

Resistência de *Clostridium difficile* do ribotipo 017 ao imipenemo: contributo da sequenciação do genoma completo

Resistance of *Clostridium difficile* from ribotype 017 to imipenem: contribution of the whole genome sequencing

Joana Isidro¹, Andrea Santos¹, Alexandra Nunes², Vítor Borges², Catarina Silva³, Luís Vieira³, Aristides L Mendes⁴, Mónica Serrano⁴, Adriano O. Henriques⁴, João Paulo Gomes², Mónica Oleastro¹

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Núcleo de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(4) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA de Lisboa, Oeiras, Portugal.

_Resumo

A infeção por *Clostridium difficile* é a principal causa de diarreia infecciosa associada aos cuidados de saúde. Neste estudo, caracterizámos um conjunto de estirpes clínicas de *Clostridium difficile*, provenientes de diversos hospitais portugueses, com o objetivo de estudar a resistência aos carbapenemos neste agente patogénico. Um total de 191 estirpes clínicas, isoladas entre 2012 e 2015 de 15 hospitais em Portugal, foram incluídas no estudo; a suscetibilidade ao imipenemo foi determinada por um método de gradiente de difusão em agar. Foram selecionadas estirpes sensíveis e resistentes ao imipenemo, para estudos fenotípicos adicionais e para contributo da sequenciação do genoma completo. A resistência ao imipenemo foi detetada em 24 (12,6%) das estirpes, 22 das quais pertencentes ao ribotipo (RT) 017 (apenas toxina B positivo), todas provenientes do mesmo hospital, durante o período em estudo, e com perfil de multiresistência. Pela análise dos dados de sequenciação dos genomas, foram identificadas duas substituições de aminoácidos (Ala555Thr e Tyr721Ser) nos domínios funcionais de duas enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano (*penicillin-binding proteins* - PBP). Uma PBP adicional foi também identificada nas estirpes RT017. Este estudo descreve pela primeira vez alterações em PBPs como base genética provável da resistência ao imipenemo em *C. difficile*.

_Abstract

Clostridium difficile is a major cause of healthcare-associated infections. Here, we characterized *C. difficile* strains isolated in Portuguese hospitals, in order to search for imipenem resistance and the underlying genetic determinants. Imipenem susceptibility testing by agar gradient diffusion was performed on 191 *C. difficile* strains, isolated from 15 Portuguese hospitals, between 2012-2015. Some of the imipenem-resistant and imipenem-susceptible strains were selected for downstream phenotypic analyses and for whole genome sequencing (WGS). Resistance to imipenem was detected in 24 (12.6 %) strains, 22 of which were ribotype (RT) 017 strains, only positive for toxin B, isolated in the same hospital, and presenting resistance to several other antibiotics. Through analysis of WGS data, two amino acid changes (Ala555Thr and Tyr721Ser) targeting the transpeptidase domain of two penicillin-binding proteins (PBP) were identified. An additional PBP was also identified in this ribotype. We describe, for the first time, mutations in PBP-encoding genes as the probable genetic basis for *C. difficile* imipenem resistance.

_Introdução

Clostridium difficile, recentemente renomeado *Clostridioides difficile*, é um bacilo de Gram-positivo, formador de esporos e produtor de toxinas, constituindo a principal causa de diarreia em doentes internados associada ao consumo de antibióticos nos países desenvolvidos (1). A infeção por *C. difficile* (ICD) resulta da ação de duas toxinas, A e B (TcdA e TcdB), sendo que algumas estirpes de *C. difficile* produzem uma toxina adicional, a toxina binária CDT (*C. difficile transferase*) (2).

Os sintomas da ICD variam entre um quadro leve de diarreia até ao desenvolvimento de colite pseudomembranosa, potencialmente letal, constituindo fatores de risco, entre outros, hospitalizações recentes e antibioterapia prévia (3). Os antibióticos causam desequilíbrio na flora protetora intestinal, permitindo que os esporos de *C. difficile* germinem no colón, e também conferem uma vantagem seletiva para o desenvolvimento de estirpes infetantes de *C. difficile* resistentes (4). Múltiplos antibióticos podem contribuir para promover a ICD, no entanto o maior risco tem sido associado ao consumo de cefalosporinas e fluoroquinolonas (4). A resistência a múltiplos antibióticos tem sido frequentemente encontrada em estirpes epidémicas de *C. difficile*, sendo frequente a localização dos determinantes de resistência em elementos genéticos que podem ser transferidos de forma horizontal (*horizontal gene transfer* - HGT) entre as bactérias (5). De facto, nas últimas décadas, a ICD tem sido mais descrita em situações associadas a surtos do que a casos esporádicos, com consequências mais negativas quanto à

severidade e letalidade da doença (6). Esta constatação foi explicada sobretudo pela disseminação de estirpes *C. difficile* resistentes às fluoroquinolonas, pertencentes ao ribotipo (RT) 027 e responsáveis por surtos em meio hospitalar em todo o mundo (7). Mais recentemente, estirpes de outros ribotipos de *C. difficile*, como RT078 e RT017, têm mostrado uma virulência aumentada e têm emergido em diversas regiões (8). O RT017, com fenótipo toxina A-negativo e toxina B-positivo, é o ribotipo mais frequente na Ásia e em alguns países da Europa de leste (8).

O imipenemo, pertencente à classe dos carbapenemos, é atualmente o antibiótico de última linha para o tratamento de infeções por bactérias de Gram-negativo. Num estudo recente, multicêntrico e europeu, que analisou mais de 900 estirpes de *C. difficile*, foi obtida uma proporção de resistência ao imipenemo de 7,4%, com uma média geométrica para a concentração mínima inibitória (CMI) de 5.91 mg/L em estirpes de *C. difficile* do RT017 (9).

_Objetivo

Neste estudo caracteriza-se um conjunto de estirpes clínicas de *Clostridium difficile*, provenientes de diversos hospitais portugueses, com o objetivo de estudar a resistência aos carbapenemos neste agente patogénico.

_Material e métodos

Entre setembro de 2012 e setembro de 2015 foram estudadas no Laboratório Nacional de Referência das Infeções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) estirpes de *C. difficile* isoladas de 191 doentes e provenientes de 15 hospitais em Portugal.

Os métodos laboratoriais relativos ao estudo da suscetibilidade aos antibióticos e sequenciação de nova geração encontram-se detalhados no material suplementar do artigo original (10).

_Resultados e discussão

Das 191 estirpes de *C. difficile* estudadas entre setembro 2012-2015 e provenientes de 15 hospitais nacionais, 24 (12,6%) foram resistentes ao imipenemo. Destas, 22 estirpes foram do RT017, uma do RT014 e a restante do RT477.

Para as 22 estirpes imipenemo-resistentes do RT017, a CMI determinada foi >32 mg/L (tabela 1), enquanto que para as duas estirpes não-RT017 a CMI foi de 16 mg/L. Os 22 isolados RT017 resistentes ao imipenemo foram provenientes de um hospital ao longo dos 3 anos do estudo, o que sugeriu a presença de um clone persistente nesta unidade hospitalar, de acordo também com os dados obtidos pela contribuição da sequenciação do genoma completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS) (Hospital A, tabela 1, figura 1). De entre as 191 estirpes estudadas, foram identificadas outras três do RT017 sensíveis ao imipenemo provenientes de um outro hospital (Hospital B, tabela 1) e cujos genomas foram comparados com os das 22 estirpes RT017 imipenemo-resistentes.

Os 22 isolados RT017 resistentes ao imipenemo foram também resistentes aos antibióticos clindamicina, eritromicina, moxifloxacina, tetraciclina e rifampicina, corroborando os resultados já descritos em outros estudos (9); os três isolados RT017 sensíveis ao imipenemo apresentaram o mesmo padrão de resistência aos antibióticos em apreciação, exceto à moxifloxacina. A CMI para o meropenemo e ertapenemo foi superior para os isolados resistentes ao imipenemo (tabela 1).

Pela análise dos dados de WGS, a multiresistência aos antibióticos não carbapenemos foi associada à presença de vários determinantes de resistência, muitos deles localizados em elementos genéticos móveis (figura 2), o que confirma que a HGT desempenha um papel major na evolução deste agente patogénico (11).

A análise dos dados de WGS mostrou também que os 25 isolados do RT017 formam dois grupos geneticamente distintos, de acordo com o hospital de origem (figura 1). De entre as mutações pontuais que distinguiam ambos os

Tabela 1: Suscetibilidade a 11 antibióticos de estirpes de *Clostridium difficile* RT017: 22 resistentes (Hospital A) e 3 sensíveis (Hospital B) ao imipenemo, setembro 2012-2015.

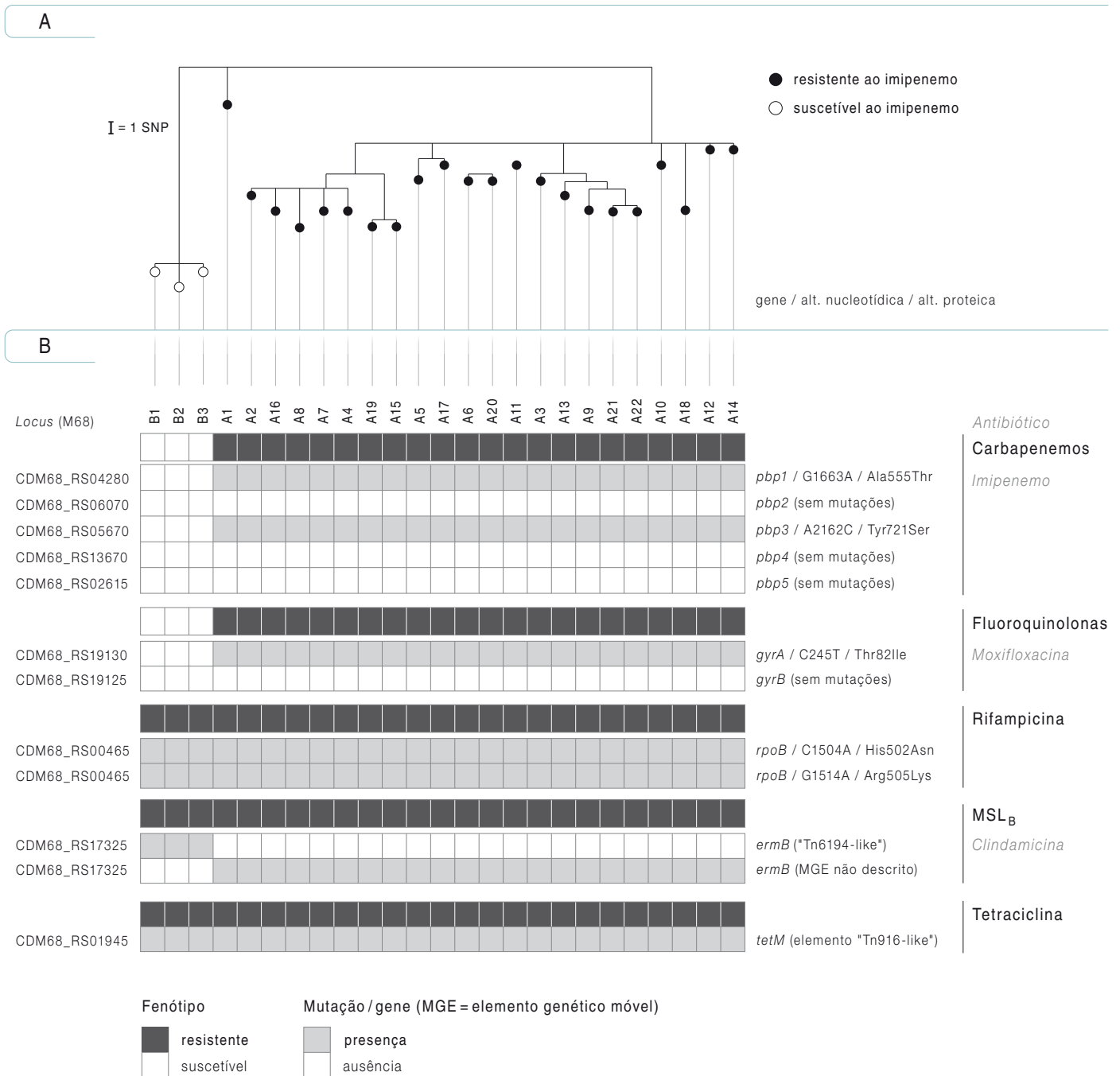
		IMP**	ETP**	MRP**	MXF*†	MTZ*†	VAN*†	CLI**	CHL**	RIF*	TGC*	TET**
cut-off R*		≥16	≥16	≥16	>4	>2	>2	≥8	≥32	>0,004	>0,25	≥16
Hospital A (n=22)	Intervalo CMI	>32	3-16	1.5-4	>32	<0.016-1	0.38-2	>256	2-6	>32	<0.016-0.094	16-32
	MG CMI	32	7.56	2.31	32	0.12	0.73	256	3.29	32	0.025	18.08
	CMI ₉₀	32	12	3	>32	0.38	2	256	4	32	0.032	32
	CMI ₅₀	32	6	2	>32	0.19	0.75	256	3	32	0.023	16
	% R	100	4,5	0	100	0	0	100	0	100	0	100
Hospital B (n=3)	Intervalo CMI	1.5-3	1.5-2	0.5-1.5	1.5	<0.016-0.25	0.38-0.75	>256	3-4	>32	<0.016-0.023	16
	MG CMI	2.08	1.82	0.83	1.5	0.072	0.60	256	3.30	32	0.020	16
	CMI ₉₀	3	2	1.5	1.5	0.25	0.75	256	4	32	0.023	16
	CMI ₅₀	2	2	0.75	1.5	0.094	0.75	256	3	32	0.023	16
	% R	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100
P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.45	0.56	-	0.98	-	0.41	0.51

IMP=imipenemo ETP=ertapenemo MRP=meropenemo MXF=moxifloxacina MTZ=metronidazol VAN=vancomicina CLI=clindamicina CHL=cloranfenicol RIF=rifampicina TGC=tigeciclina R=resistente CMI=concentração mínima inibitória MG=média geométrica; Valores da CMI em mg/L. *EUCAST **CLSI † Determinado anteriormente (12).

grupos, foram identificadas duas em genes que codificam para duas *penicillin binding proteins* (PBPs) de alto peso molecular (*high molecular weight* – HMW). (figura 2). As HMW PBPs são divididas em enzimas de classe A, bifuncionais contendo os domínios transglicosilase (TGase) e transpeptidase (TPase), e de classe B, que não possuem o domínio TGase. O domínio TPase possui três motivos funcionais, SxxK, SxN e KTG[T/S], que compõem o seu sítio ativo. Os carbapenemos bloqueiam a síntese da parede celular por inibição da atividade TPase (13). Uma das mutações foi identificada no gene codificante da PBP1, a única enzima bifuncional implicada na síntese do peptidoglicano em *C. difficile*; esta mutação resultou na substituição de aminoácidos Ala555Thr, localizada próximo do motivo funcional SSN (figura 2). A segunda mutação foi identificada no gene codificante da PBP3, uma TPase de classe B, causando a substituição de aminoácidos Tyr721Ser, entre os motivos funcionais SxN e KTGT (figura 2). As duas estirpes não pertencem

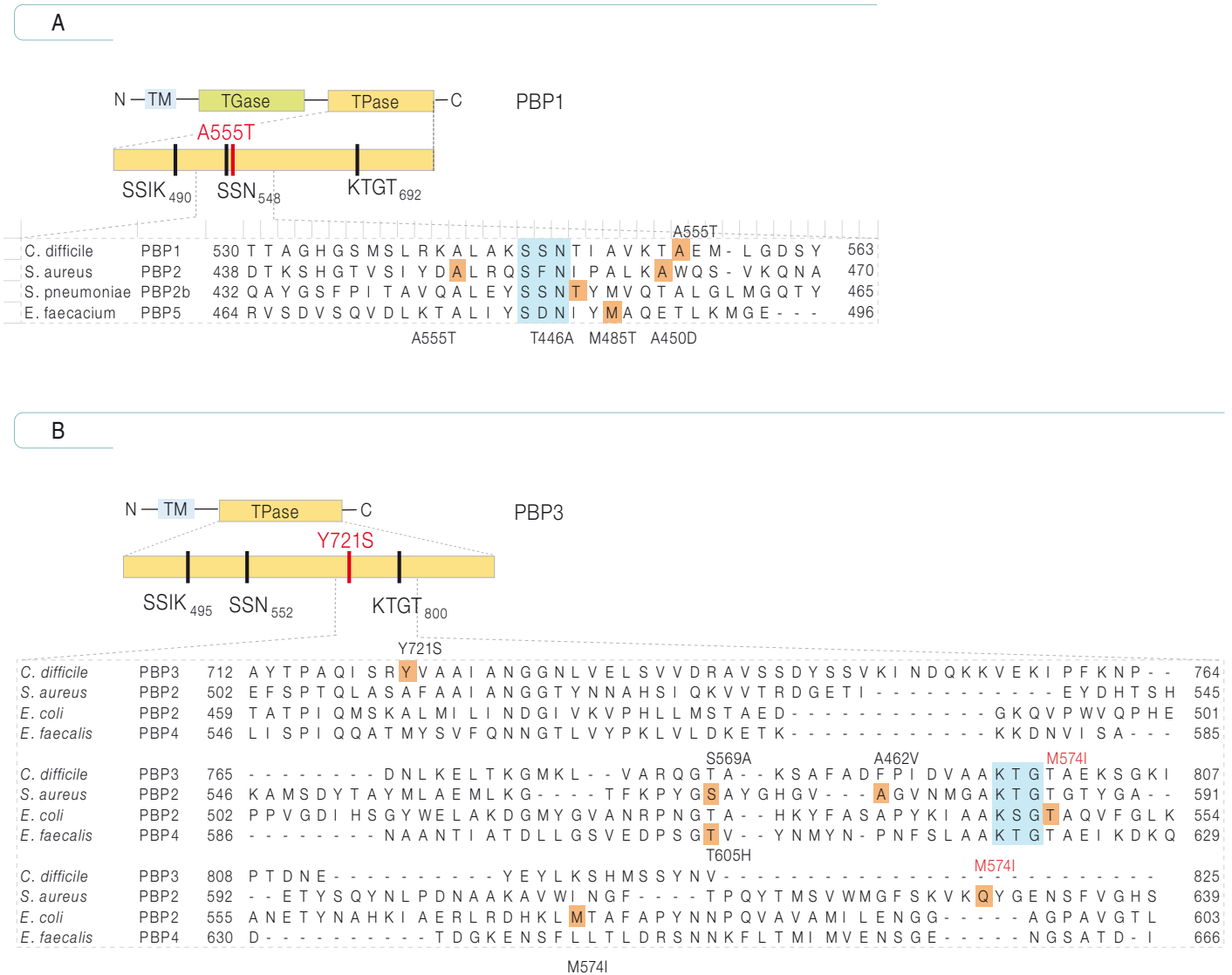
centes ao RT017, a saber as estirpes RT014 e RT477 com CMI inferior ao clone RT017 resistente, apresentaram a substituição Ala555Thr ou outra alteração também perto do motivo funcional SxN (Leu543His), ambas na PBP1. PBPs modificadas com afinidade reduzida para o antibiótico têm sido associadas à resistência aos β-lactâmicos e especificamente ao imipenemo em diferentes microrganismos (13). Não foram encontradas diferenças entre as estirpes resistentes e sensíveis para as restantes HMW PBPs (figura 2). No entanto, todas as 25 estirpes do RT017 do presente estudo, bem como estirpes do RT017 com genoma anotado, estirpe M68 (nº acesso NC_017175) e BJ08 (nº acesso CP003939), apresentaram uma HMW PBP de classe B adicional (PBP5), localizada num elemento móvel nos genomas estudados e anotados, e ausente noutros RTs. Estudos adicionais são necessários para perceber se a PBP5 contribui para a resistência ao imipenemo em *C. difficile* do RT017.

Figura 1: Filogenia de estirpes de *Clostridium difficile* RT017 e determinantes genéticos de resistência aos antibióticos.



A) Análise do genoma partilhado (*core-genome SNP-based Neighbour-joining*) de 25 isolados de *Clostridium difficile* RT017. Cada isolado está marcado de acordo com seu perfil de suscetibilidade ao imipenemo. **B)** para cada isolado o perfil de suscetibilidade a cada antibiótico é indicado juntamente com o respetivo determinante genético de resistência. A identificação dos genes (CDM68_RS) é relativa ao genoma anotado da estirpe *C. difficile* M68.

Figura 2: ▾ Substituições de aminoácidos em duas *penicillin binding proteins* (PBPs) e possível relação com a resistência ao imipenemo em *Clostridium difficile* RT017.



Organização do domínio da **PBP1** (A - homólogo de CDM68_RS04280 da estirpe M68 ou CD630_07810 na estirpe de laboratório 630) e da **PBP3** (B - homólogo de CDM68_RS04280 ou CD630_11480), com o domínio transpeptidase (TPase) em amarelo, o domínio transglicosilase (TGase) verde e o segmento transmembranar (TM) em azul. A localização dos motivos conservados SxxK, SxN e KTG[T/S] é mostrada com linhas pretas, estando as mutações encontradas nas estirpes resistentes marcadas por linhas vermelhas. Os alinhamentos abaixo das duas PBPs mostram a posição (em laranja) e natureza das substituições de aminoácidos nas estirpes RT017 resistentes ao imipenemo e em PBPs selecionadas dos organismos indicados. Números de acesso (www.ncbi.gov): *Staphylococcus aureus* (AAA74375.1); *Streptococcus pneumoniae* (WP_001829432.1), *Escherichia coli* (AAB40835.1), *Enterococcus faecalis* (AAS77615.1), e *Enterococcus faecacium* (AIG13039.1). Os aminoácidos estão indicados pelo código de uma letra.

_Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que a resistência ao imipenemo em estirpes de *C. difficile* RT017 envolveu a aquisição de mutações nos genes *pbp1* e *pbp3*, que resultam na alteração de aminoácidos perto do motivo TPase das respetivas enzimas. Estas substituições podem levar à diminuição da afinidade das PBP1 e PBP3 para o imipenemo, permitindo a síntese do peptidoglicano mesmo na presença do antibiótico. Como a presença de uma PBP5 adicional é uma característica deste ribotipo, este estudo sugere que a PBP5 possa facilitar a expressão da resistência ao imipenemo através da aquisição de mutações nos genes *pbp1* e *pbp3*. Em estirpes de outros ribotipos que não possuem a PBP5, tais como as duas estirpes dos RT014 e RT477 descritas neste estudo, a mutação na *pbp1* poderá originar apenas um nível de resistência intermédio. Assim, é provável que a disseminação do gene *pbp5* possa contribuir para a disseminação de alto nível de resistência ao imipenemo.

Portugal tem das mais elevadas taxas de infeções associadas aos cuidados de saúde e consumo de carbapenemos na Europa (1). Embora não seja possível associar diretamente o padrão de consumo de carbapenemos ao padrão de resistência em *C. difficile*, alerta-se que o aparecimento de resistência e/ou suscetibilidade reduzida a estes antibióticos pode recapitular o cenário observado com o clone de *C. difficile* RT027 resistente a fluoroquinolonas, quando estas foram o antibiótico mais prescrito nos Estados Unidos da América (14). Este estudo reforça também a necessidade de uma utilização adequada dos antibióticos em Portugal, face à emergência de resistências aos carbapenemos em clones de *C. difficile*, já de si multirresistentes, o que pode contribuir para a sua disseminação. Finalmente, este estudo evidencia a utilidade de WGS para identificação de novos determinantes de resistência aos antibióticos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo INSA (projeto 2016DDI1284) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (bolsa de investigação no âmbito do projeto Pest-C/EQB/LA0006/2011; programa IF IF/00268/2013/CP1173/CT0006, a MS; bolsa de doutoramento PD/BD/105738/2014, a ALM). Agradece-se aos hospitais partici-

pantes por cederem amostras para a vigilância laboratorial da infeção por *Clostridium difficile*; à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Este artigo é uma tradução abreviada da publicação:

Isidro J, Santos A, Nunes A, Borges V, Silva C, Vieira L, Mendes AL, Serrano M, Henriques AO, Gomes JP, Oleastro M. *Imipenem Resistance in Clostridium difficile Ribotype 017, Portugal*. Emerg Infect Dis. 2018;24(4):741-745.

<https://dx.doi.org/10.3201/eid2404.170095>

Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals, 2011-2012. Stockholm: ECDC, 2013. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>
- (2) Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(6):723-50. doi: 10.1093/femsre/fux048. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904847/>
- (3) Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al. *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453186/>
- (4) Slimings C, Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2014;69(4):881-91. Epub 2013 Dec 8.
- (5) Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Infect Dis. 2016;3(1):23-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735502/>
- (6) Gerding DN, Lessa FC. The epidemiology of *Clostridium difficile* infection inside and outside health care institutions. Infect Dis Clin North Am. 2015;29(1):37-50.
- (7) Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):529-49. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20610822/>
- (8) King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. Future Microbiol. 2015;10(1):1-4.
- (9) Freeman J, Vernon J, Morris K, et al.; Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. Clin Microbiol Infect. 2015;21(3):248.e9-248.e16. Epub 2014 Oct 13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.017>
- (10) Isidro J, Santos A, Nunes A, et al. Imipenem Resistance in *Clostridium difficile* Ribotype 017, Portugal. Emerg Infect Dis. 2018;24(4):741-745. <https://doi.org/10.3201/eid2404.170095>
- (11) He M, Sebahia M, Lawley TD, et al. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(16):7527-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2867753/>
- (12) Santos A, Isidro J, Silva C, et al. Molecular and epidemiologic study of *Clostridium difficile* reveals unusual heterogeneity in clinical strains circulating in different regions in Portugal. Clin Microbiol Infect. 2016;22(8):695-700. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.002>
- (13) Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. FEMS Microbiol Rev. 2008;32(2):361-85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
- (14) He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet. 2013;45(1):109-13. Epub 2012 Dec 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3605770/>