolated from a patient in a cancer hospital in Fortaleza and compare with the strains ATCC 700057 (non-toxigenic) and NAP1/027 (R20291 and LIBA5756, hypervirulent strains). The strains isolated from patients admitted to Haroldo Juaçaba Hospital, from the Cancer Institute of Ceará (HHJ of the ICC) were processed to phenotypic identification and detection of toxin genes and the *tpi* gene fragment by PCR. The susceptibility of the strains to eight antimicrobial agents was determined by *E-test*. Molecular identification analyses of the strains were performed by PFGE, PCR ribotyping and toxinotyping. In addition, Whole Genome Sequencing, Multilocus sequence typing (MLST), relative gene expression of the virulence factors, and protein expression of toxins A and B were performed by Western Blotting in strain ICC45 in comparison with NAP1/027. In all isolates of HHJ of the ICC, the *tpi*, *tcdA* and *tcdB* genes were detected. The binary toxin binding domain (*cdtB*) was detected in strain ICC45, but no *tcdC* gene deletions were observed in any of the isolates. Three isolates were from the same genotype and ribotype, NAP4/014-020 and toxinotype XVIII. The ICC45 strain was assigned to a new PCR ribotype and new pulsotype and was classified as ST41 of MLST Clade 2 and toxinotype IXb. ICC-45 encodes a variant TcdB. Unlike NAP1/027, which also belongs to MLST Clade 2, ICC-45 is susceptible to fluoroquinolones and does not overproduction of toxins A and B at 24 hours of culture. The relative gene expression of the *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* and *tcdC* genes was higher in the ICC45 strain. ICC45 exhibited increased expression in *fliA* ( $p < 0.0001$ ) compared to NAP1 and ATCC. *fliC* and *fliD* genes were expressed only by the ICC45 strain. The ICC45 strain also showed higher expression of *spo0A* ( $p < 0.0002$ ) and *cwp84* ( $p < 0.0001$ ) compared to NAP1 and ATCC. The overexpression of relative genes of these virulence factors by ICC45 may have contributed to the severity of the patient's disease and tissue injury and inflammatory process similar to that caused by NAP1 in animal model, previously described. The data presented here highlight the importance of studying the epidemiological situation and the emergence of new strains of *C. difficile* in Brazilian hospitals.

**Keywords:** *Clostridioides difficile*. Virulence factors. Toxin A. Variant toxin B. MLST Clade 2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Coloração de Gram de cepa ATCC 700057 de <i>Clostridioides difficile</i> para a visualização dos esporos subterminais (Aumento 1000x).....	23
Quadro 1 –	Características de desempenho de vários métodos de genotipagem para <i>Clostridioides difficile</i> .....	25
Figura 2 –	Árvore de <i>Neighbor-joining</i> construída utilizando as sequências concatenadas dos sete <i>loci</i> utilizados na MLST e pela genômica comparativa de Stabler et al (2006).....	30
Figura 3 –	Cluster "clostridial wall (cwp)" .....	32
Figura 4 –	Patogênese da infecção por <i>Clostridioides difficile</i> .....	42
Figura 5 –	Fluxograma das análises realizadas a partir das amostras de fezes para o isolamento e identificação de cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	48
Figura 6 –	Fluxograma das análises realizadas com a cepa de <i>Clostridioides difficile</i> ICC45.....	53
Figura 7 –	Padrões de PFGE de cepas de <i>C. difficile</i> isoladas no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.....	58
Figura 8 –	PCR Ribotipagem das cepas de <i>C. difficile</i> isoladas no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.....	58
Figura 9 –	Árvore filogenética baseada no genoma do núcleo da cepa de <i>C. difficile</i> (ICC45) isolada no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.....	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 10 –	Comparação das sequências PaLoc dos isolados de ICC45 e ST41/RT244 de <i>C. difficile</i> (LIBA-2811, BI-14, CM0028).....	61
Figura 11 –	Comparação das sequências <i>slpA</i> dos isolados de ICC45 e ST41/RT244 de <i>C. difficile</i> (LIBA-2811, BI-14, CM0028, C9427).....	62
Figura 12 –	Alinhamento de sequências de resíduos de aminoácidos de TcdB: i) TcdB variantes das cepas de referência 1470 e 8864 e isolados clínicos das sequências tipos ST41 e ST67 ii) TcdB de ST252 de MLST Clado 2.....	63
Figura 13 –	Expressão das toxinas A e B secretadas pelas cepas de <i>C. difficile</i> ICC45, NAP4/014-020 e NAP1/027 (LIBA5756).....	64
Figura 14 –	Expressão gênica relativa do gene <i>tcdA</i> das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	65
Figura 15 –	Expressão gênica relativa do gene <i>tcdB</i> das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	65
Figura 16 –	Expressão gênica relativa do gene <i>tcdC</i> das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	66
Figura 17 –	Expressão gênica relativa dos genes da toxina binária <i>cdtA</i> e <i>cdtB</i> das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	67
Figura 18 –	Expressão gênica relativa do gene <i>fliA</i> das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	68
Figura 19 –	Expressão gênica relativa do gene <i>fliC</i> das cepas de <i>Clostridioides difficile</i> .....	68

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 20 – Expressão gênica relativa do gene *fliD* das cepas de *Clostridioides difficile*..... 69
- Figura 21 – Expressão gênica relativa do gene *cwp84* das cepas de *Clostridioides difficile*..... 69
- Figura 22 – Expressão gênica relativa do gene *spo0A* das cepas de *Clostridioides difficile*..... 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> dos fatores de virulência de <i>C. difficile</i> para qPCR.....	56
Tabela 2 – Caracterização molecular das cepas de <i>C. difficile</i> isoladas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).....	57
Tabela 3 – Descrição genômica de isolados ST41 de diferentes origens e épocas.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	do inglês “American Type Culture Collection”
AbrB	Regulador de estado de transição da esporulação
BAK	Agar Brucella suplementado com sangue e vitamina K
BHI	do inglês “Brain Heart Infusion” (Infusão de cérebro e coração)
BI	Tipo por análise de fragmentos gerados por endonucleases de restrição
CA-CDI	do inglês “Community Acquired – CDI” (CDI associada a comunidade)
CCFA	do inglês “Cycloserine, Cefoxitin, Fructose Agar” (Agar Cicloserina Cefoxitina Frutose)
CDAD	do inglês “ <i>Clostridioides difficile</i> associated diarrhea” (diarreia associada a <i>C. difficile</i> )
CDI	do inglês “ <i>Clostridioides difficile</i> infection” (infecção por <i>C. difficile</i> )
CDT	Toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtA</i>	Gene que codifica a subunidade enzimática A da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtA	Proteína correspondente à subunidade enzimática A da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtB</i>	Gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtB	Proteína correspondente à subunidade ligante B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CdtLoc	Região gênica que codifica a toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
<i>cdtR</i>	Gene que codifica o regulador positivo da expressão das subunidades A e B da toxina binária produzida por <i>C. difficile</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Colite pseudomembranosa
CWP	do inglês “Clostridial Wall Protein” (Proteínas de parede clostridial)
EDTA	do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid” (Ácido etilenodiamino tetraacético)
EIA	do inglês “Enzyme immunoassay” (Imunoensaio enzimático)
FAB	do inglês “Fastidious Anaerobe Broth” (Caldo para Anaeróbios Fastidiosos)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FliA	Fator sigma
<i>fliA</i>	Gene que codifica o fator sigma
FliC	Flagelina
<i>fliC</i>	Gene que codifica a flagelina
FliD	Proteína flagelar CAP
<i>fliD</i>	Gene que codifica a proteína flagelar CAP
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa
GDH	Glutamato desidrogenase
GTPases	Guanosinas trifosfatases
<i>gyrA</i>	Gene que codifica a subunidade A da enzima DNA girase
<i>gyrB</i>	Gene que codifica a subunidade B da enzima DNA girase
HMP	do inglês “Human <i>Microbiome</i> Project” (Projeto Microbioma Humano)
HMW-SLP	do inglês “high-molecular weight S-layer protein”
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IL	Interleucina
LMW-SLP	do inglês “low-molecular weight S-layer protein”
MetaHIP	do inglês “Metagenomics of the Human Intestinal Tract” (Metagenômica do Trato Intestinal Humano)
MLST	do inglês “Multilocus Sequence Typing” (Tipagem de Sequência Multilocus)
NAP	do inglês “North American Pulsotype” (Pulsotipo Norte Americano)
NML	National Microbiology Laboratory
ONA	Organização Nacional de Acreditação
ORF	do inglês “Open Reading Frames” (Fase de leitura aberta)
PaLoc	do inglês “Pathogenicity locus” (Locus de Patogenicidade)
pb	Pares de bases
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
PFGE	do inglês “Pulsed-field Gel Electrophoresis” (Eletroforese de Campo Pulsado)
PSII	Polissacarídeo II

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

REA	do inglês “Restriction Endonuclease Analysis” (Análise de Endonuclease de Restrição)
RFLP	do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism” (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)
SDS-PAGE	do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
SlpA	do inglês “Surface layer protein A” (Proteína de superfície A)
<i>slpA</i>	Gene que codifica a proteína de superfície A
<i>SmaI</i>	Enzima de restrição do tipo II
SNP	do inglês “Single Nucleotide Polymorphism” (Polimorfismo de nucleotídeo único)
Spo0A	Regulador da esporulação
<i>spo0A</i>	Gene principal da regulação da esporulação de <i>C. difficile</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
<i>tcdA</i>	Gene que codifica a enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
TcdA	Proteína correspondente à enterotoxina A produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdB</i>	Gene que codifica a enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
TcdB	Proteína correspondente à enterotoxina B produzida por <i>C. difficile</i>
<i>tcdC</i>	Gene que codifica o regulador negativo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por <i>C. difficile</i>
<i>tcdE</i>	Gene que codifica uma proteína responsável pela liberação extracelular das enterotoxinas A e B produzidas por <i>C. difficile</i>
<i>tcdR</i>	Gene que codifica o regulador positivo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por <i>C. difficile</i>
TE	Tris-HCl e EDTA
TLR	do inglês “Toll Like Receptors” (Receptores Toll Like)
TNF- $\alpha$	do inglês “Tumor necrosis factor alpha” (Fator de necrose tumoral alfa)
TYT	do inglês “Tryptone, Yeast extract, Thioglycolate” (Triptona, Extrato de Levedura e Tioglicolato de sódio)
WGS	do inglês “Whole-genome sequencing” (Sequenciamento do genoma completo)



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1	<i>Clostridioides difficile</i> ( <i>Clostridium difficile</i> de Hall and O’Toole 1935 - Prévot 1938) .....	20
2.1.1	<i>Classificação taxonômica de C. difficile</i> .....	20
2.1.2	<i>Classificação morfológica e fisiológica de C. difficile</i> .....	22
2.1.3	<i>Classificação molecular e genômica comparativa de C. difficile</i> .....	24
2.2	Fatores de virulência de <i>Clostridioides difficile</i> .....	31
2.2.1	<i>Adesinas</i> .....	31
2.2.2	<i>Flagelos</i> .....	34
2.2.3	<i>Endoesporos</i> .....	35
2.2.4	<i>Biofilmes</i> .....	37
2.2.5	<i>Toxinas</i> .....	38
2.3	Patogenicidade de <i>Clostridioides difficile</i> .....	41
2.5	Epidemiologia de <i>Clostridioides difficile</i> .....	42
3	OBJETIVOS.....	46
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos específicos.....	46
4	MATERIAIS E METODOS.....	47
4.1	Cepas.....	47
4.2	Caracterização da nova cepa de <i>C. difficile</i> (ICC45).....	47
4.2.1	<i>Crterios de inclusão e coleta dos espécimes clínicos</i> .....	48
4.2.2	<i>Detecção de toxinas de C. difficile em amostras fecais</i> .....	49
4.2.3	<i>Isolamento de C. difficile a partir de amostras fecais</i> .....	49
4.2.4	<i>Identificação presuntiva dos isolados de C. difficile</i> .....	49
4.2.5	<i>Identificação definitiva dos isolados de C. difficile</i> .....	50
4.2.6	<i>Extração do DNA genômico bacteriano de C. difficile</i> .....	50

4.2.7	<i>Detecção de genes das toxinas (tcdA, tcdB, cdtB e tcdC)</i> .....	50
4.2.8	<i>Tipificação mediante eletroforese de campo pulsado (PFGE - Pulsed-field Gel Electrophoresis)</i> .....	51
4.2.9	<i>PCR Ribotipagem</i> .....	52
4.2.10	<i>Toxinotipagem</i> .....	52
4.2.11	<i>Teste de sensibilidade a antimicrobianos</i> .....	52
4.3	<i>Análises do genoma completo (WGS) e MLST das cepas de C. difficile em estudo</i> .....	53
4.4	<i>Expressão proteica de toxinas (toxinas A e B) de C. difficile por Western Blotting</i> .....	54
4.5	<i>Expressão gênica de fatores de virulência na forma planctônica de C. difficile.</i>	55
4.6	<i>Análise estatística</i> .....	56
5	<b>RESULTADOS</b> .....	57
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	71
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	77
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	78
	<b>APÊNDICES</b> .....	93
	<b>ANEXOS</b> .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

*Clostridioides difficile* é um bacilo Gram positivo anaeróbio estrito, formador de esporos e produtor de toxinas (JANOIR, 2016) sendo reconhecido como a principal causa de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos em adultos (EVANS; SAFDAR, 2015). Foi isolado pela primeira vez em 1935 e a partir da década de 1970 foi identificado como o agente etiológico da colite pseudomembranosa. Entretanto, estudos têm relatado que infecções por *C. difficile* podem variar desde diarreia leve e aquosa a colite pseudomembranosa com risco de vida, colite fulminante e morte (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Além disso, 2% a 10% da população são portadores assintomáticos deste bacilo (DONSKEY, 2017).

Infecções por *C. difficile* (CDI – *Clostridium difficile* infection) estão associadas a 14.000 óbitos nos Estados Unidos a cada ano e mais de USD 1 bilhão em custos médicos excedentes de acordo com os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (EVANS; SAFDAR, 2015). No Brasil, a incidência de casos por CDI varia de 6,8% a 48% em pacientes hospitalizados, sendo estes percentuais bem elevados comparados aos da Europa (BAUER et al, 2011; BALASSIANO et al, 2012; SECCO et al, 2014; PIRES et al, 2014; VINDIGNI; SURAWICZ, 2015; COSTA et al, 2017).

Diversos fatores de virulência do *C. difficile* contribuem para a colonização e o desenvolvimento de infecção, como flagelos, adesinas, enzimas proteolíticas, esporos, mas o principal e mais estudado fator de virulência são as toxinas produzidas por algumas cepas (BALASSIANO et al, 2012; JANOIR, 2016).

A maioria das cepas toxigênicas do *C. difficile* produz as toxinas A e B. Além da produção de toxinas A e B, algumas cepas de *C. difficile* podem produzir uma terceira toxina chamada toxina binária CDT (ADP-ribosiltransferase específico para actina) (JANOIR, 2016).

Embora as toxinas sejam consideradas os principais fatores de virulência, o papel de outros fatores na colonização bacteriana tem sido destacada nos últimos anos. Além de mediar a fixação das bactérias aos tecidos do hospedeiro, as adesinas podem ter funções adicionais no desenvolvimento da infecção. Proteínas da parede celular (CWPs), tais como Cwp66 e Cwp84 têm sido apresentadas como sendo importantes na adesão (DAPA et al, 2013). Os flagelos também contribuem na colonização de bactérias patogênicas por meio de

quimiotaxia, bem como adesão e invasão de superfícies hospedeiras (PÉCHINÉ; JANOIR; COLLIGNON, 2005; JANOIR, 2016).

Evidências mostram que o surgimento de uma nova cepa epidêmica, caracterizada como pulsotipo NAP1 (North American Pulsotype) ou BI (restriction enzyme a analysis type) ou PCR ribotipo 027 (NAP1/BI/027), está ligado ao aumento da incidência e da gravidade de infecções por *C. difficile* (McDONALD et al, 2005; WARNY et al, 2005). Essa cepa hipervirulenta é caracterizada por sua maior capacidade de virulência, ocasionada por uma superexpressão das toxinas A e B além da produção da toxina binária, produção de maior quantidade de endosporos em menor tempo quando comparada a cepas de outros ribotipos, e apresentar elevados níveis de resistência às novas fluoroquinolonas, gatifloxacina e moxifloxacina (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Os mais difíceis desafios para o tratamento de uma CDI são a recorrência múltipla e a presença de casos complicados de doença grave (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Infecções bacterianas recorrentes têm sido associadas com a capacidade de formar biofilmes por vários patógenos (DAPA et al, 2013). A capacidade de formar biofilmes por espécies de clostrídios tem sido demonstrada recentemente. No entanto, a formação de biofilmes por *C. difficile* e os mecanismos envolvidos neste processo, ainda estão sendo caracterizados (DAPA et al, 2013; VALIENTE et al, 2016).

O aparecimento de novas cepas hipervirulentas de *C. difficile* com características peculiares, como capacidade aumentada de produção de toxinas e de esporulação, faz com que a incidência e a resistência das CDI em ambientes hospitalares sejam crescentes. Pacientes oncológicos são um dos grupos de risco a este tipo de infecção exigindo bastante atenção, visto que o uso de agentes quimioterápicos pode alterar a mucosa intestinal e provavelmente este é o fator mais importante que predispõe a infecção por *C. difficile* nesses pacientes (KHAN et al, 2012; GUPTA et al, 2017).

Uma elevada incidência de CDI (48%) em pacientes oncológicos foi observada em um estudo no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, em Fortaleza (COSTA et al, 2017). Uma nova cepa de *C. difficile* também foi isolada neste hospital (COSTA et al, 2016). Este resultado mostra a necessidade do reconhecimento precoce e diagnóstico clínico e laboratorial de CDI nesses pacientes em Fortaleza assim como no Brasil. Com o objetivo de conhecer e caracterizar essa nova cepa isolada em um hospital oncológico de Fortaleza foi evidenciado a importância de realizar um estudo comparativo com a cepa hipervirulenta (NAP1/027) e outras cepas a fim de proporcionar uma melhor compreensão do estabelecimento de uma infecção por cepas hipervirulentas de *C. difficile*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Comunidades microbianas colonizam todas as superfícies do corpo humano, mas no intestino espécies bacterianas são colonizadoras em maiores densidades conhecidas como microbiota ou microflora comensal (BIEN; PALAGANI; BOZKO, 2013). Estima-se que o intestino humano adulto contenha cerca de  $10^{14}$  células bacterianas e mais de 1000 espécies bacterianas diferentes. No entanto, essas proporções podem variar muito entre os indivíduos, e as principais mudanças na microbiota intestinal são baseadas na idade, dieta e estado de saúde do organismo hospedeiro (BIEN; PALAGANI; BOZKO, 2013).

A microbiota intestinal protege contra enteropatógenos, extrai nutriente e energia de nossas dietas e contribui para a função imune normal. As rupturas do equilíbrio normal entre a microbiota intestinal e o hospedeiro são associadas à obesidade, desnutrição, doença intestinal inflamatória, distúrbios neurológicos e câncer (SEKIROV et al, 2010; LOZUPONE et al, 2012). Compreender como a microbiota intestinal afeta a saúde e a doença exige uma mudança de foco de patógenos individuais para uma abordagem ecológica que considere a comunidade como um todo (LOZUPONE et al, 2012).

A relação simbiótica entre micróbios intestinais e seu hospedeiro é entendida quando caracterizado a microbiota saudável e as diferenças associadas à doença. Projetos de grande escala, como a Metagenômica Europeia do Trato Intestinal Humano (MetaHIT) e o Projeto de Microbioma Humano dos EUA (HMP), fizeram progressos substanciais em direção a esse objetivo (LOZUPONE et al, 2012). Uma vez que a composição saudável e os estados funcionais da microbiota intestinal são entendidos, as características que, quando interrompidas, estão associadas à doença podem ser determinadas. No entanto, a complexidade da microbiota e a variação entre e dentro dos indivíduos complica a definição do que esse estado ideal pode estar dentro de uma população ou de um indivíduo (LOZUPONE et al, 2012).

A microbiota intestinal de adultos contém espécies bacterianas pertencentes em sua maioria aos filos Bacteroidetes e Firmicutes. A composição da microbiota do indivíduo pode flutuar em algumas circunstâncias, por exemplo, diarreia aguda, tratamento com antibióticos ou, em menor grau, alterações dietéticas (BIEN, PALAGANI, BOZKO, 2013). Qualquer um desses fatores pode influenciar a composição da microbiota comensal, que pode alterar o ambiente intestinal tornando o nicho suscetível a proliferação de micro-organismos patogênicos, como o *Clostridioides difficile*, encontrado em 3% de adultos saudáveis e neonatos e

em 15% a 25% dos indivíduos com exposição recente em ambiente hospitalar (SEKIROV *et al*, 2010; BIEN, PALAGANI, BOZKO, 2013).

## **2.1 *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile* de Hall and O'Toole 1935 - Prévot 1938)**

### **2.1.1 *Classificação taxonômica de C. difficile***

*Clostridium difficile* foi descrito pela primeira vez por Hall e O'Tolle em 1935 a partir de um isolamento em fezes de recém nascidos. Devido à dificuldade encontrada no isolamento e na manutenção desse micro-organismo em cultura pura, os autores o chamaram inicialmente de *Bacillus difficilis* e em seguida de *Clostridium difficile* devido as suas características morfológicas e fisiológicas.

Apenas em 1978 foi identificado como o agente etiológico da colite pseudomembranosa (CPM). Desde então passou a ser associado a quadros de infecções humanas (BARLETT *et al*, 1978; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Recentemente as manifestações clínicas de *C. difficile* foram referidas como doença ou diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) e infecção por *C. difficile* (CDI). No entanto, o termo CDI é cada vez mais preferido na literatura científica internacional, principalmente porque CDAD é usado regularmente para diarreia associada ao *C. difficile*, tornando-se um termo que não cobre todo o espectro clínico da doença (SUETENS, 2008; COHEN *et al*, 2010).

Pertencente ao filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales, família *Clostridiaceae*, o gênero *Clostridium* foi proposto em 1880 por Prazmowski composto de espécies tipo *Clostridium butyricum* e tornou-se um depósito para um grande número de bacilos Gram positivos anaeróbios formadores de esporos (KONEMAN *et al*, 2008; LAWSON *et al*, 2016). Mais tarde, o sequenciamento completo (ou quase completo) do gene RNAr 16S reforçou ainda mais a verdadeira extensão da diversidade filogenética do gênero e as verdadeiras inter-relações com outros grupos (LAWSON *et al*, 2016).

O estudo de Collins e colaboradores propôs uma revisão inicial deste importante grupo de organismos e apresentou uma estrutura hierárquica da sequência de genes RNAr 16S para a classificação de clostrídios (COLLINS *et al*, 1994; LAWSON *et al*, 2016).

Os resultados dos programas de arborização filogenética confirmaram e ampliaram os resultados dos estudos comparativos prévios de RNAr e demonstraram a forte incoerência filogenética do gênero *Clostridium* (COLLINS *et al*, 1994). A partir dessas

análises, ficou evidente que muitos clostrídios formavam clusters muito profundos, porém distintos. Quase metade das espécies de clostrídios, incluindo *Clostridium butyricum*, espécie padrão do gênero, pertenciam a um agrupamento filogenético bem definido, designado cluster I. As espécies clostridiais restantes exibiam graus muito consideráveis de diversidade filogenética e formavam numerosos clusters e linhas decrescentes individuais (COLLINS et al, 1994).

Com base na análise da sequência de genes do RNAr 16S, o parente mais próximo de *Clostridium difficile* é *Clostridium mangenotii* com 94,7% de valor de similaridade para inclusão no mesmo gênero, juntamente com uma série de características consistentes e diferenciadoras e ambos estão localizados no cluster XI, que é filogeneticamente longe de *C. butyricum* e outros membros de *Clostridium sensu stricto* (LAWSON et al, 2016).

No Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, baseado principalmente na análise de sequência de RNAr 16S, Ezaki (2009) propôs que alguns organismos localizados no cluster XI fossem incluídos em uma nova família *Peptostreptococcaceae*. Inicialmente, essa família continha os gêneros *Filifactor*, *Peptostreptococcus* e *Tepidibacter* e posteriormente foi expandida para incluir uma série de gêneros que incluíram *Asaccharospora*, *Intestinibacter*, *Paeniclostridium*, *Paraclostridium*, *Romboutsia* e *Terrisporobacter*, representando ex espécies de *Clostridium*.

Mais recentemente, Yutin e Galperin (2013) fizeram uma proposta para o nome do gênero *Peptoclostridium* incluir todos os organismos no cluster XI, mas a topologia da árvore e a profundidade filogenética demonstram que um único gênero não poderia abranger todos os micro-organismos presentes nesse cluster. Além disso, os nomes propostos não obedeceram ao Código Bacteriológico e, portanto, o nome não foi validamente publicado no IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) (LAWSON et al, 2016). E também, o nome de "*C. difficile*" ou o termo "*C. diff*" são internacionalmente onipresentes nas configurações comerciais e clínicas. Para uma mudança completamente diferente do nome do gênero, o custo da atualização de materiais e o desperdício de materiais existentes seriam de sérias consequências econômicas mundiais pagas pelo consumidor (LAWSON et al, 2016).

Embora a necessidade de reclassificar *C. difficile* não seja bem vinda nos setores comercial e de saúde, Lawson e colaboradores (2016) propuseram que a solução mais aceitável é usar um nome que reflète a similaridade fisiológica com *Clostridium* e permite a retenção da abreviatura "*C. difficile*" e termos como "*C. diff*", CDAD e CDI para serem utilizados na comunidade clínica (LAWSON et al, 2016).

Então com base em análises fenotípicas e filogenéticas, o novo gênero *Clostridioides* gen. nov. foi proposto por Lawson e colaboradores (2016) para *Clostridium difficile* como *Clostridioides difficile* gen. nov. e *Clostridium mangenotii* seja transferido para este gênero como *Clostridioides mangenotii* gen. nov.. A espécie tipo de *Clostridioides* é *Clostridioides difficile* (nome base: *Clostridium difficile* (Hall and O'Toole 1935 - Prévot 1938) (LAWSON et al, 2016). Com base no sequenciamento do gene 16S RNAr, as espécies do gênero *Clostridioides* estão localizadas na família *Peptostreptococcaceae*, cluster XI dos clostrídios como definido por Collins e colaboradores (1994).

Em 2016, o novo gênero *Clostridioides* gen. nov. foi publicado na Lista de novos nomes e novas combinações de forma efetiva no IJSEM por Oren e Garrity (2016). O objetivo desta publicação foi validar novos nomes efetivamente publicados e novas combinações de acordo com o procedimento descrito no Código Bacteriológico (Revisão de 1990), tornando-se válida a utilização do termo *Clostridioides difficile* (nome base: *Clostridium difficile* (Hall and O'Toole 1935 - Prévot 1938) proposto por Lawson e colaboradores (2016).

### **2.1.2 Classificação morfológica e fisiológica de *C. difficile***

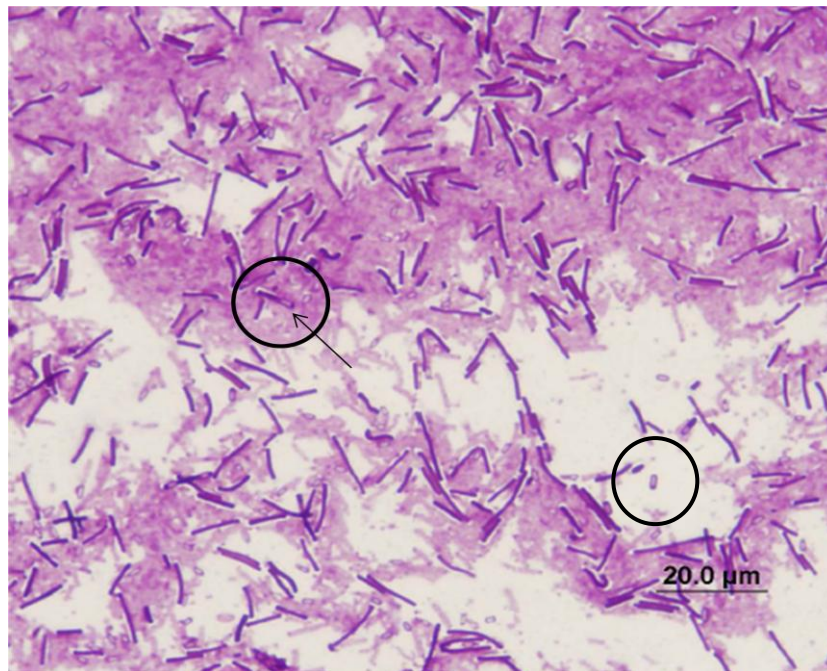
*Clostridioides difficile* é encontrado em diversos ambientes e já foi isolado do solo, água, do conteúdo intestinal de diversos animais (cavalos, vacas, porcos), da vagina e uretra de seres humanos e das fezes de neonatos sadios (KONEMAN *et al*, 2008; LAWSON et al, 2016).

*C. difficile* é um bacilo relativamente grande (3-5 µm de comprimento), anaeróbio obrigatório, formador de esporos e em sua maioria produtor de toxinas (KONEMAN *et al*, 2008; LAWSON et al, 2016). Geralmente móveis nos cultivos em caldo, com a presença de flagelos peritricos (LAWSON et al, 2016).

Na coloração de Gram, as bactérias apresentam-se como bastonetes Gram positivos, sendo que algumas cepas produzem cadeias consistindo de duas a seis células alinhadas de ponta a ponta. Os bacilos possuem esporos ovais subterminais (raramente terminal) que incham a célula (Figura 1) (JOUSIMIES-SOMER et al, 2002; LAWSON et al, 2016). A esporulação pela maioria das cepas ocorre no Agar Brucella suplementado com sangue de carneiro ou cavalo após uma incubação de 48 horas. A germinação de esporos pode ser aumentada em meios sólidos contendo 0,1% de taurocolato de sódio (LAWSON et al, 2016).



Figura 1 - Coloração de Gram da cepa ATCC 700057 de *Clostridioides difficile* para a visualização dos esporos subterminais (Aumento 1000x).



Fonte: Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Medicina, UFC, 2017.

As cepas de *C. difficile* geralmente são cultivadas e mantidas em Agar sangue. Nesse meio as colônias de superfície apresentam-se de forma circular de 2-5 mm, ocasionalmente rizoides, planas ou baixas convexas, opacas, acinzentadas ou esbranquiçadas, e têm uma superfície mate para brilhante (LAWSON et al, 2016).

A identificação e isolamento de cepas de *C. difficile* podem ser obtidos por meio de crescimento em Agar seletivo CCFA (Agar Cicloserina, Cefoxitina, Frutose), onde os antibióticos cicloserina (500 µg/mL) e cefoxitina (16 µg/mL) inibem o crescimento da maioria das bactérias, mas não do *C. difficile*. A frutose é metabolizada pelo *C. difficile* mais ativamente que a glicose e o vermelho neutro é usado como um indicador para detectar a proteólise do meio. As colônias de *C. difficile* quebram as proteínas no meio, o que resulta na produção de produtos finais alcalinos que se transformam da cor vermelho alaranjado para a cor amarelada (JOUSIMIES-SOMER et al, 2002).

A cultura de *C. difficile* apresenta fluorescência verde-amarelas quando expostas a luz ultravioleta (JOUSIMIES-SOMER et al, 2002).

A temperatura ideal para o crescimento é de 30 a 37 °C, mas pode crescer também em 25°C e 45°C. As cepas podem utilizar a frutose, mas não a arabinose, galactose,

glicogênio, inositol, lactose, maltose, rafinose, ramnose, ribose, amido e sacarose (LAWSON et al, 2016).

### ***2.1.3 Classificação molecular e genômica comparativa de C. difficile***

Desde a sua confirmação como patógeno em 1977, *C. difficile* foi um dos agentes patogênicos mais intensamente estudados, com uma miríade de sistemas de tipagem aplicados para a compreensão de sua epidemiologia (DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009).

O forte aumento mundial da incidência relatada de CDI na última década tem sido a sugestão para o desenvolvimento de novas abordagens de tipagem molecular (Quadro 1). Estes incluem eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - pulsotipos), análise de endonuclease de restrição (REA), toxinotipagem (com base em dados de sequência de toxinas A e B), tipagem de sequência multilocus (MLST) e PCR ribotipagem. O método mais amplamente aceito é PCR ribotipagem, onde mais de 100 grupos facilmente distinguíveis foram identificados com base em mutações na região espaçadora intergênica do RNAr 16S-23S (STUBBS et al, 1999). Geralmente, esses métodos de tipagem são congruentes e são exemplificados pelo fato de que as cepas de PCR-ribotipo 027 são invariavelmente NAP1 (pulsotipo 1 norte-americano), BI (por análise de endonuclease de restrição), toxinotipo III e todos têm o mesmo tipo de sequência MLST. Essas técnicas são geralmente intensivas em mão-de-obra e recursos, não são facilmente adaptadas a muito alto rendimento, e muitas vezes restritas a laboratórios de referência. Além disso, a comparação interlaboratorial de dados pode ser difícil quando eles são baseados em padrões de bandas de gel (DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009; GRIFFITHS et al, 2010).

Quadro 1: Características de desempenho de vários métodos de genotipagem para *Clostridioides difficile*.

<b>Método</b>	<b>Alvo de DNA</b>	<b>Poder discriminatório</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
PFGE	Genoma completo	Moderado	Poder discriminatório elevado, distingue subtipos.	O método é laborioso; os resultados não podem ser facilmente comparados entre laboratórios.
PCR Ribotipagem	16S–23S da Região Espaçadora Intergênica (ISR)	Bom	Reconhece tipos primários, facilmente reprodutível e portátil entre laboratórios.	Potencial discriminatório limitado, não distingue subtipos.
REA	Genoma completo	Bom	Alto poder discriminatório e estabilidade.	O método é tecnicamente exigente; os dados são difíceis de trocar entre laboratórios.
MLST	<i>Loci</i> Housekeeping (usualmente 7)	Bom	Estabilidade e transferência de dados.	Custos altos.
Toxinotipagem	Regiões do PaLoc	Moderado	Altamente reprodutível enquanto dá uma visão clara do estado da toxina, excluindo a toxina binária.	Menor poder de resolução do que outros métodos de tipagem.
Genoma completo (WGS)	Genoma completo	Excelente	Dados digitais precisos e reprodutíveis com poder discriminatório muito alto.	Custo elevado. Necessário conhecimento informático.

Adaptado de Dawson; Valiente; Wren, 2009; Huber et al, 2013; Knetsch et al, 2013.

**Eletroforeses de gel de Campo Pulsado (PFGE):** PFGE foi um dos primeiros métodos de tipagem molecular a serem aplicados ao *C. difficile*, particularmente na América do Norte. Ainda é considerado o padrão ouro no Canadá e nos Estados Unidos e continua a ser usado em outros lugares para a investigação de isolados epidemiologicamente relacionados e em estudos populacionais. A técnica resolve grandes fragmentos de DNA gerados a partir de macrorresistência de todo o genoma com uma enzima de restrição de corte pouco frequente, para *C. difficile*, geralmente é *SmaI*. O uso precoce deste método era problemático devido à dificuldade em espalhar os esporos e à degradação do DNA entre algumas cepas, mas, com o uso de culturas mais novas e a adição de tiourea ao tampão de eletroforese, a capacidade de identificação de 100% pode ser alcançada. Os problemas permanecem na velocidade do método, com a conclusão das análises que levam vários dias, na exigência de equipamentos especializados para a técnica PFGE (no entanto, o equipamento também pode ser usado para tipar outros micro-organismos) e na interpretação e troca de dados entre laboratórios (HUBER et al, 2013).

**PCR Ribotipagem:** A ribotipagem por PCR, que se baseia na amplificação da região espaçadora intergênica (ISR) 16S-23S, é o método de tipagem preferido na Europa, bem como na Austrália. A ribotipagem também foi recentemente empregada nos Estados Unidos (HUBER et al, 2013).

Em comparação com outras espécies bacterianas, *C. difficile* também possui uma diversidade intraspecífica considerável nas ISRs, tornando-o adequado para o ribotipagem por PCR. O conceito de utilização da heterogeneidade das regiões espaçadoras de RNAr intergênico 16S-23S em *C. difficile* foi descrito pela primeira vez em 1993 por Gürtler (HUBER et al, 2013).

**Análise de Endonuclease de Restrição (REA):** REA de *C. difficile* faz uso do genoma completo do DNA, que é digerido pela enzima de restrição de corte frequente *HindIII*. Os fragmentos de restrição são resolvidos por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica foi usada pela primeira vez para rastrear a disseminação de *C. difficile* em um ambiente hospitalar em 1986. A REA possui alto poder discriminatório e estabilidade, mas o método e a interpretação são tecnicamente exigentes e os dados são difíceis de trocar entre laboratórios (HUBER et al, 2013).

**Tipagem de Sequência Multilocus (MLST):** A tipagem de sequência de Multilocus (MLST) é um método de genotipagem microbiana que facilita a discriminação isolada usando sequências de nucleotídeos de fragmentos de genes de manutenção (*housekeeping*). Cada combinação exclusiva de alelos recebe um número de tipo de sequência (ST) (GRIFFITHS et

al, 2010). Os dados de sequencia inequívoca gerados podem ser facilmente comparados entre laboratórios. Em 2010, um esquema de digitação MLST com poder discriminatório semelhante ao da ribotipagem por PCR à base de gel de agarose foi desenvolvido para *C. difficile* e é mais útil para estudos populacionais (GRIFFITHS et al, 2010). No entanto, MLST é relativamente dispendioso em comparação com a PCR ribotipagem (HUBER et al, 2013).

**Toxinotipagem:** É um método baseado em polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR (RFLP) para diferenciação de cepas de *C. difficile* de acordo com as alterações no locus de patogenicidade (PaLoc), uma região que codifica as toxinas A e B. Os toxinotipos são um grupo heterogêneo de cepas que são importantes no desenvolvimento de testes de diagnóstico molecular e vacinas e são uma boa base para estudos filogenéticos de *C. difficile* (RUPNIK; JANEZIK, 2016).

Para atribuir o toxinotipo em cada cepa, os fragmentos de PCR B1 e A3 são amplificados. Os tipos de RFLP B1 são determinados de acordo com o perfil de restrição *HincII/AccI* e os tipos de RFLP A3 são determinados de acordo com as exclusões/inserções e o perfil de restrição *EcoRI*. A combinação de B1 e A3 então determina o toxinotipo, com cada toxinotipo com uma combinação única de B1 e A3. Toxinotipos com a mesma combinação B1 e A3, mas com diferenças em outros lugares, serão diferenciados em subtipos (RUPNIK; JANEZIK, 2016).

Um toxinotipo de *C. difficile* foi definido inicialmente como um grupo de cepas que apresentaram alterações idênticas na região de PaLoc e podem ser diferenciadas de cepas não-variáveis (toxinotipo 0, denominadas de acordo com o tipo mais prevalente no momento e de deformação VPI 10463, nas quais os genes da toxina foram primeiro sequenciados). Até o momento foram descritos toxinotipos de I a XXXIV (RUPNIK; JANEZIK, 2016).

A toxinotipagem tem uma reprodutibilidade muito alta. Embora o poder discriminatório não seja tão bom quanto o PFGE e a Ribotipagem, a toxinotipagem dá uma boa imagem do estado toxigênico das cepas de *C. difficile*, com exceção da toxina binária (HUBER et al, 2013).

**Sequenciamento do Genoma Completo (Whole Genome Sequencing -WGS):** A primeira sequência de genoma completo de *C. difficile*, publicada em 2006, foi gerada pela sequenciamento de Sanger (SEBAIHIA et al., 2006). Em 2010, a dinâmica evolutiva de *C. difficile* foi mostrada usando o sequenciamento de Sanger em combinação com as tecnologias de sequenciamento da próxima geração Roche 454 e Illumina (HUBER et al, 2013).

O WGS de patógenos bacterianos atingiu uma escala de alto rendimento e confiabilidade para definir com precisão a história natural e as estruturas populacionais

globais das linhagens virulentas e epidêmicas. As análises comparativas de genoma e filogenética de centenas de genomas podem identificar mudanças genéticas precisas, muitas vezes ligadas a fenômenos de virulência e resistência a antibióticos, que podem informar rapidamente a biologia do patógeno. O sequenciamento do genoma inteiro também pode distinguir cepas no nível de nucleotídeo único, comparando genomas em termos de polimorfismos de nucleotídeos únicos e, portanto, melhorando drasticamente o poder discriminatório em relação aos métodos convencionais de tipagem genética. Assim, o WGS também possui valor prático (isto é, além da filogenia) para a microbiologia clínica e para a epidemiologia da saúde pública, definindo surgimento de patógenos e também rastreando eventos de transmissão (KNETSCH et al, 2013).

Embora esses métodos de tipagem sejam geralmente eficientes na diferenciação de isolados, uma abordagem baseada em sequências do genoma é mais discriminatória e pode revelar relações filogenéticas dentro de grupos específicos. O genoma de *C. difficile* é altamente dinâmico e submete-se prontamente à troca genética de elementos móveis. No entanto, o impacto da recombinação homóloga entre cepas não está claro (HE et al, 2010).

Uma cepa representativa de *C. difficile* foi completamente sequenciada e publicada em 2006 (SEBAIHIA et al., 2006). A cepa originalmente escolhida em 1998 foi designada como 630, uma cepa PCR ribotipo 012 com resistência a vários antimicrobianos e foi isolada de um paciente com colite pseudomembranosa grave em um hospital em Zurique, Suíça (DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009).

A sequência do genoma da cepa 630 de *C. difficile* mostra uma bactéria com uma série de adaptações a um estilo de vida gastrointestinal. Incluindo uma capacidade metabólica adaptável e um conteúdo de genoma versátil, com uma ampla gama de elementos móveis, incluindo transposons conjugativos e fagos. A cepa 630 também codifica múltiplas resistências a antibióticos, cuja aquisição pode ter sido amplamente mediada por transposons conjugados. O genoma também fornece evidências de vários fatores de virulência potenciais que até agora escaparam a detecção devido à persistência deste organismo à manipulação genética (SEBAIHIA et al., 2006).

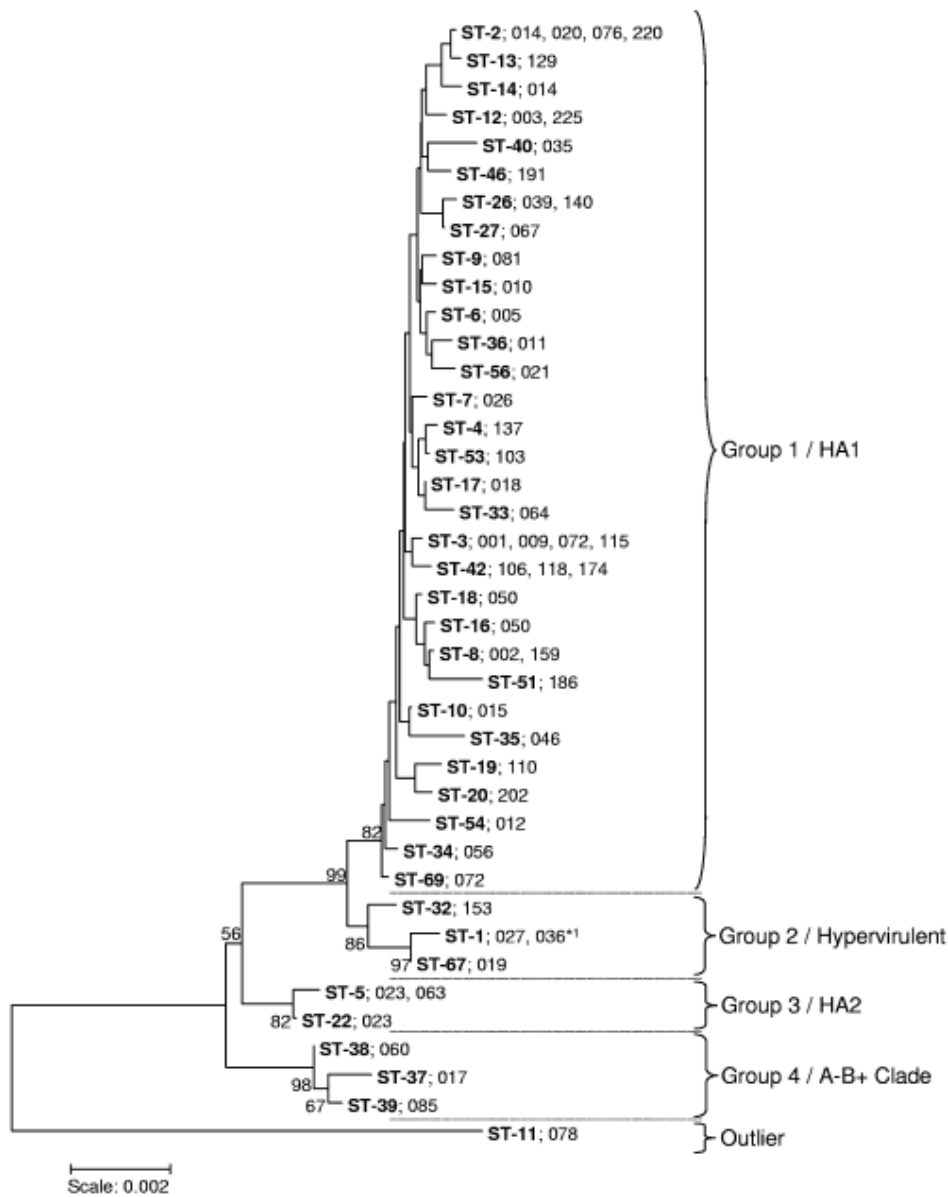
A liberação da sequência do genoma permitiu a construção de um microarranjo, que abrangeu todos os genes conhecidos na linhagem de *C. difficile* 630. Esta ferramenta foi então usada para responder a questões específicas relacionadas às diferenças genéticas e filogenia de *C. difficile*, usando uma ampla gama de cepas de locais geográficos generalizados (STABLER et al, 2006; DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009).

Um estudo comparativo filogenômico de *C. difficile* revelou quatro clados distintos das 75 cepas de *C. difficile* analisadas, usando um microarranjo de todo o genoma baseado no genoma sequenciado de *C. difficile* 630. Estes incluíram um clado específico de hipervirulentas ribotipo 027, um clado A-B+ e outros clados adicionais que continham uma mistura de isolados animais e humanos (HA1 e HA2) (STABLER et al, 2006).

A tecnologia de Microarranjo aliada à análise matemática complexa para determinar a filogenia, forneceu um método sensível e robusto para examinar a relação genética das populações bacterianas. A análise comparativa de microarranjos de DNA genômico tem sido utilizada para investigar várias espécies bacterianas em relação à patogênese e à especificidade do hospedeiro. A comparação de cepas isoladas de diferentes hospedeiros, bem como de cepas virulentas e não virulentas, podem revelar sequências de DNA codificadas que podem ser importantes para a virulência, interações patógeno-hospedeiro e transmissão (STABLER et al, 2006).

Um robusto esquema de conversão de sequências multilocus de alto rendimento (MLST) para *C. difficile* foi desenvolvido e validado por Griffiths e colaboradores (2010), utilizando uma coleção diversificada de 50 isolados de referência representando 45 ribotipos de PCR diferentes e 102 isolados de amostras clínicas recentes. Um total de 49 ribotipos de PCR foram representados em geral. Todos os isolados foram tipados por MLST e produziram 40 tipos de sequência (STs). As sequências MLST concatenadas foram usadas para construir uma árvore de união vizinha que identificou quatro grupos filogenéticos de STs e um outro (ST-11; PCR ribotipo 078). Estes grupos aparentemente se correlacionam com os clados identificados anteriormente pela genômica comparativa de Stabler e colaboradores (2006) como pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Árvore de *Neighbor-joining* construída utilizando as sequências concatenadas dos sete *loci* utilizados na MLST e pela genômica comparativa de Stabler et al (2006).



Legenda: STs são mostrados em negrito. Os PCR ribotipos são encontrados em associação com cada ST. Os STs se agrupam em quatro grupos, designados de 1 a 4 e um outlier (ST-11). Estes correspondem a grupos definidos anteriormente por análise de microarranjos de genomas inteiros de Stabler et al (2006) que foram designados HA1 (humano e animal 1), hipervirulentos (contendo a cepa 027), HA2 (humano e animal 2), e clado A-B+ (também contendo outros tipos toxigênicos).

Fonte: GRIFFITHS et al, 2010.

As tecnologias de sequenciamento de alto rendimento provaram ser uma abordagem poderosa para estudar a variação genética e a evolução de patógenos monomórficos (DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009; HE et al, 2010).

Sem dúvida, esses sequenciamentos, estudos de microarranjos de DNA e esquemas de tipagem serão a primeira de muitas técnicas usadas para desvendar o conteúdo



do genoma e a diversidade das espécies. Por exemplo, a cepa QCD32q58 que devastou os hospitais na área de Quebec, no Canadá e a cepa R20291 que causou um surto grave de CDI no hospital Stoke Mandeville no Reino Unido, são dois exemplos de cepas 027 que estão sendo sequenciadas e analisadas. A comparação desses genomas com as chamadas cepas 027 "históricas não epidêmicas" pode ser particularmente reveladora em termos de apontar as mudanças genéticas sutis que permitiram que as contrapartes 027 modernas fossem tão problemáticas. Os dados de sequência inicial mostram várias regiões de diferença genética entre as cepas 027 e entre outros ribotipos confirmando que *C. difficile* continua a evoluir (DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009).

A análise comparativa de todas estas sequências do genoma fornecerá informações vitais sobre fatores de virulência e patogênese de cepas patogênicas emergentes de *C. difficile* e podem ajudar a desvendar os níveis aumentados de transmissão e gravidade da doença (DAWSON; VALIENTE; WREN, 2009).

## **2.2 Fatores de virulência de *Clostridioides difficile***

Diversas estruturas e proteínas celulares de *C. difficile* contribuem para a sua ação patogênica no organismo hospedeiro. Alguns fatores contribuem facilitando sua colonização, o que promove o desenvolvimento da infecção, como adesão, invasão do tecido e outros contribuem diretamente com a infecção, como regulação do crescimento bacteriano e metabolismo, e estimulação da resposta imune do hospedeiro (VEDANTAM et al, 2012).

Os principais fatores de virulência do *C. difficile* são:

### **2.2.1 Adesinas**

Para muitos agentes patogênicos, a adesão às células hospedeiras é um primeiro passo crucial para a colonização e o estabelecimento da infecção. A aderência de esporos e células vegetativas às células epiteliais intestinais, e a observação de que os esporos de uma cepa de ribotipo 027 aderem melhor às monocapas de células epiteliais humanas do que os esporos de um isolado de ribotipo 002 sugerem que a aderência pode ser um fator importante na patogênese da doença causada por *C. difficile* (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016). Embora as toxinas sejam os principais fatores de virulência de *C. difficile*, outros fatores de virulência importantes incluem aqueles que podem desempenhar um papel na aderência e na

colonização como a camada superficial (*S-layer*), as proteínas da parede celular (CWP), proteínas de ligação à fibronectina e fímbrias (AWAD et al, 2014).

**Cwps:** As proteínas Cwp são uma família de proteínas associadas à superfície que compreende 29 membros caracterizados pela presença de um domínio de ligação conservado (Pfam 04122) recentemente demonstrado para ancorar as proteínas na superfície bacteriana através do polissacarídeo II (PSII). Doze dos genes de codificação Cwp estão localizados dentro do "conjunto de genes da parede clostridial (cwp)" que contém 18 fases de leitura abertas (ORFs) (Figura 3) (JANOIR, 2016).

Figura 3 - Cluster "clostridial wall (cwp)"



Legenda: 18 ORFs entre os quais 12 codificam proteínas com um peptídeo sinal, um domínio de ligação conservado para a superfície bacteriana (localizado na parte N- ou C-terminal da proteína) e um domínio variável de uma função específica.

Fonte: JANOIR, 2016.

Dezessete cwp estão distribuídos por todo o cromossomo. Demonstrou-se que dois desses Cwps (SlpA e CwpV), cujos genes de codificação estão localizados dentro e fora do cluster cwp, respectivamente, são secretados pelo sistema SecA2. Pode-se, portanto, hipotetizar que essa via é usada para a secreção de outros Cwps (JANOIR, 2016).

Os genes cwp localizados dentro do cluster Cwp podem ser altamente variáveis ou muito conservados entre cepas de *C. difficile*, como cwp84. Os genes *slpA*, *cwp66* e *secA2* são particularmente variáveis e constituem uma cassete de 10 kb que é capaz de trocas genéticas por recombinação homóloga. Isso resulta em principais mudanças antigênicas, enquanto o resto do genoma permanece inalterado. Consequentemente, vários dos genes da CWP localizados fora do cluster Cwp apresentam uma alta diversidade genética, ligada aos grupos definidos por PCR ribotipagem. Considera-se que as variações genéticas nas proteínas associadas à superfície evoluem sob a pressão da imunidade e contribuem para fugir da resposta imune do hospedeiro (JANOIR, 2016).

Cwp84 é localizado principalmente na camada S como forma de 77 kDa, após clivagem do seu propeptídeo por outra protease de cisteína associada à superfície (Cwp13), cujo gene codificador também pertence ao cluster Cwp. A forma de 77-kDa é indubitavelmente responsável pela clivagem do precursor SlpA da camada S. Esta forma também é encontrada na fração extracelular, juntamente com uma forma abreviada da protease de 47 kDa. Esta forma de 47 kDa é capaz de se reassociar de maneira não covalente à superfície de *C. difficile*. Pode ser responsável pela clivagem ou a degradação das proteínas de matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, vitronectina ou laminina. Até o momento, esta atividade proteolítica só foi observada *in vitro*, mas pode afetar a integridade dos tecidos do hospedeiro *in vivo*, facilitando a disseminação de bactérias (VEDANTAM et al, 2012; AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

**Proteínas SLPs:** As camadas superficiais celulares ou as camadas S são camadas proteicas expostas à superfície que são produzidas por muitas bactérias. As camadas S geralmente consistem em subunidades de glicoproteínas monoméricas idênticas que formam uma matriz bidimensional regular visível por microscopia eletrônica. As funções da camada S variam entre diferentes espécies de bactérias e incluem papéis como proteção de parasitas bacterianos, adesão e resistência do complemento. A camada S tipicamente forma a camada mais externa da bactéria, dando-lhe forte potencial imunogênico. As proteínas da camada S (SLPs) foram detectadas em todas as cepas de *C. difficile* (AWAD et al, 2014).

As duas subunidades SLP, nomeadamente o LMW-SLP (proteína de camada S de baixo peso molecular) e a HMW-SLP (proteína de camada S de alto peso molecular), são os componentes da camada S de *C. difficile*. Estas duas subunidades são derivadas da clivagem do precursor SlpA pela cisteína protease Cwp84 e não covalentemente se reassociam após clivagem precursora. LMW e HMW-SLPs não parecem ser glicosilados. No entanto, a inserção de um grupo de genes de glicosilação de camada S foi descrita em um grupo particular, sugerindo que a glicosilação da camada S pode ocorrer em algumas cepas de *C. difficile* (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

Estudos recentes mostraram que os SLPs são importantes no reconhecimento imune e na resposta inflamatória. Tanto as proteínas SLP nativas quanto a SlpA recombinante se ligam a células Hep-2 e a tecidos gastrointestinais humanos mostrados a partir de espécimes de biópsia normais. Além disso, as SLPs também são importantes contribuintes para a adesão bacteriana às células Caco-2 e a HMW-SLP exibe propriedades de ligação *in*

*in vitro* às proteínas ECM incluindo colágeno tipo I, trombospondina e vitronectina (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

As subunidades da camada S são capazes de ativar o sistema imune inato do hospedeiro, através do reconhecimento por receptores Toll Like (TLR). TLRs são uma família de receptores de reconhecimento que reconhecem componentes estruturais compartilhados por bactérias, fungos e vírus. Essa interação leva, através da ativação das vias de sinalização, à maturação das células dendríticas e à estimulação dos macrófagos, característica fundamental para a depuração bacteriana (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016). A importância das proteínas da camada superficial na depuração bacteriana também foi avaliada *in vitro* em macrófagos murinos. No entanto, a atividade imunomoduladora das proteínas da camada S não parece estar relacionada à virulência das cepas, uma vez que nenhum padrão imunomodulador específico foi encontrado para as cepas 027 quando comparado às cepas clássicas de *C. difficile* (JANOIR, 2016).

### 2.2.2 Flagelos

Flagelos são um importante determinante de virulência para muitos agentes patogênicos entéricos, desempenhando um papel na invasão e colonização do hospedeiro. Do mesmo modo, as cepas de *C. difficile* são conhecidas como móveis e possuem flagelos, embora este seja um traço variável entre os isolados clínicos clonais (AWAD et al, 2014).

Os flagelos bacterianos têm sido implicados em contribuir à patogênese bacteriana por: (i) promover a adesão a células hospedeiras; (ii) proporcionar motilidade motivada por quimiotaxia; (iii) promover a formação de biofilmes; (iv) facilitar a translocação de fatores de virulência através das membranas celulares; e (v) atuando como imunomoduladores desencadeando citocinas pró-inflamatórias através da via de sinalização do receptor Toll-like 5 (TLR5) (STEVENSON; MINTON; KUEHNE, 2015).

*C. difficile* é móvel graças à presença de um aparelho flagelar composto de um corpo basal ligado à membrana, um filamento helicoidal e um gancho (GHOSE et al, 2016). Os genes que regem a montagem dos flagelos de *C. difficile* são organizados em três operons. O locus F3 contém genes de estágio inicial e inclui o fator sigma FliA (também chamado SigD). FliA controla a expressão de genes flagelares de fase tardia a partir do locus F1, como genes que codificam a flagelina, FliC, e a proteína flagelar CAP, FliD. O locus F2 é responsável pela modificação pós-tradução de flagelos que foi demonstrado essencial para a montagem funcional de flagelos e motilidade de *C. difficile*. Os três *loci* são variáveis entre

linhagens de *C. difficile* (JANOIR, 2016). E em estudos recentes o locus F3 estava ausente na linhagem emergente e virulenta 078, sugerindo que flagelos e, portanto, motilidade são dispensáveis para a virulência de *C. difficile* (JANOIR, 2016).

Em outras bactérias patogênicas móveis, a expressão de genes flagelares é fortemente regulada por condições ambientais. Em *C. difficile*, os genes envolvidos na motilidade são expressos em níveis mais elevados durante a fase de crescimento exponencial e isto sugere que esses genes são expressos durante a fase de colonização muito precoce e podem estar envolvidos no processo de colonização. Além disso, a produção de anticorpos anti-flagelina específicos em pacientes indica que o flagelo é expresso durante a infecção em seres humanos (JANOIR, 2016).

Os primeiros estudos sobre o papel dos flagelos no processo de colonização mostraram que ambas as proteínas flagelais purificadas FliC e FliD são capazes de se ligar ao muco murino e isso se confirma em estudos em que cepas não flageladas de ocorrência natural são menos aderentes ao ceco do camundongo do que as cepas flageladas, mas isso não resulta em uma diminuição da colonização intestinal, pois existem outros fatores de virulência que podem favorecer a colonização (GHOSE et al, 2016; JANOIR, 2016). Portanto isso sugere que as propriedades adesivas das proteínas flagelares podem promover a ligação de *C. difficile* ao muco graças à motilidade conduzida por flagelos (JANOIR, 2016).

A contribuição de flagelos para a patogênese de *C. difficile* é complexa e ainda não totalmente compreendida. Há evidências científicas crescentes que sugerem que os flagelos desempenham um papel mais direto na virulência, através da modulação da expressão da toxina ao invés de simplesmente atuar na motilidade bacteriana (STEVENSON; MINTON; KUEHNE, 2015).

### **2.2.3 Endoesporos**

*C. difficile*, sob condições de estresse, geralmente falta de nutrientes, se diferenciam em esporos que são uma forma dormente da bactéria. Os esporos são as partículas infecciosas e são críticos tanto para a infecção como para a transmissão mediada por *C. difficile*. Eles são encontrados de forma ubíqua no ambiente e são propagados nas fezes de humanos e animais, levando a susceptibilidade às infecções (AWAD et al, 2014).

Devido à sua estrutura multicamada, os esporos são extremamente resistentes ao calor, à radiação e a muitos desinfetantes químicos e à base de álcool utilizados para limpar instalações hospitalares e comunitárias (AWAD et al, 2014). Os esporos propagados por meio

de fezes são, portanto, difíceis de erradicar e podem persistir em instalações de cuidados de saúde por longos períodos de tempo, levando a infecção ou reinfecção de indivíduos por ingestão inadvertida de material contaminado (AWAD et al, 2014; PETTIT et al, 2014).

A capacidade dos esporos a persistirem no meio ambiente é atribuída a sua estrutura com cada esporo contendo uma cópia completa do genoma envolto em um núcleo protetor de esporos. O núcleo é cercado por uma camada grossa de peptidoglicano (*spore coat*) e uma camada externa solta denominada exósporo (AWAD et al, 2014).

Após a alteração da microbiota normal, mais comumente como resultado de um tratamento com antibióticos, ocorre infecção e colonização por *C. difficile*. A esporulação pode então resultar no intestino, permitindo que uma sub população de *C. difficile* persista por longos períodos de tempo e facilite a transmissão do organismo. Há alguns estudos sobre a associação entre os ribotipos de cepas de *C. difficile* e a eficiência de produção ou germinação de esporos. Vários estudos observaram que alguns isolados clínicos de *C. difficile*, especialmente aqueles do tipo NAP1/027/BI, formaram esporos com maior proficiência do que outros isolados clínicos, no entanto, outros estudos não relataram tal associação (AWAD et al, 2014).

O regulador mestre de esporulação é Spo0A, que controla a transição da bactéria para a forma de esporos, é um fator de transição ativo nos estágios iniciais da esporulação em *C. difficile* e em outras bactérias esporulantes (MACKIN et al, 2013; PETTIT et al, 2014).

Os ortologos de Spo0A são codificados por uma variedade de Firmicutes, incluindo *Bacillus* e *Clostridium*, e a inativação genética deste gene leva a um fenótipo não esporulado. Nos organismos de *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp., muitos dos efeitos pleiotrópicos de Spo0A são devidos a regulação indireta através do regulador de estado de transição AbrB. No entanto, *C. difficile* não codifica um ortologo AbrB destacando as diferenças na atividade de Spo0A entre *C. difficile* e outras espécies de *Clostridium* e *Bacillus* estudadas até o momento (PETTIT et al, 2014).

Spo0A de *C. difficile* liga diretamente ao DNA a montante de vários genes de esporulação precoce, mas esse regulador transcricional também pode controlar outros processos associados à regulação de fatores de virulência de outros fenótipos, como motilidade, que não estão obviamente associados à esporulação. Trabalhos recentes examinaram o papel de Spo0A na regulação da expressão de genes das toxinas A e B por *C. difficile* e doença em camundongos e formação de biofilmes *in vitro* (MACKIN et al, 2013; PETTIT et al, 2014).

Consequentemente, Pettit e colaboradores (2014) realizaram uma análise do genoma que demonstra que o gene *spo0A* de *C. difficile* codifica um regulador transcricional global que coordena uma série de fenótipos associados à colonização e transmissão do hospedeiro.

#### **2.2.4 Biofilmes**

Os biofilmes são comunidades microbianas associadas à uma superfície, encapsuladas em matrizes poliméricas auto produzidas (DAPA et al, 2013). O biofilme pode se aderir a superfícies abióticas, como cateteres utilizados em tratamentos médicos ou bióticas como em tecidos e células.

Os biofilmes representam o estado predominante das bactérias na natureza. Acredita-se que apenas uma pequena fração de bactérias em ecossistemas naturais exista na forma planctônica (DAPA et al, 2013).

As células do biofilme podem diferir das cultivadas em cultura planctônica em fisiologia, expressão gênica e morfologia. Essas diferenças, em combinação com as moléculas extracelulares especializadas, podem dotar o biofilme da capacidade de sobreviver a diversos estresses ambientais (SEMENYUK et al, 2014).

*Clostridioides difficile* é capaz de formar um biofilme em superfície abiótica, as bactérias são incorporadas numa matriz compostas por DNA, polissacarídeos e proteínas, incluindo várias Cwps e toxinas, notadamente a toxina A (JANOIR, 2016). A formação de biofilme de *C. difficile* demonstrou ser modulada por reguladores centrais como *Spo0A* e *LuxS* e por componentes de superfície tais como flagelos e proteases Cwp84 (JANOIR, 2016). Enquanto que fortes evidências foram acumuladas na capacidade de *C. difficile* formar um biofilme *in vitro*, a formação de biofilme por *C. difficile* *in vivo* permanece menos clara. Até à data, poucas observações apoiam esta hipótese: em um modelo de camundongo, foram observados grupos de *C. difficile* em estreita associação com tecido danificado, o que poderia sugerir a formação de microcolônias. No entanto, estudos adicionais são necessários para definir com mais precisão o papel da formação de biofilmes no CDI e suas recorrências. De fato, demonstrou-se que os biofilmes aumentam a resistência das células de *C. difficile* a antibióticos, bem como ao stress de oxigênio e promovem a persistência da bactéria como esporos resistentes (JANOIR, 2016).

Uma melhor compreensão da formação de biofilmes por agentes patogênicos e de como os biofilmes contribuem para doenças pode resultar em melhora na prevenção e tratamento de doenças, como a CDI.

### 2.2.5 Toxinas

Os principais e mais estudados fatores de virulência de *C. difficile* são as toxinas (JANOIR, 2016).

As cepas toxigênicas podem produzir até três tipos de toxinas: toxinas A (TcdA), B (TcdB) e binária (CDT) (BOUILLAUT et al, 2014; JANOIR, 2016).

**Toxinas A e B:** Os genes que codificam as duas principais toxinas TcdA (*tcdA*) e TcdB (*tcdB*) estão localizados dentro de um locus de patogenicidade ou PaLoc de 19,6 kb, encontrado apenas em cepas toxigênicas de *C. difficile*. Este locus também inclui genes que codificam um fator de sigma de RNA polimerase (TcdR) que é essencial para ativar a expressão do gene da toxina, um possível antagonista de TcdR (chamado TcdC) e uma proteína de tipo holin, TcdE, que é necessária para a liberação extracelular das toxinas TcdA e TcdB da bactéria (BOUILLAUT et al, 2014; JANOIR, 2016).

O papel da proteína codificada pelo terceiro gene, *tcdC*, é menos claro. Foi proposto há muito tempo como um regulador negativo da síntese de TcdA e TcdB, por causa da relação inversa entre sua transcrição e a dos outros genes PaLoc e do surgimento de linhagens hipervirulentas cujas cepas produziam altos níveis de toxina e estavam transportando modificações no gene *tcdC* (JANOIR, 2016).

O primeiro estudo molecular atribuído ao TcdC é um papel de regulador negativo da expressão do gene da toxina através da sua ação antagonista de TcdR. TcdC interfere com a capacidade do TcdR contendo RNA polimerase para reconhecer os promotores *tcdA* e *tcdB*, levando a uma inibição de sua transcrição. Este papel foi confirmado, mas estudos adicionais trouxeram resultados conflitantes. Em particular, as manipulações genéticas de *tcdC* não conseguiram mostrar uma correlação entre o genótipo de *tcdC* e a produção de toxina em *C. difficile* R20291 ou *C. difficile* 630. Além disso, modificações em *tcdC*, levando à produção de uma proteína truncada inicialmente associou-se a uma maior produção de toxinas, particularmente nas cepas 027, mas esta hipótese foi refutada posteriormente. Portanto o papel do TcdC é, no entanto, controverso com numerosos estudos que fornecem dados conflitantes



sobre o envolvimento do TcdC na regulação da produção de toxinas e a resultante capacidade de virulência de *C. difficile* (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

Notavelmente, foi recentemente demonstrado que o PaLoc pode ser transferido horizontalmente para cepas não patogênicas. Também deve notar-se que a expressão de toxinas TcdA e TcdB é regulada com precisão por condições ambientais, como disponibilidade de nutrientes específicos, mudanças de temperatura e alteração do potencial redox e reguladores globais (BOUILLAUT et al, 2014; JANOIR, 2016).

TcdA e TcdB são proteínas de 308 e 270 kDa, respectivamente, com 49% de identidade e 63% de similaridade. Eles pertencem à grande família de toxinas clostridial (LCTs) e compartilham uma estrutura de domínio ABCD semelhante. O domínio A (para "Atividade") é o domínio da N-terminal de glicosiltransferase, domínio B (para "Ligação") está localizado na parte C-terminal da proteína e exibe oligopeptídeos repetitivos combinados, domínio C (para "Corte") consiste em um domínio de cisteína protease envolvido no autoprocessamento de toxinas e o domínio D (para "Entrega") corresponde à região hidrofóbica interna. Consequentemente, a ação da toxina envolve quatro etapas principais: 1 - endocitose mediada pelo receptor mediada pelo domínio B; 2- translocação de um domínio catalítico através da membrana que envolve o domínio D; 3- libertação da fração enzimática uma vez que a toxina é internalizada em células hospedeiras por processamento autoproteolítico (domínio C) promovido pelo hexa-fosfato de inositol celular; 4- inativação por glicosilação de GTPases da família de proteínas Rho (domínio A) (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

Com efeito, os alvos de atividade enzimática de TcdA e TcdB são a família de GTPases Rho e Ras no interior das células hospedeiras, que desempenham papéis importantes numa série de processos celulares vitais, incluindo adesão célula a célula e manutenção do citoesqueleto. TcdA e TcdB inativam a família GTPases Rho, Rac e Cdc42, levando à alteração do citoesqueleto de actina. As toxinas causam o arredondamento das células, a interrupção das junções oclusivas e o comprometimento da função de barreira intestinal, bem como a morte celular por apoptose ou necrose (BRITO et al, 2002a). A perda resultante da função de barreira do epitélio intestinal leva ao acúmulo de líquido e ao dano intestinal grave. As toxinas também estimulam a libertação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-8) a partir de células epiteliais e células imunes residenciais mucosas, o que provoca influxo de neutrófilos e leva a uma maior destruição do revestimento intestinal (JANOIR, 2016).

**Toxina binária:** *Clostridium difficile* transferase (CDT), também conhecida como toxina binária, é um determinante associado à virulência, cujo papel exato na patogênese da doença permanece indefinido (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

A CDT foi descrita pela primeira vez em 1988 e pertence à família de toxinas ADP-ribosilantes binárias, especificamente na subfamília iota de toxinas binárias, que inclui toxina iota de *C. perfringens*. Tal como acontece com todas as toxinas binárias, a CDT compreende dois componentes: o componente enzimático (CDTa) que confere atividade ADP ribosiltransferase e o componente de ligação/translocação (CDTb) que permite a passagem do componente enzimático para o citosol celular. Nas cepas que produzem CDT, os genes que codificam CDTa e CDTb, *cdtA* e *cdtB*, respectivamente, estão localizados em uma região genômica de 6,2 kb, denominada locus CDT, ou CDTLoc, que também codifica um regulador positivo da produção de CDT, CdtR (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

O papel da toxina binária na virulência ainda é uma questão de debate. Estudos recentes mostraram um possível papel que a toxina binária desempenha em relação à adesão e colonização de *C. difficile* no hospedeiro (AWAD et al, 2014; JANOIR, 2016).

Estudos recentes demonstram que em doses baixas, a toxina binária induz a formação de protrusões na superfície das células epiteliais que aumentam a adesão ao *C. difficile in vitro* às células Caco-2 e também *in vivo* num modelo de infecção do camundongo. A microscopia eletrônica de varredura revelou que as bactérias estão incorporadas nessas protrusões de membrana à base de microtúbulos. As pesquisas relatam que essas protrusões induzidas por CDT contêm vesículas de tráfego e retículo endoplasmático, permitindo o reencaminhamento de vesículas contendo fibronectina da superfície basolateral para a superfície apical das células epiteliais intestinais, onde as protrusões são formadas. A fibronectina liberada aumenta a adesão de bactérias, e experimentos com animais demonstraram a relevância desse mecanismo *in vivo* (JANOIR, 2016).

As cepas de ocorrência natural que expressam apenas CDT mostraram ser não virulentas em um modelo de hamster. A toxina binária é encontrada em cerca de 20% de cepas em situações de não surto, mas os genes de codificação dessa toxina estão sempre presentes em algumas cepas de epidemias, como os ribotipos 027 e 078. Até o momento, presume-se que a presença da toxina binária está correlacionada positivamente com os resultados graves do CDI, de modo que a toxina binária pode potencializar a toxicidade de TcdA e TcdB e levar a uma doença mais grave (JANOIR, 2016).

Finalmente, a detecção de CDT em amostras clínicas de pacientes é atualmente limitada, uma vez que não existem ensaios de diagnóstico confiáveis disponíveis. Por este

motivo, o impacto real da CDT na morbidade e mortalidade CDI provavelmente está subestimado (AWAD et al, 2014).

### **2.3 Patogenicidade de *Clostridioides difficile***

A infecção por *C. difficile* se inicia com a ingestão de esporos ou células vegetativas. A transmissão de *C. difficile* ocorre via fecal-oral (POUTANSEN; SIMOR, 2004).

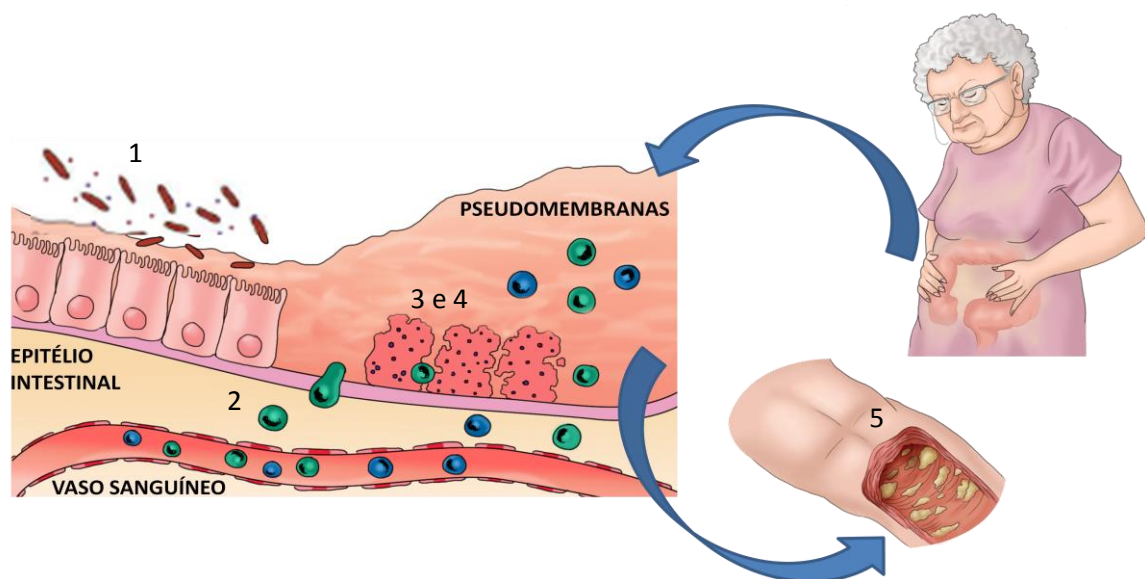
A infecção por *C. difficile* é precipitada, por exemplo, por terapia antimicrobiana, o que provoca uma alteração da microbiota normal (DENEVE et al, 2009; ABT; McKENNEY; PAMER, 2016). Essa alteração da microbiota cria um ambiente mais hospitaleiro para o crescimento de *C. difficile*. No cólon, bactérias comensais produtoras de sialidase divide os açúcares das proteínas glicosiladas que estão ligadas na membrana celular epitelial, que libera ácido siálico no lúmen. Fermentadores primários quebram carboidratos complexos em ácidos graxos de cadeia curta. Ambos os metabólitos são rapidamente consumidos como fontes de energia por bactérias comensais. No entanto, o tratamento antibiótico pode eliminar bactérias comensais concorrentes, o que leva a uma abundância de ácido siálico e succinato, um ácido que é produzido durante a fermentação. *C. difficile* tem genes tanto para o catabolismo de ácido siálico quanto para transportadores de succinato, o que lhe permite usar o excesso de ácido siálico e succinato para o crescimento (ABT; McKENNEY; PAMER, 2016).

Após alteração da microbiota normal, a contaminação endógena ou exógena pode ocorrer por ingestão de esporos ou células vegetativas de *C. difficile*, e as células vegetativas são mortas no estômago devido à acidez, mas os esporos podem sobreviver, e germinar no intestino delgado por meio da ação dos ácidos biliares (Figura 4). Os esporos germinam e as formas vegetativas se multiplicam. *C. difficile* pode então aderir à camada de muco que aloja os enterócitos por meio de suas múltiplas adesinas e penetra a camada de muco com a ajuda de flagelos e proteases. Isso resulta na primeira fase do processo patogênico, a colonização (POUTANSEN; SIMOR, 2004; DENEVE et al, 2009).

A segunda fase do processo patogênico é a produção de toxinas pelas células vegetativas de *C. difficile*, quando aderidas ao epitélio (1). Os principais fatores de virulência, as toxinas TcdA e TcdB são produzidas. As toxinas A e B agem quando são liberadas no lúmen intestinal e são internalizadas por endocitose, pelas células intestinais por meio de ligação aos receptores na lâmina basal. Dentro das vesículas endossômicas, cujo pH torna-se

ácido por causa da fusão com lisossomos presentes no citoplasma, as toxinas sofrem clivagem autocatalítica, e os fragmentos contendo os sítios ativos migram para o citoplasma, onde exercem suas funções causando a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas pró-inflamatórias, aumentando a permeabilidade vascular, o recrutamento de monócitos e neutrófilos (2), abertura das junções de células epiteliais (3) e a apoptose de células epiteliais (4). A produção local de enzimas hidrolíticas leva a degradação do tecido conjuntivo, levando à formação de colite pseudomembrana (5) e diarreia aquosa. Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, agindo também em outros órgãos (BRITO et al, 2002a; BRITO et al, 2002b; POUTANSEN; SIMOR, 2004; HOOKMAN; BARKIN, 2009).

Figura 4 - Patogênese da infecção por *Clostridioides difficile*.



Fonte: Adaptada de POUTANSEN; SIMOR, 2004.

Ilustração: Juliana Rabelo.

## 2.5 Epidemiologia de *Clostridioides difficile*

*Clostridioides difficile* é a causa mais frequente de diarreia infecciosa associada a internações hospitalares e em centros de cuidados prolongados, tendo substituído o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (EVANS; SAFDAR, 2015; VINDIGNI; SURAWICZ, 2015)

Os Centros para Controle e Prevenção de Doenças recentemente identificaram a CDI como uma "ameaça urgente" em seu recente relatório sobre ameaças de resistência a

antibióticos nos EUA, destacando a necessidade de ações urgentes e agressivas para prevenir esta infecção. O impacto dos antibióticos como fator de risco para o CDI de novo aparecimento está bem estabelecido; no entanto, reconhecer classes de antibióticos com os maiores riscos e reduzir o uso desnecessário de antibióticos são estratégias importantes para prevenção de CDI e subsequente recorrência (EVANS; SAFDAR, 2015).

A partir do ano 2000 houve um aumento de relatos de casos graves de CDI, dominado por cepas epidêmicas com maior patogenicidade, levando a altas taxas de transmissão, maior gravidade e maior mortalidade (MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016). Essa alta incidência de casos de CDI no mundo foi ocasionada devido ao surgimento de uma nova cepa hipervirulenta caracterizada como pulsotipo NAP1 ou BI ou ribotipo 027 (NAP1/BI/027) (FREEMAN et al, 2010; VINDIGNI; SURAWICZ, 2015). Várias características encontradas em NAP1/BI/027 podem contribuir para sua hipervirulência, incluindo polimorfismos no gene regulador negativo, *tcdC*, aumentando a produção das toxinas A e B, presença dos genes que codificam a toxina binária (*ctdA* e *ctdB*) e elevado nível de resistência a fluoroquinolonas (McDONALD et al, 2005; WARNY et al, 2005).

A cepa hipervirulenta foi descrita pela primeira vez em 2005 por investigadores norte-americanos e canadenses (McDONALD et al., 2005; WARNY et al., 2005). Na Europa, foi relatada pela primeira vez na Inglaterra e logo depois na Holanda (BAUER et al, 2011). Já na América Latina, o primeiro isolamento da NAP1/BI/027 foi reportado na Costa Rica em 2009 (QUESADA-GÓMEZ et al, 2010). No Brasil ainda não foram registrados nenhum isolamento de NAP1/027.

O aumento da incidência e a gravidade de CDIs têm sido bem documentados na última década em toda América do Norte e Europa (FREEMAN et al, 2010; BAUER et al, 2011; DePESTEL; ARONOFF, 2013; VINDIGNI; SURAWICZ, 2015). Enquanto isso, a conscientização e vigilância de CDI na América Latina permaneceram escassas. Pouco se sabe sobre os casos de CDI que ocorrem em países latino-americanos, apesar da diarreia ser uma das principais causas de morbidade nos países em desenvolvimento (BALASSIANO et al, 2012; LOPARDO et al, 2015).

No Brasil há pouca informação sobre a incidência de CDI e a disseminação de *C. difficile*. Isso se deve em parte ao fato de que a detecção de bactérias anaeróbias não é um procedimento de rotina nos laboratórios clínicos em nosso país, principalmente devido à falta de tecnologias e instalações para o seu cultivo e, portanto, contribuindo para a sub-notificação de CDI (BALASSIANO et al, 2009).

Além disso, existem poucos grupos de pesquisas em micro-organismos anaeróbios no país. A maioria dos estudos em hospitais é realizada no Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Porto Alegre e Fortaleza (BALASSIANO et al, 2009; BALASSIANO et al, 2012; SILVA et al, 2015; COSTA et al, 2014; COSTA et al, 2016; COSTA et al, 2017).

Considerando os poucos centros de pesquisa para identificação de *C. difficile* no Brasil, alguns estudos revelam ainda pouco do padrão molecular das cepas circulantes no Brasil. Alcides e colaboradores (2007) detectaram 13 ribotipos em um estudo que realizaram para caracterizar um grupo de cepas de *C. difficile* isoladas de diarreia pediátrica, crianças saudáveis e ambientes hospitalares no Rio de Janeiro. Balassiano e colaboradores (2009) detectaram dois ribotipos (014 e 106) em um estudo realizado no Rio de Janeiro para caracterizar cepas de *C. difficile* isoladas a partir de amostras fecais de pacientes internados e amostras ambientais hospitalares. Secco e colaboradores (2014), também no Rio de Janeiro, realizaram um estudo epidemiológico em um hospital terciário e identificaram três ribotipos (014, 043 e 046) isolados a partir de amostras fecais de pacientes internados. Silva e colaboradores (2015) em um estudo comparativo dos ribotipos encontrados em humanos e animais em Belo Horizonte, identificaram 14 ribotipos (entre eles 010, 014/020, 106, 131) em humanos, sendo sete novos ribotipos.

No Nordeste do Brasil existe uma carência de informações sobre a epidemiologia do *C. difficile* que se restringia apenas a pesquisa em pacientes da Hematologia do Hospital Walter Cantídio internados entre 1991-1993, Fortaleza, Ceará que mostrou uma incidência de 18,75% de positividade para *C. difficile* nos pacientes com diarreia usando somente ELISA para toxina A (MESQUITA et al, 2011). A partir de 2013, as pesquisas em Fortaleza, Ceará, foram intensificadas com um estudo do nosso grupo em um hospital oncológico de Fortaleza que mostrou uma incidência de CDI (48%) em pacientes oncológicos (COSTA et al, 2017) e em 2015 iniciou-se da pesquisa de *C. difficile* em um hospital infantil de referência do Estado do Ceará.

O estudo realizado no hospital oncológico do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, em Fortaleza, além de descrever a incidência de CDI (48%) em pacientes oncológicos, evidenciou pela primeira vez a presença de *C. difficile* em casos associados a comunidade (CA-CDI) nesses pacientes no Brasil, ressaltando a importância do estudo dessa bactéria para a compreensão da situação epidemiológica dessa infecção e de sua dispersão entre unidades hospitalares brasileiras (COSTA, 2014; COSTA et al, 2014; COSTA et al, 2017).

Portanto, o aumento da morbidade, mortalidade e nos custos devido a CDI sugerem que são necessários esforços contínuos para a prevenção primária e secundária de CDI, incluindo a redução do uso desnecessário de antibióticos e monitorando o uso de inibidores de bombas de prótons e antagonistas histamínicos (EVANS; SAFDAR, 2015). Além disso, reconhecer os resultados centrados no paciente como uma área de estudo necessária, intensificará os esforços na identificação de estratégias de prevenção para reduzir a incidência e gravidade de CDI.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar uma nova cepa de *Clostridioides difficile* (ICC45) isolada de um paciente internado em um hospital oncológico de Fortaleza e comparar com as cepas ATCC 700057 (não toxigênica) e NAP1/027 (R20291 e LIBA5756, cepas hipervirulentas).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente a nova cepa de *C. difficile* (ICC45) por meio de provas bacteriológicas, bioquímicas e quanto à sensibilidade a antimicrobianos;
- Caracterizar molecularmente a cepa de *C. difficile* (ICC45) por meio de PFGE, PCR Ribotipagem, Toxinotipagem e sequenciamento genético;
- Realizar a tipagem molecular por MLST da nova cepa de *C. difficile* (ICC45);
- Avaliar a expressão proteica de toxinas (toxinas A e B) no sobrenadante de cultivo de cepas de *C. difficile* em estudo por meio de *Western Blotting*;
- Avaliar a expressão gênica de toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*), adesinas (*cwp84*), proteínas flagelares (*fliA*, *fliC*, *fliD*) e esporos (*spo0A*) pelas cepas estudadas de *C. difficile* por meio de PCR em tempo real;
- Comparar os dados do sequenciamento das cepas de *C. difficile* em estudo com os resultados da expressão gênica.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Cepas

As cepas de *Clostridioides difficile* utilizadas no estudo foram: ATCC 700057 (não toxigênica), NAP1/027 R20291 e LIBA5756 (hipervirulentas isolada de surtos no Reino Unido e na Costa Rica, respectivamente) e ICC45 (cepa clínica toxigênica, novo ribotipo/genótipo) isolado de paciente internado no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará em 2014 por nosso grupo de pesquisa (COSTA et al, 2016).

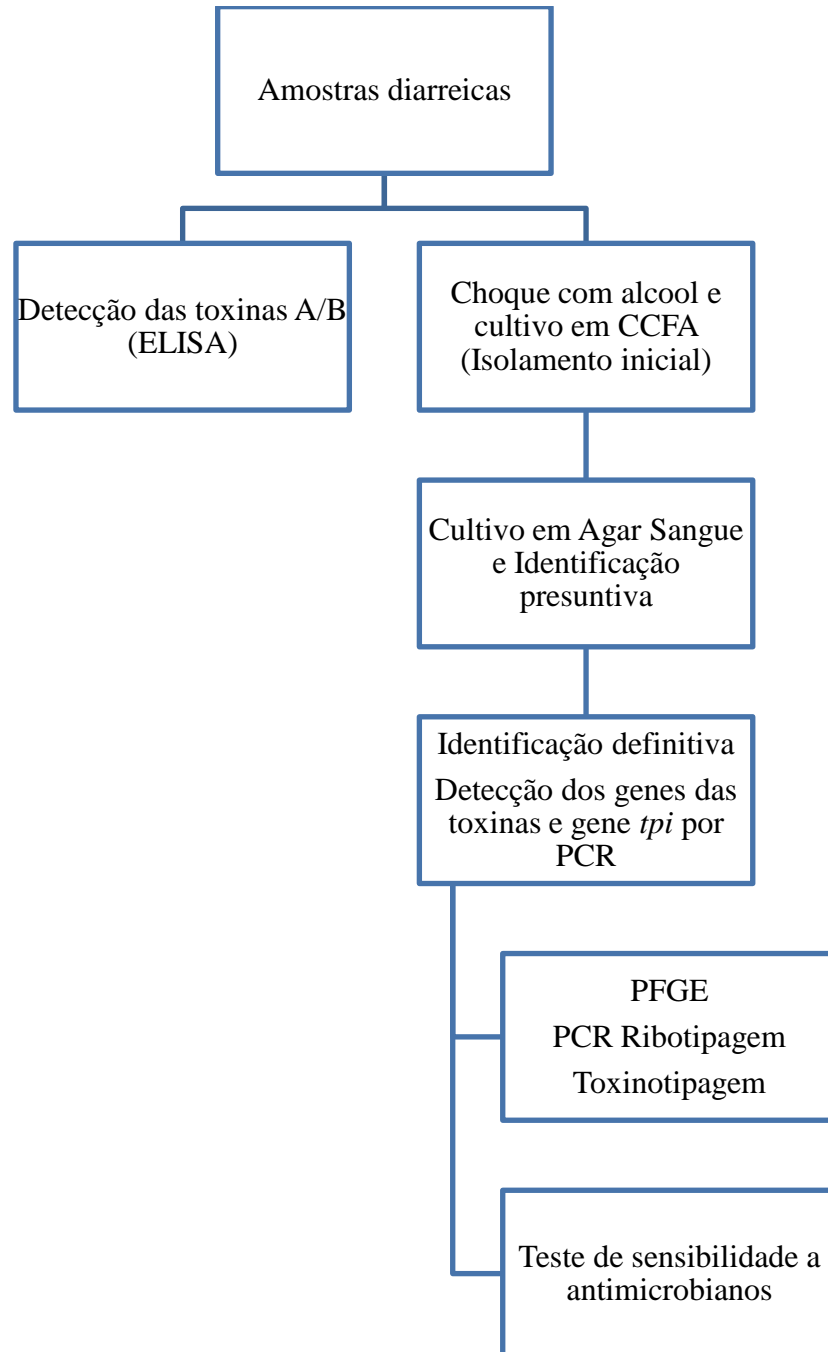
### 4.2 Caracterização da nova cepa de *C. difficile* (ICC45)

A amostragem foi realizada em um hospital de atendimento de pacientes com fator de risco para a doença associada ao *Clostridioides difficile*. Os pacientes foram identificados clinicamente pela equipe médica do hospital e foram aplicados Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e Questionário (Apêndice B) para o paciente participar do estudo.

A coleta dos espécimes clínicos foi realizada no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, durante o período de 18 meses (maio de 2013 a novembro de 2014) e em seguida realizadas várias análises a fim do isolamento e identificação de cepas de *C. difficile* (Figura 5).

A coleta de amostras foi realizada durante a execução de um projeto intitulado “Isolamento, genotipagem e estudo comparativo da virulência de cepas de *Clostridium difficile* em pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará” submetido e aprovado pelo comitê de ética do Instituto do Câncer do Ceará (Anexo A) e financiado pela FUNCAP, nº de processo 12535679-0, referente a Chamada 03/2012 Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde PPSUS-REDE-MS/CNPq/FUNCAP/SESA. E essa pesquisa em questão também faz parte do projeto do “Núcleo de Excelência em Pesquisa do *Clostridium difficile* no Estado do Ceará (NEPEC-CE)” financiado por PRONEX/FUNCAP/CNPq por meio da concessão nº PR2-0101-00060.01.00/15, referente ao edital 02/2015 do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência PRONEX/FUNCAP/CNPq.

Figura 5: Fluxograma das análises realizadas a partir das amostras de fezes para o isolamento e identificação de cepas de *Clostridioides difficile*.



#### 4.2.1 Critérios de inclusão e coleta dos espécimes clínicos

As amostras fecais diarreicas foram coletadas de pacientes hospitalizados, acima de 18 anos de idade, com câncer, que fizeram uso de quimioterápicos e/ou antibióticos nas últimas oito semanas antes do início do quadro diarreico. Pacientes com enteropatia causadora

de diarreia crônica, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino curto foram excluídos da pesquisa assim como qualquer condição médica que pudesse comprometer a capacidade do paciente de participar do estudo.

Como critério para paciente com diarreia foi definido como três ou mais evacuações de fezes não formadas em 24 horas ou em menos horas consecutivas (COHEN et al, 2010).

A coleta foi realizada a partir da evacuação espontânea de qualquer horário do dia, dentro de um frasco de coleta estéril com boca larga e uma tampa bem ajustada. A amostra foi transportada em um recipiente com gelo. O tempo decorrido entre a coleta e a semeadura não excedeu a seis horas ou então a amostra foi congelada a – 20 °C e analisada dentro de um prazo máximo de dois meses.

#### ***4.2.2 Detecção de toxinas de *C. difficile* em amostras fecais***

Toxinas A/B foram detectadas em amostras de fezes diarreicas através do kit de detecção comercial ProSpecT™ *Clostridium difficile* Toxin A/B Microplate (Remel®, Lenexa, KS, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

#### ***4.2.3 Isolamento de *C. difficile* a partir de amostras fecais***

O isolamento de *C. difficile* a partir das fezes foi realizado por meio de um tratamento de choque com álcool à 96%. Em seguida as fezes foram semeadas em placa de Petri contendo o meio Cefoxitina-Cicloserina-Fructose-Agar (CCFA) (OXOID®) por meio de *swab*. As placas foram incubadas em anaerobiose (jarra de anaerobiose, 90% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) por 72h a 37 °C. As colônias características crescidas no CCFA foram examinadas e em seguida realizadas as devidas etapas de identificação e caracterização (ALFA et al., 2000; MILLER et al., 2010; QUESADA-GÓMEZ et al., 2010).

#### ***4.2.4 Identificação presuntiva dos isolados de *C. difficile****

Colônias suspeitas foram cultivadas no meio de cultura agar Brucella suplementado com vitamina K (1 µg/mL) e 5% de sangue lisado de carneiro (BAK) e em 5 mL de caldo BHI suplementado com cisteína, extrato de levedura e a mesma quantidade de vitamina K e hemina (5 µg/mL, Sigma®), ambos foram incubados em anaerobiose por 72

horas a 37 °C. As colônias crescidas em agar BAK foram submetidas à prova de tolerância ao oxigênio, coloração de Gram e detecção de fluorescência em luz UV (MILLER *et al*, 2010).

O teste de aerotolerância foi realizado para confirmar que o micro-organismo isolado era uma bactéria anaeróbia estrita. Esse teste consiste em repicar cada colônia isolada na cultura em anaerobiose em uma placa de agar sangue e incubar em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. Se o micro-organismo crescer apenas na atmosfera anaeróbia, confirma a presença de uma bactéria anaeróbia (KONEMAN *et al*, 2008).

Também foi realizado o teste rápido de aglutinação em látex, que detecta especificamente a proteína glutamato-desidrogenase de *C. difficile* (*C. difficile* Test Kit® da Oxoid®), seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.2.5 Identificação definitiva dos isolados de *C. difficile***

A cepa isolada a partir do meio BAK foi identificada mediante provas bioquímicas comerciais (RapID™ ANA II System, Remel®). Além disso, a sua identificação foi confirmada pela detecção de um fragmento do gene *tpi* exclusivo de *C. difficile* (triose fosfato isomerase) por PCR, com os iniciadores e as condições descritas (KATO *et al*, 1991; STUBBS *et al*, 2000; SPIGAGLIA *et al*, 2004; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

#### **4.2.6 Extração do DNA genômico bacteriano de *C. difficile***

O DNA genômico foi extraído de cada cepa previamente cultivadas em caldo BHI suplementado com vitamina K (1 µg/mL, Sigma®) e hemina (5 µg/mL, Sigma®). As cepas foram incubadas por 12 a 18 horas, a 37 °C e sob condições anaeróbias. A extração foi realizada por meio do kit InstaGene Matrix® (BioRad®) seguindo as recomendações do fabricante e segundo descrito em Miller *et al* (2010) e Quesada-Gómez *et al* (2010).

#### **4.2.7 Detecção de genes das toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *cdtB* e *tcdC*)**

A determinação da presença de fragmentos dos genes das toxinas A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*), domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) e o potencial regulador negativo do PaLoc (*tcdC*) foi realizada por meio de PCR Multiplex. O protocolo, iniciadores e as condições utilizadas foram as descritas na literatura (KATO *et al*, 1991; STUBBS *et al*, 2000; SPIGAGLIA *et al*, 2004; QUESADA-GÓMEZ *et al*, 2010).

Os produtos amplificados foram visualizados mediante a inoculação de 10 µL da amplificação em gel de agarose a 1,5% e corridos em eletroforese em tampão TBE 0.5X, a 100V por 90 minutos (COHEN; TANG; SILVA, 2000; QUESADA-GÓMEZ et al, 2010).

As deleções parciais no gene *tcdC* foram interpretadas de acordo com o tamanho do fragmento amplificado nas imagens do eletroforese (COHEN; TANG; SILVA, 2000; QUESADA-GÓMEZ et al, 2010).

Os controles positivos de amplificação foram as seguintes cepas: uma cepa hipervirulenta NAP1 (*tcdA+*, *tcdB+*, deleção 18 pb em *tcdC*, *cdtB+*), NAP7 (*tcdA-*, *tcdB+*, deleção > 18 pb em *tcdC*, *cdtB+*) e uma cepa que apresentasse somente a toxina B (*tcdA-*, *tcdB+*, sem deleção no *tcdC*, *cdtB-*).

#### **4.2.8 Tipificação mediante eletroforese de campo pulsado (PFGE - Pulsed-field Gel Electrophoresis)**

O padrão de macrorestrição foi determinado por meio da digestão do genoma com a enzima de restrição *SmaI*, obtido pelo equipamento PFGE, para cada um dos isolados de *C. difficile* de acordo com o método descrito (ALFA et al, 2000; QUESADA-GÓMEZ et al, 2010).

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI por 6 a 8 horas. Em seguida, estas bactérias foram ressuspensas em tampão de lise celular (6 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM de EDTA pH 9,0, NaCl 1 M para desoxicolato a 0,2%, sarcosil a 0,5%, Brij 58 a 0.5%) e os plugs de agarose foram feitos por uma mistura de volumes iguais das soluções bacterianas e da agarose SeaKream Gold<sup>®</sup> (Lonza<sup>®</sup>) à 1% fundida, contendo dodecilsulfato de sódio à 1% em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 1 mM). As bactérias foram lisadas durante a noite por incubação dos plugs em tampão de lise celular e enzimas (2 mg/mL de lisozima, 20 mg/mL de RNase e 12,5 unidades de mutanolisina), a uma temperatura de 37 °C. Em seguida, os plugs foram incubados a 55 °C durante 12 – 18 horas em uma suspensão de 500 mM de EDTA pH 9,0, sarcosil a 1% e 50 mg/mL de proteinase K.

Depois destas lises, os plugs de agarose com o DNA genômico foram lavados, de 7 a 8 vezes, com tampão TE 1X e água ultrapura (bidestilada, deionizada e estéril). A digestão com a enzima de restrição *SmaI* (Roche<sup>®</sup>) foi realizada durante overnight a 25 °C.

O DNA dos plugs foi separado em géis de agarose a 1% (BioRad<sup>®</sup> grau campo pulsado) em tampão TBE 0,5X (tris-borato-EDTA) contendo 50 mM de tiourea em 6 V/cm

com 1 a 40 segundos, tempo de comutação durante 22 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio, descorados com água ultrapura, e fotografados digitalmente.

As imagens dos géis foram analisadas com software BioNumerics® (Applied Maths®) e com o banco de dados do National Microbiology Laboratory (NML), Winnipeg, Manitoba, Canadá. Com isso, o genótipo foi determinado e dado uma designação "NAP" para cada cepa em estudo.

Como um controle do tamanho dos fragmentos de DNA foi utilizado a cepa *Salmonella* serovar Braenderup H9812, estabelecida para esta metodologia, com uma digestão enzimática com *Xba*I (Roche®) durante 18-24 horas a 37 °C (Roche®) (ALFA et al, 2000; QUESADA-GÓMEZ et al, 2010).

A PFGE foi realizada no Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia da Faculdade de Microbiologia da Universidad da Costa Rica (UCR).

#### **4.2.9 PCR Ribotipagem**

Para o PCR ribotipagem, as regiões espaçadoras intergênicas foram amplificadas usando Primers Bidet conforme descrito anteriormente (BIDET et al, 1999). Os PCR ribotipos foram determinados pela apresentação de dados à base de dados Maribor (Eslovênia) e também foram realizados pelo Laboratório de Referência de Rede de Ribotipos de *Clostridium difficile* em Leeds Teaching Hospitals Trust, Leeds, Reino Unido (usando eletroforese capilar) (STUBBS et al, 1999).

#### **4.2.10 Toxinotipagem**

Para toxinotipagem, regiões A1 e B3 de *tcdA* e *tcdB* foram analisadas com um método descrito anteriormente (RUPNIK et al, 1998).

A toxinotipagem foi realizada no Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia da Faculdade de Microbiologia da Universidad da Costa Rica (UCR).

#### **4.2.11 Teste de sensibilidade a antimicrobianos**

A concentração inibitória mínima (CIM) de clindamicina, levofloxacina, moxifloxacina, rifampicina, ceftriaxona, metronidazol e vancomicina para *C. difficile* foi

determinada por meio de *E-test* (bioMérieux®) em agar Brucella suplementado com 5% sangue de carneiro, hemina (5 µg/mL), e vitamina K (1 µg/mL).

Os pontos de corte da resistência foram estabelecidos de acordo com as diretrizes do CLSI (M11-A8) da seguinte forma: ceftriaxona  $\geq 64$  µg/ml; moxifloxacina  $\geq 4$  µg/ml; clindamicina  $\geq 8$  µg/ml; metronidazol  $\geq 32$  µg/ml; rifampina  $\geq 32$  µg/ml e vancomicina  $> 2$  µg/ml.

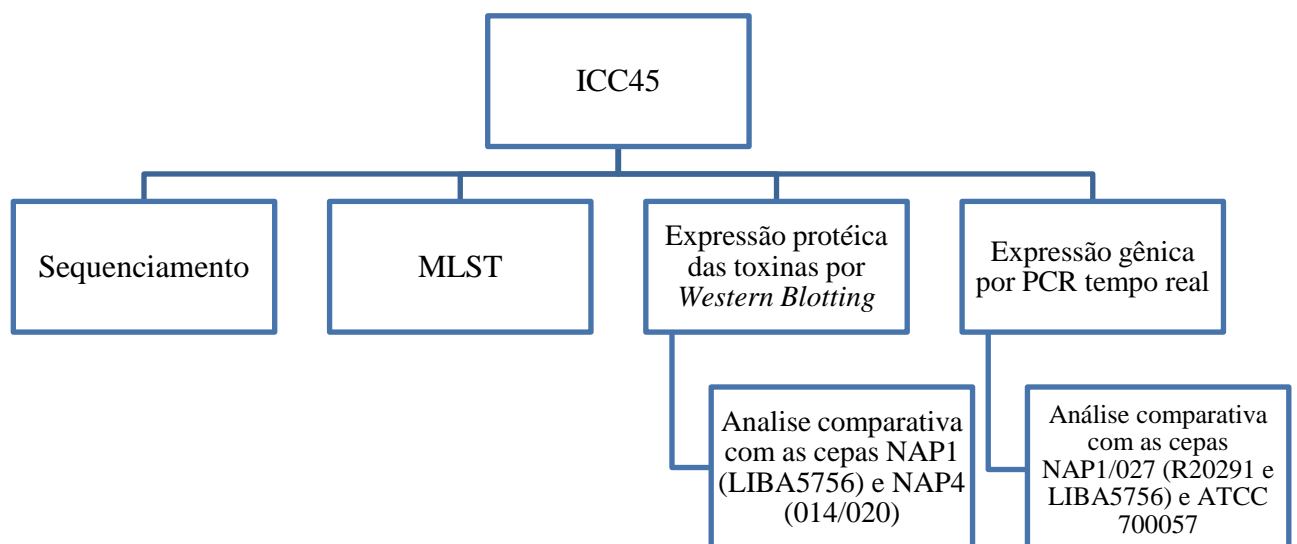
Para as fluoroquinolonas, utilizamos o ponto de corte da moxifloxacina (ciprofloxacina e levofloxacina), para a vancomicina foram utilizadas as diretrizes da EUCAST ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)) e para a rifampicina, o ponto de corte usado por O'Conner e colaboradores (2008).

O controle utilizado foi a cepa *C. difficile* ATCC® 700057.

#### 4.3 Análises do genoma completo (WGS) e MLST das cepas de *C. difficile* em estudo

Algumas análises foram realizadas apenas na cepa ICC45 em comparação a cepa ATCC 700057 e NAP1/027 (R20291 e LIBA5756) como detalhado na Figura 6.

Figura 6: Fluxograma das análises realizadas com a cepa de *Clostridioides difficile* ICC45.



Para o sequenciamento foi obtida uma sequência de genoma integral de qualidade de rascunho (WGS) para a cepa ICC45 utilizando bibliotecas multiplexadas de pares de extremidades (2 a 300 pb) e sequenciamento por síntese no MiSeq (Illumina, San Diego, CA).

As leituras foram montadas usando Velvet (ZERBINO, BIRNEY, 2008). Os scaffolds resultantes foram ordenados usando MAUVE (RISSMAN et al, 2009) e o genoma da cepa de referência NAP1/027 R20291 (FN545816). Para a anotação automática foi utilizado o Prokka (SEEMANN, 2014) e os bancos de dados *C. difficile* personalizados.

Para o multialinhamento do núcleo do genoma, a chamada variante e a filogenia do genoma do núcleo foram utilizadas a ferramenta Harvest Suite (TREANGEN et al, 2014). As sequências PaLoc e TcdB foram extraídas manualmente e alinhadas com MAFFT (KATO, STANDLEY, 2013) ou MUSCLE (EDGAR, 2004). Para estas subsequências, a reconstrução filogenética através da máxima verossimilhança foi feita usando Fasttree (GUINDON et al, 2010).

Para a tipagem por MLST, os arquivos foram escaneados contra o esquema de tipagem PubMLST de Griffiths et al. (2010) usando o script MLST (LARSEN et al, 2012). Este esquema é baseado nos genes *adk*, *atpA*, *tpi*, *glyA*, *dxr*, *sodA* e *recA*.

As sequências foram depositadas em EMBL/GenBank sob o número de acesso SAMN04011654 (ICC-45).

O sequenciamento da cepa ICC45 foi realizado pela prof<sup>a</sup> Dra Adriana Abalen no Laboratório de Genética Experimental, do Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e as sequências foram analisadas pelo prof Dr César Rodríguez do Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia da Faculdade de Microbiologia da Universidad da Costa Rica (UCR).

#### **4.4 Expressão proteica das toxinas (toxinas A e B) de *C. difficile* por *Western Blotting***

As cepas de *C. difficile* (ICC45, NAP1 LIBA5756, NAP4) foram cultivadas durante 24 horas em 100 ml de caldo de TYT em uma câmara anaeróbia.

A síntese das toxinas foi quantificada por meio de *Western Blotting* a partir dos sobrenadantes bacterianos sem células concentrados por precipitação com metanol/clorofórmio (KUEHNE et al, 2010). Para este fim, 20-40 µg de proteínas foram preparadas e corridas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 7,5% em 150V por 2 horas. Após a corrida, foi realizada a transferência por eletroforese para a membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno). Após esta etapa, as membranas serão bloqueadas e incubadas *overnight* com anticorpos monoclonais anti-TcdA (TTC8) ou anti-TcdB (2CV) (tgcBIOMICS). Em seguida as membranas foram incubadas com a adição de um anticorpo feito em cabra anti rato conjugado de IgG e anti rato IgG peroxidase (Invitrogen) e o substrato



de Lumi-Light Plus *Western Blotting* (Roche) e os sinais de quimioluminescência emitidos foram registrados pelo equipamento ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

#### **4.5 Expressão gênica de fatores de virulência na forma planctônica de *C. difficile***

A expressão dos genes dos fatores de virulência foi realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real. Os primers utilizados foram os referentes aos seguintes genes: toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*), adesinas (*cwp84*), proteínas flagelares (*fliA*, *fliC*, *fliD*) e esporos (*spo0A*).

As cepas de *C. difficile* foram cultivadas durante 24 horas em 100 ml de caldo de BHI suplementado em uma câmara anaeróbia.

O RNA foi isolado a partir de *pellets* bacterianos obtidos após a centrifugação da cultura (11500 rpm por 2 minutos) usando o kit comercial SV Total RNA Isolation System (PROMEGA). Após a extração do RNA foi feita a dosagem e a qualidade do RNA utilizando o Nanodrop.

Para a síntese de cDNA, 800ng de RNA total foi convertida em cDNA usando kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

As amostras de cDNA foram diluídas 1:4 em água livre de nuclease e utilizadas para qPCR.

O kit SYBR Green PCR master mix (Life Technologies) foi usado na amplificação dos genes avaliados. Os valores de Threshold cycle (C<sub>q</sub> ou C<sub>t</sub>), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Microsoft Office Excel 2010, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001). O gene 16S rRNA foi utilizado como um gene de controle interno (ALDAPE et al, 2015). As sequências dos *primers* que foram utilizados para qPCR estão listadas na Tabela 1.

As análises foram realizadas no equipamento CFX96 Real Time PCR (BioRad).

Tabela 1. Sequências dos *primers* dos fatores de virulência de *C. difficile* para qPCR.

	<i>Primers</i>	Tamanho do produto (pb)
<i>tcdA</i>	5' CAGGGCTAATAGTTTGTTTACAGAACA 3' 5' CAACATCTAAATATACTCCGCCAAAA 3'	143
<i>tcdB</i>	5' AGCAGTTGAATATAGTGGTTTAGTTAGAGTTG 3' 5' CATGCTTTTTTAGTTTCTGGATTGAA 3'	144
<i>tcdC</i>	5' GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCC 3' 5' TGAAAGACGACGAAAAGAAAGC 3'	150
<i>cdtA</i>	5' GATCTGGTCCTCAAGAATTTGGTT 3' 5' GCTTGTCTTCCCATTTTCGATT 3'	103
<i>cdtB</i>	5' AAAAGCTTCAGGTTCTTTTGACAAG 3' 5' TGATCAGTAGAGGCATGTTCAATTG 3'	132
<i>fliA</i>	5' TGGAGTCATTGGATTGATTGATG 3' 5' ACTTTAGTTAGATTATGTTTAGAAATTGG 3'	150
<i>fliC</i>	5'AGAATTAAGAGAGCTGCTGACGA3' 5'ACCAGTTTCTTCCAATGCACC3'	150
<i>fliD</i>	5'AGCGAGATGACAGGCGAATT3' 5'TTTGTTCCCACCAGCATCAG3'	150
<i>cwp84</i>	5'CACCAGTTGCCACCATCTT3' 5'TTGGTCTTACTACACCAGCA3'	150
<i>spo0A</i>	5' AGCGCAATAAATCTAGGAGCA 3' 5' AGGTTTTGGCTCAACTTGTGT 3'	117
16S rRNA	5' AGCGGTGAAATGCGTAGATAT 3' 5' CAG CGTCAGTTACAGTCCAGA 3'	_____

#### 4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 6.0, utilizando os testes adequados, ANOVA e Tukey. O nível de significância adotado será de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

## 5 RESULTADOS

Durante o período de coleta de amostras (maio de 2013 a novembro de 2014), foram coletadas 48 amostras de fezes diarreicas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará. Dessas amostras, 48% (23/48) foram positivas para presença das toxinas A/B por ELISA e/ou cultura do *C. difficile* e foram obtidos quatro isolamentos de *C. difficile* (17%, 4/23).

As cepas isoladas (ICC01, ICC05, ICC14 e ICC45) foram processadas e realizadas análises de detecção dos genes das toxinas e do fragmento do gene *tpi* (identificação definitiva), e em todos os isolados foram detectados os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*. O domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) só foi detectado em uma cepa, a ICC45, mas não foram observadas deleções no gene *tcdC* em nenhum isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização molecular das cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará (2013-2014).

Identificação dos isolados*	Perfil toxigênico*	Pulsotipo*	Ribotipo	Toxinotipo	Período de isolamento*
<b>ICC01</b> feminino, 68, CA de reto	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB-</i> , sem deleções <i>tcdC</i>	NAP4	014/020	XVIII	Maio 2013
<b>ICC05</b> masculino, 63, CA de bexiga	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB-</i> , sem deleções <i>tcdC</i>	NAP4	014/020	XVIII	Junho 2013
<b>ICC14</b> feminino, 37, Linfoma de Burkitt	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB-</i> , sem deleções <i>tcdC</i>	NAP4	014/020	XVIII	Agosto 2013
<b>ICC45</b> feminino, 34, CA de mama	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtB+</i> , sem deleções <i>tcdC</i>	Novo	Novo	IXb	Agosto 2014

\*Esses dados das cepas (ICC01, ICC05, ICC14) foram publicados em COSTA, 2014.

CA – câncer

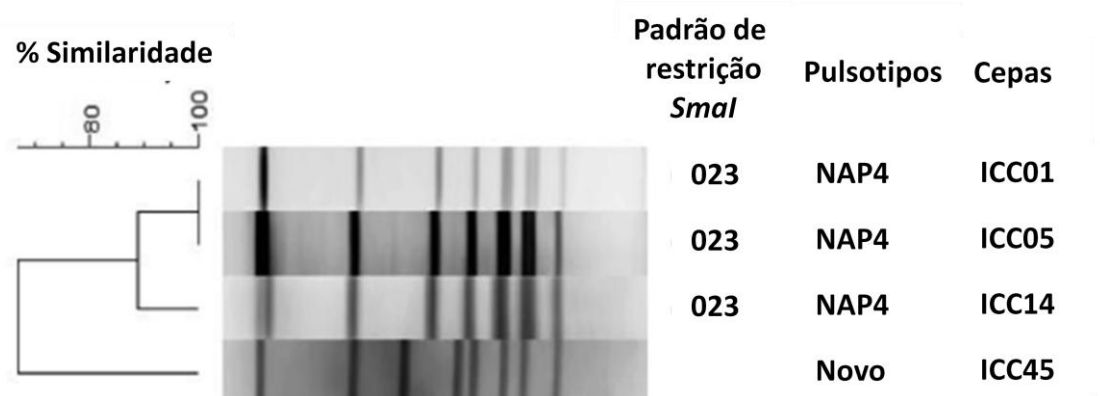
Perfil toxigênico – *tcdA* (enteroxina TcdA), *tcdB* (enterotoxina TcdB), *cdtB* (domínio de ligação da toxina binária) e *tcdC* (gene regulador negativo que controla a produção de TcdA e TcdB).

A cepa ICC45 foi isolada de uma paciente do sexo feminino de 34 anos, diagnosticada inicialmente com câncer de mama e posteriormente com metástase no sistema nervoso. Esta paciente foi submetida à radioterapia e completou um ciclo de quimioterapia com Herceptin (Trastuzumab). A diarreia começou 16 dias após a hospitalização e foi tratada

com meropenem e vancomicina, evoluindo, no entanto, para o óbito após 54 dias de internação e ainda com diarreia. O isolamento da cepa de *C. difficile* foi realizado em agosto de 2014 (Tabela 2).

A análise molecular PFGE revelou que esses isolados clínicos (Tabela 2) pertencem a dois padrões de macrorrestrrição PFGE diferentes, sendo que três cepas de *C. difficile* foram caracterizadas pelo genótipo NAP4 e ribotipo 014/020, e o quarto isolado, a cepa ICC45, não foi caracterizado com genótipo e ribotipo conhecidos, e, portanto, deu origem a um novo padrão *SmaI* e a um novo ribotipo (SLO231/UK[CE]821) diferentes dos registrados nos bancos de dados mundial (Figura 7 e Figura 8).

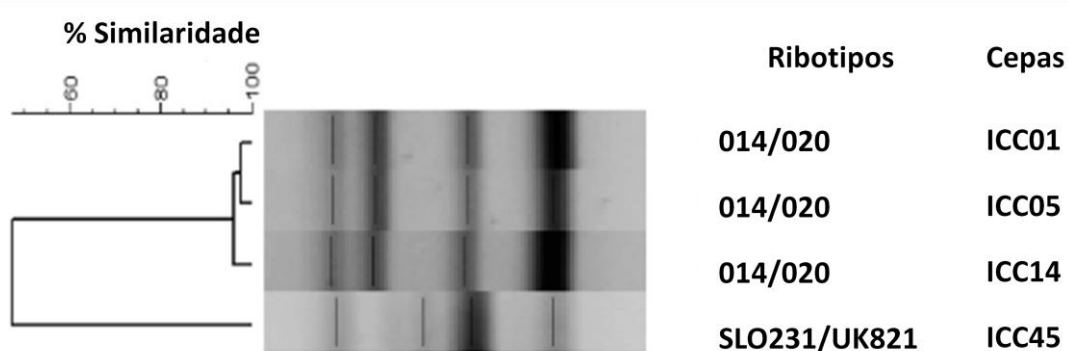
Figura 7 - Padrões de PFGE de cepas de *C. difficile* isoladas no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.



Legenda: Padrões de PFGE de cepas de *C. difficile* isoladas no Hospital Haroldo Juaçaba. Foram detectados dois padrões de macrorrestrrição *SmaI* (enzima de restrição) diferentes e classificados no tipo NAP4 indicado e um tipo NAP previamente não descrito é mostrado (cepa ICC45).

NAP = *North American Pulsotype*

Figura 8 - PCR Ribotipagem das cepas de *C. difficile* isoladas no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.

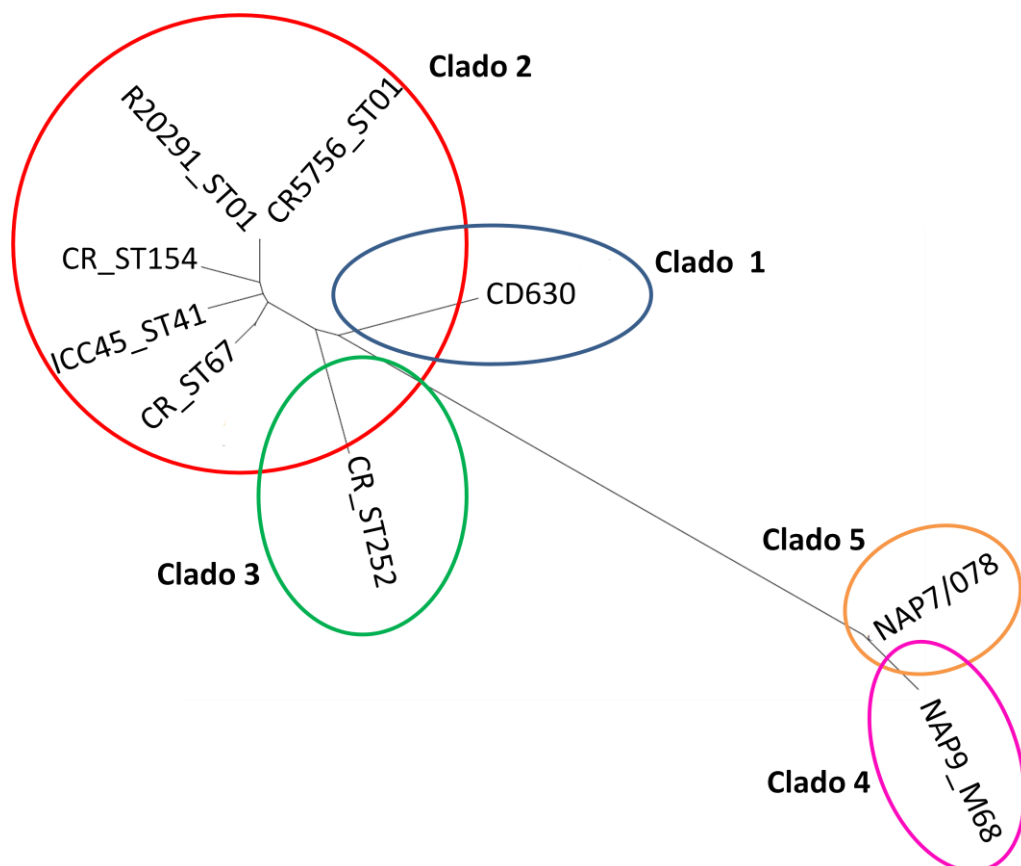


Legenda: Padrões de PCR Ribotipagem foram detectados dois padrões diferentes nos isolados e classificados no ribotipo 014/020 e um ribotipo previamente não descrito é mostrado (cepa ICC45).

A análise de toxinotipagem caracterizou as cepas NAP4/RT014-020 como toxinotipo XVIII e a cepa ICC45 como toxinotipo IXb.

A análise de tipagem de sequência de Multilocus (MLST) revelou a cepa ICC45 como pertencente a ST41 do Clado 2. Congruentemente, uma reconstrução filogenética baseada no polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) confirmou que a cepa ICC45 está intimamente relacionada com as cepas epidêmicas NAP1/027/ST01, como a cepa de referência R20291 e LIBA5756, um isolado clínico de um hospital costarriquenho, bem como para isolados clínicos de tipos de sequência incluídos no Clado 2 (ST41, ST67, ST154 e ST252) (Figura 9).

Figura 9 - Árvore filogenética baseada no genoma do núcleo da cepa de *C. difficile* (ICC45) isolada no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.



Legenda: A árvore filogenética baseada em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do núcleo revelou que a cepa ICC45 está intimamente relacionada às cepas NAP1/027 e isolados clínicos hipervirulentos do Clado 2. Os genomas das cepas de referência R20291 (NAP1/027), M68 (NAP9/017 com toxina B variante) e NAP7/078 foram incluídos para validar os resultados dos métodos de tipagem molecular.

O genoma da cepa ICC45 consiste em um cromossomo circular de 4.282.787 pares de bases e aproximadamente 3 a 5% do genoma consistem em elementos genéticos móveis. Assim como outros genomas sequenciados de outras cepas de *C. difficile* que estão sendo analisados como o da cepa R20291, o genoma da cepa ICC45 ainda está em análise.

Muitas sequências ainda não se tem ideia do que codifica e por isso não foi possível fechar a descrição do genoma completo da ICC45, como existe da única cepa totalmente sequenciada e analisada de *C. difficile* 630. Por isso nesse estudo foi realizado análises com genes específicos como locus de patogenicidade PaLoc, *tcdB*, *slpA*, *gyrA*, *gyrB* que também proporcionaram o desenho das sequências dos *primers* utilizados na análise de expressão gênica relativa.

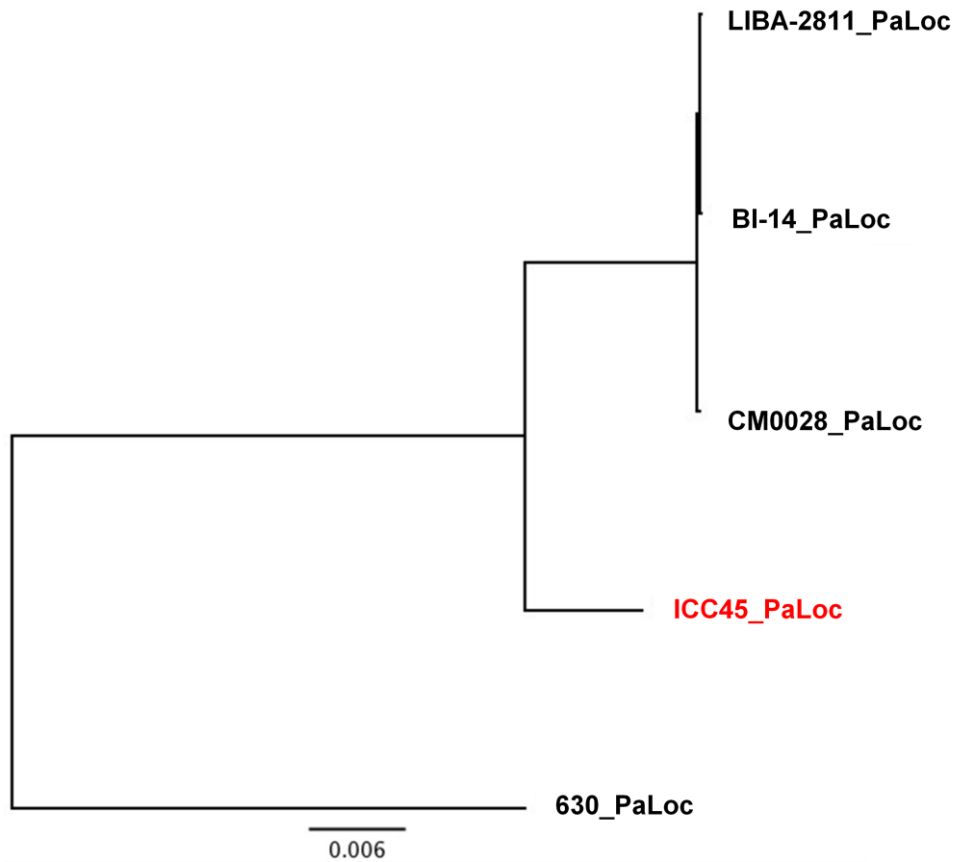
As análises independentes e dependentes do alinhamento confirmaram que o genoma do núcleo e o genoma acessório da cepa ICC45 diferem de outras cepas ST41 classificadas como Ribotipo 244 (RT244) (Tabela 3). Essas diferenças incluem o PaLoc e o gene *slpA* (Figura 10 e Figura 11). Estes *loci* são altamente polimórficos e utilizados na classificação de *C. difficile*. Em ambas as análises, a ICC45 não se agrupa com os outros isolados ST41.

Tabela 3. Descrição genômica de isolados ST41 de diferentes origens e épocas.

<b>Isolados clínicos</b>	<b>ST</b>	<b>Ribotipo</b>	<b>Origem/Ano</b>
LIBA-2811	41	NA	Costa Rica/2003
BI-14	41	UK244	USA/2004
Oxford 1307	41	NA	Oxford/2008
Oxford 2287	41	NA	Oxford/2009
CM0028	41	UK244	UK/2011
C9427_WA0427	41	UK244	Austrália/2011
ICC45	41	SLO231	Brasil/2014

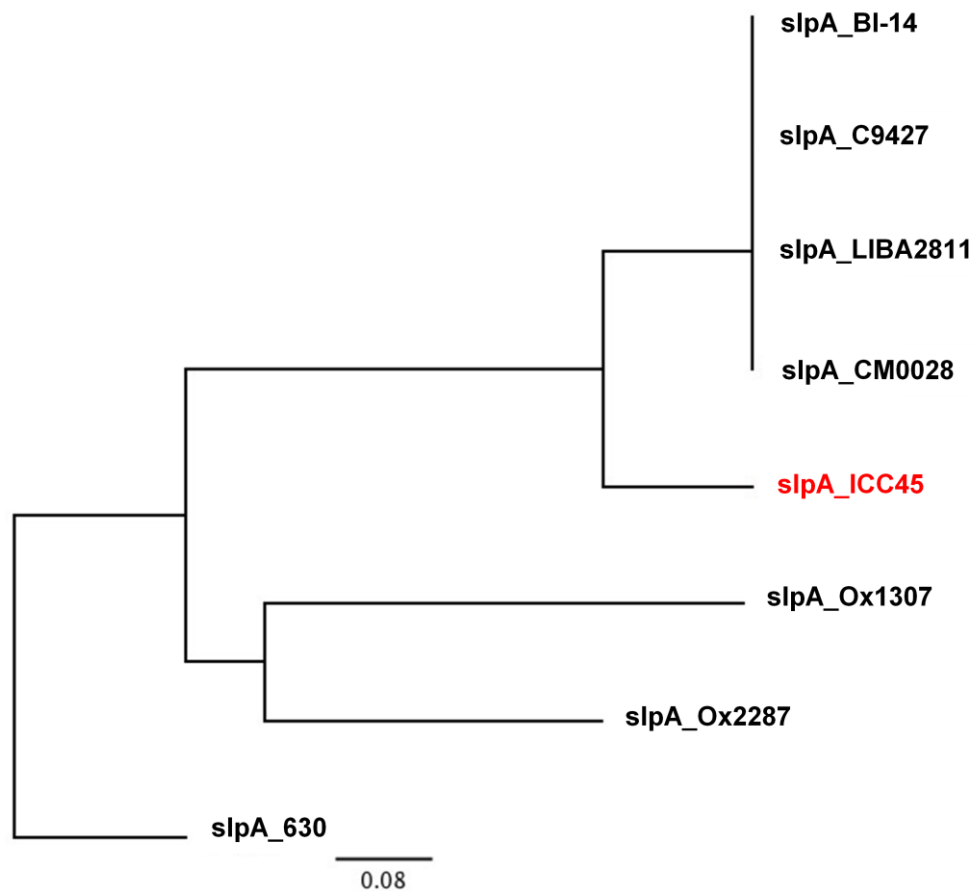
Legenda: NA – não foi realizada a PCR Ribotipagem

Figura 10 - Comparação das sequências PaLoc dos isolados de ICC45 e ST41/RT244 de *C. difficile* (LIBA-2811, BI-14, CM0028).



Legenda: Comparação das sequências PaLoc (lôcus de patogenicidade que contém os genes que codificam as toxinas A e B de *C. difficile*) dos isolados de ICC45 (vermelho) e ST41/RT244 de *C. difficile* (LIBA-2811, BI-14, CM0028). Os alelos da cepa de referência *C. difficile* 630 foram incluídos como outro grupo. Este lócus PaLoc é altamente polimórfico e utilizado na classificação de *C. difficile*.

Figura 11 - Comparação das sequências *slpA* dos isolados de ICC45 e ST41/RT244 de *C. difficile* (LIBA-2811, BI-14, CM0028, C9427).



Legenda: Comparação das sequências *slpA* (proteína de superfície A que auxilia na colonização de *C. difficile* na célula hospedeira) dos isolados de ICC45 (vermelho) e ST41/RT244 de *C. difficile* (LIBA-2811, BI-14, CM0028, C9427). Os alelos da cepa de referência *C. difficile* 630 foram incluídos como outro grupo. *slpA* é altamente polimórfico e utilizado na classificação de *C. difficile*.

Semelhante às cepas NAP1/027, a cepa ICC45 possui *tcdA*, *tcdB* e *ctdB*. No entanto, não apresenta a deleção de 18 pb nem deleção na posição 117 características no *tcdC* das cepas NAP1/027.

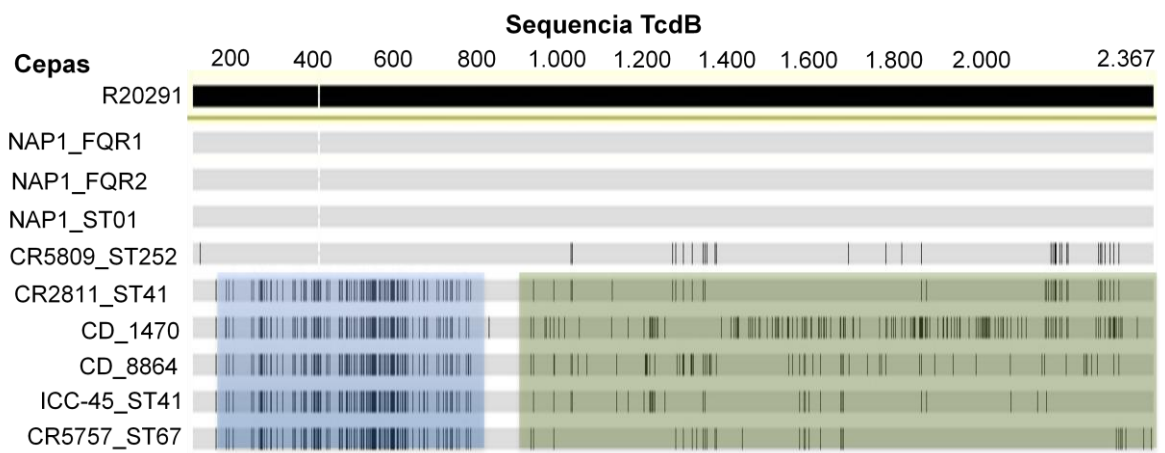
Os padrões de restrição *tcdA* obtidos para ICC45 e NAP1/027 eram idênticos. Em contraste, observamos polimorfismos no fragmento B1 de *tcdB*, que inclui a região catalítica de TcdB, entre as cepas ICC45 e NAP1/027. Assim, o toxintipo de ICC45 (IXb) diferiu do obtido para cepas NAP1/027 (III).

A toxina B da cepa ICC45 se assemelha as sequências TcdB de cepas A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>. Em geral, TcdB da cepa ICC45 apresentou maior identidade às sequências TcdB de cepas que induzem efeitos citopáticos variantes, como TcdB\_8864 (95%) e TcdB\_ST67 (100%), do que as de cepas NAP1/027 (93%). Além disso, mostrou a inserção na posição 311 em TcdB que caracteriza as cepas variantes, mas não as cepas NAP1/027. Em consonância com esta



observação, as regiões de reconhecimento de substratos TcdB das cepas ICC45 e NAP1/027 mostraram apenas 62% da identidade e o domínio enzimático de ICC45 se assemelhou bastante às cepas de variedades TcdB variantes (TcdB\_8864 e TcdB\_ST67) como demonstrado na Figura 12. Por outro lado, os domínios de ligação e autoproteolíticos de TcdB das cepas ICC45 e NAP1/027 mostraram 95% de identidade.

Figura 12 - Alinhamento de sequências de resíduos de aminoácidos de TcdB: i) TcdB variantes das cepas de referência 1470 e 8864 e isolados clínicos das sequências tipos ST41 e ST67 ii) TcdB de ST252 de MLST Clado 2.



Legenda: Os blocos negros representam descentendimentos para a sequência TcdB da cepa R20291, que foi selecionada como referência para o alinhamento. A caixa azul descreve a região da glicosiltransferase e a caixa verde mostra os domínios autoproteolíticos e de repetição do receptor, respectivamente.

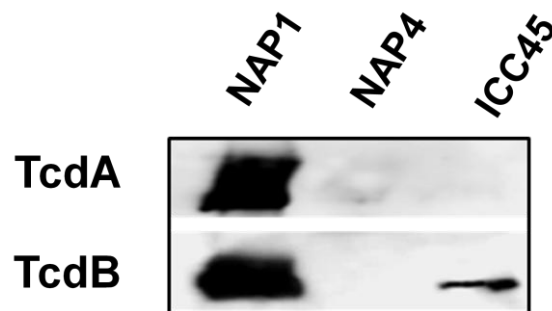
Com relação à sensibilidade aos antimicrobianos, foi verificada que a concentração inibitória mínima (CIM) das fluoroquinolonas para a cepa ICC45 foi inferior aos de CIM já registrados por cepas NAP1/027 (VARDAKAS et al, 2012).

As análises das mutações em *gyrA* e *gyrB* foram realizadas manualmente por meio da comparação do sequenciamento (WGS) da cepa ICC45 com o das cepas de referência *C. difficile* 630 (fluoroquinolona sensível) e R20291 (fluoroquinolona resistente). Portanto a sensibilidade da cepa ICC45 as fluoroquinolonas concorda com a ausência da transição Thr82Ile em *gyrA* que distingue das cepas NAP1/027. Não foram detectadas mutações em *gyrB*, dado obtido por meio do sequenciamento da cepa.

Além disso, a cepa ICC45 foi resistente a ceftriaxona (> 32 µg/mL) e clindamicina (8 µg/mL), mas sensível a metronidazol (0,032 µg/mL), vancomicina (1 µg/mL), rifampicina (<0,002 µg/mL), moxifloxacina (2 µg/mL) e levofloxacina (2 µg/mL).

A expressão das toxinas A e B quantificadas por meio de *Western Blotting* após 24 horas de crescimento *in vitro*, demonstrou que a quantidade de TcdA nos sobrenadantes de ICC45 e NAP4/014-020 foi bastante baixa. Em contraste, os níveis de TcdB na cepa ICC45 foram maiores do que em uma cepa NAP4/014-020. Foram detectadas altas concentrações de ambas as toxinas nos sobrenadantes NAP1/027 (LIBA5756) (Figura 13).

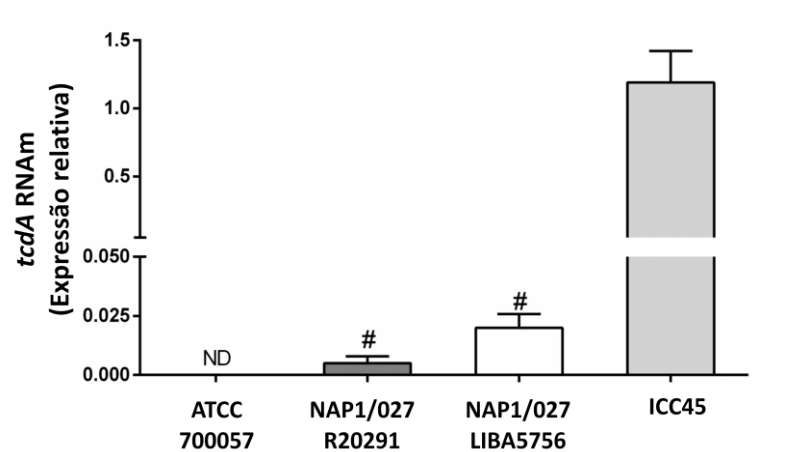
Figura 13 - Expressão das toxinas A e B secretadas pelas cepas de *C. difficile* ICC45, NAP4/014-020 e NAP1/027 (LIBA5756).



Legenda: Quantidade de toxinas secretadas pelas cepas. As proteínas de sobrenadantes bacterianos obtidos após 24 h de crescimento das cepas de *C. difficile* em caldo TYT anaerobiamente e que foram concentradas e quantificadas por Western Blotting.

As análises de expressão gênica relativa mostraram que os genes *tcdA*, *tcdB* e *tcdC* não foram expressos pela ATCC 700057 (não toxigênica), enquanto a expressão *tcdA* foi maior na cepa ICC45 do que na NAP1 LIBA5756 e NAP1 R20291 ( $p < 0,006$ ) (Figura 14), a expressão de *tcdB* também foi maior na cepa ICC45 do que na NAP1 LIBA5756 e NAP1 R20291 ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado na Figura 15.

Figura 14 - Expressão gênica relativa do gene *tcdA* das cepas de *Clostridioides difficile*.

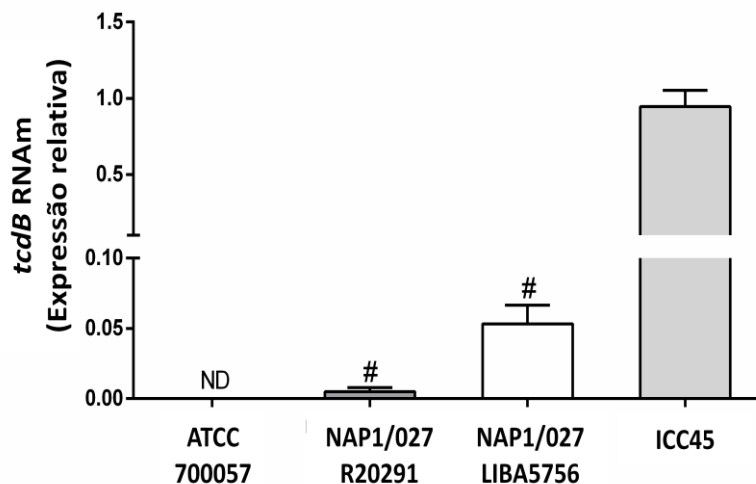


Legenda: ATCC 700057 (não toxigênica) não expressou RNAm *tcdA*. Houve uma maior expressão de *tcdA* por ICC45 e quando comparadas as cepas NAP1/027 teve diferença significativa. Não houve diferença significativa de expressão entre as cepas NAP1/027 R20291 e LIBA 5756.

ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

Figura 15 - Expressão gênica relativa do gene *tcdB* das cepas de *Clostridioides difficile*.



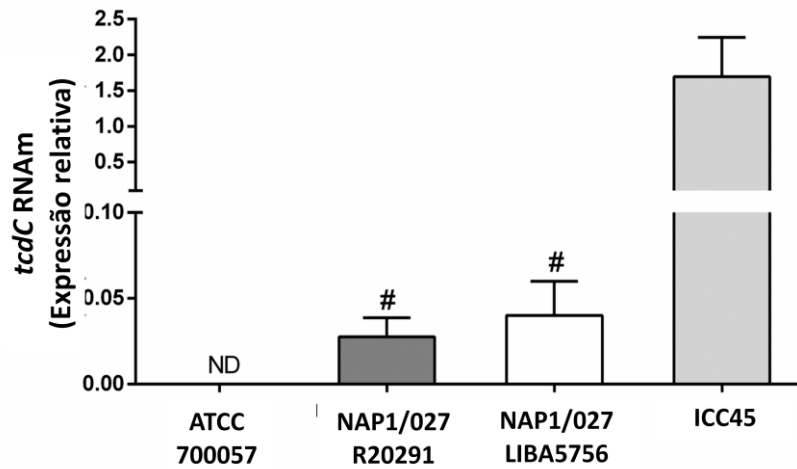
Legenda: ATCC 700057 (não toxigênica) não expressou RNAm *tcdB*. Houve uma maior expressão de *tcdB* por ICC45 e quando comparadas as cepas NAP1/027 teve diferença significativa. Não houve diferença significativa de expressão entre as cepas NAP1/027 R20291 e LIBA 5756.

ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

A expressão relativa de *tcdC* foi maior na cepa ICC45 do que na NAP1 LIBA5756 e NAP1 R20291 ( $p < 0,006$ ), como representado na Figura 16.

Figura 16 - Expressão gênica relativa do gene *tcdC* das cepas de *Clostridioides difficile*.



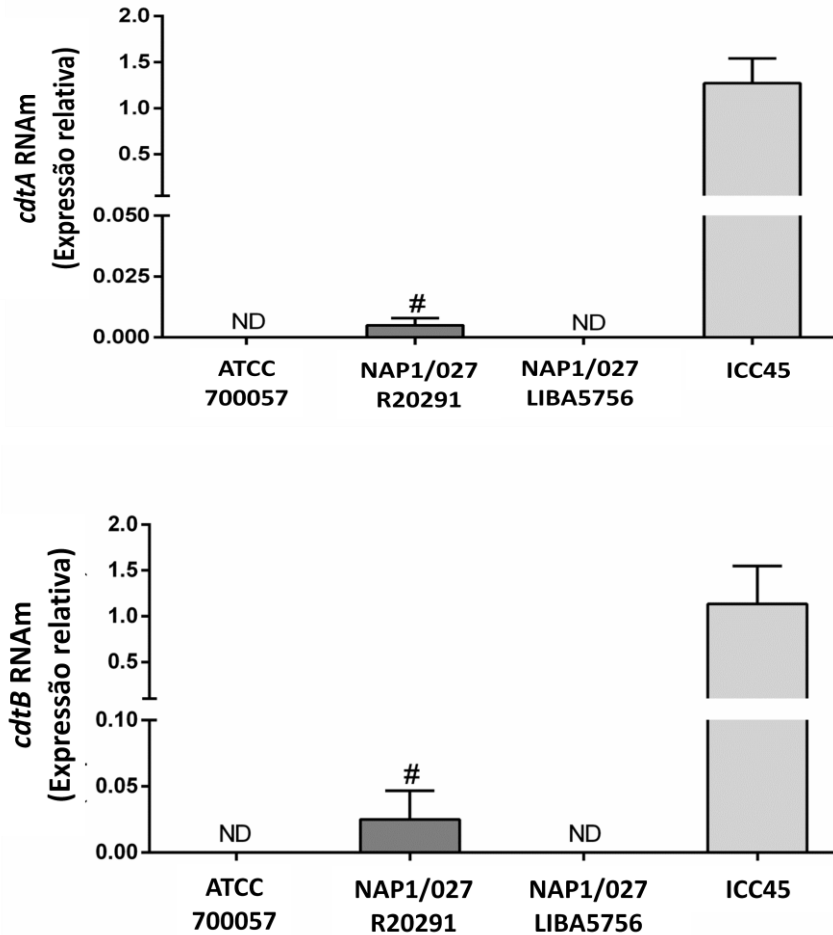
Legenda: ATCC 700057 (não toxigênica) não expressou RNAm *tcdC*. Houve uma maior expressão de *tcdC* por ICC45 e quando comparadas as cepas NAP1/027 teve diferença significativa. Não houve diferença significativa de expressão entre as cepas NAP1/027 R20291 e LIBA 5756.

ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

Os genes *cdtA* e *cdtB* não foram expressos pela ATCC 700057 (não toxigênica) nem pela NAP1 LIBA5756, enquanto a expressão *cdtA* foi maior na cepa ICC45 do que na cepa NAP1 R20291 ( $p < 0,003$ ) e a expressão de *cdtB* também foi maior na cepa ICC45 do que na cepa NAP1 R20291 ( $p < 0,02$ ), como demonstrado na Figura 17.

Figura 17 - Expressão gênica relativa dos genes da toxina binária *cdtA* e *cdtB* das cepas de *Clostridioides difficile*.



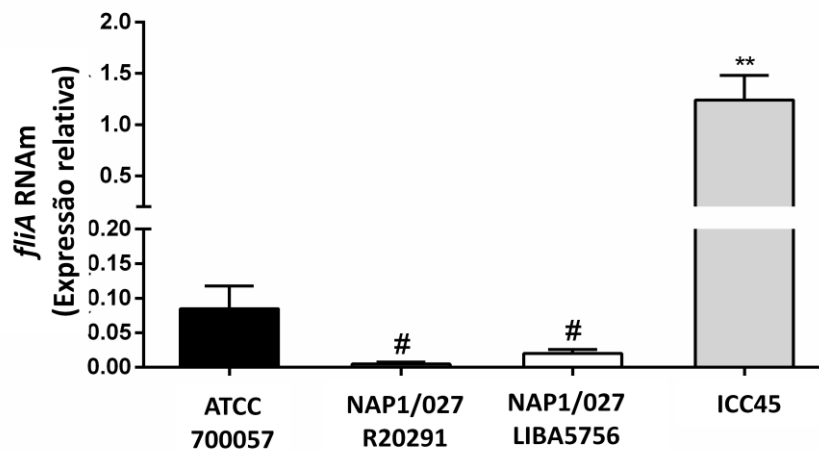
Legenda: ATCC 700057 (não toxigênica) e a cepa NAP1/027 LIBA5756 não expressaram RNAm *cdtA* e *cdtB*. Houve uma maior expressão de *cdtA* por ICC45 e quando comparadas a cepa NAP1/027 R20291 teve diferença significativa.

ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

ICC45 exibiu um aumento na expressão de *fliA* ( $p < 0,0001$ ) em comparação com NAP1 LIBA5756, NAP1 R20291 e ATCC 700057 (Figura 18). Os genes *fliC* e *fliD* não foram expressos por NAP1 LIBA5756, NAP1 R20291 e ATCC, apenas foram expressos por ICC45 (Figura 19 e Figura 20, respectivamente).

Figura 18 - Expressão gênica relativa do gene *fliA* das cepas de *Clostridioides difficile*.



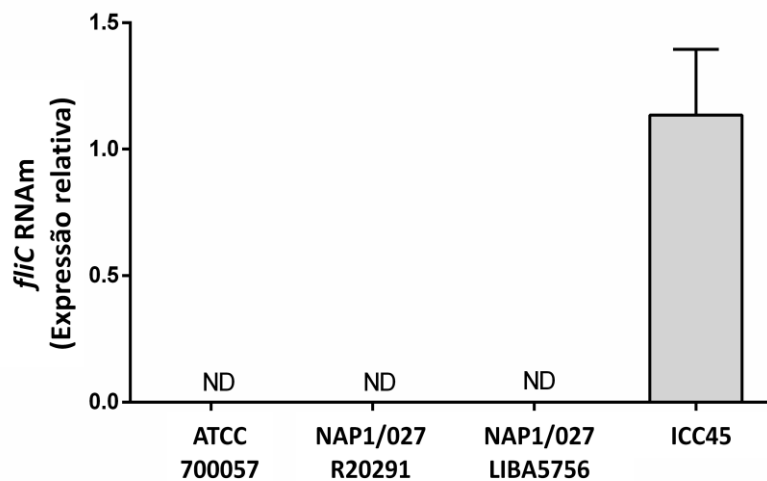
Legenda: A expressão de RNAm *fliA* foi maior pela cepa ICC45 e quando comparadas as cepas NAP1/027 e ATCC 700057 teve diferença significativa. Não houve diferença significativa de expressão entre as cepas NAP1/027 R20291 e LIBA 5756 e ATCC 700057.

ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

\*\* resultado significativo quando comparado a ATCC 700057

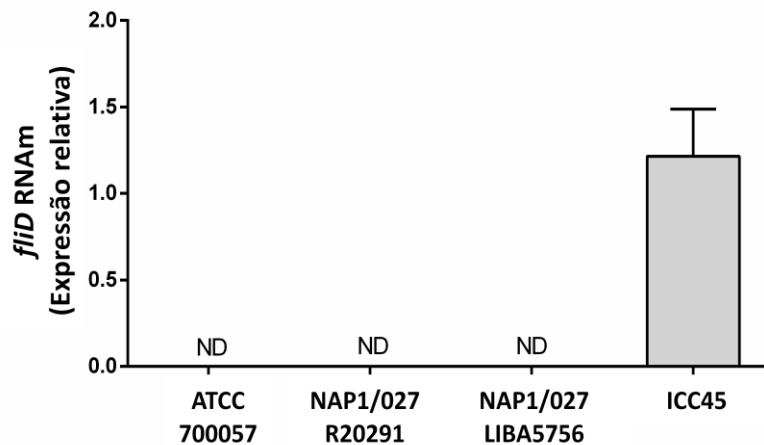
Figura 19 - Expressão gênica relativa do gene *fliC* das cepas de *Clostridioides difficile*.



Legenda: Apenas a cepa ICC45 expressou RNAm *fliC*.

ND = não determinado

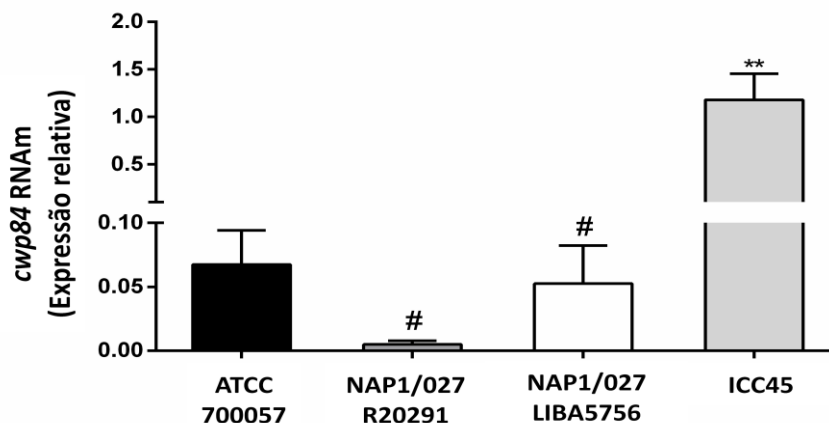
Figura 20 - Expressão gênica relativa do gene *fliD* das cepas de *Clostridioides difficile*



Legenda: Apenas a cepa ICC45 expressou RNAm *fliD*.  
ND = não determinado

A expressão de *cwp84* foi maior na cepa ICC45 do que na NAP1 LIBA5756, NAP1 R20291 e ATCC ( $p < 0,0001$ ). Não foram encontradas diferenças significativas na expressão entre NAP1 LIBA5756, NAP1 R20291 e ATCC, como demonstrado na Figura 21.

Figura 21 - Expressão gênica relativa do gene *cwp84* das cepas de *Clostridioides difficile*.



Legenda: A expressão de RNAm *cwp84* foi maior pela cepa ICC45 e quando comparadas as cepas NAP1/027 e ATCC 700057 teve diferença significativa. Não houve diferença significativa de expressão entre as cepas NAP1/027 R20291 e LIBA 5756 e ATCC 700057.

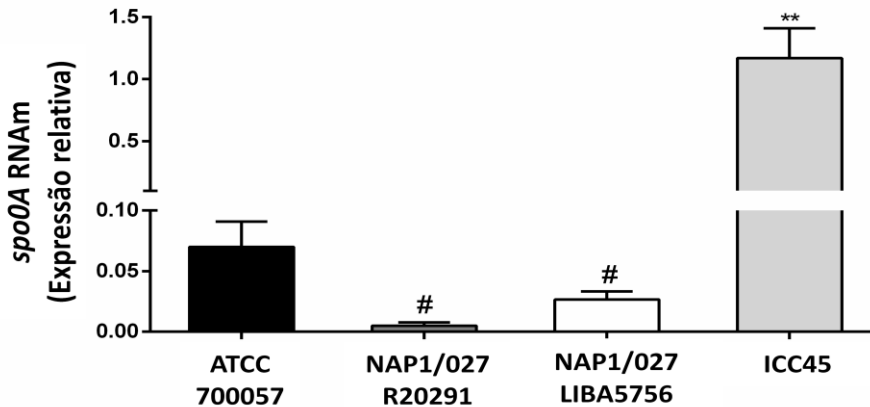
ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

\*\* resultado significativo quando comparado a ATCC 700057

ICC45 também mostrou maior expressão relativa de *spo0A* em comparação com NAP1 LIBA5756, NAP1 R20291 e ATCC ( $p < 0,0002$ ), como representado na Figura 22.

Figura 22 - Expressão gênica relativa do gene *spo0A* das cepas de *Clostridioides difficile*.



Legenda: A expressão de RNAm *spo0A* foi maior pela cepa ICC45 e quando comparadas as cepas NAP1/027 e ATCC 700057 teve diferença significativa. Não houve diferença significativa de expressão entre as cepas NAP1/027 R20291 e LIBA 5756 e ATCC 700057.

ND = não determinado

# resultado significativo quando comparado a ICC45

\*\* resultado significativo quando comparado a ATCC 700057



## 6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que 48% (23/48) das amostras de fezes diarreicas de pacientes internados no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, durante o período de maio de 2013 a novembro de 2014, foram positivas para presença das toxinas A/B por ELISA e/ou cultura do *C. difficile*.

Foram obtidos quatro isolados de *C. difficile* (17%, 4/23). A identificação molecular das cepas isoladas ICC01, ICC05, ICC14 foi a mesma. Todas pertenciam ao mesmo genótipo toxigênico NAP4 (*tcdA+* e *tcdB+*), ribotipo 014/020 e toxinotipo XVIII. Enquanto a cepa ICC45 representa um novo padrão de macrorrestrição PFGE (*tcdA+*, *tcdB+*, *cdtB+*) e um novo ribotipo SLO231/UK [CE] 821.

A tipagem molecular é uma ferramenta essencial para monitorar infecções e surtos de *Clostridioides difficile* nas instalações de saúde, desempenhando um papel fundamental na definição das mudanças regionais e globais nos tipos circulantes de *C. difficile*.

Os padrões dos tipos de *C. difficile* que circulam na Europa (e globalmente) continuam mal compreendidos, embora haja esforços internacionais para entender esses padrões espaciais e temporais dos tipos de *C. difficile* e essa compreensão seja essencial para investigar adequadamente os fatores de risco específicos para infecções por *C. difficile* (CDI) e acompanhar a transmissão de longo prazo (KNETSCH et al, 2013).

NAP4 (genótipo das cepas isoladas ICC01, ICC05, ICC14) tem sido um genótipo comum para CDI associado a ambientes hospitalares, embora tenha se tornado menos comum nos últimos anos, já que na maioria dos estudos a cepa hipervirulenta, NAP1, foi a mais identificada (LIMBAGO et al, 2009; SEE et al, 2014). O ribotipo 014/020 está amplamente distribuído em todo o mundo e é um dos principais ribotipos que causa CDI na comunidade europeia (BAUER et al, 2011; JANEZIC et al, 2012). O ribotipo 014 também foi descrito no Brasil (BALASSIANO et al., 2009; SECCO et al., 2014, SILVA et al., 2015).

Diferentemente dos outros isolados, a cepa ICC45 pertence ao grupo de cepas ST41 segundo análise de tipagem de sequência de Multilocus (MLST) sendo, portanto, filogeneticamente relacionado com cepas NAP1/027/ST01 e outras cepas pertencentes ao MLST Clado 2 da linhagem hipervirulenta postulada por Griffiths et al. (2010). Curiosamente, as cepas deste clado foram relatadas na Austrália (cepa DLL3110 da RT244/ST41) (LIM et al, 2014) e recentemente na América Latina, conforme confirmado por este estudo e pela descoberta de outras cepas dos tipos de sequência 41, 67, 154 e 252 em hospitais da Costa Rica (dados não publicados).

Os padrões de restrição *tcdA* obtidos para ICC45 e NAP1/027 eram idênticos. Em contraste, observamos polimorfismos no fragmento B1 de *tcdB*, que inclui a região catalítica de TcdB, entre as cepas ICC45 e NAP1/027. Assim, o toxinotipo de ICC45 (IXb) diferiu do obtido para cepas NAP1/027 (III). Toxinotipo IXb é o toxinotipo da cepa isolada na Austrália Ribotipo 244 e é semelhante à cepa de referência do toxinotipo IX nos principais fragmentos B1 e A3 (regiões mais variáveis em *tcdB* e *tcdA*, codificando para o domínio catalítico e de ligação, respectivamente). Essa distribuição adicional em subtipos, designada de IXa a IXd, é baseada em *HindIII* em RFLP da região B2 do gene *tcdB* (JANEZIC et al, 2016).

Embora a cepa ICC45 não tenha algumas características que tenham sido associadas ao aumento da virulência da cepa epidêmica NAP1/027, como deleção em *tcdC*, superprodução de toxinas e resistência à fluoroquinolonas, induz inflamação e estresse oxidativo em níveis comparáveis aos induzidos por sobrenadantes de NAP1/027 (COSTA et al, 2016). O desfecho fatal da paciente, juntamente com as respostas induzidas pela cepa ICC45 no modelo de alça ileal murino (COSTA et al, 2016), sugerem que essa cepa possui um aumento do potencial patogênico.

Uma possível explicação para o aumento do potencial patogênico da cepa ICC45 no modelo de alça ileal é a produção de uma TcdB variante. De fato, isolados de cepas TcdA-/TcdB+, isto é cepas que produzem apenas toxina B e produzem uma toxina B variante, causaram epidemias em vários países asiáticos (COLLINS; HAWKEY; RILEY, 2013; DU et al, 2014). Dois fatos importantes reforçam essa hipótese: (i) a toxina B recentemente foi proposta como o principal fator de virulência na CDI e um fator primário para a indução de respostas imunes e inflamatórias inatas do hospedeiro (CARTER et al, 2015) e (ii) outros isolados da MLST Clado 2 de síntese TcdB variantes, como a cepa australiana RT244/ST41 (LIM et al, 2014), foram associadas a doença grave.

Especula-se que ICC45, mesmo produzindo menos TcdB do que as cepas NAP1/027, cause lesão inflamatória semelhante a essa última em modelo animal (Costa et al., 2016) devido as variações no seu domínio de reconhecimento de substrato e domínio catalítico. Foi relatado que TcdB variante modifica GTPases que não são glicosiladas por outras TcdBs (CHAVES-OLARTE et al, 2003). Além disso, o impacto de diferentes modificações do substrato na patogênese de *C. difficile* foi explorado recentemente, uma vez que se observou um padrão mais amplo de glicosilação de GTPases por TcdB a partir de cepas MLST Clado 2, como NAP1/027/ST01 e NAP1/019/ST67 (QUESADA-GOMÉZ et al, 2016), este efeito pode ter um impacto diverso na resposta inflamatória e no dano epitelial.

Outro fator compartilhado entre cepas ICC45 e NAP1/027 é a produção de CDT. Embora o papel da CDT ainda não seja totalmente compreendido, recentemente descreveu-se que as cepas TcdB negativas que abrigam CDT induzem CDI em um modelo de infecção animal (CARTER et al, 2015), e essas cepas também têm uma virulência aumentada quando comparadas às negativas para CDT (KUEHNE et al, 2014). De qualquer forma, é altamente improvável que a TcdA desempenhe um papel importante no aumento do potencial patogênico observado na cepa ICC45 comparado a NAP1/027, uma vez que o isolado desse estudo, produz baixas quantidades desta toxina.

O sequenciamento do genoma completo de patógenos bacterianos atingiu uma escala e confiabilidade de alto rendimento para definir com precisão a história natural e as estruturas populacionais globais das linhagens virulentas e epidêmicas. Embora seu uso e aplicação permaneçam limitados a instalações selecionadas, dentre alguns fatores devido ao alto custo, se tornará uma ferramenta importante para a vigilância e epidemiologia de *C. difficile* nos próximos anos (KNETSCH et al, 2013).

O genoma da cepa ICC45 consiste em aproximadamente 3 a 5% em elementos genéticos móveis. A cepa 630, única cepa de *C. difficile* totalmente sequenciada e analisada, indica que uma grande proporção (11%) do genoma consiste em elementos genéticos móveis, principalmente na forma de transposons conjugados. Esses elementos móveis são responsáveis pela aquisição por *C. difficile* de uma ampla gama de genes envolvidos na resistência antimicrobiana, virulência, interação do hospedeiro e a produção de estruturas superficiais que mostram múltiplas adaptações para sobrevivência e crescimento dentro do ambiente intestinal (SEBAIHIA et al, 2006).

Apesar de ter o sequenciamento completo da cepa ICC45 ele ainda não foi completamente analisado. Foi realizada a análise de regiões do genoma ou genes específicos que tem maior significado na patogenicidade da doença como as sequências PaLoc e TcdB que foram extraídas manualmente do genoma para estudo comparativo com outras cepas e dentre elas a cepa NAP1/027.

O PaLoc é um locus altamente polimórfico utilizado na classificação de *C. difficile*, e em análise comparativa das sequências de PaLoc de ICC45 com as sequências de outras cepas pertencente ao ST41, a cepa ICC45 não se agrupa com os outros isolados ST41, mostrando que por mais que pertença ao mesmo grupo apresenta variações genéticas.

A exposição a antimicrobianos é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de CDI (DePESTEL; ARONOFF, 2013). As cepas isoladas nesse estudo apresentaram sensibilidade aos antibióticos de escolha para o tratamento dessa infecção,

metronidazol e vancomicina, e resultados semelhantes foram relatados em outros estudos (BALASSIANO et al, 2010; RODRÍGUEZ-PARDO et al, 2013).

Várias classes de antimicrobianos aumentam o risco de desenvolvimento de CDI, como lincosamidas (clindamicina), cefalosporinas e fluoroquinolonas (OWENS et al, 2008; BLONDEAU, 2009; DESHPANDE et al, 2013). ICC45 foi resistente à clindamicina o que está de acordo com outros estudos que relatam resistência a esse antibiótico (OWENS et al, 2008; SECCO et al, 2014).

O uso de cefalosporinas de terceira geração como cefotaxime e ceftriaxona também está associado a um alto risco de desenvolvimento de CDI (OWENS et al, 2008; BLONDEAU, 2009). Geralmente, os isolados de *C. difficile* são resistentes à maioria das cefalosporinas (OWENS et al, 2008; CARROLL; BARTLETT, 2011). Nesse estudo ICC45 foi resistente a ceftriaxona.

Todas as fluoroquinolonas têm sido relacionadas a CDI, incluindo a levofloxacina, moxifloxacina e ciprofloxacina. O aumento do risco associado a fluoroquinolona foi concomitante com o aumento da incidência da cepa hipervirulenta de *C. difficile* (BI/NAP1/027) e de outras cepas que carregam alto nível de resistência à esse antimicrobiano (OWENS et al, 2008; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). A resistência à fluoroquinolona é tipicamente atribuída a mutações em *gyrA* e *gyrB*. Uma mutação na posição nucleotídica 82 (substituição T→I) em *gyrA* é a causa da resistência à fluoroquinolonas na maioria das cepas europeias (ZHOU et al, 2014). Nesse estudo ICC45 foi sensível a levofloxacina e a moxifloxacina resultado de acordo com a ausência de mutações em *gyrA* e *gyrB* também analisadas nesse estudo.

A análise da expressão gênica relativa de genes específicos para fatores de virulência (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*, *fliA*, *fliC*, *fliD*, *cwp84*, *spo0A*) mostrou que a cepa ICC45 teve uma expressão elevada comparada as outras cepas estudadas ATCC 700057 e NAP1/027 (R20291 e LIBA5756).

A capacidade de se adaptar de forma eficiente a uma ampla gama de mudanças ambientais, especialmente a alterações na qualidade nutricional, é uma característica universal no mundo bacteriano. Em muitas bactérias patogênicas, a adaptação a um ambiente alterado é frequentemente associada à ativação da transcrição de genes de virulência, portanto, muitos genes de virulência são regulados por sinais ambientais e nutricionais sugerindo uma estreita ligação entre metabolismo e virulência (BOUILLAUT et al, 2015).

A expressão relativa dos genes das toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*), binária (*cdtA* e *cdtB*) foi mais elevada na cepa ICC45 do que nas cepas NAP1/027 (R20291 e LIBA5756).

Entretanto a expressão proteica das toxinas A e B foi mais elevada na cepa NAP1/027 (LIBA5756) que na ICC45. Bouillaut e colaboradores (2015) relatam que a expressão dos genes das toxinas é induzida, e as proteínas das toxinas se acumulam dentro da célula e são lentamente liberadas ao longo de várias horas. Dessa forma pode ser que as cepas NAP1/027 (LIBA5756) e ICC45 tenham uma cinética diferente de expressão gênica e liberação de toxinas. Mais estudos comparativos da cinética da expressão gênica e proteica das toxinas são necessários para o esclarecimento dessa hipótese.

Em relação aos genes flagelares, o gene *fliA* foi expresso por todas as cepas mas com uma maior expressão pela cepa ICC45. O gene *fliA* controla a expressão de genes flagelares de fase tardia a partir do locus F1, como genes que codificam a flagelina, *fliC*, e a proteína flagelar CAP, *fliD*. Os genes *fliC* e *fliD* só foram expressos por ICC45. Esses resultados mostram vários padrões de expressão flagelar entre as cepas de *C. difficile*, o que concorda com estudos que afirmam que a expressão flagelar é altamente variável entre cepas de *C. difficile* (ABT, MCKENNEY; PAMER, 2016). A alta expressão por ICC45 dos genes flagelares em estudo *fliA*, *fliC* e *fliD* pode estar relacionada com o nível de virulência dessa cepa. Estudos mostram que cepas mutantes que não possuem componentes da maquinaria flagelar exibem a expressão das toxinas desregulada e a correspondente alteração de virulência *in vivo*, o que sugere uma ligação entre a expressão flagelar e a regulação da toxina (AUBRY et al, 2012; ABT, MCKENNEY; PAMER, 2016).

Todas as cepas em estudo expressaram o gene *cwp84*. Cwp84 é responsável pela clivagem de SlpA, adesinas essenciais na colonização e desenvolvimento da infecção por *C. difficile* (JANOIR, 2016).

Spo0A é um fator de transcrição que é ativo nos estágios iniciais da esporulação em *C. difficile* e em outras bactérias esporulantes (PETTIT et al, 2014). Estudos indicam que *spo0A* é expresso durante tanto o crescimento exponencial como o estacionário por *C. difficile*. Todas as cepas em estudo expressaram o gene *spo0A*, tendo uma maior expressão por ICC45. Os esporos de *C. difficile* atuam na dinâmica e persistência da infecção no ambiente, pois os esporos de *C. difficile* são altamente resistentes à dessecação e podem persistir em superfícies por meses. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que as cepas hipervirulentas esporulam mais do que cepas não hipervirulentas. Essa taxa aumentada de esporulação pode explicar, pelo menos em parte, a observação de taxas de recaída elevadas associadas a cepas hipervirulentas, porque os pacientes são mais propensos a contaminar seu ambiente local e, posteriormente, se infectam novamente (YAKOB et al, 2015).

A alta expressão gênica relativa desses fatores de virulência por ICC45 pode ter contribuído para a gravidade da doença da paciente e explicar a lesão tecidual e o processo inflamatório semelhante a NAP1 em modelo animal, anteriormente descrito (COSTA et al, 2016).

Surgimento de novas cepas hipervirulentas demonstra que são necessários métodos de vigilância reforçada para monitorar a incidência de CDI, como a caracterização molecular das cepas de *Clostridioides difficile* circulantes, ressaltando a importância de um maior conhecimento da situação epidemiológica desta infecção em unidades hospitalares brasileiras a fim de informar estratégias de prevenção adicionais às autoridades de saúde pública para evitar surtos de CDI, principalmente em pacientes de risco como os pacientes com câncer.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem tecer conclusões sobre o isolamento uma nova cepa de *C. difficile*, em um hospital de oncologia.

- Uma das cepas circulantes detectada nesta unidade hospitalar, pertence ao genótipo toxigênico, NAP4 (*tcdA+* e *tcdB+*) e ribotipo 014/020, comumente encontrado em outros países, como EUA e Europa assim como em outros estados aqui no Brasil. Esse genótipo também tem sido isolado tanto em casos de infecção hospitalar como em casos de CDI associados à comunidade.
- Isolamento de uma nova cepa de *C. difficile*, com um novo padrão de macrorrestrrição PFGE e um novo padrão de Ribotipagem, pertencente ao ST41 MLST Clado 2 das cepas hipervirulentas, toxinotipo IXb e toxina B variante que induz um efeito citopático distinto de acordo com o seu fenótipo de virulência aumentado atribuído à linhagem MLST Clado 2;
- ICC45 apresentou sensibilidade aos antibióticos de escolha para o tratamento de CDI, metronidazol e vancomicina, e apresentaram ausência de resistência a fluoroquinolonas assim como ausência de mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* que tipicamente atribuí resistência a fluoroquinolonas;
- O sequenciamento do genoma da cepa ICC45 e a expressão gênica relativa aumentada em ICC45 de diversos fatores de virulência auxilia na compreensão da dinâmica de infecções por novas cepas e cepas hipervirulentas de *C. difficile*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABT, M.C.; MCKENNEY, P.T.; PAMER, E.G. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. **Nature reviews Microbiology**. 4(10):609-620, 2016.

ALCIDES, A.P.; BRAZIER, J.S.; PINTO, L.J.; BALASSIANO, I.T.; BOENTE, R.F.; DE PAULA, G.R.; FERREIRA, E.O.; AVELAR, K.E.; MIRANDA, K.R.; FERREIRA, M.C.; DOMINGUES, R.M. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil: prevalent types of *Clostridium difficile* in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 92(1):53-9, 2007.

ALFA, M. J., KABANI, A., LYERLY, D., MONCRIEF, S., NEVILLE, L.M., AL-BARRAK, A., HARDING, G.K., DYCK, B., OLEKSON, K., EMBIL, J.M. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**. 38, p. 2706-2714, 2000.

AWAD, M.M.; JOHANESSEN, P.A.; CARTER, G.P.; ROSE, E.; LYRAS, D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. **Gut Microbes**. 5(5):579-93, 2014.

BALASSIANO, I. T.; MIRANDA, K. R.; BOENTE, R. F.; PAUER, H.; OLIVEIRA, I. C.; SANTOS-FILHO, J.; AMORIM, E. L.; CANINÉ, G. A.; SOUZA, C. F.; GOMES, M. Z.; FERREIRA, E. O.; BRAZIER, J. S.; DOMINGUES, R. M. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**. 15:61-4, 2009.

BALASSIANO, I. T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; DE OLIVEIRA, M. P.; RAMOS, M. C.; JAPIASSU, A. M.; DOS REIS, A. M.; BRAZIER, J. S.; FERREIRA, E. O.; DOMINGUES, R. M. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 68(4):449-55, 2010.



BALASSIANO, I. T.; YATES, E. A.; DOMINGUES, R. M.; FERREIRA, E. O. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **Journal of Medical Microbiology**. Feb;61(Pt 2):169-79, 2012.

BARTLETT, J. G.; CHANG, T-W.; GURWITH, M.; GORBACH, S.L.; ONDERDONK, A. B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. **New England Journal of Medicine**. 298:531-4, 1978.

BAUER, M. P.; NOTERMANS, D. W.; VAN BENTHEM, B. H.; BRAZIER, J. S.; WILCOX, M. H.; RUPNIK, M.; MONNET, D. L.; VAN DISSEL, J. T.; KUIJPER, E. J.; ECDIS STUDY GROUP. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. **Lancet**. 377, p.63-73, 2011.

BIDET, P.; BARBUT, F.; LALANDE, V.; BURGHOFFER, B.; PETIT, J.C. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. **FEMS Microbiology Letters**. 15;175(2):261-6, 1999.

BIEN, J.; PALAGANI, V.; BOZKO, P. The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**. 6(1):53-68, 2013.

BLONDEAU, J. M. What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 63:238-42, 2009.

BOUILLAUT, L.; DUBOIS, T.; SONENSHEIN, A.L.; DUPUY, B. Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. **Research in Microbiology**. 166(4):375-83, 2015.

BRITO, G.A.; FUJII, J.; CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, A.A.M.; OBRIG R.; GUERRANT R.L. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **Journal of Infectious Diseases**. 186, 1438-1447, 2002a.

BRITO, G.A.; SULLIVAN, G.W.; CIESLA, W.P.; CARPER H.T.; MANDELL, G.L.; GUERRANT R.L. *Clostridium difficile* toxin A alters in vitro-adherent neutrophil morphology and function. **Journal of Infectious Diseases**. 185, 1297-1306, 2002b.

CARROLL, K. C.; BARTLETT, J. G. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. **Annual Review of Microbiology**. 65:501-21, 2011.

CARTER, G.P.; CHAKRAVORTY, A.; PHAM NGUYEN TA, MILETO S.; SCHREIBER, F.; LI, L.; HOWARTH, P.; CLARE, S.; CUNNINGHAM, B.; SAMBOL, S.P.; CHEKNIS, A.; FIGUEROA, I.; JOHNSON, S.; GERDING, D.; ROOD, J.I.; DOUGAN, G.; LAWLEY, T.D.; LYRAS, D. Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. **MBio**. 6(3):e00551. 2015.

CHAPETÓN MONTES, D; COLLIGNON, A; JANOIR, C. Influence of environmental conditions on the expression and the maturation process of the *Clostridium difficile* surface associated protease Cwp84. **Anaerobe**. 19:79-82, 2013.

CHAVES-OLARTE, E.; FREER, E.; PARRA, A.; GUZMÁN-VERRI, C.; MORENO, E.; THELESTAM, M. R-Ras glucosylation and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains of *Clostridium difficile*. **The Journal of Biological Chemistry**. 7;278(10):7956-63. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard, 8th ed.** CLSI M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COHEN, S.; TANG, Y.J.; SILVA, J. JR. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. **Journal of Infectious Diseases**. 181, p. 659–663, 2000.

COHEN, S. H.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S.; KELLY, C. P.; LOO, V. G.; MCDONALD, L. C.; PEPIN, J.; WILCOX, M. H.; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. 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). **Infection Control and Hospital Epidemiology**. 31:431–55, 2010.

COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J.A. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 44(4):812-26, 1994.

COLLINS, D.A.; HAWKEY, P.M.; RILEY, T.V. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. 1;2(1):21. 2013.

COSTA, Cecília Leite. ***Clostridium difficile*: incidência da infecção e caracterização das cepas isoladas de pacientes com diarreia internados em um hospital oncológico de Fortaleza, Ceará**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

COSTA, C.L.; QUESADA-GÓMEZ, C.; DE CARVALHO, C.B.; GONZÁLEZ, R.H.; GIFONI, M.A.; RIBEIRO, R.A.; DE CASTRO BRITO, G.A. Community-acquired diarrhea associated with *Clostridium difficile* in an HIV-positive cancer patient: first case report in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**. 26:138-9, 2014.

COSTA, C.L.; LÓPEZ-UREÑA, D.; DE OLIVEIRA ASSIS, T.; RIBEIRO, R.A.; SILVA, R.O.; RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; DE CARVALHO, A.F.; DO CARMO, A.O.; DIAS, A.A.; DE CARVALHO, C.B.; CHAVES-OLARTE, E.; RODRÍGUEZ, C.; QUESADA-GÓMEZ, C.; DE CASTRO BRITO, G.A. A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe**. 40:76-84 2016.

COSTA, C.L.; MANO DE CARVALHO, C.B.; GONZÁLEZ, R.H.; GIFONI, M.A.C.; RIBEIRO, R.A.; QUESADA-GÓMEZ, C.; BRITO, G.A.C. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**. 48:232-236, 2017.

DAPA, T.; LEUZZI, R.; NG, Y.K.; BABAN, S.T.; ADAMO, R.; KUEHNE, S.A.; SCARSELLI, M.; MINTON, N.P.; SERRUTO, D.; UNNIKRIISHNAN, M. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**. 195(3):545-55, 2013.

DAWSON, L.F.; VALIENTE, E.; WREN, B.W. *Clostridium difficile*--a continually evolving and problematic pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**. 9(6):1410-7, 2009.

DENÈVE, C.; JANOIR, C.; POILANE, I.; FANTINATO, C.; COLLIGNON, A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 33 Suppl 1:S24-8, 2009.

DePESTEL, D. D.; ARONOFF, D. M. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Pharmacy Practice**. 26:464-75, 2013.

DESHPANDE, A.; PASUPULETI, V.; THOTA, P.; PANT, C.; ROLSTON, D. D.; SFERRA, T. J.; HERNANDEZ, A. V.; DONSKEY, C. J. Community-associated *Clostridium difficile* infection and antibiotics: a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 68:1951-61, 2013.

DONSKEY, C.J. *Clostridium difficile* in Older Adults. **Infectious Diseases Clinics of North America**. 31(4):743-756, 2017.

DU, P.; CAO, B.; WANG, J.; LI, W.; JIA, H.; ZHANG, W.; LU, J.; LI, Z.; YU, H.; CHEN, C.; CHENG, Y. Sequence variation in *tcdA* and *tcdB* of *Clostridium difficile*: ST37 with truncated *tcdA* is a potential epidemic strain in China. **Journal of Clinical Microbiology**. 52(9):3264-70. 2014.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**. 19;32(5):1792-7, 2004.

EVANS, C.T.; SAFDAR, N. Current trends in the epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. 15;60 Suppl 2:S66-71, 2015.

EZAKI, T. Family VII. Peptostreptococcaceae fam. nov, in: P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second ed. vol. 3, Springer, New York, pp. 738e828, 1008e1015, 2009.

FREEMAN, J.; BAUER, M. P.; BAINES, S. D.; CORVER, J.; FAWLEY, W. N.; GOORHUIS, B.; KUIJPER, E. J.; WILCOX, M. H. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. **Clinical Microbiology Reviews**. 23:529-49, 2010.

GHOSE, C.; EUGENIS, I.; SUN, X.; EDWARDS, A.N.; MCBRIDE, S.M.; PRIDE, D.T.; KELLY, C.P.; HO, D.D. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC. **Emerging Microbes and Infection**. 3;5:e8, 2016.

GRIFFITHS, D.; FAWLEY, W.; KACHRIMANIDOU, M.; BOWDEN, R.; CROOK, D.W.; FUNG, R.; GOLUBCHIK, T.; HARDING, RM.; JEFFERY, K.J.M.; JOLLEY, K.A.; KIRTON, R.; PETO, T.E.; REES, G.; STOESSER, N.; VAUGHAN, A.; WALKER, S.A.; YOUNG, B.C.; WILCOX, M.; DINGLE, K.E. Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**. 48(3):770-778, 2010.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**. 59(3):307-21, 2010.

GUPTA, A.; TARIQ, R.; FRANK, R.D.; JEAN, G.W.; BEG, M.S.; PARDI, D.S.; JOHNSON, D.H.; KHANNA, S. Trends in the incidence and outcomes of hospitalized cancer patients with *Clostridium difficile* Infection: A Nationwide Analysis. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**. 15(4):466-472, 2017.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants. **American Journal of Diseases of Children**. 49:390-402, 1935.

HE, M.; SEBAIHIA, M.; LAWLEY, T.D.; STABLER, R.A.; DAWSON, L.F.; MARTIN, M.J.; HOLT, K.E.; SETH-SMITH, H.M.; QUAIL, M.A.; RANCE, R.; BROOKS, K.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; BENTLEY, S.D.; BURROWS, C.; CLARK, L.; CORTON, C.; MURRAY, V.; ROSE, G.; THURSTON, S.; VAN TONDER, A.; WALKER, D.; WREN, B.W.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 20;107(16):7527-32, 2010.

HENSGENS, M. P.; KEESSEN, E. C.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V.; KOENE, M. G.; DE BOER, E.; LIPMAN, L. J.; KUIJPER, E. J.; European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases study group for *Clostridium difficile* (ESGCD). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? **Clinical Microbiology and Infection.** 18:635-45, 2012.

HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. **World Journal of Gastroenterology.** v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.

HUBER, C.A.; FOSTER, N.F.; RILEY, T.V.; PATERSON, D.L. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. **Journal of Clinical Microbiology.** 51(9):2810-4, 2013.

JANEZIC, S.; OCEPEK, M.; ZIDARIC, V.; RUPNIK, M. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. **BMC Microbiology.** 27;12:48, 2012.

JANEZIC, S; POTOČNIK, M; ZIDARIC, V; RUPNIK, M. Highly divergent *Clostridium difficile* strains isolated from the environment. **PLoS One.** 23;11(11):e0167101. 2016.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. **Anaerobe.** 37:13-24, 2016.

JOUSIMIES-SOMER, H. R.; SUMMANEN, P.; CITRON, D. M.; BARON, E. J.; WEXLER, H. M.; FINEGOLD, S. M. **Anaerobic bacteriology manual.** 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing Company; 2002.

KATO, N.; OU, C-Y.; KATO, H.; BARTLEY, SL.; BROWN, V.K.; DOWELL, V.R.; UENO, L. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. 29, p. 33–37, 1991.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**. 30(4):772-80, 2013.

KHAN, A.; RAZA, S.; BATUL, S.A.; KHAN, M.; AKSOY, T.; BAIG, M.A.; BERGER, B.J. The evolution of *Clostridium difficile* infection in cancer patients: epidemiology, pathophysiology, and guidelines for prevention and management. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**. Aug 1;7(2), p. 157-70, 2012.

KHANNA, S.; PARDI, D. S.; ARONSON, S. L.; KAMMER, P. P.; ORENSTEIN, R.; ST SAUVER, J. L.; HARMSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. **American Journal of Gastroenterology**. 107:89-95, 2012

KNETSCH, C.W.; LAWLEY, T.D.; HENSGENS, M.P.; CORVER, J.; WILCOX, M.W.; KUIJPER, E.J. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. **Euro Surveillance**. 18(4):20381, 2013.

KONEMAN, E.W.; WINN JR, W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

KUEHNE, S.A.; CARTMAN, S.T.; HEAP, J.T.; KELLY, M.L.; COCKAYNE, A.; MINTON, N.P. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. **Nature**. 7;467(7316):711-3, 2010.

KUEHNE, S.A.; COLLERY, M.M.; KELLY, M.L.; CARTMAN, S.T.; COCKAYNE, A.; MINTON, N.P. Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. **Journal of Infectious Diseases**. 1;209(1):83-6. 2014.

LARSEN, M.V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C.; HASMAN, H.; MARVIG, R.L.; JELSBAK, L.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; USSERY, D.W.; AARESTRUP, F.M.; LUND, O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. 50(4):1355-61, 2012.

LAWSON, P.A.; CITRON, D.M.; TYRRELL, K.L.; FINEGOLD, S.M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**. 40:95-9, 2016.

LIM, S.K.; STUART, R.L.; MACKIN, K.E.; CARTER, G.P.; KOTSANAS, D.; FRANCIS, M.J.; EASTON, M.; DIMOVSKI, K.; ELLIOTT, B.; RILEY, T.V.; HOGG, G.; PAUL, E.; KORMAN, T.M.; SEEMANN, T.; STINEAR, T.P.; LYRAS, D.; JENKIN, G.A. Emergence of a ribotype 244 strain of *Clostridium difficile* associated with severe disease and related to the epidemic ribotype 027 strain. **Clinical Infectious Diseases**. 58(12):1723-30. 2014.

LIMBAGO, B. M.; LONG, C. M.; THOMPSON, A. D.; KILLGORE, G. E.; HANNETT, G. E.; HAVILL, N. L.; MICKELSON, S.; LATHROP, S.; JONES, T. F.; PARK, M. M.; HARRIMAN, K. H.; GOULD, L. H.; MCDONALD, L. C.; ANGULO, F. J. *Clostridium difficile* strains from community-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**. 47(9):3004-7, 2009.

LOPARDO, G.; MORFIN-OTERO, R.; MORAN-VAZQUEZ, I.I.; NORIEGA, F.; ZAMBRANO, B.; LUXEMBURGER, C.; FOGLIA, G.; RIVAS, E.E. Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 19(1):8-14, 2015.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. 489(7415), 220–23, 2012.

MACKIN, K.E.; CARTER, G.P.; HOWARTH, P.; ROOD, J.I.; LYRAS, D. Spo0A differentially regulates toxin production in evolutionarily diverse strains of *Clostridium difficile*. **PLoS One**. 13;8(11):e79666, 2013.



MARTIN, J.S.; MONAGHAN, T.M.; WILCOX, M.H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. 13(4):206-16, 2016.

McDONALD, L.C.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A.; OWENS R.C.; KAZAKOVA, S.V.; SAMBOL, S.P.; JOHNSON, S.; GERDING, N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**. 8, p. 2433-2441, 2005.

MESQUITA, A. M. R. C.; RODRIGUES, J. L. N.; MESQUITA, V. P.; LIMA, N. L.; LIMA, A. A. M. Diarréia nosocomial e outras infecções adquiridas em hospital universitário. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.**, v. 10, n. 1, p. 54-61, 2011.

MILLER, M.; GRAVEL, D.; MULVEY, M.; TAYLOR, G.; BOYD, D.; SIMOR, A.; GARDAM, M.; MCGEER, A.; HUTCHINSON, J.; MOORE, D. Y.; KELLY, S. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. **Clinical Infectious Diseases**. 50, p. 194–201, 2010.

O'CONNOR, JR.; GALANG, M. A.; SAMBOL, S. P.; HECHT, D. W.; VEDANTAM, G.; GERDING, D. N.; JOHNSON, S. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 52(8):2813-7, 2008.

OREN, A.; GARRITY, G.M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published: Validation List no. 166. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 66(11):4916, 2016.

OWENS, R. C. JR.; DONSKEY, C. J.; GAYNES, R. P.; LOO, V. G.; MUTO, C. A. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. 15;46 Suppl 1:S19-31, 2008.

PÉCHINÉ, S.; JANOIR, C.; COLLIGNON, A. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. **Journal of Clinical Microbiology**. 43(10):5018-25, 2005.

PETTIT, L.J.; BROWNE, H.P.; YU, L.; SMITS, W.K.; FAGAN, R.P.; BARQUIST, L.; MARTIN, M.J.; GOULDING, D.; DUNCAN, S.H.; FLINT, H.J.; DOUGAN, G.; CHOUDHARY, J.S.; LAWLEY, T.D. Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism. **BMC Genomics**. 25;15:160, 2014.

PIRES, R.N.; MONTEIRO, A. A.; CARNEIRO, L. C.; BAETHGEN, L. F.; TAVARES, R.; LINCHO, C. S.; PARK, S.; PERLIN, D.; RODRIGUES FILHO, E. M.; PASQUALOTTO, A. C. *Clostridium difficile* infection in Brazil: a neglected problem? **American Journal of Infection Control**. 42(4):459-60, 2014.

POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal**. 171:51-8, 2004.

QUESADA-GÓMEZ, C.; RODRÍGUEZ, C.; GAMBOA-CORONADO, M. M.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E.; MULVEY, M.; VILLALOBOS-ZÚÑIGA, M.; BOZACORDERO, R. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**. 48, p. 669-670, 2010.

QUESADA-GÓMEZ, C.; LÓPEZ-UREÑA, D.; CHUMBLER, N.; KROH, H.K.; CASTRO-PEÑA, C.; RODRÍGUEZ, C.; OROZCO-AGUILAR, J.; GONZÁLEZ-CAMACHO, S.; RUCAVADO, A.; GUZMÁN-VERRI, C.; LAWLEY, T.D.; LACY, D.B.; CHAVES-OLARTE, E. Analysis of Tcdb proteins within the hypervirulent Clade 2 reveals an impact of rhoa glucosylation on *Clostridium difficile* proinflammatory activities. **Infection and Immunity**. 11;84(3):856-65. 2016.

RISSMAN, A.I.; MAU, B.; BIEHL, B.S.; DARLING, A.E.; GLASNER, J.D.; PERNA, N.T. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. **Bioinformatics**. 15;25(16):2071-3, 2009.

RODRÍGUEZ-PARDO, D.; ALMIRANTE, B.; BARTOLOMÉ, R. M.; POMAR, V.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F.; SORIANO, A.; SORLÍ, L.; MARTÍNEZ-MONTAUTI, J.; MOLINS, M. T.; LUNG, M.; VILA, J.; PAHISSA, A.; BARCELONA CLOSTRIDIUM DIFFICILE STUDY GROUP. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**. 51:1465-73, 2013.

RUPNIK, M.; AVESANI, V.; JANC, M.; VON EICHEL-STREIBER, C.; DELMÉE, M. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 36(8):2240-7, 1998.

RUPNIK, M.; WILCOX, M.H.; GERDING, D.N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. Jul;7(7): 526-36, 2009.

RUPNIK, M; JANEZIC, S. An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. 54(1):13-8, 2016.

SEBAIHIA, M.; WREN, B.W.; MULLANY, P.; FAIRWEATHER, N.F.; MINTON, N.; STABLER, R.; THOMSON, N.R.; ROBERTS, A.P.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; WANG, H.; HOLDEN, M.T.; WRIGHT, A.; CHURCHER, C.; QUAIL, M.A.; BAKER, S.; BASON, N.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DOWD, L.; FRASER, A.; FELTWELL, T.; HANCE, Z.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; STEVENS, K.; UNWIN, L.; WHITHEAD, S.; DUPUY, B.; DOUGAN, G.; BARRELL, B.; PARKHILL, J. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. **Nature Genetics**. 38(7):779-86, 2006.

SECCO, D. A.; BALASSIANO, I. T.; BOENTE, R. F.; MIRANDA, K. R.; BRAZIER, J.; HALL, V.; DOS SANTOS-FILHO, J.; LOBO, L. A.; NOUÉR, S. A.; DOMINGUES, R. M. *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. **Anaerobe**. 28:85-9, 2014.

SEE, I.; MU, Y.; COHEN, J.; BELDAVS, Z. G.; WINSTON, L. G.; DUMYATI, G.; HOLZBAUER, S.; DUNN, J.; FARLEY, M. M.; LYONS, C.; JOHNSTON, H.; PHIPPS, E.; PERLMUTTER, R.; ANDERSON, L.; GERDING, D. N.; LESSA, F. C. NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. 58(10):1394-400, 2014.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**. 15;30(14):2068-9, 2014.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. 90(3):859-904, 2010.

SEMENYUK, E. G.; LANING, M.L.; FOLEY, J.; JOHNSTON, P.F.; KNIGHT, K.L.; GERDING, D.N.; DRIKS, A. Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. **PLoS One**. 30;9(1), 2014.

SILVA, R.O.S.; RUPNIK, M.; DINIZ, A.N.; VILELA, E.G.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 110(8):1062-1065, 2015.

SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. **Journal of Medical Microbiology**. 53, p. 1129–1136, 2004.

STABLER, R.A.; GERDING, D.N; SONGER, J.G; DRUDY, D.; BRAZIER, J.S.; TRINH, H.T.; WITNEY, A.A.; HINDS, J.; WREN, B.W. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. **Journal of Bacteriology**. 188(20):7297-305, 2006.

STEVENSON, E.; MINTON, N.P.; KUEHNE, S.A. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. **Trends in Microbiology**. 23(5):275-82, 2015.

STUBBS, S.L.; BRAZIER, J.S.; O'NEILL, G.L.; DUERDEN, B.I. PCR targeted to the 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library

consisting of 116 different PCR ribotypes. **Journal of Clinical Microbiology**. 37, 461–463, 1999.

STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B.; POPOFF, M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. **FEMS Microbiology Letters**. 186, p. 307–312, 2000.

SUETENS, C. *Clostridium difficile*: summary of actions in the European Union. **Eurosurveillance**. v. 13, p. 7-9, 2008.

TREANGEN, T.J.; ONDOV, B.D.; KOREN, S.; PHILLIPPY, A.M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. **Genome Biology**. 15(11):524, 2014.

VALIENTE, E.; BOUCHÉ, L.; HITCHEN, P.; FAULDS-PAIN, A.; SONGANE, M.; DAWSON, L.F.; DONAHUE, E.; STABLER, R.A.; PANICO, M.; MORRIS, H.R.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; LOGAN, S.M.; DELL, A.; WREN, B.W. Role of glycosyltransferases modifying type b flagellin of emerging hypervirulent *Clostridium difficile* lineages and their impact on motility and biofilm formation. **The Journal of Biological Chemistry**. 2;291(49):25450-25461. 2016.

VARDAKAS, K.Z.; KONSTANTELIAS, A.A.; LOIZIDIS, G.; RAFAILIDIS, P.I.; FALAGAS, M.E. Risk factors for development of *Clostridium difficile* infection due to BI/NAP1/027 strain: a meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**. 16(11):e768-73, 2012.

VEDANTAM, G.; CLARK, A.; CHU, M.; MCQUADE, R.; MALLOZZI, M.; VISWANATHAN, V. K. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. **Gut Microbes**. 3:121-34, 2012.

VINDIGNI, S.M.; SURAWICZ, C.M. *C. difficile* infection: changing epidemiology and management paradigms. **Clinical and Translational Gastroenterology**. 9;6:e99, 2015.

WARNY, M.; PEPIN, J.; FANG, A.; KILLGORE, G.; THOMPSON, A.; BRAZIER, J.; FROST, E.; MCDONALD, C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet**. 366: 1079-1084, 2005.

WEXLER, H.; MULLIGAN, M.E.; FINEGOLD, S.M. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns produced by *Clostridium difficile*. **Reviews of Infectious Diseases**. 6 Suppl 1:S229-34, 1984.

YAKOB, L.; RILEY, T.V.; PATERSON, D.L.; MARQUESS, J.; MAGALHAES, R.J.; FURUYA-KANAMORI, L.; CLEMENTS, A.C. Mechanisms of hypervirulent *Clostridium difficile* ribotype 027 displacement of endemic strains: an epidemiological model. **Scientific Reports**. 28;5:12666. 2015.

YUTIN, N.; GALPERIN, M.Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. **Environmental Microbiology**. 15(10):2631-41, 2013.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**. 18(5):821-9, 2008.

ZHOU, Y; BURNHAM, C.A.; HINK, T.; CHEN, L.; SHAIKH, N.; WOLLAM, A.; SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G.M.; TARR, P.I.; DUBBERKE, E.R. Phenotypic and genotypic analysis of *Clostridium difficile* isolates: a single-center study. **Journal of Clinical Microbiology**. 52(12):4260-6. 2014.

## APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### CORRELAÇÃO ENTRE SINTOMAS GASTRINTESTINAIS, QUALIDADE DE VIDA E PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM PACIENTES DO HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA

Neste momento, você recebe um tratamento com remédios importantes para combater as células do tumor que precisa ser combatido. Entretanto, estas medicações costumam produzir lesões na mucosa oral e intestinal, provocando sinais e sintomas como aftas, úlceras, alteração do gosto dos alimentos, dor ao engolir, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, além de diminuir o número das células responsáveis pela defesa do seu organismo, muitas vezes prejudicando o andamento do tratamento e a sua eficácia e favorecendo infecções por bactérias que podem se aproveitar da queda da imunidade.

O Hospital Haroldo Juaçaba e a Universidade Federal do Ceará (UFC) promovem uma pesquisa que pretende estudar e dimensionar a presença de uma bactéria chamada *Clostridium difficile* em pacientes tratados na instituição. Este microrganismo está associado à presença de diarreia em pacientes com redução da capacidade imunológica e pode causar graves consequências aos pacientes infectados.

Para tanto, você deverá realizar coleta de fezes para que a pesquisa e a tipagem da bactéria seja efetuada. Além disso, você responderá a perguntas relacionadas aos sintomas que você está sentindo e ao tratamento oncológico ao qual você está sendo submetido. É importante, para esta pesquisa, garantir que você receberá prontamente o tratamento para a infecção caso a presença da bactéria se confirme.

Sua identidade será mantida em sigilo, sendo a divulgação dos resultados dos exames totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão em ambiente acadêmico com propósito científico, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes por outros componentes da equipe de saúde, exceto pelos responsáveis diretos por seu tratamento.

A sua participação deverá ser voluntária e consciente. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação neste estudo. Em qualquer momento, você terá o direito de desistir da pesquisa sem necessidade de dar explicações. A eventual desistência não acarretará prejuízo ou discriminação quanto à manutenção do seu tratamento

EU CONCORDO LIVREMENTE EM PARTICIPAR DESTA ESTUDO

---

( NOME DO SUJEITO DA PESQUISA  
LETRA DE FORMA)

---

DATA

---

ASSINATURA

---

INVESTIGADOR

---

DATA

---

ASSINATURA

---

NOME DA TESTEMUNHA

---

DATA

---

ASSINATURA



## APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

### Questionário

Paciente nº: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### 1. Epidemiologia e tratamento oncológico

Paciente \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ Sexo  M  F Prontuário \_\_\_\_\_ Nascimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_ Estado ao Dx: \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Cirurgia:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Radioterapia  Sim  Não Região: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Recebeu Quimioterapia?  Sim  Não

Recebe quimioterapia atualmente?  Sim  Não

Adjuvante  Neoadjuvante  Radiossensibilizante  Paliativa  Curativa

Regimes:

Adjuvante: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

1ª linha: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

2ª linha: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

3ª linha: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Hormonioterapia:  Sim  Não

1ª linha \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

2ª linha \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

3ª linha \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Fim \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Internado ?  Sim  Não Quantos dias? \_\_\_\_\_

Antibióticos?  Sim  Não Regime? \_\_\_\_\_ Quantos dias? \_\_\_\_\_

## 2- Sintomas atuais

1. Diarréia (grau):

1  2  3  4

2. Dor Abdominal (grau):

1  2  3  4

3. Náusea (grau):

1  2  3  4

4. Vômito (grau):

1  2  3  4

5. Mucosite oral (grau):

1  2  3  4

6. Febre:

Sim  Não

7. Muco nas fezes

Sim  Não

8. Sangue nas fezes:

Sim  Não

9. Performance status

0  1  2  3  4

**3- Exames (se disponíveis):**

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Hemoglobina: \_\_\_\_\_

Leucócitos: \_\_\_\_\_

Linfócitos: \_\_\_\_\_

Neutrófilos: \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_

Uréia: \_\_\_\_\_

Creatinina: \_\_\_\_\_

**4- Outras informações**

Comorbidades:

Diabetes:  Sim  NãoHipertensão:  Sim  NãoInsuficiência Renal Crônica:  Sim  NãoInsuficiência Coronariana:  Sim  NãoDPOC:  Sim  NãoAVC prévio:  Sim  NãoIAM prévio:  Sim  NãoInternação nos últimos 30 dias:  Sim  Não

---

---

---

---

---

---

---

## ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

INSTITUTO DO CÂNCER DO  
CEARA - ICC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Isolamento, genotipagem e estudo comparativo da virulência de cepas de *Clostridium difficile* em pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará

**Pesquisador:** Markus Andret Cavalcante Gifoni

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 05843813.0.0000.5528

**Instituição Proponente:** Instituto do Cancer do Ceara

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 208.362

**Data da Relatoria:** 28/02/2013

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de estudo multicêntrico, prospectivo, transversal e analítico acerca da incidência, patogenia e virulência de cepas de *Clostridium difficile* isoladas de pacientes com diarreia atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba, em Fortaleza-Ceará

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Tipar e traçar um perfil da toxicidade, virulência e sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas de pacientes em ambiente hospitalar.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto não oferece riscos ao paciente.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa acrescentará dados importantes acerca do perfil epidemiológico de pacientes com diarreia em ambiente hospitalar.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Sem considerações.

#### **Recomendações:**

Sem recomendações.

**Endereço:** PAPI JUNIOR

**Bairro:** BELA VISTA

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**CEP:** 60.441-700

**Telefone:** 3288-4853

**E-mail:** cep\_icc@yahoo.com.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO  
CEARA - ICC



**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado.

FORTALEZA, 28 de Fevereiro de 2013

---

Assinador por:  
Marcelo Gurgel Carlos da Silva  
(Coordenador)

Endereço: PAPI JUNIOR

Bairro: BELA VISTA

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: 3288-4653

CEP: 60.441-700

E-mail: cep\_icc@yahoo.com.br

## ANEXO B – PULICAÇÕES ORIGINADAS A PARTIR DO TRABALHO

Periódico: Anaerobe

Fator de Impacto: 2.278

Classificação do Qualis Capes para Área de Ciências Biológicas II: B1

Anaerobe 40 (2016) 76–84



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anaerobe](http://www.elsevier.com/locate/anaerobe)

Clostridium difficile

## A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption



Cecília Leite Costa <sup>a,b</sup>, Diana López-Ureña <sup>c</sup>, Thiago de Oliveira Assis <sup>a,d</sup>,  
 Ronaldo A. Ribeiro <sup>e,f,†</sup>, Rodrigo Otávio Silveira Silva <sup>g</sup>, Maja Rupnik <sup>h</sup>, Mark H. Wilcox <sup>i</sup>,  
 Alex Fiorini de Carvalho <sup>j</sup>, Anderson Oliveira do Carmo <sup>j</sup>, Adriana Abalen Martins Dias <sup>j</sup>,  
 Cibele Barreto Mano de Carvalho <sup>b</sup>, Esteban Chaves-Olarte <sup>c</sup>, César Rodríguez <sup>c</sup>,  
 Carlos Quesada-Gómez <sup>c,\*,1</sup>, Gerly Anne de Castro Brito <sup>a,\*\*,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Bacteriology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>c</sup> Facultad de Microbiología and Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

<sup>d</sup> Department of Morphology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>e</sup> Haroldo Juaçaba Hospital, Cancer Institute of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>f</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>g</sup> Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>h</sup> University of Maribor, Faculty of Medicine and National Laboratory for Health, Environment and Food, Maribor, Slovenia

<sup>i</sup> Department of Microbiology, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, The General Infirmary, Leeds, UK

<sup>j</sup> Experimental Genetics and Laboratory Animal Science, Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 February 2016

Received in revised form

10 June 2016

Accepted 12 June 2016

Available online 14 June 2016

Handling Editor: Paola Mastrantonio

## Keywords:

Clostridium difficile

MLST Clade 2

Variant toxin B

Inflammation

Oxidative stress response

## ABSTRACT

The epidemiology of *Clostridium difficile* infections is highly dynamic as new strains continue to emerge worldwide. Here we present a detailed analysis of a new *C. difficile* strain (ICC-45) recovered from a cancer patient in Brazil that died from severe diarrhea. A polyphasic approach assigned a new PCR-ribotype and PFGE macrorestriction pattern to strain ICC-45, which is toxigenic (*tcdA*<sup>+</sup>, *tcdB*<sup>+</sup> and *ctdB*<sup>+</sup>) and classified as ST41 from MLST Clade 2 and toxinotype IXb. Strain ICC-45 encodes for a variant TcdB that induces a distinct CPE in agreement with its toxinotype. Unlike epidemic NAP1/027 strains, which are also classified to MLST Clade 2, strain ICC-45 is susceptible to fluoroquinolones and does not overproduce toxins TcdA and TcdB. However, supernatants from strain ICC-45 and a NAP1/027 strain produced similar expression of pro-inflammatory cytokines, epithelial damage, and oxidative stress response in the mouse ileal loop model. These results highlight inflammation and oxidative stress as common features in the pathogenesis of *C. difficile* Clade 2 strains. Finally, this work contributes to the description of differences in virulence among various *C. difficile* strains.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Clostridium difficile* is a strict anaerobic, spore-forming, toxin-producing Gram-positive bacterium. This pathogen is the main cause of nosocomial diarrhea associated with antibiotic use [1]. Most strains produce two enterotoxins with cytotoxic activity; toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB). In addition, a subset of strains also synthesize an actin-ADP-ribosylating toxin known as binary toxin (CDT) [2]. Genes encoding TcdA and TcdB are located on a

\* Corresponding author. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, 110501 San José, Costa Rica.

\*\* Corresponding author. Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 60430-170 Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail addresses: [carlos.quesada@ucr.ac.cr](mailto:carlos.quesada@ucr.ac.cr) (C. Quesada-Gómez), [gerlybrito@hotmail.com](mailto:gerlybrito@hotmail.com) (G.A. de Castro Brito).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<sup>†</sup> Deceased.



C.difficile (including epidemiology)

## Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital



Cecília Leite Costa<sup>a,b</sup>, Cibele Barreto Mano de Carvalho<sup>b</sup>, Rafael Holanda González<sup>c</sup>,  
Markus Andret Cavalcante Gifoni<sup>c</sup>, Ronaldo de Albuquerque Ribeiro<sup>c,d,1</sup>,  
Carlos Quesada-Gómez<sup>e</sup>, Gerly Anne de Castro Brito<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Bacteriology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>c</sup> Haroldo Juaçaba Hospital, Cancer Institute of Ceara, Fortaleza, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Cancer (LAFICA), Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil

<sup>e</sup> Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología and Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 April 2017

Received in revised form

26 September 2017

Accepted 3 October 2017

Available online 5 October 2017

Handling Editor: Dena Lyras

#### Keywords:

Cancer patients

*Clostridium difficile*

Diarrhea

Novel ribotype/PFGE-type

### ABSTRACT

*Clostridium difficile* is a Gram-positive spore forming anaerobic bacterium and the main cause of healthcare-associated diarrhea. This study aimed to perform the phenotypic characterization and molecular typing of *Clostridium difficile* isolates among patients at a cancer hospital in Brazil. During 18 months, 48 diarrheic fecal samples were collected, of these 48% were positive in either one or both of the performed tests: detection of toxins A/B and culture. *Clostridium difficile* was recovered from four samples (17%). All strains carried toxin A and B genes, and the isolates belonged to PCR-ribotype 014/020, PFGE-type NAP4 and toxinotype XVIII. On the other hand, one isolate belonged to a novel PCR-ribotype, and PFGE-type, likewise to toxinotype IXb. The isolates showed susceptibility to metronidazole, vancomycin and moxifloxacin, and were resistant to ciprofloxacin. Finally, the findings indicate high positivity between the samples tested, suggesting an expressive importance of this infection, including detection of a novel ribotype/PFGE-type of *Clostridium difficile*, and show for the first time the detection of community-associated *Clostridium difficile* infection (CA-CDI) in these patients in Northeast Brazil. These data emphasize the importance to a better understanding of the epidemiological situation of this infection in Brazilian hospitals.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

*Clostridium difficile* is a strictly anaerobic, spore-forming, toxin-producing Gram positive bacillus. Currently, it is the main cause of healthcare associated diarrhea due to the use of antibiotic [1].

The major risk factors for the development of *C. difficile* infection (CDI) include advanced age and exposure to healthcare institutions and antimicrobial agents [1].

Patients with cancer can be particularly susceptible to CDI

owing to the presence of multiple CDI risk factors including prolonged hospitalization and exposure to multiple antibiotics and chemotherapeutic agents [2,3].

Chemotherapeutic agents can cause CDI without concurrent use of antibiotics, because alter the intestinal mucosa, causing inflammation and necrosis, which are important factors that predispose these patients to CDI. Methotrexate and 5-fluorouracil have been commonly associated with CDI [2,3]. Moreover, these patients are often immunosuppressed and frequently use broad spectrum antibiotics, which can alter the gut microbiota [2–5].

Diarrhea is a frequent side effect of antineoplastic agents. In cancer patients receiving chemotherapy, it is difficult to distinguish chemotherapy-associated diarrhea from antibiotic-associated CDI with that *C. difficile* infection can be neglected in these patients, resulting in further compromise of general health

\* Corresponding author. Universidade Federal do Ceará, Rua Delmiro de Farias S/N, Rodolfo Teófilo, CEP: 60430-170, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail address: [gerlybrito@hotmail.com](mailto:gerlybrito@hotmail.com) (G.A.C. Brito).

<sup>1</sup> Deceased.