

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

GABRIELE ZVIR SALDANHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Clostridium*
difficile EM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO NO BRASIL**

Porto Alegre

2019

GABRIELE ZVIR SALDANHA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Clostridium difficile* EM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Andreza Francisco Martins

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Saldanha, Gabriele Zvir
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Clostridium difficile EM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO
MULTICÊNTRICO NO BRASIL / Gabriele Zvir Saldanha. --
2019.
98 f.
Orientadora: Andreza Francisco Martins.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Estudo epidemiológico. 2. Clostridium difficile.
3. MLST. 4. Cultura anaeróbia. I. Martins, Andreza
Francisco, orient. II. Título.

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis,
se você lembrar de acender a luz.”

Alvo Dumbledore

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo a professora Andreza Martins pela oportunidade de trabalhar nesse projeto, a todo o aprendizado e crescimento que tive sob sua orientação. Agradeço à Renata Neto Pires, Alexandre Monteiro, Cássia Caurio e professor Alessandro Pasqualotto pela parceria nesse projeto.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Roberta Taufer Boff, Franciele Adam, Marcela de Borba e Heloísa Giacomelli pelo apoio nas horas mais difíceis e por tantos momentos bons e trocas vividas. Agradeço pelo trabalho de nossa equipe, composta pela doutoranda Sílvia Lentz e mestrandas Rafaela Ramalho e Daniela Signori, e alunas bolsistas Ana Paula Rauber, Thaianne Marques e Camila Muller. À todos os alunos do laboratório de Microbiologia Aplicada, meu muito obrigada!

Também agradeço aos meus familiares pelo apoio e incentivo em todos os momentos, e de saber a importância desse título na minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao PPGMAA por oportunizar o desenvolvimento dessa pesquisa.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Clostridium difficile* EM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO NO BRASIL¹

Autor: Gabriele Zvir Saldanha

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Andreza Francisco Martins

RESUMO

A doença associada ao *Clostridium difficile* (CDI) é mundialmente reconhecida como um problema de saúde pública, sendo a tipagem molecular uma ferramenta importante para o entendimento da disseminação da bactéria. Esse trabalho tem como objetivo identificar as STs (*sequence type*) de isolados de *C. difficile* através da tipagem molecular por MLST (*multilocus sequence type*), bem como identificar os fatores de virulência e resistência associados a essas cepas. Foram coletadas amostras de fezes diarreicas oriundas de oito hospitais de três estados brasileiros em dois dias pré-estabelecidos e 80 amostras de carnes embaladas. Para o isolamento da bactéria, utilizou-se o meio seletivo *C. difficile* CM0601 (Oxoid) suplementado com *D*-cicloserina e cefoxitina, em atmosfera de anaerobiose. MALDI-TOF MS (Bruker) foi utilizado para a identificação da bactéria em nível de espécie. O MLST foi realizado baseado no sequenciamento dos genes *housekeeping*: *adh*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* e *tpi*. Para a análise dos fatores de virulência, sete amostras foram submetidas ao sequenciamento de nova geração pela plataforma Illumina Miseq. Em 13 amostras foi realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de ágar diluição para os antimicrobianos metronidazol e vancomicina. Do total de 153 amostras analisadas, foram recuperados das fezes 17 isolados de *C. difficile*, identificando-se as ST2, ST15, ST35, ST42, ST54, ST67 e oito novas STs. Genes de resistência como *ermB*, *tetM*, *VanW* e *nimb*, e outros genes associados aos fatores de virulência, como *cwp84*, *cwp66*, *cwp2*, *fbpA* e *secA* foram encontrados em cepas toxigênicas. A CIM apresentou isolados resistentes à vancomicina e ao metronidazol. A bactéria não foi encontrada em amostras de carnes. As diferentes STs encontradas no estudo revelam a grande variabilidade de cepas de *C. difficile* que circulam em hospitais brasileiros, contribuindo para um melhor entendimento da dinâmica de distribuição da bactéria no país.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*; MLST; fatores de virulência.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (xx p.) março, 2019.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND VIRULENCE FACTORS OF *Clostridium difficile* IN EPIDEMIOLOGICAL MULTICENTRIC STUDY IN BRAZIL¹

Author: Gabriele Zvir Saldanha

Advisor: Prof^(a). Dr^(a). Andreza Francisco Martins

ABSTRACT

The disease associated with *Clostridium difficile* (CDI) is recognized worldwide as a public health problem, and molecular typing is an important tool for understanding the dissemination of the bacteria. This work aims to identify STs (*sequence type*) of *C. difficile* isolates through molecular typing by MLST (*multilocus sequence type*), as well as to identify the virulence and resistance factors associated with these strains. Samples of diarrheal stools from eight hospitals in three Brazilian states were collected on two pre-established days and 80 samples of packed meats. For the isolation of the bacteria, the *C. difficile* CM0601 (Oxoid) selective medium supplemented with D-cycloserine and cefoxitin was used under anaerobic conditions. MALDI-TOF MS (Bruker) was used to identify the bacteria at the species level. MLST was performed based on the sequencing of *housekeeping* genes: *adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* and *tpi*. For the analysis of the virulence factors, seven samples were submitted to the new generation sequencing by the Illumina Miseq platform. In 13 samples the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test was performed using the agar dilution method for the antimicrobials metronidazole and vancomycin. From the total of 153 analyzed samples, 17 isolates of *C. difficile* were recovered from the stools and ST2, ST15, ST35, ST42, ST54, ST67 and eight new STs were identified. Resistance genes such as *ermB*, *tetM*, *VanW* and *nimb*, and other genes associated with virulence factors such as *cwp84*, *cwp66*, *cwp2*, *fbpA* and *secA* were found in toxigenic strains. The MIC presented isolates resistant to vancomycin and metronidazole. The bacteria were not found in meat samples. The different STs found in the study reveal the great variability of *C. difficile* strains circulating in Brazilian hospitals, contributing to a better understanding of the dynamics of bacterial distribution in the country.

Key words: *Clostridium difficile*; MLST; virulence factors.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (xx p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3.	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Caracterização da bactéria.....	15
3.2	Fatores de virulência	15
	3.2.1 Produção de toxinas	15
	3.2.2 Outros fatores de virulência	18
3.3	Métodos de identificação.....	20
3.4	Tipagem molecular	21
3.5	Infecção por <i>Clostridium difficile</i> (CDI)	25
3.6	Tratamento de CDI e mecanismos de resistência em <i>C. difficile</i>	29
3.7	Reservatório nos alimentos	31
3.8	Epidemiologia	32
	3.8.1 Distribuição Global	32
	3.8.2 Epidemiologia Molecular	34
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Caracterização da amostra	40
4.2	Semeadura das amostras de fezes	40
4.3	Semeadura das amostras de carne	41
4.4	Confirmação das amostras positivas.....	41
4.5	Teste Molecular através do kit GeneXpert	41
4.6	Extração de DNA por lise térmica	42
4.7	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.8	MLST.....	44
	4.8.1 Sequenciamento de fragmentos	44
	4.8.2 Sequenciamento do Genoma Completo	44
	4.8.3 Análise filogenética	45
4.9	Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)	45
5.	RESULTADOS	49

5.1	Coleta das amostras de fezes.....	49
5.2	Cultura das amostras de fezes	49
5.3	Cultura das amostras de carne	51
5.4	PCR in house e GeneXpert <i>C.difficile</i>	51
5.5	MLST	53
5.6	Fatores de virulência e resistência das cepas toxigênicas	55
5.7	Análise filogenética	58
	5.7.1 eBURST	58
	5.7.2 Dendrograma	58
5.8	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	63
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONCLUSÃO	74
8.	PERSPECTIVAS	75
9.	REFERÊNCIAS	76
10.	ARTIGO	84
11.	APÊNDICES	94

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Desempenho dos principais métodos de tipagem de <i>Clostridium difficile</i>	10
Tabela 2. Recomendações para Tratamento de CDI publicada no guia “Clinical Practice Guidelines for <i>Clostridium difficile</i> Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)”	17
Tabela 3. Principais cepas de <i>C. difficile</i> circulantes em humanos baseado em métodos de tipagem molecular	25
Tabela 4. Genes housekeeping de <i>Clostridium difficile</i> e seus respectivos primers	30
Tabela 5. Pontos de corte para <i>C. difficile</i> preconizados pelo CLSI e BrCAST.....	33
Tabela 6. Número de coletas de amostras de fezes realizadas nos Hospitais participantes da pesquisa	36
Tabela 7. Resultado das culturas das amostras de fezes. Espécies confirmadas através de MALDI-TOF MS (Bruker)	37
Tabela 8. Resultado das culturas das amostras de carnes. Espécies confirmadas através de MALDI-TOF MS (Bruker)	38
Tabela 9. Resultados da PCR in house e GeneXpert	40
Tabela 10. Listagem das STs determinadas pelo MLST em cada amostra do estudo	41
Tabela 11. Análise dos fatores de virulência e resistência encontrados nas amostras toxigênicas submetidas à WGS (Whole genome sequencing)	42
Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima de treze amostras de <i>C. difficile</i> testadas para os antimicrobianos metronidazol e vancomicina	52
Tabela 13. CIM50 e CIM90 dos isolados de <i>C. difficile</i> testados e comparação do número de amostras sensíveis e resistentes de acordo com BrCast e CLSI	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Processo de invasão celular mediada por Toxina A e Toxina B de <i>C. difficile</i>	5
Figura 2. Localização do PaLoc e CdtLoc no cromossomo da cepa de referência <i>C.difficile</i> 630	6
Figura 3. Clados de <i>C. difficile</i> determinados pela técnica de MLST.....	13
Figura 4: Algoritmo para confirmação de CDI	14
Figura 5. Patogênese de <i>Clostridium difficile</i>	15
Figura 6. Fluxograma das análises realizadas com as amostras de fezes ..	34
Figura 7. Fluxograma das análises realizadas com as amostras de carnes	35
Figura 8. Gel de agarose mostrando as amplificações dos genes <i>housekeeping</i> e dos genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> e <i>tcdC</i> da amostra 153	39
Figura 9. Diagrama gerado pela plataforma online eBURST v3	47
Figura 10. Dendrograma gerado pelo software BioNumerics 7.6	49
Figura 11. Leitura do teste de CIM	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDI	<i>Clostridium difficile</i> infection
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ECDC	European Centre for Disease and Prevention
MLST	<i>Multilocus sequence type</i>
ST	<i>Sequence type</i>
RT	Ribotipo
PaLoc	<i>Locus da Patogenicidade</i>
CdtLoc	Locus da toxina binária
WGS	Whole genome sequencing
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
MLVA	Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis
EIA	Enzyme Immunoassay
GDH	Glutamate Dehydrogenase testing assay
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test
TC	Toxigenic Culture
CCTA	Cell Cytotoxicity Assay
CCNA	Cell Cytotoxicity Neutralization Assay
CIM	Concentração Inibitória Mínima
µL	Microlitro
µg	Micrograma
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

1. INTRODUÇÃO

A infecção causada por *Clostridium difficile* (CDI – *Clostridium difficile infection*) é uma doença grave que atinge a superfície interna do cólon, causando inflamações devido à produção de toxinas, podendo levar o indivíduo a desenvolver colite pseudomembranosa (Pereira, 2014). O principal fator de risco da doença envolve o uso prévio de antibióticos de amplo espectro pelos pacientes, o que provoca a alteração da microbiota normal do intestino, permitindo a proliferação do *C. difficile* (DENÈVE et al., 2009). Este microrganismo vem sendo apontada como a maior causa de diarreia nosocomial entre adultos nos países industrializados, e está associada com índices significativos de morbidade, particularmente entre pacientes com idade maior que 65 anos (CDC, 2012).

A ocorrência destas infecções aumenta consideravelmente os custos associados aos cuidados de saúde. Uma vez no ambiente, os esporos de *C. difficile* são difíceis de eliminar, podendo levar a transmissão-cruzada entre hospedeiros susceptíveis, com o potencial de causar surtos em ambiente hospitalar (Cohen et al., 2014).

Tendo em vista que a transmissão da bactéria se dá via fecal-oral e os esporos resistem às altas temperaturas, os alimentos podem ser fontes de contaminação do patógeno. Existem relatos de uma sobreposição genética entre cepas toxigênicas de *C. difficile* isoladas de humanos, gado e carne de varejo (Rodriguez-Palacios et al., 2014), sendo importante a pesquisa de fontes exógenas de contaminação.

Estimativas recentes sugerem que o número de casos de CDI nos EUA está próximo a 500.000 infecções anualmente, sendo a cepa epidêmica e virulenta de ribotipo 027 a mais comumente identificada (MCDONALD et al., 2018). Na Europa, os índices de CDI vem diminuindo, sendo que em 2016 foram relatados 7 711 casos em 20 países (ECDC, 2018). Na América Latina, a dinâmica da CDI tem sido estudada principalmente no Chile, Uruguai, Costa Rica, Argentina, México e Brasil. No entanto, dados epidemiológicos e sistemas de vigilância são escassos para essa região (MUÑOZ et al., 2018).

A proposta dessa pesquisa é verificar a presença de *C. difficile* bem como fazer a caracterização molecular das cepas encontradas, em amostras de fezes de pacientes internados e em amostras de carnes embaladas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a relação genética e os fatores de virulência das cepas de *Clostridium difficile* circulantes em diferentes estados brasileiros.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Verificar a presença de *C. difficile* em amostras de fezes diarreicas de pacientes internados em oito diferentes hospitais de três estados brasileiros.
- 2.2.2 Verificar a presença de *C. difficile* em diferentes tipos de carnes seladas prontas para venda no município de Porto Alegre.
- 2.2.3 Determinar as STs (*Sequence type*) de *C. difficile* circulantes nos diferentes ambientes estudados através da técnica de MLST.
- 2.2.4 Caracterizar a produção de toxinas nas cepas identificadas.
- 2.2.5 Determinar o perfil de susceptibilidade das cepas toxigênicas e não-toxigênicas.
- 2.2.6 Avaliar fatores de virulência das cepas toxigênicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Caracterização da bactéria

A bactéria *Clostridium difficile* foi descrita pela primeira vez por Hall e O'Toole em 1935, anteriormente denominada *Bacillus difficilis* (BARTLETT, 2008). Caracteriza-se como um bacilo gram-positivo, de crescimento anaeróbio e formador de esporos, o que possibilita sua persistência e disseminação no ambiente. Os esporos são resistentes ao calor, à acidez, a determinados antibióticos e à maioria dos desinfetantes comuns, podendo permanecer viáveis por meses (PAREDES-SABJA; SHEN & SORG, 2014). Recentemente, foi realizada uma análise filogenética da bactéria, que foi reclassificada como *Clostridioides difficile* (LAWSON et al., 2016). Porém, como a espécie *Clostridium difficile* é amplamente reconhecida na comunidade médica e no meio científico, diversos autores ainda utilizam essa nomenclatura.

O *Clostridium difficile* pode ser encontrado em alimentos e na água, bem como na microbiota normal do homem e de vários animais de criação, de estimação e animais silvestres (PEREIRA, 2014).

3.2 Fatores de Virulência

3.2.1 Produção de Toxinas

A produção das toxinas A (enterotoxina) e B (citotoxina) está associada a colite pseudomembranosa (VIEIRA et al., 2010). Tanto a toxina A como a toxina B rompem o citoesqueleto de actina das células epiteliais intestinais por meio da glicosilação de proteínas UDP-glicose das sub-famílias Rho e Ras (Figura 1), levando à morte celular, inflamação e as manifestações clínicas da CDI (BARBUT et al., 2007).

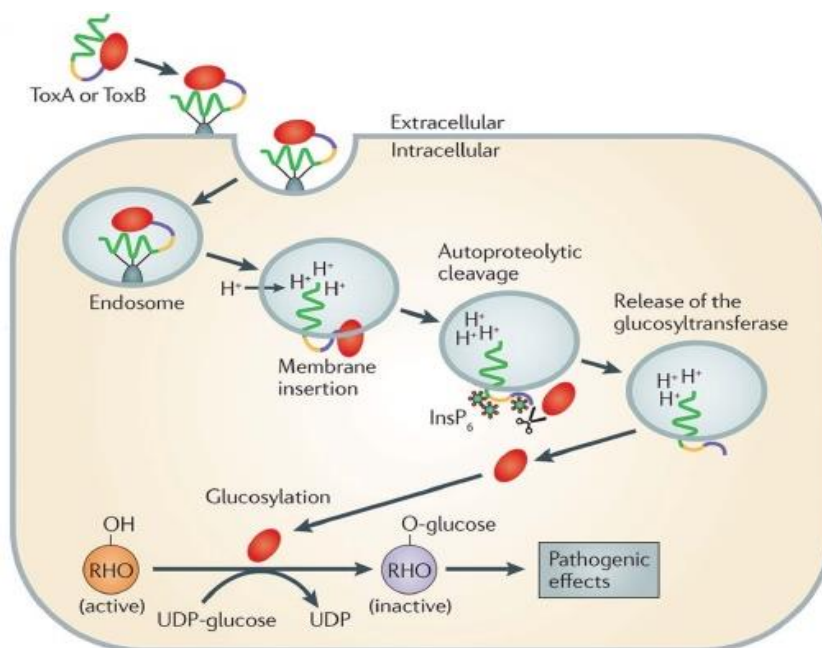


Figura 1. Processo de invasão celular mediada por Toxina A e Toxina B de *C. difficile*. UDP: Difosfato de Uridina (AWAD et al., 2015)

A produção da toxina A é regulada pelo gene *tcdA* e a toxina B pelo gene *tcdB*, principais fatores responsáveis pela patogenicidade da bactéria (PEREIRA, 2014). Embora as toxinas A e B tenham cada uma, papel na patogênese da CDI, a toxina B é mais potente e está diretamente relacionada a CDI. A CDI causada pela cepa (A–, B+) é comum e pode levar a resultados falso-negativos a partir de testes que investiguem somente a presença da toxina A. Alternativamente, as cepas (A+, B–) são extremamente raras (MCCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012).

A região cromossômica onde se localizam os genes das toxinas A e B é chamada de PaLoc (*Locus* da Patogenicidade). O PaLoc é uma ilha genômica (Figura 2) que normalmente é encontrado na mesma localização no cromossomo, e é substituído nas linhagens não-toxigênicas, por uma região não codificante altamente conservada de 115/75 pares de bases. (MONOT et al., 2015). Relatos recentes na literatura descrevem que em algumas cepas atípicas o PaLoc pode ser transferido através de elementos genéticos móveis (RAMÍREZ-VARGAS et al., 2018).

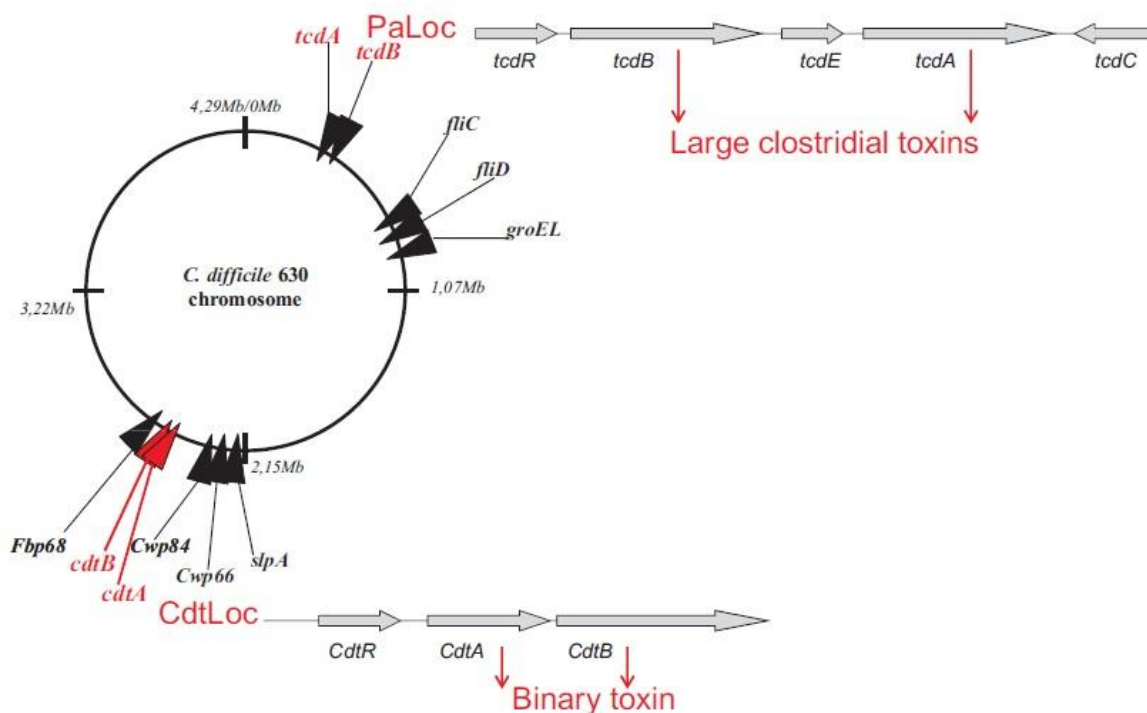


Figura 2. Localização do PaLoc e CdtLoc no cromossomo da cepa de referência *C.difficile* 630 (DENEVE, 2009).

Além dos genes das toxinas A e B, três genes acessórios (*tcdC*, *tcdR* e *tcdE*) codificam proteínas que estão envolvidas na regulação e secreção de toxinas. O gene *tcdR* é um fator sigma de RNA polimerase alternativo e regula positivamente a expressão dos genes das toxinas A e/ou B. O *tcdC* funciona como um fator anti-sigma que regula negativamente a expressão dessas toxinas (CURRY et al., 2007). Já o *tcdE* pode funcionar como uma proteína lítica para facilitar a liberação de toxina A e toxina B para o ambiente extracelular, pois as mesmas não possuem um peptídeo sinal (TAN, WEE, & SONG, 2001).

Além da variabilidade em *tcdA* e *tcdB*, diferentes alelos *tcdC* foram relatados entre cepas toxigênicas. Foram descritos três genótipos de *tcdC*: *tcdC-A*, que possui uma deleção de 39 pares de bases e é encontrado comumente em cepas do toxotipo V e VI e *tcdC-B* e *tcdC-C* que apresentaram deleção de 18 pares de bases, sendo que *tcdC-C* é derivado de cepas de pacientes assintomáticos (SPIGAGLIA; MASTRANTONIO, 2002). O genótipo *tcdC-B* ocorre em todas as cepas hipervirulentas do ribotipo 027, que além de apresentar essa deleção inespecífica de 18 pares de bases, apresentam uma deleção pontual na posição 117 do gene, que leva a uma proteína TcdC inativa e truncada (DENEVE et al., 2009).

Além de cepas produtoras de toxinas A e/ou B, a espécie também pode apresentar a chamada toxina binária (CDT), uma terceira toxina que consiste em dois polipeptídeos não ligados, CdtA e CdtB, que quando combinados apresentam atividades citotóxica e enterotóxica (CARMAN et al., 2011). A prevalência de cepas humanas de *C. difficile* que possuem apenas genes CDT (A⁻B⁻CDT⁺) é geralmente baixa (<5%) (MCGOVERN et al., 2017).

De acordo com Carman et al. (2011), o *locus* de patogenicidade da toxina binária é chamado de CdtLoc, onde o gene *cdtA* forma uma mono-ADP-ribosiltransferase específica para actina, que quando ligada à *cdtB*, interrompem os processos metabólicos das células hospedeiras, levando à morte celular. Nesse locus ainda se localiza o gene *ctdR*, regulador da expressão (Figura 2). A toxina binária é encontrada em 23% das cepas de *C. difficile* (MONOT et al., 2015).

Muitos pacientes são colonizados por *C. difficile* e assintomáticos, pois a colonização pode ocorrer por cepas produtoras ou não-produtoras de toxinas. A prevalência de colonização difere entre as diferentes faixas etárias das populações: por exemplo, neonatos e crianças com menos de 1 ano de idade são frequentemente colonizados por *C. difficile*, mesmo com cepas produtoras de toxinas, sem apresentar sintomas, o que pode ser explicado pela falta de receptores para as toxinas nesses indivíduos (MCCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012). Em adultos, é provável que os pacientes colonizados sirvam como reservatórios para *C. difficile* em ambientes de cuidados de saúde. Outros reservatórios potenciais para *C. difficile* incluem animais domésticos, o suprimento de alimentos, como carne, e ambientes como solo e água de rio (BAUER; KUIJPER, 2015).

Nos Estados Unidos, a colonização assintomática de adultos da comunidade varia de 7 a 26% em unidades de tratamentos agudos e de 5 a 7% em instituições de longa permanência, como lar de idosos (COHEN et al., 2010).

3.2.2 Outros fatores de virulência

Além da produção das toxinas, a bactéria apresenta outros fatores que conferem maior aderência ao hospedeiro, garantindo assim um maior sucesso na colonização e estabelecimento da infecção. Entre esses fatores destacam-se as adesinas de superfície celular (*S-layer*), proteínas da parede celular (CWP), proteínas de ligação à fibronectina, flagelos e a proteína de choque térmico GroEL (AWAD et al., 2015).

Adesinas de superfície celular (*S-layer*) formam tipicamente a camada mais externa da bactéria, concedendo forte potencial imunogênico, produzindo proteínas de *S-layer* (SLPs), e ao contrário da maioria das bactérias, ela é composta por um único tipo de proteína em *C. difficile* e consiste em duas subunidades proteicas comumente referidas como proteínas de alto peso molecular (HMW – *high molecular weight*) e proteínas de baixo peso molecular (LMW – *low molecular weight*) (SÁRA; SLEYTR, 2000). De acordo com Ryan et al. (2011) além da adesão, as SLPs são importantes no reconhecimento imunológico e na resposta inflamatória.

As proteínas CWP pertencem a uma família de proteínas associadas à superfície celular que ficam ancoradas através do polissacarídeo II (PSII). Os genes das proteínas CWP podem ser altamente variáveis ou muito conservados entre cepas de *C. difficile*, como *cwp84*, *cwp66* e *cwpV*, que atuam na maturação do precursor de *S-layer*, degradação de proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, ligam-se a células Vero nos ensaios de citotoxicidade e possuem propriedades auto agregativas (JANOIR, 2016).

Proteínas de ligação à fibronectina (glicoproteína que atua na adesão do patógeno ao hospedeiro) são encontradas em todas as cepas de *C. difficile*, porém o seu papel na patogenicidade não é totalmente compreendido. Sabe-se que o gene *fbpA* possui propriedades degradativas que aumentam a invasividade e disseminação de *C. difficile* dentro do hospedeiro infectado, bem como interação com a mucosa intestinal (AWAD et al., 2015).

Flagelos conferem motilidade e são importantes em patógenos entéricos. Em *C. difficile*, os principais genes relacionados à expressão de flagelos são FliC e FliD, monômetro estrutural de flagelina e capa de proteína, respectivamente. Os genes flagelares são expressos durante a fase inicial da colonização e podem estar envolvidos nesse processo. Além disso, a produção de anticorpos anti-flagelina específicos indica que os flagelos são expressos durante o curso de CDI em humanos (TASTEYRE et al., 2000).

A proteína de choque-térmico GroEL possui cerca de 58 kDa e é expressa após exposição a estresse incluindo calor, choque ácido ou osmótico, privação de ferro, a presença de concentrações sub-inibitórias do antibiótico ampicilina, ou contato com células eucarióticas *in vitro*. A adesão de *C. difficile* às células epiteliais *in vitro* mostrou aumentar após o choque térmico em diversos estudos (HENNEQUIN; COLLIGNON; KARJALAINEN, 2001).

3.3 Métodos de Identificação

As técnicas mais conhecidas para a detecção da bactéria incluem a cultura toxigênica (TC), ensaio de citotoxicidade celular (CCTA), ensaios imunoenzimáticos de toxinas (EIA), técnica de glutamato desidrogenase (GDH), métodos moleculares e recentemente, a técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF).

A cultura toxigênica (TC) consiste no cultivo anaeróbio de amostras de fezes em meio seletivo, realizando-se previamente um tratamento de choque de álcool, e quando combinado com um método de detecção de toxinas sensível e específico (como CCTA ou PCR), a cultura toxigênica é considerada como um dos padrões ouro do diagnóstico de CDI (LUK et al., 2014).

O ensaio de citotoxicidade celular (CCTA) baseia-se na detecção do efeito citopático na cultura de células que é neutralizado pela presença de anticorpos contra as toxinas do *C. difficile*. As células são cultivadas na presença de um filtrado fecal, com e sem a presença de anticorpos antitoxina, então estas culturas são examinadas microscopicamente em 24 e 48 h para evidência de um efeito citopático (MUSHER et al., 2007). As limitações dessa técnica incluem a dificuldade dos laboratórios em realizar culturas de células e um certo grau de especialização para reconhecer alterações nas células no momento da análise (PLANCHE; WILCOX, 2011).

O ensaio imunoenzimático (EIA) consiste na utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais contra as toxinas de *C. difficile*. Atualmente, os kits comerciais incluem a detecção das toxinas A e B e são de baixo custo, porém a sensibilidade e especificidade podem variar de 40 a 100% dependendo do kit utilizado (BURNHAM; CARROLL, 2013).

A técnica de GDH utiliza uma enzima metabólica codificada pelo gene *gluD*. Este antígeno é produzido em níveis elevados em todos os isolados de *C. difficile*, incluindo estirpes não-toxigênicas. É um método importante na clínica como teste de rastreio, possuindo alta sensibilidade, tempo rápido de resposta para resultados negativos e baixo custo se comparado a métodos moleculares. Todavia, deve ser seguido de um teste confirmatório para a detecção da presença de toxinas (EASTWOOD et al., 2009).

Os métodos moleculares incluem desde a reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) convencional até PCR em tempo real, sendo que há muitos kits comerciais para amplificação e detecção dos genes de *C. difficile*.

Apesar da alta especificidade e sensibilidade, os testes detectam a presença dos genes responsáveis pela codificação das toxinas, porém não é possível detectar a sua expressão, necessitando a sua associação com dados do quadro clínico do paciente (BURNHAM; CARROLL, 2013). Apesar dos testes moleculares custarem até três vezes mais que o EIA, diversos estudos apontam que sua utilização diminui consideravelmente o tempo de isolamento dos pacientes, gerando economia nos custos com internação (BARBUT et al., 2011).

O kit comercial Xpert *C. difficile* (GeneXpert Cepheid®) é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo para a rápida identificação e diferenciação de toxina B e toxina Binária diretamente de amostras de fezes. O teste utiliza a reação em cadeia da polimerase automatizada em tempo real para detectar os genes *tcdB*, *cdt* e deleção no gene regulatório *tcdC* nt 117 (*tcdCΔ117*), sendo que essa deleção é característica da cepa hipervirulenta NAP1/B1/027, o que possibilita ao teste presumir a sua presença na amostra. O teste demonstra 100% de especificidade e ~95% de sensibilidade¹.

A Ionização/Dessorção por Laser Assistida por Matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (*Time of flight*), MALDI-TOF, consiste em uma técnica automatizada para a identificação de espécies bacterianas, sendo extremamente rápida e de alta acurácia. Esse método analítico, na qual proteínas são ionizadas, mede a razão de sua massa e carga (*m/z*) sendo que cada espécie bacteriana possui um perfil único. A reprodutibilidade desta técnica se dá através da análise das proteínas ribossomais expressas. A gama de massa molecular usada para estas análises é determinada entre 2.000 e 20.000 Da, onde as proteínas ribossômicas aparecem e, aliado a um extenso banco de dados, é possível identificar a amostra a nível de gênero e em muitos caso até espécie (SINGHAL et al., 2015). Diversos tipos de amostras podem ser empregadas na análise, como urocultura e hemocultura. Porém, para pesquisa de *C. difficile* se faz necessário o crescimento prévio da colônia, sendo um excelente método de identificação associado à cultura toxigênica (PERRY, 2017).

3.4 Tipagem Molecular

¹ Cepheid, Xpert® *C. difficile* Kit Insert, 300-9291, Rev. E, November 2012.

O interesse na tipagem de cepas de *C. difficile* vem aumentando, pois a tipagem permite a análise epidemiológica da bactéria a nível global, tanto para avaliar as cepas que circulam em diferentes partes do mundo, como para conhecer a evolução das mesmas. Além disso, a tipagem pode ser usada para rastrear eventos de transmissão e surtos, e pode servir para identificar a cepa causadora da doença em pacientes recorrentes, verificando se estes pacientes têm uma recaída associada à cepa originalmente causadora da infecção ou se eles adquiriram ou se reinfectaram com uma nova do ambiente (KNETSCH et al., 2013).

Os principais métodos utilizados na tipagem molecular de *C. difficile* são *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), Ribotipagem, Análise de Endonuclease de Restrição (REA), *Multilocus Variable-number Tandem-repeat Analysis* (MLVA) e *Multilocus Sequency Typing* (MLST). Outras metodologias, utilizadas com menor frequência, incluem a Toxinotipagem, Tipagem de Sequência de Proteína A de *S-layer* (slpAST) e mais recentemente, sequenciamento do genoma total (WGS) (COLLINS; ELLIOTT; RILEY, 2015). Para avaliar a capacidade de um método em discriminar cepas únicas como diferentes, utiliza-se a escala de Simpson, onde o valor máximo de *D* (índice de discriminação) é 1 (HUNTER; GASTON, 1988). A tabela 1 demonstra uma comparação entre os métodos.

Tabela 1. Desempenho dos principais métodos de tipagem de *Clostridium difficile*. Adaptado de Knetsch et al., 2013.

Método	Alvo	Poder discriminatório	Tipabilidade	Reprodutibilidade	Facilidade na interpretação	Complexidade da técnica	Valor de <i>D</i>
Baseado em padrão de bandas							
REA	Genoma total	Bom	Razoável	Razoável	Pobre	Moderado	---
PFGE	Genoma total	Moderado	Razoável	Moderado	Razoável	Moderado	0,843
Ribotipagem	16S 23S ITS	Bom	Moderado	Moderado	Moderado	Baixo	0,688- 0,700
MLVA	Genoma total	Excelente	Pobre	Moderado	Bom	Moderado	0,964
Baseado em sequenciamento							
MLST	7 GH	Bom	Moderado	Moderado	Excelente	Moderado	0.958

ITS: Internal Transcribed Spacer

GH: genes *housekeeping*

O PFGE foi o primeiro método utilizado para tipagem de *C. difficile*, sendo considerado o padrão-ouro e consiste na digestão do DNA genômico com uma enzima de restrição que para *C. difficile* a enzima comumente usada é *SmaI* (BURNHAM; CARROLL, 2013). Os fragmentos de DNA resultantes são separados usando eletroforese em gel de agarose de campo pulsado (campo elétrico é repetidamente trocado em três direções diferentes durante o processo), formando padrões de bandas referidos como tipos de *North American Pulsed Field* (NAP). Cepas com 80% de similaridade são geralmente consideradas como um único tipo, embora possa haver uma grande subjetividade na interpretação dos padrões de bandas, especialmente quando as diferenças entre a linhagem de teste e as de referência são pequenas. O valor de *D* para PFGE foi relatado como 0,843 (KILLGORE et al., 2008).

A Ribotipagem por PCR é frequentemente utilizada na Europa e baseia-se na amplificação da região intergênica (ITS) entre os genes *16S* e *23S rRNA*. Este *operon* tem várias cópias no genoma do *C. difficile*, e as diferentes cópias variam em tamanho. Assim, um único par de *primers* pode resultar em um padrão de fragmentos de DNA, geralmente variando de 200 a 700 pb (BIDET et al., 1999). Os fragmentos podem ser visualizadas e comparadas em um gel de agarose, utilizando kits comerciais ou *software* de análise. Em geral, a ribotipagem por PCR exibe bom poder discriminatório, mas pode não ser capaz de diferenciar entre as cepas dos ribotipos intimamente relacionados 027, 106 e 017, possuindo um valor de *D* de 0,700 em estudos nos EUA e de 0,688 no Reino Unido (MANZOOR et al., 2011).

A Análise de Endonuclease de Restrição envolve a digestão do DNA cromossômico usando uma enzima de corte raro, mas em contraste com a PFGE, os fragmentos da digestão são separados por eletroforese padrão, em géis de agarose ou poliacrilamida. A REA utiliza a enzima de restrição *HindIII*, formando *fingerprints* difíceis de interpretar, devido ao grande número de bandas (COLLINS; ELLIOTT; RILEY, 2015)

O método de MLVA usa várias repetições em *tandem* de locus de números variáveis (VNTR) que estão dispersos por todo o genoma e variam em relação ao nível de diversidade. Os amplicons que são obtidos são resolvidos usando eletroforese capilar, seguida pela análise automatizada dos fragmentos. A "soma da diferença de repetições em tandem" (STRD) é usada como uma medida da diferença genética entre os isolados. Até o momento, uma abordagem

consensual para tipagem de MLVA para *C. difficile* não foi estabelecida (BURNHAM; CARROLL, 2013). O valor de *D* relatado para MLVA é de 0,964 (KILLGORE et al., 2008).

A Toxinotipagem é um método baseado no polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR para diferenciação de cepas de *Clostridium difficile* de acordo com as mudanças no PaLoc. Atualmente, são conhecidos 34 toxinotipos: I a XXXIV (RUPNIK, 2016).

O método de slpAST consiste na tipagem de sequência de locus único usando o gene da proteína de camada superficial A, sendo considerado uma metodologia alternativa de genotipagem, reproduzível interlaboratorialmente e com bons resultados em casos de surto. Porém, a experiência geral com slpAST ainda é limitada para *C. difficile*, e os estudos acabam utilizando outro método de tipagem associado ao slpAST (JOOST et al., 2009).

O sequenciamento do genoma total (WGS) é um método de alto rendimento, que vem substituindo abordagens diagnósticas tradicionais, gerando dados através das plataformas Illumina (GA IIx, MiSeq, HiSeq), Roche (454 GS-FLX+, 454 GS-Junior) e Life Technologies (SOLiD, PGM, Proton), as três maiores plataformas mundiais (CHAN et al., 2012). Sequenciando o genoma completo dos isolados, é possível realizar a caracterização dos genes *housekeeping* utilizando bancos de dados abertos, determinando a sequência tipo (ST), por exemplo, no caso do MLST, e outras informações sobre a virulência da cepa.

A técnica de MLST consiste na análise de genes *housekeeping*, que são genes constitutivos altamente conservados em espécies bacterianas, cujas pequenas variações podem ser utilizadas para distinguir cepas, de modo a agrupá-las com base na sua proximidade evolutiva, e podem ser divididas em clados (GRIFFITHS et al., 2010). Os genes *housekeeping* do *C. difficile* são bem descritos na literatura, sendo utilizados para a realização de MLST nos trabalhos de Lemee et al. (2005), Killgore et al. (2008) e Griffiths et al. (2010), que utilizaram amostras fecais humanas, e no trabalho de Rodriguez et al. (2014) que utilizou amostras de carne de varejo. O MLST analisa variações de sequência em um conjunto de genes, e a atribuição de um tipo alélico a cada gene, sendo que para cada combinação única de alelos é atribuída uma sequência tipo (ST). O objetivo é avaliar a estrutura geral da população e diversidade dentro de uma espécie, utilizando alelos típicos com massas entre 300 e 600 pares de bases, pois fragmentos com esse tamanho

podem oferecer leituras confiáveis e reprodutíveis em um único sequenciamento. A tipagem por MLST possui valor de D de 0.958 na escala de Simpson, mostrando-se superior se comparado ao PFGE e Ribotipagem, que se baseiam em padrões de fragmentos em géis, e são de difícil reprodutibilidade interlaboratorial (BURNHAM; CARROLL, 2013). Atualmente, existem oito clados (Figura 3) que separam as cepas analisadas pelo MLST de acordo com a evolução filogenética de *C. difficile* (ELLIOTT et al., 2017).

Apesar da padronização do MLST ter sido realizada em 2010 (GRIFFITHS et al., 2010), ainda é um método relativamente novo se comparado às técnicas clássicas de Ribotipagem, PFGE, REA e Toxinotipo, amplamente difundidas na literatura. Assim, os dados envolvendo MLST são escassos, porém podem mudar a forma como a evolução de *C. difficile* é atualmente entendida.

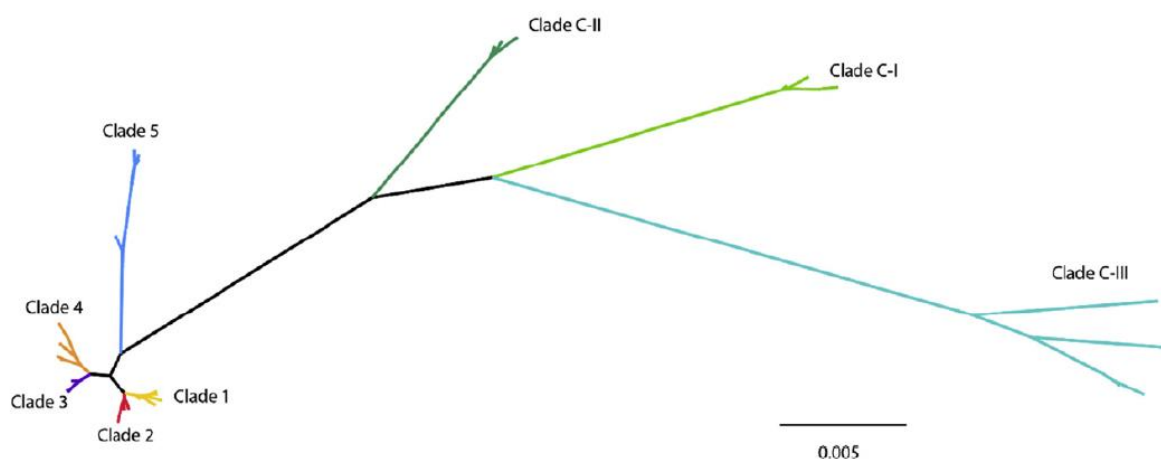


Figura 3. Clados de *C. difficile* determinados pela técnica de MLST. Os clados 1, 2, 3 e 5 consistem principalmente de cepas toxigênicas, enquanto que os clados 4 e C-I permanecem em grande parte não toxigênicos. Menos conhecido, clado C-II contém ST200, toxinotipo XXXII (A-B+). O clado C-III, representado pela ST204, é não-toxigênico (ELLIOTT et al., 2017).

3.5 Infecção por *Clostridium difficile* (CDI)

A bactéria é transmitida por via fecal-oral, tendo como reservatórios os portadores humanos sintomáticos e portadores assintomáticos, através da contaminação fecal de superfícies inanimadas e das mãos de profissionais de saúde, ou por meio do contato direto entre pacientes (BAUER; KUIJPER, 2015) *C.*

difficile é altamente prevalente em neonatos, no entanto, eles geralmente não apresentam sinais clínicos de infecção (SCHÄFFLER; BREITRÜCK, 2018).

Conforme as Diretrizes de Prática Clínica para as Infecções por *Clostridium difficile* em adultos (SHEA, 2010) os casos de CDI devem incluir a presença de sintomas, normalmente diarreia aquosa, e um resultado positivo de exame de fezes para toxinas ou exame de colonoscopia que demonstre colite pseudomembranosa. De acordo com o órgão, sugerem-se dois algoritmos de duas etapas para a confirmação de CDI (Figura 4).

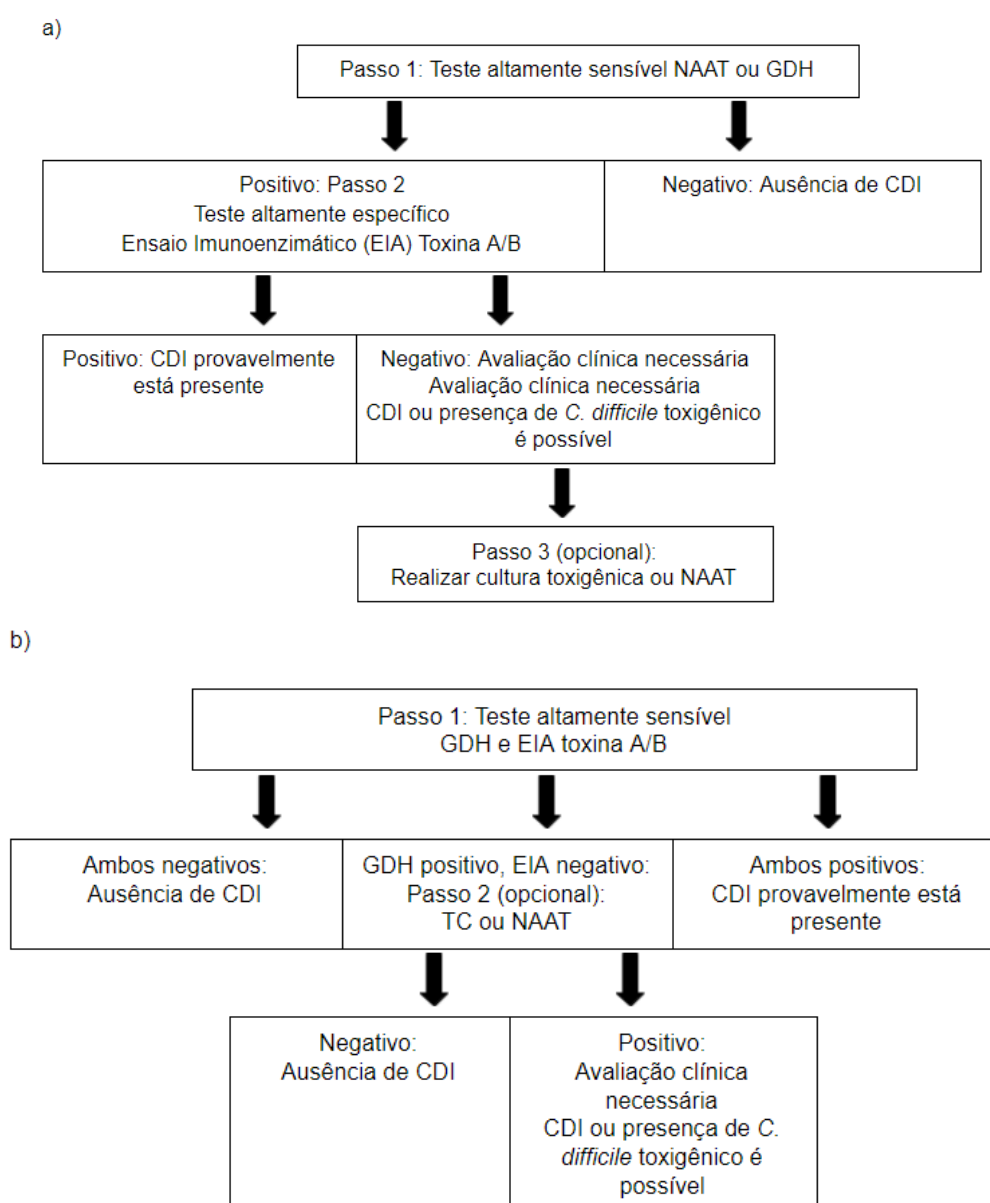


Figura 4: Algoritmo para confirmação de CDI: a) teste de Desidrogenase do Glutamato (GDH) ou Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAT); b) Teste de Desidrogenase do Glutamato (GDH) e Ensaio Imunoenzimático (EIA) Toxina A/B.

Segundo Pereira (2014), as formas vegetativas do *C. difficile* são sensíveis ao pH ácido do suco gástrico, porém seus esporos são resistentes. Uma das hipóteses é que, ao chegar ao intestino delgado, os esporos da bactéria começam a germinar até atingirem sua forma vegetativa, isso pode ocorrer devido à capacidade da bactéria em produzir compostos que permitem utilizar nitrogênio e fosfolipídios encontrados na dieta do hospedeiro para sua sobrevivência na presença de sais biliares. Estas formas vegetativas, ao chegarem ao cólon encontrando condições favoráveis, colonizam a mucosa e produzem as toxinas A e/ou B, responsáveis pelo aparecimento da infecção associada ao *C. difficile* (CDI).

Burnham e Carroll (2013) também sugerem que uma significativa região do genoma é responsável pela sobrevivência da bactéria no trato gastrointestinal. Essas regiões codificam a produção de enzimas que auxiliam no transporte e metabolismo de hidratos de carbono, entre eles o *p-cresol*, um componente bacteriostático de outros microrganismos intestinais, garantindo assim a sobrevivência do *C. difficile*.

Deneve (2009), propõe um fluxograma para elucidar a ação da bactéria, desde a sua colonização até às manifestações clínicas (Figura 5). Primeiramente, o uso de antibióticos altera a microbiota normal, perturbando a eficiência das barreiras intestinais. Com a hospitalização, ocorre a contaminação endógena ou exógena do paciente. Os fatores de colonização compreendem: a germinação do esporo, multiplicação de células vegetativas, aderência do *C. difficile* ao muco e enterócitos. Assim, inicia-se a primeira fase de colonização. Em seguida, inicia-se a segunda fase, de produção de toxinas (TcdA, TcdB e/ou Cdt). Na ausência de anticorpos, as manifestações clínicas começam a aparecer.

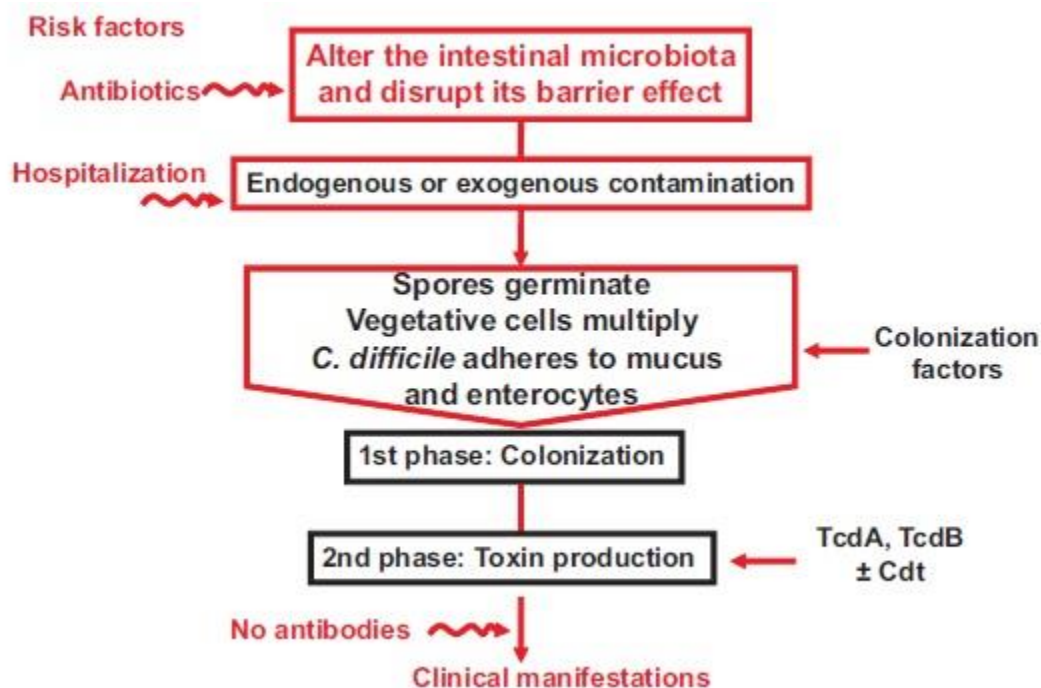


Figura 5. Patogênese de *Clostridium difficile* (DENEVE, 2009)

O sintoma mais comum da CDI é a persistência de diarreia aquosa, com três ou mais evacuações no período de vinte e quatro horas, podendo variar desde quadros leves de diarreia até a sua forma mais grave, conhecida como colite pseudomembranosa, causando grave inflamação na parede do cólon (POUTANEN; SIMOR, 2004). As toxinas produzidas pela bactéria estimulam a expressão epitelial de interleucina (IL)-8 e de ICAM-1, mediadores de inflamação, necrose celular e de perda de proteínas. As toxinas também interferem na síntese de proteínas da mucosa, na permeabilidade capilar e no peristaltismo intestinal (VIEIRA et al., 2010).

A letalidade de *C. difficile* torna-se significativa conforme o tempo de internação hospitalar e a faixa etária do indivíduo, acometendo gravemente idosos com >64 anos, bem como imunossuprimidos (HIV, pós-operatório de cirurgias intestinais, pacientes em quimioterapia) devido ao comprometimento imunológico desses pacientes (COHEN ET. AL, 2010).

O uso prévio de antimicrobianos é o maior fator de risco, principalmente o uso de clindamicinas, cefalosporinas e fluoroquinolonas que propiciam ambiente não competitivo, oferecendo melhores condições para a germinação dos esporos de *C. difficile* no trato gastrointestinal (BARTLETT, 2008). Historicamente, antibióticos como clindamicina e cefalosporinas são reconhecidos como agentes de alto risco para CDI, e embora tenha sido observado um número menor de infecções nos

hospitais que reduziram o uso desses antibióticos (KHAN et al., 2003) o risco de CDI adquirido no hospital permanece elevado.

3.6 Tratamento de CDI e Mecanismos de Resistência em *C. difficile*

A primeira opção de antibiótico utilizado para o tratamento de CDI é a vancomicina, que pode ser substituída por fidaxomicina, e como segunda opção, recomenda-se o uso do metronidazol. A administração do antibiótico (via oral ou retal) e posologia variam de acordo com a gravidade da infecção e faixa etária do paciente, sendo apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Recomendações para Tratamento de CDI publicada no guia “Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)” (MCDONALD et al., 2018)

Recomendação	Grau de recomendação/Grau de evidência
Interromper a terapia com o(s) agente(s) antibiótico(s) instigante(s) o mais cedo possível, pois isso pode influenciar o risco de recidiva da CDI.	Forte recomendação, qualidade de evidência moderada.
A antibioticoterapia para CDI deve ser iniciada empiricamente para situações em que se espera um atraso substancial na confirmação laboratorial, ou para CDI fulminante.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Recomenda-se vancomicina ou fidaxomicina sobre o metronidazol para um episódio inicial de CDI. A dose de vancomicina é de 125 mg por via oral 4 vezes por dia ou fidaxomicina 200 mg duas vezes ao dia por 10 dias.	Forte recomendação, qualidade de evidência alta.
Em locais onde o acesso à vancomicina ou fidaxomicina é limitado, sugere-se o uso de metronidazol para um episódio inicial de CDI não grave.	Recomendação fraca, qualidade de evidência alta.
A dose de metronidazol sugerida é de 500 mg por via oral 3 vezes por dia durante 10 dias. Evite ciclos repetidos ou prolongados devido ao risco de neurotoxicidade cumulativa e potencialmente irreversível.	Forte recomendação, qualidade de evidência moderada.
Para a CDI fulminante, a vancomicina administrada por via oral é o regime de escolha.	Forte recomendação, qualidade de evidência moderada.
Em CDI fulminante, se o íleo estiver presente, a vancomicina também pode ser administrada pelo reto.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Em CDI fulminante, a dose de vancomicina é de 500 mg por via oral 4 vezes por dia e 500 mg (em aproximadamente 100 mL de solução salina) pelo reto a cada 6 horas como um enema de retenção. O metronidazol por via intravenosa deve ser administrado juntamente com vancomicina oral ou retal, particularmente se o íleo estiver presente. A dose de metronidazol é de 500 mg por via intravenosa a cada 8 horas.	Forte recomendação, qualidade de evidência moderada.
Se o tratamento cirúrgico for necessário para pacientes graves,	Forte recomendação,

realizar colectomia subtotal com preservação do reto.	qualidade de evidência moderada.
Desviar ileostomia em alça com lavagem do cólon seguida por rubor anterógrado de vancomicina é uma abordagem alternativa que pode levar a melhores resultados.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Reincidência de CDI: Tratar uma primeira recorrência de CDI com vancomicina oral com um regime intenso, em vez de um segundo tratamento padrão de 10 dias de vancomicina.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Tratar uma primeira recorrência de CDI com um tratamento de 10 dias de fidaxomicina em vez de 10 dias de vancomicina.	Recomendação fraca, qualidade de evidência moderada.
Tratar uma primeira recorrência de CDI com um tratamento padrão de 10 dias de vancomicina em vez de um segundo ciclo de metronidazol se o metronidazol foi usado para o episódio primário.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Pacientes com >1 recidiva: tratamento padrão de vancomicina oral seguido de rifaximina ou fidaxomicina.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
O transplante de microbiota fecal é recomendado para pacientes com múltiplas recorrências de CDI que falharam nos tratamentos antibióticos apropriados.	Forte recomendação, qualidade de evidência moderada.
O metronidazol ou a vancomicina são recomendados para o tratamento de crianças com um episódio inicial ou primeira recorrência de CDI não grave.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Para crianças com um episódio inicial de CDI severo, a vancomicina oral é recomendada em relação ao metronidazol.	Forte recomendação, qualidade de evidência moderada.
Para crianças com um segundo ou maior episódio de CDI recorrente, a vancomicina oral é recomendada em relação ao metronidazol.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.
Considerar o transplante de microbiota fecal para pacientes pediátricos com múltiplas recorrências de CDI após tratamentos antibióticos padrão.	Recomendação fraca, qualidade de evidência baixa.

Além de existirem poucas opções de tratamento para CDI, diversos mecanismos que propiciam resistência a antibióticos contra *C. difficile* já foram descritos, incluindo a aquisição de genes de resistência através da transferência de elementos genéticos móveis (plasmídeos), mutações genéticas, alteração na expressão de proteínas, mecanismo de reparação do DNA e formação de biofilme (PENG et al., 2017a).

O mecanismo de resistência à vancomicina em *C. difficile* ainda não está elucidado, porém um estudo recente demonstrou que a alteração de aminoácidos Pro108Leu no gene *murG* de mutantes resistentes a vancomicina é obtida *in vitro*, sendo que *murG* converte o lipídio I em lipídio II durante o estágio de biossíntese de peptidoglicano. Esta substituição pode afetar a atividade do antibiótico (LEEDS et al., 2014). A formação de biofilme também é um fator que pode estar envolvido na resistência a vancomicina, pois tem sido encontradas cepas de *C. difficile* resistente

a altas concentrações de vancomicina (20mg/L) dentro de biofilmes (DAPA et al., 2013).

A resistência ao metronidazol, quando identificada, ainda não é completamente entendida, possibilidades incluem maior gravidade da doença, fraca resposta imunitária dos doentes ou resistência a antibióticos (MUSHER et al., 2005). Dados obtidos em estudos recentes sobre a linhagem RT027 sugerem que esta resistência é um processo multifatorial envolvendo alterações em diferentes vias metabólicas, como a atividade de nitrorredutases, absorção de ferro e reparo de DNA (CHONG et al., 2014).

3.7 Reservatórios nos Alimentos

A presença de *C. difficile* nos alimentos sugere fortemente que os reservatórios animais e a transmissão por meio de alimentos são possíveis fontes para infecções associadas à comunidade (RUPNIK, 2007). Um estudo no Canadá de Rodriguez-Palacios et al. (2007) demonstrou a presença de *C. difficile* em 20% das amostras de carne de varejo analisadas, com a presença de ribotipos produtores de toxinas. Nos Estados Unidos, encontrou-se a prevalência de 42% de contaminação em carnes cruas e produtos prontos para consumo, como embutidos, com a presença de ribotipos 078 e 027 (SONGER et al., 2009), considerados hipervirulentos.

Os ribotipos que circulam entre os animais também coincidem com os dos humanos. Koene et al. (2012) analisaram a presença e características de *C. difficile* em fezes de sete espécies animais diferentes, desde animais de corte à animais domésticos na Holanda. As ST's (sequência tipo) 012, 014 e 078 foram mais frequentemente isoladas entre esses animais, encontrando-se tipos similares entre pacientes hospitalizados nos Países Baixos em 2009 e 2010.

Além disso, os alimentos que entram em contato com água podem ser fontes de aquisição de *C. difficile*, como marisco comestível, conhecido por sua capacidade de concentrar vários patógenos da água através de filtração, e outros frutos do mar e peixes mostraram conter a bactéria. Vegetais crus também se mostraram contaminados por esporos de *C. difficile* (BAUER; KUIJPER, 2015)

3. 8 Epidemiologia

3.8.1 Distribuição Global

Nos Estados Unidos, o *C. difficile* mostra ser a causa mais importante de diarreia associada à assistência à saúde, além de se estabelecer como um importante patógeno comunitário. Estimativas recentes sugerem que a CDI nesse país está próximo de 500.000 infecções anualmente, e dependendo do grau e do método de atribuição, a CDI está associada a 15.000 a 30.000 mortes e o gasto de internação em cuidados agudos ultrapassa US\$ 4.8 bilhões (MCDONALD et al., 2018).

No Canadá um estudo que avaliou casos de CDI de 2009 a 2015 revelou que 20.623 pacientes adultos admitidos em hospitais do país com infecção por *C. difficile* associada à assistência à saúde foram notificados, o que representou ao longo desses 7 anos um decréscimo na taxa nacional de 5,9 para 4,3 por 10.000 pacientes-dia (KATZ et al., 2018).

Em um estudo que incluiu 20 países da Europa em 2016, foram relatados 7.711 casos de CDI, dos quais 5.756 (74,6%) eram associados à assistência à saúde (2,4 casos/10.000 pacientes-dia) e 1.955 casos (25,4%) estavam associados à comunidade ou de origem desconhecida (ECDC, 2018).

Na Ásia, uma recente revisão que avaliou 51 publicações sobre CDI no continente concluiu que a proporção confirmada entre todos os pacientes com diarreia foi de 14,8%, com uma prevalência maior no leste da Ásia (19,5%), em comparação com o sul da Ásia (10,5%) ou o Oriente Médio (11,1%). Houve uma estimativa de 5,3 episódios de CDI por 10.000 pacientes-dia, semelhante às taxas relatadas na Europa e na América do Norte (BORREN et al., 2017).

Na América Latina, há carência de estudos que avaliam a epidemiologia de CDI ao longo dos anos. Casos de CDI já foram reportados no México e Argentina (LOPARDO et al., 2015) em um estudo com 414 pacientes, com taxa de incidência de CDI de 3,1/1000 pacientes-dia durante a hospitalização e 1,1/1000 pacientes-dia durante o período de acompanhamento de 30 dias.

Na Colômbia (MUÑOZ et al., 2018) um estudo que avaliou 217 amostras de fezes diarreicas coletadas de pacientes internados no período de 2015 a 2017 demonstrou altas frequências de CDI utilizando diferentes métodos de detecção:

cultura *in vitro* utilizando ágar cromogênico (52,1%), PCR convencional de 16S (45,6%) e PCR convencional para o gene de GDH (42,4%).

Na Costa Rica, a toxina A foi detectada em amostras de fezes de 24% e 30% dos pacientes com diarreia associada ao uso de antimicrobianos em ambiente nosocomial, em um hospital para idosos e um hospital adulto, respectivamente (LIC; RODRÍGUEZ; GAMBOA-CORONADO, 2016).

No Chile, um estudo realizado em 2012 (PLAZA-GARRIDO et al., 2016) demonstrou taxa de incidência de 2 a 6 casos de infecção por *C. difficile* para cada 1000 pacientes-dia ambulatoriais.

No Brasil, assim como no restante da América Latina, ainda há poucos estudos relacionados a epidemiologia da bactéria. No Rio de Janeiro, temos 5 estudos de maior importância. Um deles com 137 crianças de 3 meses a 7 anos hospitalizadas, com presença ou ausência de diarreia, detectou *C. difficile* em 35 isolados de fezes, sendo 17 amostras toxigênicas e 18 não-toxigênicas (ALCIDES et al., 2007). A frequência de CDI foi relatada em 28,5% em outro estudo com 21 pacientes adultos que foram submetidos a antibioticoterapia de amplo espectro, três deles soropositivos e um com neoplasia do sistema nervoso central (BALASSIANO et al., 2009). Um estudo realizado entre 2006 a 2009 (BALASSIANO et al., 2010) averiguou um total de 43 (19,7%) casos de CDI confirmados, todos representando infecção nosocomial (UTI). A taxa média de CDI foi calculada como 1,8/1000 pacientes-dia, com a maior incidência entre dezembro de 2007 e agosto de 2008 (média de 5,5/1000 pacientes-dia), que caracterizou um surto de *C. difficile* neste período. Em 2011, CDI foi identificada por ELISA em 27,1% (19/70) dos pacientes internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, e a bactéria foi recuperada de oito dessas amostras fecais (BALASSIANO et al., 2011). Outro estudo no Rio de Janeiro (SECCO et al., 2014) com 74 amostras de fezes coletadas detectou CDI em 4 pacientes que apresentavam leucemia linfóide aguda ou mielóide e faziam uso de agentes antimicrobianos e quimioterapia.

Em São Paulo, um estudo com 90 crianças de 0 a 5 anos hospitalizadas detectou a presença de *C. difficile* em 5,5% dos pacientes (FERREIRA, et al., 2003). Nesse mesmo estado, um estudo com 98 adultos (49 com diarreia e 49 pacientes controle sem diarreia) detectou 44,9% de positividade para *C. difficile* (22/49) através do método de ELISA (MARCON; GAMBA; VIANNA, 2006). No trabalho de Spadão et al. (2014) a taxa de incidência de diarreia associada a

Clostridium difficile variou de 0,65 a 5,45 por 1000 pacientes-dia em pacientes hematológicos e com transplante de células-tronco no período de janeiro de 2007 a junho de 2011.

No Ceará, foi realizado o primeiro relato de CDI adquirido da comunidade no Brasil, em um paciente HIV positivo (COSTA et al., 2014). Neste mesmo estado, a detecção de *C. difficile* em um hospital de Câncer foi de 48% em um estudo realizado com 48 pacientes oncológicos (COSTA et al., 2017).

Na região Sul, em um estudo realizado na cidade de Porto Alegre (RS), 8,3% dos pacientes com diarreia nosocomial possuíam cepas toxigênicas de *C. difficile* em suas fezes, sendo os fatores de risco desses pacientes o recebimento de transplante de órgãos sólidos e choque séptico (PIRES et al., 2014). Outro estudo que tinha como objetivo a detecção de cepas hipervirulentas (MONTEIRO et al., 2014) avaliou 116 pacientes e detectou a presença da bactéria em 11 deles, porém nenhuma delas com perfil de hipervirulência.

3.8.2 Epidemiologia Molecular

O estudo da epidemiologia molecular da CDI é desafiador e complexo devido a diferentes abordagens de amostragem e de testes diagnósticos que são utilizadas. Ao longo do tempo, essas estratégias foram se modificando tanto pela ampla gama de alvos bacterianos possíveis quanto pela necessidade de diferenciar entre linhagens toxigênicas e não-toxigênicas (MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016).

Antes de 2010, os métodos de tipagem molecular eram baseados na visualização de padrões de fragmentos de DNA, sendo amplamente utilizados na caracterização de surtos, mas difíceis para comparação interlaboratorial. Após 2010, métodos baseados em sequenciamento começaram a serem desenvolvidos, fomentando banco de dados que podem ser acessados e comparados em qualquer lugar do mundo (BURNHAM; CARROLL, 2013).

A descrição do primeiro grande surto foi associada a um clone extremamente epidêmico de *C. difficile*, do toxinotipo III, tipo BI pela análise de endonuclease de restrição (REA), pulstipo norte-americano 1 (NAP1) por macrorestrição do DNA seguida de eletroforese em gel de campo pulsado e 027 por ribotipagem, designado BI/NAP1/027 (ST 1, Clado 2 por MLST) emergiu em Quebec (Canadá) no ano de 2000 e rapidamente se disseminou nos EUA, sendo

responsável por diversos surtos em hospitais Canadenses e Americanos (GHOSE, 2013). Esse clone possui uma superexpressão das toxinas A e B, produzindo 16 vezes mais toxina A e 26 vezes mais toxina B que o toxintipo 0 (DENÈVE et al., 2009). Além disso, é capaz de produzir a toxina binária e apresenta resistência às fluoroquinolonas, produzindo quadros mais graves da doença. Tem sido apontado como um dos fatores causadores do aumento da letalidade e da morbidade da CDI (MACCANNELL et al., 2006).

Nos Estados Unidos, Snyderman e colaboradores (2017) avaliaram os ribotipos 027, 014-020, 002 e 106 circulantes no país de 2010 a 2014 e demonstraram que o ribotipo 027 diminuiu em mais de 50%, enquanto houve um aumento de 014-020, 002 e 106, sendo que o ribotipo 014-020 foi o mais frequente nesse estudo e, embora a prevalência da cepa ribotipo 027 tenha caído acentuadamente, ela continua sendo uma das cepas mais comumente identificadas nos Estados Unidos.

No Canadá, NAP1 (ribotipo 027) permaneceu como o tipo de linhagem dominante em um estudo de 2009 a 2015, mas a infecção com essa cepa diminuiu significativamente ao longo do tempo, seguida por uma tendência crescente de infecção com as cepas NAP4 e NAP11 (RT014-020 e RT106, respectivamente). A cepa NAP1 foi significativamente associada a uma maior taxa de morte atribuível à infecção por *C. difficile* em comparação com cepas não NAP1 (KATZ et al., 2018).

Na Europa, Davies e colaboradores (2016) identificaram cento e vinte e cinco ribotipos diferentes de 1.196 amostras oriundas de dezenove países, coletadas a partir de dois dias de amostragem em 2012 e 2013, dos quais os ribotipos 027 (19%, n = 222), 001/072 (11%, n = 134) e 014/020 (10%, n = 119) foram os mais prevalentes.

Na Ásia, uma recente revisão (BORREN et al., 2017) determinou que os principais ribotipos descritos no continente foram 027 (incidência de 0,3%) e 017 (14%) relatados em quinze estudos. O ribotipo 027 raramente é relatado em países asiáticos, sendo descrito pela primeira vez na China em 2016, encontrado em dois pacientes (CHENG et al., 2016).

Na América Latina a frequência de CDI das cepas circulantes e os perfis toxigênicos são pouco conhecidos, sendo que os principais ribotipos são relatados em alguns estudos pontuais. No México, os ribotipos 017 (LOPARDO et al., 2015), 027 e 001 (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2018) foram os mais frequentes. Na

Colômbia, os ribotipos dominantes relatados foram 591, 106 e 002 na cidade de Medellín (SALAZAR et al., 2018). Na Costa Rica, um estudo encontrou onze diferentes ribotipos, sendo 002 e 001 os mais frequentes (JÍMENEZ et al., 2018). No Chile, em um estudo que avaliou trezentos e noventa e dois pacientes no período de um ano demonstrou os ribotipos 012, 027, 046 e 014-020 como os mais frequentes (PLAZA-GARRIDO et al., 2016).

No Brasil, um estudo (ALCIDES et al., 2007) avaliou trinta e cinco isolados de fezes e quatro isolados de ambiente hospitalar e determinou treze diferentes ribotipos, sendo sete deles novos. Os ribotipos 015, 131, 134 e 135 foram identificados em crianças sintomáticas e o ribotipo 133 em todas as crianças assintomáticas avaliadas. Outros estudos em hospitais brasileiros detectaram a presença dos ribotipos 014-020 e 106 (BALASSIANO et al., 2009), 135 e 038 (BALASSIANO et al., 2010), 133 e 233 (BALASSIANO et al., 2011) 014, 043 e 046 (SECCO et al., 2014), ribotipo SL0231/UK821 (COSTA et al., 2016) 014-020 (COSTA et al., 2017) e 135, 133 e 014-020 (Ferreira et al, 2017).

Um estudo brasileiro também avaliou os ribotipos mais frequentes em fezes de animais e humanos, com um total de setenta e seis amostras (vinte e cinco amostras humanas, vinte e três amostras de cachorros, doze amostras de leitões, sete amostras de potros, sete amostras de bezerros, uma amostra de gato e uma de lobo-guará), encontrando-se vinte e quatro ribotipos diferentes, dos quais 014-020 e 106 foram os ribotipos mais frequentes entre as cepas toxigênicas. Quatorze ribotipos diferentes foram detectados entre isolados humanos, nove deles também foram identificados em pelo menos uma espécie animal (SILVA et al., 2015).

A pesquisa realiza em um hospital de Minas Gerais (CANÇADO et al., 2018) com quarenta e dois isolados positivos para *C. difficile* realizou a ribotipagem em quarenta e uma delas, identificando a presença de vinte e quatro ribotipos diferentes, sendo os mais frequentes os ribotipos RT014-020 (20,5%) e RT106 (20,5%).

O recente estudo de Diniz e colaboradores (2019) avaliaram 38 isolados não-duplicados coletados ao longo de seis anos (2012 a 2017) em um hospital de Minas Gerais, realizando a técnica de MLST e Ribotipagem, e identificaram vinte diferentes STs, quatorze delas STs já depositadas no banco de dados do PubMLST e seis novas, sendo as mais frequentes a ST42 (RT106) e ST2 (RT014-020).

Até a presente data, a cepa de ribotipo 027 não foi relatada em humanos ou animais no país.

Outra cepa hipervirulenta emergente é a de ribotipo 078 (ST 11, Clado 2), de toxinotipo V, que primeiramente foi relatada como um ribotipo predominante em bezerros e porcos (KEEL et al., 2007). O ribotipo 078 é o terceiro tipo mais prevalente em hospitais holandeses, e relatos de sua disseminação em demais países da Europa já foram reportados (RUPNIK et al., 2008) bem como em carnes embaladas nos Estados Unidos (SONGER et al., 2009). No Brasil, o ribotipo 078 já foi relatado em potros (SILVA et al., 2015). Estes dados apoiam a discussão de *C. difficile* como um patógeno zoonótico.

Um resumo sobre as principais cepas circulantes no mundo pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Principais cepas de *C. difficile* circulantes em humanos baseado em métodos de tipagem molecular (Ribotipagem, PFGE e MLST).

País ou Região	Período de coleta	Cepas (tipagem molecular)	Referência
EUA	2010-2014	RT014-020/ST2/NAP4 RT002/ST8/NAP6 RT106/ST42/NAP11 RT027/ST1/NAP1	Snydman, 2017
Canadá	2009-2015	RT027/ST1/NAP1 RT014-020/ST2/NAP4 RT106/ST42/NAP11	Katz et al., 2018
Europa	2016	RT027/ST1/NAP1 RT001-072/ST3/NAP2 RT014-020/ST2/NAP	Davies et al., 2016
Ásia	2007 - 2016	RT027/ST1/NAP1 RT017/ST37/NAP9	Borren et al., 2017
América Latina			
México	2010-2011 ^a	RT017/ST37/NAP9	Lopardo et al., 2015
	2011-2012	RT027/ST1/NAP1 RT027/ST1/NAP1	Camacho-Ortiz et al., 2015
	2011-2016	RT001-072/ST3/NAP2	Martínez-Meléndez et al., 2018
Argentina	2010-2011 ^a	RT017/ST37/NAP9	Lopardo et al., 2015
Colômbia	2013-2015	RT591 ^c RT106/ST42/NAP11 RT002/ST8/NAP6	Salazar et al., 2018
Costa Rica	2008 - 2010	RT027/ST1/NAP1 RT012/ST54/NAP _{cr1} RT001-072/ST3/NAP2 RT014-020/ST2/NAP4 RT002/ST8/NAP6 RT017/ST37/NAP9	Quesada-Gómez et al., 2015
	2003 – 2012	RT027/ST1/NAP1 RT012/ST54/NAP _{cr1}	Murillo et al., 2018

	2015-2016	RT002/ST8/NAP6 RT001/ST3/NAP2	Jímenez et al., 2018
Chile	2011-2012	RT012/ST54/NAP _{cr1} RT027/ST1/NAP1 RT046/ST35 RT014-020/ST2/NAP4	Plaza-Garrido et al., 2016
Brasil	Não informado	RT133/ST29 RT015 ^c RT131 ^c RT134 ^c RT135 ^c	Alcides et al., 2007
	2006-2007	RT014-020/ST2/NAP4 RT106/ST42/NAP11	Balassiano et al., 2009
	2006-2009	RT135 ^c RT038 ^c	Balassiano et al., 2010
	2008-2009	RT133/ST29 RT233 ^c	Balassiano et al., 2011
	2009-2010	RT014-020/ST2/NAP4 RT043 ^c RT046/ST35	Secco et al., 2014
	2008-2015	RT014-020/ST2/NAP4 RT106/ST42/NAP11	Silva et al., 2015
	2013-2014 ^b	RTSL0231UK821/ST41	Costa et al., 2016
	2013-2014 ^b	RT014-020/ST2/NAP4	Costa et al., 2017
	2006-2008	RT135 ^c RT133/ST29 RT014-020/ST2/NAP4	Ferreira et al., 2017
	2011 - 2015	RT014-020/ST2/NAP4 RT106/ST42/NAP11 RT001/072/ST3 RT046/ST35 RT050/ST18 RT109 RT111/ST114 RT126/ST11 RT131/ST122 RT602/ST455 RTBR1 a BR8	Cançado et al., 2018
	2012 - 2017	RT014-020/ST2/NAP4 RT001-072/ST3 RT602/ST5 RT126/ST11 RT014-020/ST14/NAP11 RT050/ST18 RT133/ST29 RT216/ST33 RT046/RT250/ST35 RT106/RT014-020/ST42 RT043/ST103 RT111/ST114 RT131/ST122 RT602/ST455 RT882/ST459 ST460 RT883/ST461 RT884/ST462 RT885/ST463	Diniz et al., 2019

RT424/ST464

RT = nomenclatura da cepa pelo método de Ribotipagem;

ST = nomenclatura da sequência tipo pelo método de MLST;

NAP = nomenclatura da cepa pelo método de PFGE;

^a Mesmo estudo nos dois países (México e Argentina)

^b Estudos realizados com as mesmas amostras.

^c Cepas que apresentam somente um método de tipagem, não havendo identificação por outra técnica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características da Amostra

As amostras de fezes diarreicas foram coletadas em oito centros de saúde localizados em Porto Alegre, São Paulo e Curitiba, em dois dias pré-estabelecidos, compreendendo uma coleta no mês de março e uma no mês de julho do ano de 2017. As fezes foram armazenadas em frascos estéreis e imediatamente congeladas (-70 °C ou -20 °C), sendo assim mantidas até o envio para o Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Neste, as amostras foram mantidas congeladas a -80 °C até o processamento.

A participação dos pacientes no estudo ocorreu de forma voluntária, sendo que os critérios de exclusão foram <18 anos, pacientes internados na emergência, unidades pediátricas, unidades de diálise e pacientes ambulatoriais. Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram avaliados no trabalho de doutorado em Patologia da aluna Renata Neto Pires, pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). O estudo obteve aprovação do comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre sob o parecer número 1.476.107.

As amostras de carnes embaladas (carne de gado, suína, de frango e hambúrguer) foram coletadas em quatro grandes mercados em Porto Alegre - RS, em maio de 2017, totalizando 80 amostras (20 de cada tipo). Foram armazenadas em frascos estéreis e congeladas em freezer -80 °C até o processamento.

4.2 Semeadura das amostras de fezes

Após o descongelamento, as amostras de fezes foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Em seguida, realizou-se a Técnica de Choque de Álcool (LEVETT, 1985), adicionando à amostra fecal, álcool absoluto na proporção de 1:1, incubando-se em temperatura ambiente por 1 hora.

Utilizando uma alça estéril de 10 µL, foi realizada a semeadura por espalhamento de 20 µL da amostra (10 µL em cada metade da placa), no meio de cultura seletivo *Clostridium difficile* CM0601 (Oxoid®). O meio foi preparado conforme orientação do fabricante, adicionando-se 7 % de sangue de cavalo desfibrinado e os antibióticos cefoxitina (250 mg/L) e D-cicloserina (8 mg/L). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose contendo gerador e indicador de anaerobiose

(Genbox Anaer, bioMérieux[®]), a 35 °C ± 2 °C em estufa durante 48 horas. Para controle positivo, utilizou-se a cepa *C. difficile* ATCC 9689.

4.3 Semeadura das amostras de carne

Foi utilizado o protocolo adaptado de Rodriguez-Palacios (2009). Pesou-se 2 g de cada amostra previamente descongelada, incubando-as em caldo de enriquecimento para anaeróbios Tioglicolato (Merck[®]) em atmosfera de anaerobiose durante 7 dias, a 35 °C ± 2 °C em estufa. O caldo foi preparado conforme orientação do fabricante. Para controle positivo, uma amostra de carne estéril foi contaminada com 1 µL de inóculo contendo *C. difficile* que foi processada da mesma forma que as amostras em estudo.

Após o período de incubação, realizou-se o choque de álcool absoluto na proporção 1:2 em 2 mL de caldo, durante 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e o sedimento semeado em placas contendo o mesmo meio descrito na semeadura das fezes, mantidas em atmosfera de anaerobiose por 48 horas, a 35 °C ± 2 °C em estufa.

4.4 Confirmação das amostras positivas

As amostras que apresentaram crescimento de colônias características foram confirmadas em nível de espécie através da técnica de espectrometria de massa por ionização e adsorção (MALDI-TOF MS), no Instituto de Ciências da Saúde (ICBS – UFRGS). Foi utilizada a técnica de extração, inoculando-se de 2 a 3 colônias em 300 µL de água ultrapura, homogeneizando a mistura em vórtex, de modo que fique turvo, e acrescentando 900 µL de etanol absoluto e novamente homogeneizando em vórtex.

Foram consideradas identificadas em nível de espécie as amostras que apresentaram score ≥ 1,800.

4.5 Teste Molecular através do kit GeneXpert

Todas as amostras de fezes foram analisadas através da técnica de PCR em Tempo Real (q-PCR) direto das fezes utilizando-se o kit GeneXpert (Cepheid[®]), conforme instruções do fabricante no Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Misericórdia.

A técnica inicia com a preparação do cartucho, mergulhando o suabe na amostra de fezes por alguns instantes. Coloca-se o cotonete no tubo que contém o reagente de eluição, empurrando a haste contra a borda do tubo para quebrá-lo. A amostra deve ser homogeneizada em vórtex em alta velocidade por 10 segundos e após deve ser transferido todo o conteúdo do reagente de eluição para a câmara “S” do Cartucho Xpert *C difficile*. Após, inserir o cartucho no leitor GeneXpert Dx Instrument[®] e aguardar o resultado da leitura realizada pelo software GX software[®].

4.6 Extração de DNA por lise térmica

Utilizando suabe estéril, foram retiradas de 1 a 2 colônias, misturadas a 700µL de TE (tampão de extração). Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho-seco a 80 °C durante 20 minutos, e após imediatamente depositadas em freezer -20 °C. Esse material foi posteriormente centrifugado e o sobrenadante submetido à quantificação e análise de pureza por espectrofotometria (NanoDrop, Kasvi[®]). O DNA extraído foi armazenado em freezer -20 °C.

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras positivas foram analisadas pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) *in house* para sete genes *housekeeping* e genes das toxinas *tcdA*, *tcdB* e *tcdC* (GRIFFITHS et al., 2010) discriminados na tabela 4.

Para a reação de 50 µL para amplificar os genes *housekeeping* e gene *tcdB* utilizou-se MasterMix 2x (Quatro G[®]), que é composto por tampão de reação 10x (100 mM de Tris-HCl, pH 8,5 e 500 mM KCl), 1,7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante, 0,32 µM de cada primer e 10ng de DNA. As condições de amplificação para os genes *housekeeping* foram de 15 minutos a 95 °C seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 50 °C e 70 segundos a 72 °C e 5 minutos a 72 °C. Para o gene *tcdB*, as condições de amplificação foram de 15 minutos a 95°C seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 51 °C e 70 segundos a 72 °C e 5 minutos a 72 °C.

Para os genes *tcdA* e *tcdC*, para a reação de 25 µL foram utilizados tampão de ensaio 10x (100 mM de Tris HCl, pH 8,4 e 500 mM de KCl), 0,6 mM de MgCl₂, 0,12 mM de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen[®]), 0,32 µM de cada primer e 10 ng de DNA. As condições de amplificação foram de 15

minutos a 95 °C seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C e 40 segundos a 72 °C e 5 minutos a 72 °C.

Para verificar a eficiência da amplificação, realizou-se a eletroforese em cuba de eletroforese de gel de agarose com concentrações que variaram de 0,9 a 1,5 %, dependendo do tamanho fragmento de DNA pesquisado.

Como controle positivo utilizou-se o DNA da cepa ATCC 9689, que possui a presença dos genes das toxinas (*tcdA* e *tcdB*), e como controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada.

Tabela 4. Genes *housekeeping* de *Clostridium difficile* e seus respectivos primers, em estudo realizado por Griffiths et al., 2010.

Locus	Primer name	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	Locus size (bp)
<i>adk</i>	adk1F adk1R	T TACTTGGACCTCCAGGTGC T TCCACTTCCTAAGGCTGC	635	501
<i>atpA</i>	atpA1F atpA1R	TGATGATTTAAGTAAACAAGCTG AATCATGAGTGAAGTCTTCTCC	674	555
<i>dxr</i>	dxr3F dxr4R	GCTACTTTCCATTCTATCTG CCAACCTCTTTGTGCTATAAA	525	411
<i>glyA</i>	glyA1F glyA1R	ATAGCTGATGAGGTTGGAGC TTCTAGCCTTAGATTCTTCATC	625	516
<i>recA</i>	recA2F recA2R	CAGTAATGAAATTGGGAGAAGC ATTCAGCTTGCTTAAATGGTG	705	564
<i>sodA</i>	sodA5F sodA6R	CCAGTTGTCAATGTATTCATTTT ATAACTTCATTTGCTTTTACACC	585	450
<i>tpi</i>	tpi2F tpi2R	ATGAGAAAACCTATAATTGCAG TTGAAGGTTTAACTTCCACC	640	504
<i>tcdA</i>	tcdA-F tcdA-R	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT GTATCAGGCATAAAGTAATACTTT	369 (A+ B+) 110 (A-B+)	----
<i>tcdB</i>	tcdB1 tcdB2	TGATGAAGATACAGCAGAAGC TGATTCTCCCTCAAATTCTC	688	----
<i>tcdC</i>	tcdC-F(_17) tcdC-R(_462)	AAAAGGGAGATTGTATTATGTTTTT CAATAACTTGAATAACCTTACCTTCA	479	----

4.8 MLST

4.8.1 Sequenciamento de fragmentos

Os produtos das PCRs dos 7 genes *housekeeping* foram purificados utilizando-se 5 µL de produto da PCR e 2 µL de enzima ExoSAP-IT (Invitrogen). As condições de purificação foram 30 min a 37 °C e 15min a 80 °C. Após a ciclagem, adicionou-se 1 µL do primer forward a 5 µM. Após a purificação, as amostras foram enviadas para sequenciamento enzimático de Sanger, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP – Hospital de Clínica de Porto Alegre).

As análises dos resultados dos sequenciamentos foram realizadas utilizando os dados do PubMLST (<http://pubmLst.org/cdifficile/>). As sequências foram comparadas com o banco de dados para obtenção da ST correspondente.

4.8.2 Sequenciamento do Genoma Completo

As cepas confirmadas como toxigênicas e que foram recuperadas do congelamento tiveram seu genoma totalmente sequenciado na plataforma *MiSeq* (Illumina, San Diego, CA) no Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS - Hospital de Clínica de Porto Alegre).

Para extração do DNA, foi utilizado o protocolo de Sim et al. (2015), com algumas modificações. As culturas foram incubadas anaerobicamente em meio líquido, durante 48 horas. 1mL da cultura foi centrifugado e ressuspenso em 100 µL tampão TLA (Tail Lysis Buffer) e 20 µL Proteinase K (PK), ambos da Promega. Após incubação de 1 hora, a 56 °C, o DNA foi purificado com o kit Wizard SV Genomic DNA purification system (Promega) e diluído em água ultra pura.

Para construção da biblioteca *paired-end*, utilizou-se o kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina). Para a corrida, foi utilizado o kit MiSeq Reagent V2 (500 ciclos), com cobertura de 100x.

A montagem do genoma *de novo* foi realizada usando o SPAdes (v3.6.2; <http://cab.spbu.ru/software/spades/>). O arquivo gerado pela montagem foi anotado na plataforma RAST (<http://rast.nmpdr.org>) e no Prokka (SEEMANN, 2014). Além disso, foi realizada a anotação por referência (cepa de referência *C. difficile* 630) no software Geneious®. *In silico*, o MLST foi avaliado usando PubMLST (<https://pubmLst.org/cdifficile/>) e a plataforma MLST do Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Os genes de resistência foram avaliados usando o ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e software Geneious[®]. Os fatores de virulência foram avaliados baseados nos dados gerados pelo PubMLST.

4.8.3 Análise filogenética

As relações entre as STs, com base em seus perfis alélicos, foi realizada através da plataforma eBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/default.asp>). Além das STs encontradas no trabalho, demais STs descritas no mundo e no Brasil foram acrescentadas para fins de comparação. A análise foi realizada com base em dois critérios: um mais rigoroso, onde todos os membros atribuídos ao mesmo grupo partilham alelos idênticos a ≥ 6 dos 7 *loci*, e outro menos rigoroso, definindo os grupos pelo compartilhamento de alelos a ≥ 5 dos 7 *loci*.

O algoritmo do eBURST realiza sua análise mostrando as relações entre isolados de uma espécie bacteriana ou população bacteriana, e ao contrário de diagramas de cluster, árvores ou dendrogramas, usa um modelo simples de evolução bacteriana em que um genótipo ancestral (ou fundador) aumenta em frequência na população e, ao fazê-lo, começa a diversificar para produzir um cluster de genótipos intimamente relacionados que são todos descendentes do genótipo fundador, como um “complexo clonal” (FEIL et al., 2004).

A árvore do tipo Neighbor Joining foi construída usando as quatorze cepas de *C. difficile* testadas neste estudo e mais as ST1 e ST11 para fins de comparação, baseando-se nas sete sequências de genes *housekeeping* combinados utilizando o Software BioNumerics 7.6. Os critérios utilizados foram de 100 *bootstraps* e o mínimo de *match sequence* de 2 e o máximo de *gap count* de 9.

4.9 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima foi realizada por Ágar Diluição conforme protocolo indicado no documento M10 do CLSI (CLSI, 2018).

As placas foram preparadas utilizando-se Ágar Brucella (Difco[®]), hemina bovina (5 mg/mL) e vitamina K₂ (1 mg/mL), esterilizadas em autoclave. Após o resfriamento do meio em cerca de 50 °C foi adicionado 5 % de sangue de carneiro desfibrinado. Cada placa recebeu uma concentração diferente de antibiótico, para o metronidazol (Sigma[®]), as placas foram confeccionadas nas seguintes concentrações: 0,5µg/mL, 1µg/mL, 2µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL e 32µg/mL.

Para a vancomicina (Sigma[®]), as concentrações foram de 0,5 µg/mL, 1 µg /mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL.

As colônias bacterianas foram ressuspensas em caldo tioglicolato e mantidas em atmosfera de aneroiose por 7 dias a \pm 35 °C. Após o tempo de incubação e verificação de turvação do meio, realizou-se o ajuste da concentração do caldo para obter uma turbidez equivalente a um padrão de 0,5 McFarland. Inoculou-se 2 µL de cada amostra em cada placa, utilizando-se a cepa ATCC 700057 como controle do teste. Após a inoculação, as placas foram depositadas em jarras de anaeroiose com gerador e indicador, mantidas por 48h em temperatura de \pm 35 °C para posterior leitura.

No teste de CIM foram testados 13 isolados e a cepa ATCC *C. difficile* 700057, em triplicata. As amostras 02, 26, 34 e 150 não foram incluídas no teste, pois não foram recuperadas do congelamento.

A leitura da CIM foi realizada de acordo com o predito no documento do CLSI M100, onde o crescimento de colônias no local do inóculo é interpretado como resistente e a completa ausência ou baixa quantidade de colônias visíveis é interpretado como sensível.

Para validação do teste, o CLSI M-100 determina que o CIM da ATCC para o metronidazol deve ser de 0,125 a 0,5 µg/mL e da vancomicina de 0,5 a 4 µg/mL.

Os pontos de corte para avaliação da CIM segundo o CLSI M100 e BrCAST (BRCAST, 2017) encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Pontos de corte para *C. difficile* preconizados pelo CLSI e BrCAST.

Antimicrobiano	BrCAST		CLSI		
	2 S	>2 R	≤8 S	16 I	≥32 R
Metronidazol	2 S	>2 R	≤8 S	16 I	≥32 R
Vancomicina	2 S	>2 R	≤2 WT	-	≥4 NWT

S = sensível; R = resistente; WT = wild-type (cepa selvagem); NWT = non-wild-type (cepa não selvagem).

Para uma visão geral dos testes realizados, seguem abaixo os fluxogramas das metodologias empregadas na análise das fezes (figura 6) e das carnes (figura 7).

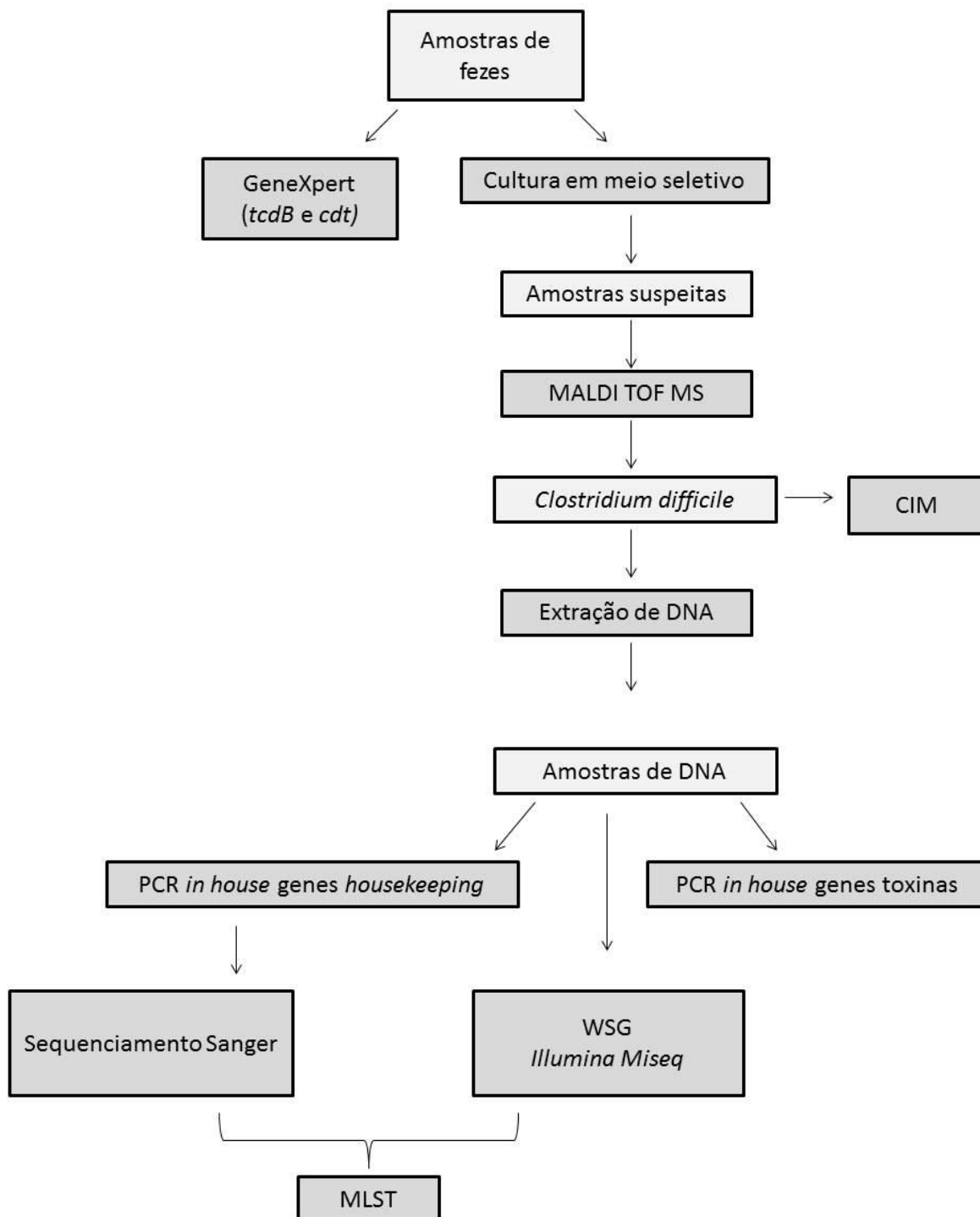


Figura 6. Fluxograma das análises realizadas com as amostras de fezes.

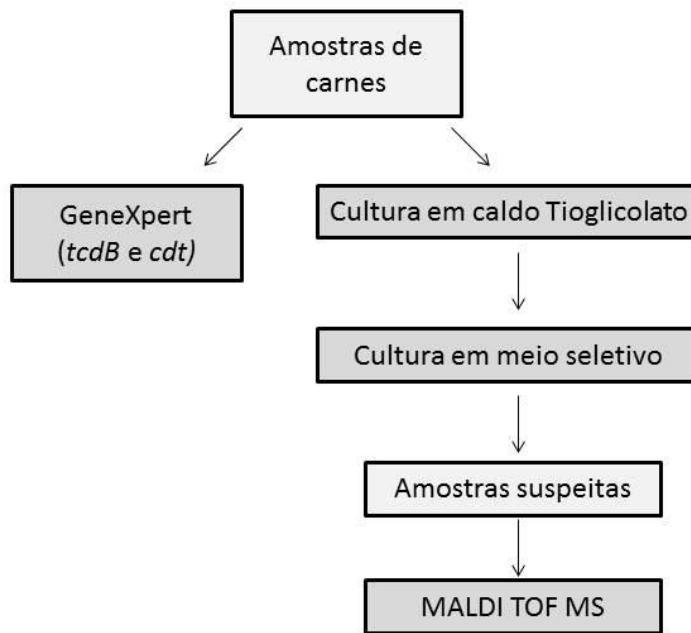


Figura 7. Fluxograma das análises realizadas com as amostras de carnes.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta das amostras de fezes

No total, foram coletados 153 amostras de fezes nos dois dias pré-estabelecidos (91 no período de verão e 62 no inverno). A distribuição do número de amostras por cidade foi de 106 em Porto Alegre, 25 em São Paulo e 22 em Curitiba. O estado do Rio Grande do Sul foi o que obteve o maior número de amostras com 69,2 % (106/153). A tabela 6 mostra o número de coletas por hospital nos dois dias de coleta.

Tabela 6. Número de coletas de amostras de fezes realizadas nos Hospitais participantes da pesquisa.

Hospital/Cidade/Estado	Coleta de verão	Coleta de inverno	Total
H2 Porto Alegre/RS	32	11	43
H3 Porto Alegre/RS	16	17	33
H1 Porto Alegre/RS	17	13	30
H5 São Paulo/SP	8	9	17
H7 Curitiba/PR	8	4	12
H4 São Paulo/SP	3	5	8
H6 Curitiba/PR	3	2	5
H8 Curitiba/PR	3	2	5

5.2 Cultura das amostras de fezes

Foram realizadas as culturas das 153 amostras, havendo crescimento suspeito em 44 delas (28,75 %). Do total de amostras, 18/153 (11,76 %) foram confirmadas como *C. difficile* através da espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Houve crescimento na cultura de outras espécies de *Clostridium* spp., como *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium glycolicum* e *Clostridium innocuum*, além de outras espécies comuns ao trato gastrointestinal.

As amostras positivas na cultura para *C. difficile* foram oriundas dos seguintes hospitais: seis do H1, cinco do H2 e três do H3 (Porto Alegre), duas do H7 e uma do H8 (Curitiba) e uma do H5 (São Paulo).

Informações sobre os resultados da cultura são demonstradas na tabela 7.

Tabela 7. Resultado das culturas das amostras de fezes. Espécies confirmadas através de MALDI-TOF MS (Bruker).

Amostra	Hospital da coleta	Data da coleta	Identificação da espécie
01 (LB)	H1 Porto Alegre /RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
02 (FAD)	H1 Porto Alegre /RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
08 (PRGS)	H1 Porto Alegre /RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
12 (ODO)	H1 Porto Alegre /RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
14 (HLN)	H1 Porto Alegre /RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
22 (MNS)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium innocuum</i>
25 (JVS)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Enterococcus faecalis</i>
26 (JVMS)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
30 (IGDS)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium clostridioforme</i>
34 (RMSS)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
36 (JBM)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
46 (EMS)	H7 Curitiba/PR	08/03/2017	<i>Flavonifractor plautii</i>
48 (IB)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
53 (SML)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Coprobacillus cateniformis</i>
54 (SSD)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Flavonifractor plautii</i>
57 (PRC)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Flavonifractor plautii</i>
60 (BFS)	H2 Porto Alegre/RS	08/03/2017	<i>Clostridium glycolicum</i>
63 (FPF)	H5 São Paulo/SP	08/03/2017	<i>Ruminococcus gnavus</i>
66 (SDM)	H5 São Paulo/SP	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
68 (NBP)	H5 São Paulo/SP	08/03/2017	<i>Enterococcus faecalis</i>
71 (MAT)	Hospital H4 São Paulo/SP	08/03/2017	<i>Clostridium clostridioforme</i>
74 (NSA)	H8 Curitiba /PR	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
77 (ATF)	H3/ Porto Alegre RS	08/03/2017	<i>Clostridium clostridioforme</i>
81 (JCP)	H3/ Porto Alegre RS	08/03/2017	<i>Clostridium difficile</i>
87 (CM)	H6 Curitiba /PR	08/03/2017	<i>Enterococcus faecalis</i>
90 (JOL)	H3/ Porto Alegre RS	08/03/2017	<i>Ruminococcus gnavus</i>
93 (DAM)	H1/ Porto Alegre RS	12/07/2017	<i>Enterococcus faecium</i>
94 (ICL)	H7 Curitiba /PR	12/07/2017	<i>Clostridium clostridioforme</i>
100 (ECS)	H2 Porto Alegre/RS	12/07/2017	<i>Clostridium difficile</i>
101 (GAB)	H7 Curitiba /PR	12/07/2017	<i>Clostridium difficile</i>
106 (AJI)	H3/ Porto Alegre RS	12/07/2017	<i>Robinsoniella peoriensis</i>
107 (ITCC)	H1/ Porto Alegre RS	12/07/2017	<i>Clostridium glycolicum</i>
110 (ACRG)	H1/ Porto Alegre RS	12/07/2017	<i>Enterococcus faecium</i>
113 (LA)	H1/ Porto Alegre RS	12/07/2017	<i>Clostridium difficile</i>
114 (NTEA)	H2 Porto Alegre/RS	12/07/2017	<i>Clostridium innocuum</i>
115 (DSS)	H3 Porto Alegre /RS	12/07/2017	<i>Coprobacillus cateniformis</i>
119 (OACS)	H7 Curitiba /PR	12/07/2017	<i>Clostridium difficile</i>
122 (LZ)	H3 Porto Alegre /RS	12/07/2017	<i>Enterococcus faecium</i>
123 (JS)	H8 Curitiba /PR	12/07/2017	<i>Enterococcus faecalis</i>
143 (MRR)	H4 São Paulo/SP	12/07/2017	<i>Pediococcus acidilacta</i>
150 (MLSB)	H3 Porto Alegre /RS	12/07/2017	<i>Clostridium difficile</i>
151 (ZAF)	H2 Porto Alegre/RS	12/07/2017	<i>Clostridium innocuum</i>
152 (IMS)	H2 Porto Alegre/RS	12/07/2017	<i>Enterococcus faecium</i>
153 (JDC)	H3 Porto Alegre /RS	12/07/2017	<i>Clostridium difficile</i>

5.3 Cultura das amostras de carne

Realizou-se a cultura de 80 amostras de carnes, havendo crescimento suspeito em seis amostras (7,5 %). Nenhuma amostra foi confirmada como *C. difficile* e nenhuma amostra foi positiva no GeneXpert. As espécies identificadas no MALDI-TOF MS estão listadas na tabela 8.

Tabela 8. Resultado das culturas das amostras de carnes. Espécies confirmadas através de MALDI-TOF MS (Bruker).

Amostra	Tipo de amostra	Identificação da espécie
C55	Suíno	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
C76	Hambúrguer	<i>Pediococcus acidilactici</i>
C79	Hambúrguer	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C81	Frango	<i>Enterococcus gallinarum</i>
C83	Hambúrguer	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C87	Hambúrguer	<i>Pediococcus acidilactici</i>

5.4 PCR *in house* e GeneXpert *C.difficile*

Das 18 amostras de fezes confirmadas para *C. difficile*, apenas uma amostra não foi possível a extração do DNA bacteriano para realização da PCR *in house* (amostra 74), pois as poucas colônias que cresceram na placa foram enviadas para a identificação e não foi possível recuperar a bactéria novamente da amostra de fezes.

Das 17 amostras analisadas, todas amplificaram os sete genes *housekeeping* no gel de agarose e foram confirmados por sequenciamento. Os genes das toxinas (*tcdA*, *tcdB*) e *tcdC* foram detectados em dez amostras. A figura 8 apresenta a corrida de gel de agarose da amostra 153, contendo a amplificação dos genes *housekeeping glyA*, *sodA* e *tpi* mais os genes *tcdA*, *tcdB* e *tcdC*.

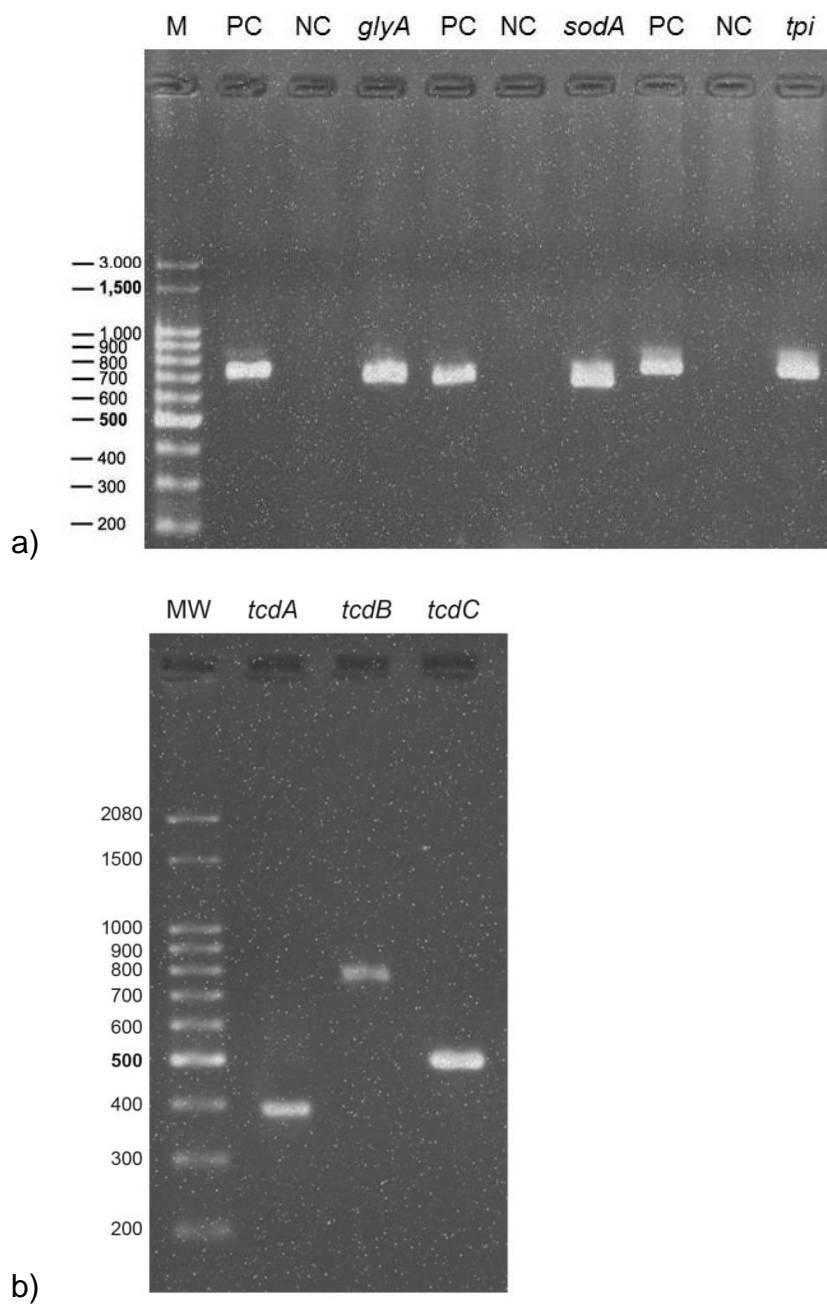


Figura 8. Gel de agarose mostrando as amplificações dos genes *housekeeping* (a) e dos genes *tcdA*, *tcdB* e *tcdC* (b) da amostra 153. MW Ladder 100pb; PC = positive control; NC = negative control.

Os testes realizados utilizando o kit comercial GeneXpert *C. difficile* (Cepheid®) apresentaram resultado positivo em 12 amostras, sendo que apenas uma amostra (amostra 94) foi positiva no GeneXpert e negativa na cultura para *C. difficile*. Além disso, a amostra 153 apresentou resultado presuntivo positivo para a cepa BI/NAP1/027 no GeneXpert.

A partir dos resultados obtidos na PCR e no GeneXpert, as dez amostras que apresentaram a presença de genes de toxinas foram classificadas como toxigênicas (01, 08, 12, 26, 48, 66, 100, 113, 150 e 153) e as sete que não apresentaram os genes, como não-toxigênicas (02, 14, 34, 36, 81, 101 e 119). Os resultados de ambos os testes são apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados da PCR *in house* e GeneXpert.

Amostra	Cultura	GeneXpert	Genes <i>housekeeping</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdC</i>
T01	P	P	P	P	P	P
NT02	P	N	P	N	N	N
T08	P	P	P	P	P	P
T12	P	P	P	P	P	P
NT14	P	N	P	N	N	N
T26	P	P	P	P	P	P
NT34	P	N	P	N	N	N
NT36	P	N	P	N	N	N
T48	P	P	P	P	P	P
T66	P	P	P	P	P	P
NT81	P	N	P	N	N	N
T100	P	P	P	P	P	P
NT101	P	N	P	N	N	N
T113	P	P	P	P	P	P
NT119	P	N	P	N	N	N
T150	P	P	P	P	P	P
T153	P	P	P	P	P	P
74 ^a	P	P	-----	-----	-----	-----
94 ^b	N	P	N	N	N	N
Total	19 P	18 P	17 P	10 P	10 P	10 P

^a Não foi possível realizar a extração de DNA da amostra 74.

^b Amostra identificada como *Clostridium clostridioformes* no MALDI-TOF, porém identificada como toxigênica no GeneXpert.

P = positivo; N = negativo; T = toxigênicas; NT = não toxigênica.

5.5 MLST

Das dez amostras toxigênicas, sete delas (12, 26, 66, 100, 113, 150 e 153) foram possíveis sequenciar pela plataforma Illumina Miseq (sequenciamento do genoma completo). Para as demais amostras (01, 02, 08, 14, 34, 36, 48, 81, 101, 119) os genes *housekeeping* foram sequenciados por Sanger (sequenciamento de fragmentos).

Todas as amostras que tiveram o genoma completo sequenciado tiveram as suas STs identificadas com 100% de identidade nos bancos de dados utilizados.

A amostra 12 foi identificada como ST35, as amostras 26 e 100 como ST42, as amostras 66 e 150 como ST54 e a amostra 113 como ST2, todas do clado 1. A amostra 153 foi identificada como ST67, pertencente ao clado 2, clado as quais pertencem as STs hipervirulentas, como a ST1 que é a de ribotipo 027.

Apenas uma amostra que foi sequenciada pelo método de Sanger teve a ST identificada com 100% de identidade para os sete genes *housekeeping* (amostra 119, ST15, clado 1). Das outras nove amostras, três (amostras 02, 34 e 101) obtiveram *match* igual em 5 locus e 5 amostras (01, 08, 14, 36 e 48) obtiveram *match* igual em 6 locus, o que resulta em uma combinação de alelos inexistente no banco de dados, provavelmente indicando novas STs. A amostra 81 foi inconclusiva devido à baixa qualidade do sequenciamento. As STs (sequence type) encontradas no estudo, bem como a sequência alélica dos genes *housekeeping* são demonstradas na tabela 10.

Tabela 10. Listagem das STs determinadas pelo MLST em cada amostra do estudo.

AMOSTRA	CIDADE/ ESTADO	DATA COLETA	HOSPITAL	ST	CLADO	Sequência alélica ^a
Amostras toxigênicas						
T01	Porto Alegre/RS	Março	H1	b	ND	1-1-11-1-1-22-4
T08	Porto Alegre/RS	Março	H1	b	ND	1-1-2-1-1-7-3
T12	Porto Alegre/RS	Março	H1	35	1	2-5-8-1-1-3-6
T113	Porto Alegre/RS	Julho	H1	2	1	1-1-2-1-5-3-1
T26	Porto Alegre/RS	Março	H2	42	1	1-1-2-1-1-7-1
T48	Porto Alegre/RS	Março	H2	b	ND	1-1-10-9-1-3-2
T100	Porto Alegre/RS	Julho	H2	42	1	1-1-2-1-1-7-1
T150	Porto Alegre/RS	Julho	H3	54	1	1-4-7-1-1-3-3
T153	Porto Alegre/RS	Julho	H3	67	2	1-1-9-9-1-3-5
T66	São Paulo/SP	Março	H5	54	1	1-4-7-1-1-3-3
Amostras não-toxigênicas						
NT02	Porto Alegre/RS	Março	H1	b	ND	1-1-24-34-1-3-3
NT14	Porto Alegre/RS	Março	H1	b	ND	1-1-24-16-1-3-1
NT34	Porto Alegre/RS	Março	H2	b	ND	1-1-51-35-1-1-1
NT36	Porto Alegre/RS	Março	H2	b	ND	3-7-3-8-11-20-11
NT81	Porto Alegre/RS	Março	H3	-	ND	0-1-0-0-8-39-0
NT101	Curitiba/PR	Julho	H7	b	ND	13-46-22-40-18-31-26
NT119	Curitiba/PR	Julho	H7	15	1	1-1-6-1-8-5-1

^a Sequência alélica determinada pela combinação dos genes *housekeeping* na seguinte ordem: *adhA*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* e *tpi*.

b = ST não encontrada no banco de dados. Nova ST.

ND = Não determinado

0 = alelo não identificado devido à baixa qualidade do sequenciamento.

5.6 Fatores de virulência e resistência das cepas toxigênicas

Foi possível avaliar diversos fatores de virulência e resistência, além da produção de toxinas, nas sete amostras que tiveram o genoma completo sequenciado.

Os fatores de virulência ligados às proteínas CWP (*cwp84*, *cwp66* e *cwp2*) estão todos presentes nas amostras 100 (ST42), 150 (ST54) e 113 (ST2), e na amostra 12 (ST35) com exceção de *cwp2*. O gene *secA* está presente nas amostras 26 e 100 (ST42), 66 e 150 (ST54) e 113 (ST2). O gene do choque-térmico *groEL* foi presente nas amostras 12 (ST35), 26 (ST42), 66 e 150 (ST54), enquanto o gene da fibronectina *fbpA* aparece nas amostras 12 (ST35), 66 e 150 (ST54) e 153 (ST67).

Genes de motilidade (proteínas de flagelo) estão presentes em todas as amostras analisadas.

Os genes da toxina binária estão presentes nas amostras 100, 113, 150 e 153 (ST42, ST2, ST54 e ST67, respectivamente).

Os genes de resistência de importância clínica, como gene *nimb* que confere resistência ao metronidazol, e a família dos genes *van*, que conferem resistência a vancomicina, aparecem nas amostras 12 (ST35), 26 (ST42) e 150 (ST54). Os genes *van* ainda estão presentes nas amostras 66 (ST54), 100 (ST42), 113 (ST2) e 153 (ST67).

A tabela 11 apresenta um panorama geral dos principais genes encontrados nas amostras avaliadas.

Tabela 11. Análise dos fatores de virulência e resistência encontrados nas amostras toxigênicas submetidas à WGS (Whole Genome Sequencing).

Amostra 12 – ST35	
CWP Cluster genes	<i>cwp84</i> (Cell surface-associated cysteine protein) <i>cwp66</i> (Cell surface protein)
Gene da fibronectina	<i>fbpA</i> (Fibronectin/fibrogen binding-protein)
Gene do choque-térmico	<i>groEL</i> (Heat shock protein)
Genes de Resistência	<i>tetW</i> (Tetracycline resistance protein) <i>tet32</i> (Tetracycline resistance protein) <i>vanW</i> (Vancomycin B-type resistance protein VanW) <i>vanA</i> (Vancomycin/teicoplanin A-type resistance protein VanA) <i>nimb</i> (Nitroimidazole antibiotic resistance protein Nimb) <i>qnr</i> (Quinolone resistance protein)

Genes de motilidade	<i>flaA</i> (Flagellin protein) <i>fliD</i> (Flagellar cap protein) <i>flhA</i> (Flagellar biosynthesis protein)
Amostra 26 – ST42	
CWP Cluster genes	<i>cwp2</i> (Cell wall binding protein) <i>cwp66</i> (Cell surface protein) <i>secA</i> (Protein translocase subunit secA) <i>slpA</i> (Precursor of the S-layer proteins)
Gene do choque-térmico	<i>groEL</i> (Heat shock protein)
Genes de Resistência	<i>tetW</i> (Tetracycline resistance protein) <i>tetO</i> (Tetracycline-resistant ribosomal protection protein) <i>vanW</i> (Vancomycin B-type resistance protein VanW) <i>vanZ</i> (Teicoplanin resistance protein) <i>mefA</i> (Macrolide efflux A domain protein) <i>nimb</i> (Nitroimidazole antibiotic resistance protein Nimb) <i>mdtG</i> (Multidrug resistance protein) <i>qnr</i> (Quinolone resistance protein)
Genes de motilidade	<i>flaA</i> (Flagellin protein) <i>fliD</i> (Flagellar cap protein) <i>flhA</i> (Flagellar biosynthesis protein)
Amostra 66 –ST54	
CWP Cluster genes	<i>secA</i> (Protein translocase subunit secA)
Gene da fibronectina	<i>fbpA</i> (Fibronectin/fibrogen binding-protein)
Gene do choque-térmico	<i>groEL</i> (Heat shock protein)
Genes de Resistência	<i>ermB</i> (Clindamycin resistance) <i>tetW</i> (Tetracycline resistance protein) <i>tetM</i> (Tetracycline resistance protein) <i>vanZ</i> (Teicoplanin resistance protein) <i>vanW</i> (Vancomycin B-type resistance protein VanW) <i>mefA</i> (Macrolide efflux A domain protein) <i>qnr</i> (Quinolone resistance protein)
Genes de motilidade	<i>flaA</i> (Flagellin protein) <i>fliD</i> (Flagellar cap protein) <i>flhA</i> (Flagellar biosynthesis protein)
Amostra 100 – ST42	
CWP Cluster genes	<i>cwp2</i> (Cell wall binding protein) <i>cwp66</i> (Cell surface protein) <i>cwp84</i> (Cell surface-associated cysteine protein)

	<i>secA</i> (Protein translocase subunit <i>secA</i>) <i>slpA</i> (Precursor of the S-layer proteins)
Genes de Resistência	<i>ermB</i> (Clindamycin resistance) <i>mefA</i> (Macrolide efflux A domain protein) <i>mecl</i> (Methicillin resistance regulatory protein) <i>mdtA</i> . <i>MdtC</i> , <i>MdtD</i> e <i>MdtG</i> (Multidrug resistance protein) <i>norM</i> (Multidrug resistance protein) <i>mdtG</i> (Multidrug resistance protein) <i>marR</i> (Multiple antibiotic resistance) <i>tetA</i> (Tetracycline efflux pump) <i>vanB</i> (Vancomycin B-type resistance protein)
Genes de motilidade	<i>flaA</i> (Flagellin protein) <i>fliD</i> (Flagellar cap protein) <i>flhA</i> (Flagellar biosynthesis protein)
Genes toxina binária	<i>cdtA</i> (ADP-ribosyltransferase enzymatic component) <i>cdtB</i> (ADP-ribosyltransferase binding component)
Amostra 113 – ST2	
CWP Cluster genes	<i>cwp2</i> (Cell wall binding protein) <i>cwp66</i> (Cell surface protein) <i>cwp84</i> (Cell surface-associated cysteine protein) <i>secA</i> (Protein translocase subunit <i>secA</i>) <i>slpA</i> (Precursor of the S-layer proteins)
Genes de Resistência	<i>mdtD</i> e <i>mdtG</i> (Multidrug resistance protein) <i>norM</i> (Multidrug resistance protein) <i>vanB</i> (Vancomycin B-type resistance protein) <i>mecl</i> (Methicillin resistance regulatory protein)
Genes de motilidade	<i>flaA</i> (Flagellin protein) <i>fliD</i> (Flagellar cap protein) <i>flhA</i> (Flagellar biosynthesis protein)
Genes toxina binária	<i>cdtB</i> (ADP-ribosyltransferase binding component)
Amostra 150 – ST54	
CWP Cluster genes	<i>cwp2</i> (Cell wall binding protein) <i>cwp66</i> (Cell surface protein) <i>cwp84</i> (Cell surface-associated cysteine protein) <i>secA</i> (Protein translocase subunit <i>secA</i>) <i>slpA</i> (Precursor of the S-layer proteins)
Gene da fibronectina	<i>fbpA</i> (Fibronectin/fibrogen binding-protein)
Gene do choque-térmico	<i>groEL</i> (Heat shock protein)

Genes de Resistência	<i>tetW</i> (Tetracycline resistance protein) <i>tetM</i> (Tetracycline resistance protein) <i>tetO</i> (Tetracycline-resistant ribosomal protection protein) <i>msrD</i> (Macrolide resistance) <i>InuC</i> (Lincosamide nucleotidyltransferase) <i>ermB</i> (Clindamycin resistance) <i>vanW</i> (Vancomycin B-type resistance protein VanW) <i>nimb</i> (Nitroimidazole antibiotic resistance protein Nimb)
Genes toxina binária	<i>cdtA</i> (ADP-ribosyltransferase enzymatic component) <i>cdtB</i> (ADP-ribosyltransferase binding component)
Amostra 153 – ST67	
CWP Cluster genes	<i>secA</i> (Protein translocase subunit secA)
Gene da fibronectina	<i>fbpA</i> (Fibronectin/fibrogen binding-protein)
Genes de Resistência	<i>vanW</i> (Vancomycin B-type resistance protein VanW) <i>vanB</i> (Vancomycin B-type resistance protein) <i>marA</i> (Multiple antibiotic resistance protein) <i>mecI</i> (Methicillin resistance regulatory protein) <i>mecR</i> (Methicillin resistance mecR1 protein) Fluoroquinolones export permease protein <i>norM</i> (Multidrug resistance protein) <i>emrY</i> (Multidrug resistance protein) <i>bmr3</i> (Multidrug resistance protein) <i>mdtG</i> (Multidrug resistance protein)
Genes de motilidade	<i>fliS</i> (Flagellin protein) <i>flhA</i> (Flagellar biosynthesis protein)
Genes toxina binária	<i>cdtA</i> (ADP-ribosyltransferase enzymatic component) <i>cdtB</i> (ADP-ribosyltransferase binding component)

5.7 Análise filogenética

5.7.1 eBURST

Nessa análise, utilizou-se o critério onde todos os membros atribuídos ao mesmo grupo partilham alelos idênticos de ≥ 5 dos 7 *loci* com pelo menos um outro membro do grupo (dados brutos gerados encontram-se no apêndice 11.3). Uma análise mais criteriosa foi realizada com ≥ 6 dos 7 *loci*, porém dessa forma algumas

STs ficaram sem ser representadas no diagrama (dados brutos encontram-se no apêndice 11.1 e 11.2).

As relações entre as STs realizadas no eBURST demonstraram que as ST2, ST42, T08 e NT14 pertencem ao grupo 1, onde a fundadora é a ST28 (distâncias médias da fundadora de 2.83, 2.45, 3.08 e 3.48, respectivamente). A ST2 dá origem a um subgrupo onde se relaciona com as STs 68, 49 e 13, todas de clado 1. A amostra T08 está localizada em um subgrupo cuja fundadora é a ST17, que pertence a outro subgrupo fundado pela ST48, todas de clado 1. A amostra NT14 se relaciona com a ST29. A ST42 não formou subgrupos nessa análise.

A ST67 pertence ao grupo 3, onde a fundadora presuntiva é a ST41 também relacionando-se com T48 (distância média da fundadora de 1.5 para ambas). Tanto a ST67 quanto ST41 pertencem ao clado 2, pressupondo assim que a mostra T48 (nova ST de perfil toxigênico) também pertence a esse clado.

As ST15, 35, 54 e as novas STs T01, NT02, NT14, NT34, NT36 e NT101 não se relacionaram com nenhuma outra sequência tipo analisada. As STs epidêmicas, ST1 (RT027) e ST11 (RT078) foram incluídas a fim de comparação, e não demonstraram se relacionar diretamente com nenhuma outra ST investigada.

O diagrama gerado pelo eBURST se encontra na figura 9 e a análise detalhada gerado pela plataforma se encontra nos apêndices.

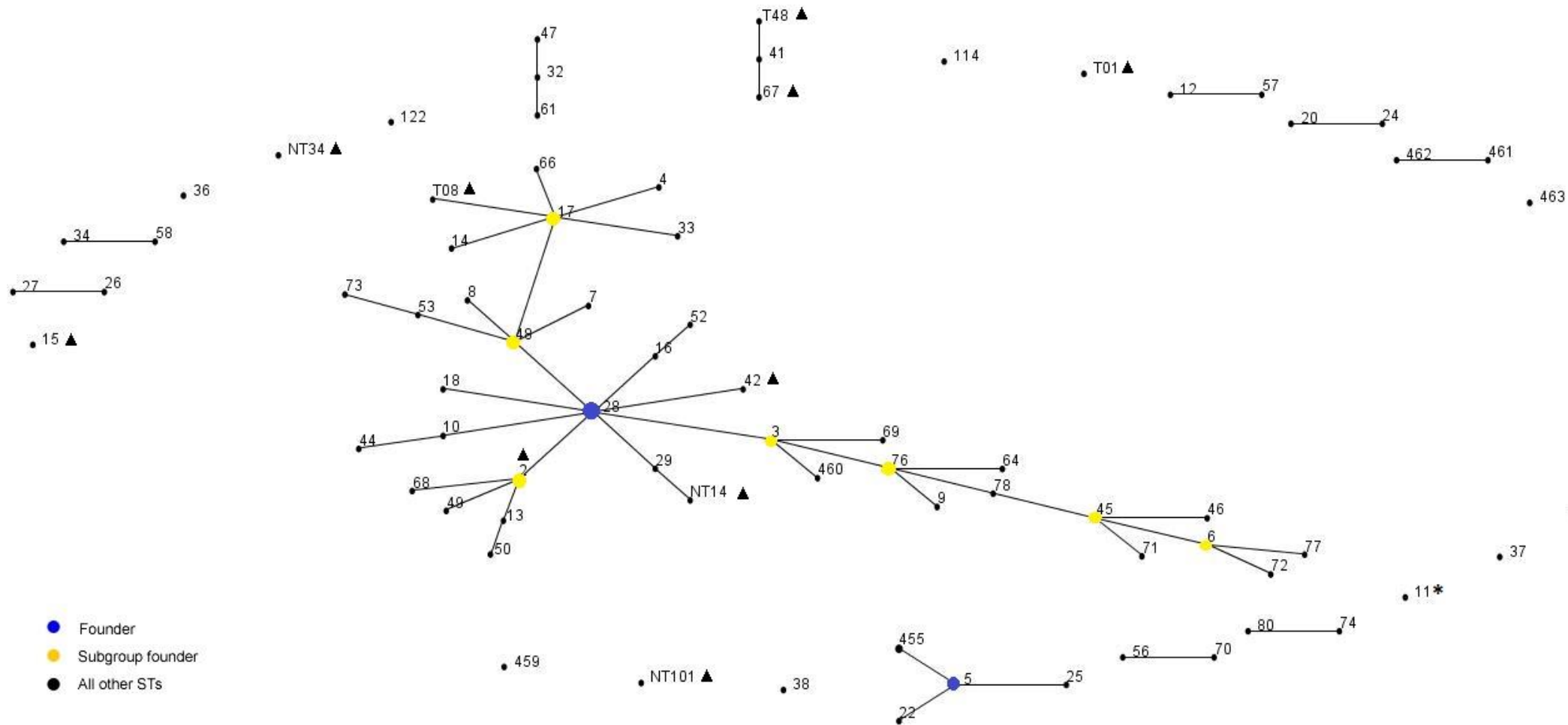


Figura 9. Diagrama gerado pela plataforma online eBURST v3 em 09/02/2019 . Em azul encontra-se as ST fundadoras, em amarelo os subgrupos fundadores. ▲ STs encontradas neste estudo; Novas STs identificadas por NT = não-toxigênica e T= toxigênicas. * STs epidêmicas ST1/RT027 e ST11/RT078 utilizadas a fim de comparação.

5.7.2 Dendrograma

Através da disponibilidade de um plugin MLST, o software BioNumerics é amplamente utilizado para o armazenamento e análise de sequências MLST, analisando automaticamente lotes de arquivos de rastreamento de seqüência, conecta-se a bancos de dados MLST on-line, recupera números de alelos correspondentes, tipos de seqüência e informações complexas clonais disponíveis. Os resultados são armazenados no banco de dados e estão disponíveis para análise estatística e de população, agrupamento e identificação (informações retiradas da página <http://www.applied-maths.com/applications/mLst>).

Através da árvore do tipo Neighbor-Joining gerada utilizando as sequências concatenadas dos sete *loci* dos genes *housekeeping* (figura 10) podemos supor que todas as amostras, com exceção de NT101, possuem uma cepa ancestral comum, que originou dois grupos (verde e amarelo). Podemos presumir que o grupo em amarelo sofreu pequenas alterações entre si ao longo do tempo, mostrando-se um grupo bastante relacionado evolutivamente. Dentro do grupo amarelo podemos perceber uma nova ramificação (grupo vermelho), de STs extremamente próximas uma das outras.

As amostras NT14 e NT02 possuem similaridade de 97,2 %, formando o grupo em verde. Dentro do grupo em amarelo, as amostras T08 e NT34 possuem semelhança de 98,3 % entre si. No grupo em vermelho, as STs 42, 15, 2, 54, 35, 67, 1 (BI/NAP1/027), amostras T48 e NT36 possuem semelhanças entre si $\geq 99,1$ %.

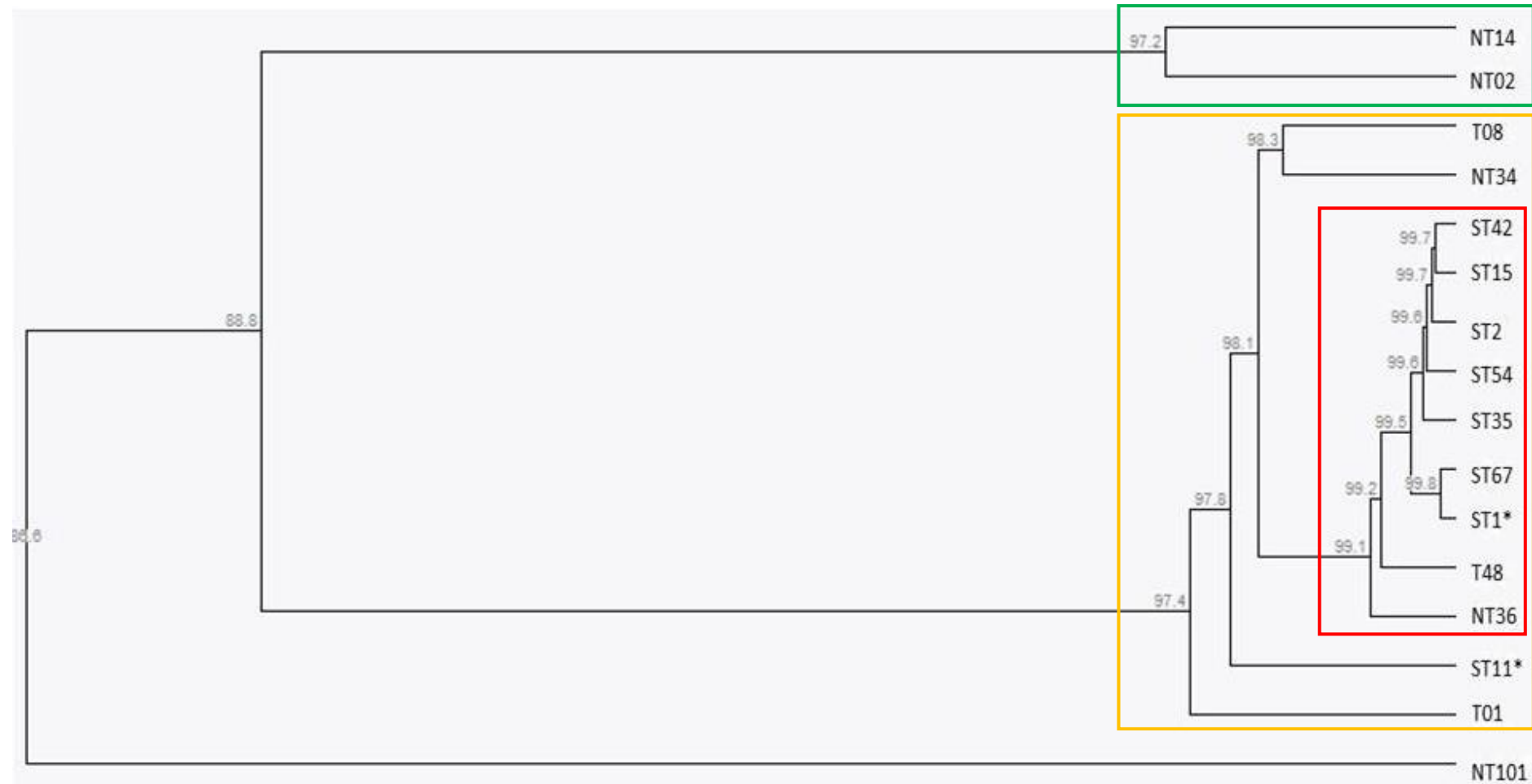


Figura 10. Dendrograma Neighbor-Joining gerado pelo software BioNumerics v. 7.6. Bootstraps foram gerados usando 1.000 réplicas e valores baixos foram removidos para maior clareza. Novas STs identificadas por NT14, NT02, NT34 = não-toxigênicas e T48, T08, T01= toxigênicas. * STs epidêmicas ST1/RT027 e ST11/RT078 utilizadas a fim de comparação.

5.8 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Das 13 amostras testadas para o metronidazol, oito demonstraram perfil de sensibilidade de acordo com os pontos de corte do BrCast ($<2 \mu\text{g/mL}$), sendo elas: 01, 08, 12, 48, 66 (toxigênicas) e 81, 101 e 119 (não-toxigênicas). As cinco amostras que mostraram perfil de resistência ($>2 \mu\text{g/mL}$) foram as amostras 14 e 36 (não-toxigênicas) e 100, 113 e 153 (toxigênicas). Segundo o ponto de corte do CLSI, somente as amostras 14, 100 e 153 mostraram perfil de resistência ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$), sendo todas as demais consideradas sensíveis de acordo com o documento.

Para a vancomicina, em ambos os documentos, três amostras (01 e 08 toxigênicas e 101 não-toxigênica) demonstraram perfil de sensibilidade ao antimicrobiano ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$), enquanto as outras dez amostras testadas 12, 48, 66, 100, 113 e 153 (toxigênicas) e 14, 36, 81 e 119 (não-toxigênicas) obtiveram perfil de resistência ($> 2 \mu\text{g/mL}$ para o BrCast e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ para o CLSI).

A figura 9 ilustra a maneira com que os testes foram avaliados, observando o crescimento da colônia no local de inóculo.

A tabela 12 demonstra os valores de CIM do metronidazol e da vancomicina para cada amostra e a tabela 13 mostra a CIM50 e CIM90 dos isolados.

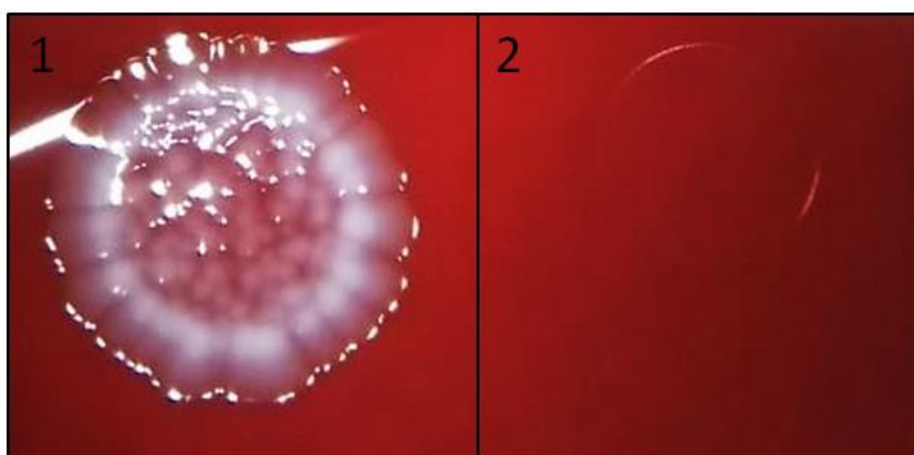


Figura 11. Leitura do teste de CIM. Inóculo da esquerda (1) representando resultado de resistência (amostra 153) e inóculo da direita (2) mostrando sensibilidade ao antimicrobiano (ATCC 700057). Teste realizado com metronidazol a $32 \mu\text{g/mL}$. Aumento de 0,8x.

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima de treze amostras de *C. difficile* testadas para os antimicrobianos metronidazol e vancomicina.

Amostra	Metronidazol (µg/mL)	BrCAST	CLSI	Vancomicina (µg/mL)	BrCAST	CLSI
Amostras toxigênicas						
01 (NOVA ST)	<0,5	S	S	<0,5	S	S
08 (NOVA ST)	2	S	S	<0,5	S	S
12 (ST35)	1	S	S	4	R	R
48 (NOVA ST)	<0,5	S	S	4	R	R
66 (ST54)	1	S	S	4	R	R
100 (ST42)	>32	R	R	4	R	R
113 (ST2)	4	R	S	8	R	R
153 (ST67)	>32	R	R	>16	R	R
Amostras não-toxigênicas						
14 (NOVA ST)	>32	R	R	16	R	R
36 (NOVA ST)	4	R	S	8	R	R
81 (ST ND)	2	S	S	4	R	R
101 (NOVA ST)	<0,5	S	S	<0,5	S	S
119 (ST15)	1	S	S	4	R	R
Controle ATCC 700057	<0,5			4		

ST ND – ST não determinada. S – sensível; R – resistente.

Tabela 13. CIM50 e CIM90 dos isolados de *C. difficile* testados e comparação do número de amostras sensíveis e resistentes de acordo com BrCast e CLSI.

Antimicrobiano	CIM50 (µg/mL)	CIM90 (µg/mL)	Sensibilidade (nº de amostras)		Resistência (nº de amostras)	
			BrCast	CLSI	BrCast	CLSI
Metronidazol	1	4	8	10	5	3
Vancomicina	4	8	3	3	10	10

6 DISCUSSÃO

A doença associada ao *C. difficile* é amplamente estudada e medidas de controle já são implementadas há muitos anos em vários países do mundo, a exemplo dos Estados Unidos, Canadá e países da Europa (COHEN et al, 2010; CROBACH et al., 2016; KATZ et al., 2018). Países em desenvolvimento, como os da América Latina, por vezes não conseguem mensurar os problemas causados pela bactéria, principalmente devido à cultura bacteriana anaeróbia não ser um procedimento de rotina em muitos laboratórios, devido ao custo e a falta de suprimentos (ROLDAN; CUI; POLLOCK, 2018).

O presente estudo é o maior já realizado no Brasil em relação ao número de hospitais participantes e de diferentes estados do território nacional, englobando estados da região Sul e Sudeste. A incidência de amostras positivas de *C. difficile* identificadas na cultura foi de 11,76 % (18/153), porém, considerando o método de cultura associado ao GeneXpert, o estudo obteve um total de incidência de 12,41 % (19/153). O estado do Rio Grande do Sul, representado pela participação de três grandes hospitais localizados na capital Porto Alegre, foi o maior em relação ao número de coletas no estudo (83,6 %), consequentemente o maior em amostras positivas de *C. difficile* identificadas na cultura (14/153), o que representa 9,15%. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Monteiro et al (2014) na mesma capital, onde o número de amostras positivas para a bactéria foi de 9,48% (11/116) e um pouco acima do relatado por Pires et al (2014) também em Porto Alegre, com 8 amostras positivas de 96 pacientes (8,3 %). Com isso, podemos concluir que a média de casos positivos para *C. difficile* na capital gaúcha mantém-se a mesma nos últimos anos. Em relação ao estado de São Paulo, esse estudo obteve um baixo número de amostras coletas, sendo a frequência da bactéria de 0,65 % (1/153). Já no estado do Paraná a incidência foi de 1,96 % (3/153).

O teste realizado com as carnes embaladas não demonstrou a presença da bactéria, diferentemente de relatos na literatura, como no estudo de Rodriguez-Palacios et al. (2007) que demonstrou presença de *C. difficile* em 20 % das amostras (12/60) em um período de dez meses de coleta em mercearias varejistas de Ontário e Quebec, no Canadá. Bem como a presença da bactéria em 42 % (37/88) em um período de um mês de coleta nos Estados Unidos (SONGER et al., 2009). Apesar de nosso estudo utilizar a mesma metodologia dos citados autores, e

possuir um n de amostras semelhante (que em nosso estudo teve $n=80$), nossa coleta ocorreu em apenas um dia pré-estabelecido, além de abranger apenas mercados de grande porte, não sendo feitas coletas em mercearias menores e em bairros mais afastados do centro da cidade, o que pode ter promovido um viés amostral. A contaminação direta de *C. difficile* de alimentos para humanos ainda não foi comprovada, necessitando de maiores estudos. Apesar do nosso estudo não detectar a presença de *C. difficile* nas amostras pesquisadas, foi o primeiro trabalho do tipo realizado no Brasil a ser publicado (PIRES et al., 2018). O artigo na íntegra pode ser conferido nos anexos.

Em relação às metodologias empregadas no trabalho, o meio de cultura CM0601 (Oxoid[®]) se mostrou eficiente na recuperação das bactérias oriundas das fezes, tratando-se de um meio a base de frutose e suplementado com cicloserina e cefoxitina, conhecido na literatura como meio CCFA, já utilizado em diversos trabalhos (ARROYO et al., 2005; CAMACHO-ORTIZ et al., 2015; GOUDARZI et al., 2013). É importante ressaltar que mesmo com o uso de um meio seletivo específico para *C. difficile*, outras espécies de anaeróbios e anaeróbios facultativos foram detectadas, sendo que a coprocultura deve possuir métodos de identificação associados, que no caso do nosso estudo foi realizado através do MALDI-TOF, PCR de genes conservados (genes *housekeeping*) e uso do GeneXpert.

Em relação ao uso do GeneXpert *C. difficile* (Cepheid[®]), estudos anteriores demonstraram que ensaios com o kit foram mais sensíveis, rápidos e fáceis de usar para a detecção de *C. difficile* toxigênico em amostras de fezes e para a confirmação laboratorial de CDI, como o trabalho de Pancholi et al. (2012) que comparou o método com o ensaio de neutralização da citotoxina celular (CCNA), obtendo concordância de 97,9 %. Em nosso estudo, o GeneXpert também demonstrou eficiência na identificação de cepas toxigênicas, e por ser um teste realizado diretamente das fezes, identificou uma amostra (amostra 94) que não foi possível de ser isolada na coprocultura. O GeneXpert conta com a detecção presuntiva de cepas BI/NAP1/027, através da detecção de uma deleção pontual no gene *tcdC*. Em nosso estudo, uma amostra apresentou esse resultado e foi encaminhada para sequenciamento de genoma completo, que acabou sendo classificada como uma cepa do mesmo clado da BI/NAP1/027 (ST01, clado 2) de perfil hipervirulento, mas outra ST (dados publicados em Pires et al., 2018).

A maioria dos estudos já publicados no Brasil utilizaram principalmente a Ribotipagem para detecção da bactéria (ALCIDES et al., 2007; BALASSIANO et al., 2011; CANÇADO et al., 2018; SILVA et al., 2015), sendo o MLST empregado no trabalho de Costa et. al (2016) com apenas uma amostra, e no trabalho de Diniz et. al (2019) com 38 amostras. Com nosso trabalho, foi possível realizar a técnica do MLST em 16 amostras, determinando as STs de oito delas: duas amostras de ST42, duas de ST54, e as outras quatro amostras de ST2, ST15, ST35 e ST67. As STs 15 e 54 (e seus respectivos ribotipos) ainda não foram descritos no Brasil, sendo esta a primeira descrição. As ST2, ST35 e ST42 já foram relatadas anteriormente, tanto pela identificação de ribotipagem quanto de sequência tipo (BALASSIANO et al., 2009; CANÇADO et al., 2018; COSTA et al., 2017; DINIZ et al., 2019; SECCO et al., 2014; SILVA et al., 2015). A ST67 encontrada nesse trabalho foi relatada por nosso grupo de pesquisa (PIRES et al., 2018). Oito amostras foram consideradas novas STs por conterem uma sequência alélica única que ainda não foi depositada no banco de dados do PubMLST. Como há poucos estudos de MLST publicados no Brasil, a identificação de novas sequências tipos é esperada, assim como descrito por Diniz e colaboradores (2019), que descreveram seis novas STs no país.

Observamos que duas amostras (26 e 100) pertencentes a ST42 foram oriundas do mesmo hospital, em pacientes diferentes e em períodos distintos, o que sugere uma persistência deste clone neste ambiente, tendo em vista que essa a ST42 (RT106) já foi descrita anteriormente em Minas Gerais e no Rio de Janeiro (BALASSIANO et al., 2009; CANÇADO et al., 2018; DINIZ et al., 2019; SILVA et al., 2015). Já as amostras 66 e 150, pertencentes a ST54, foram provenientes de hospitais diferentes, em estados diferentes (SP e RS) e em período de coletas distintos, o que pode indicar que esta ST seja comum no Brasil, sendo este o primeiro relato.

Os estudos mais recentes a nível mundial indicam que a ST2 (RT014-020) é uma das *sequência tipo* mais disseminadas no mundo, como nos Estados Unidos, Canadá, Europa e Chile (DAVIES et al., 2016; KATZ et al., 2018; PLAZA-GARRIDO et al., 2016; SNYDMAN, 2017) e relatada em diversos estudos no Brasil como sendo um ribotipo frequente no país (CANÇADO et al., 2018; COSTA et al., 2017; DINIZ et al., 2019; SILVA et al., 2015). Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, o trabalho de Tickler et al., (2014) não encontrou nenhum isolado ST2 resistente à vancomicina e ao metronidazol, diferentemente do nosso

estudo, em que o resultado do isolado foi de resistência à vancomicina (CLSI e BrCAST) e resistência ao metronidazol (BrCAST). Porém, o trabalho de Tickler et al (2014) utilizou Etest, que não é recomendado para *C. difficile*. A ST2 de ribotipo 014-020 já foi avaliada quanto à presença de proteínas de camada (CWP) no trabalho de Ferreira et al. (2017), que através da técnica de extração de proteínas detectou Cwp2, Cwp6, Cwp84 e SlpA, que aparentemente desempenham um papel importante na CDI e fornecem integridade estrutural às células de *C. difficile*, facilitando a ligação celular aos tecidos do hospedeiro. Em nosso estudo, os genes que codificam essas proteínas foram encontrados.

A ST42 (RT106) possui relatos de alta frequência nos Estados Unidos, Canadá e Colômbia (KATZ et al., 2018; SALAZAR et al., 2018; SNYDMAN, 2017), bem como esse ribotipo possui diversos relatos em estudos brasileiros (BALASSIANO et al., 2009; CANÇADO et al., 2018; DINIZ et al., 2019; SILVA et al., 2015). Um estudo na Inglaterra demonstrou que os índices de mortalidade (em vinte e oito dias) e morte precoce (em setenta e duas horas) para essa ST foi de 11% e 3%, respectivamente (SUNDRAM et al., 2009). Nos Estados Unidos, essa ST foi relatada como predominante em pacientes pediátricos em um estudo que realizou o sequenciamento do genoma completo de vinte e oito cepas ST42, todas sensíveis ao metronidazol e vancomicina no teste de susceptibilidade (KOCIOLEK et al., 2018), diferentemente do resultado encontrado em nosso estudo, cuja cepa 100 (ST42) mostrou-se resistente aos dois antibióticos citados de acordo com o CLSI. Kociolek e colaboradores (2018) também averiguaram a presença do gene de resistência *ermB* em seis isolados e o gene *mefA* em um isolado, o que vem de encontro com nossa análise que também encontrou esses dois genes na amostra 100 e *mefA* na amostra 26.

A ST35 (RT046) já foi relatada em humanos na América Latina, como no Chile (PLAZA-GARRIDO et al., 2016) e Brasil (CANÇADO et al., 2018; DINIZ et al., 2019; SECCO et al., 2014). Apresentou-se como a ST mais prevalente em um recente estudo Chinês (LIU et al., 2018) e a segunda maior em outro estudo neste mesmo país (LUO et al., 2018). No trabalho de Luo et al (2018) apresentou a maior gravidade clínica entre as STs observadas ($3,69 \pm 0,85$). Essa ST já foi encontrada em amostras de água residuais de estações de tratamento na Inglaterra, cujas fontes foram contaminadas com isolados clínicos, apresentando elementos genéticos móveis carreando os genes *tetM* e *ermB* (MORADIGARAVAND et al.,

2018). Comparando ao nosso estudo, a ST35 possui o gene *tetW* e o gene *ermB* não foi identificado *in silico*. Em relação ao perfil de susceptibilidade, em nosso estudo essa amostra demonstrou sensibilidade ao metronidazol e resistência à vancomicina (CLSI e BrCAST) e no estudo de Tian et al (2016) sensibilidade para ambos os antibióticos em isolados dessa ST na China.

ST54 (RT012) não possui relatos significativos nos Estados Unidos e Europa, porém foi a ST mais abundante no Chile (14,8%) e apresentou prevalência de 16,4-18,9% em Pequim (LUO et al., 2018; PLAZA-GARRIDO et al., 2016). Na Costa Rica, essa ST foi descrita como uma nova variante encontrada durante um surto e associada com graves manifestações clínicas, possuindo uma deleção de 18bp em *tcdC*, porém não sintetizam níveis de toxina A e B comparáveis à BI/NAP1/027 (QUESADA-GÓMEZ et al., 2015).

De acordo com Luo e colaboradores (2018) essa ST foi considerada de gravidade leve ($2,57 \pm 0,53$), sensíveis ao metronidazol e vancomicina. Já um estudo na Costa Rica (RAMÍREZ-VARGAS et al., 2017) observou sensibilidade diminuída à vancomicina (quatro isolados com CIM de 4 µg/mL entre trinta e oito isolados) e resistência ao metronidazol. Os dados da literatura foram ao encontro aos observados em nosso estudo quanto ao metronidazol, mas não houve consenso quanto a vancomicina. Um fator importante é que nosso estudo só avaliou um dos dois isolados de ST54, enquanto os demais estudos possuem um banco de isolados maior devido aos vários anos de coleta. No estudo de Ramírez-Vargas et al. (2017) foram avaliados genes de resistência presentes no genoma, sendo *tetM* e *ermB* comumente encontrados nas cepas de ST54, sendo que os três genes também foram encontrados na amostra 150 e *tetM* e *ermB* na amostra 66 deste trabalho. A cepa de referência *C. difficile* 630 é ST54, e seu genoma completo está depositado na base de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/535?genome_assembly_id=371940), onde os genes *cwp66*, *cwp84*, *secA* e *slpA* podem ser encontrados, como em nossa cepa. O gene *cwp2* não foi encontrado na cepa de referência, mas foi localizado em nossa amostra através da análise realizada no PubMLST.

A ST67 (RT019), caracterizada como cepa hipervirulenta, já foi referenciada no trabalho de Griffiths et al. (2010), encontrada em um isolado na Tailândia (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2015) e em um isolado no México (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2018). Por possuir poucos dados na literatura, não

foi possível avaliar o seu poder de disseminação e letalidade. Em nosso estudo, foi possível aferir que a cepa possui CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ para o metronidazol e ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para a vancomicina, indicando sua alta resistência frente a dois importantes antibióticos utilizados no tratamento de CDI. A partir do sequenciamento do genoma completo, diversos genes importantes foram anotados, como *secA* (que faz parte do cluster de CWPs), *fbpA* (associados à fibronectina) e diversos genes associados à multipla resistência. Por ser do mesmo clado da cepa hipervirulenta BI/NAP1/027 (ST1, clado 2), possuir uma distância evolutiva muito próxima, como o observado no dendrograma da figura 10, e também por demonstrar CIMs altos para as principais drogas utilizadas no tratamento de CDI, podemos presumir que seu potencial patogênico se assemelha. Esse fenômeno pode ser observado em outra cepa de mesmo clado, a ST11 (ribotipo 078), que compartilha as mesmas características de virulência genética que 027 e causa doença grave em uma taxa similar (PENG et al., 2017b). Um estudo mais aprofundado do genoma da ST67 se faz necessário para uma melhor compreensão de suas semelhanças e diferenças com a 027. Nosso trabalho foi o primeiro a caracterizar uma cepa hipervirulenta no Brasil (PIRES et al., 2018b). O artigo na íntegra pode ser conferido nos anexos.

A ST15 (RT010), caracterizada como não-toxigênica, também foi identificada no trabalho de Griffiths et al. (2010) e de Dingle et al. (2011) no Reino Unido. Por ser uma ST não produtora de toxinas, não há dados na literatura que justifiquem preocupação clínica quanto a disseminação dessa cepa. Um trabalho que avaliou isolados oriundos de cavalos detectou a presença de uma amostra ST15, sensível ao metronidazol e à vancomicina (KECEROVA et al., 2019). Em nosso trabalho, essa ST se mostrou sensível ao metronidazol, porém resistente à vancomicina, o que levanta a discussão sobre a importância do estudo mais profundo de cepas não-toxigênicas, que podem carrear genes de resistência e outros fatores de virulência (CHOWDHURY et al., 2016).

A bactéria possui outros genes que conferem virulência, mesmo elas não produzindo toxinas (cepas não-toxigênicas), sendo eles fatores de colonização, adesão ao hospedeiro, motilidade, capacidade de suportar choque de calor, entre outros. Por isso, torna-se importante o estudo desses fatores em cepas epidêmicas e em cepas não-toxigênicas. Um estudo que avaliou diferentes cepas de clados diferentes (clados 1, 2, 4 e 5), utilizando ensaio em roedores (LEWIS et al., 2017) concluiu que isolados do clado 1 e clado 2 foram os mais virulentos, e que a

produção de toxinas não se correlacionou com a gravidade da doença, assim como fenótipos normalmente associados à virulência de *C. difficile*, como taxa de esporulação e taxa de germinação, também não demonstraram uma associação com a virulência.

Cepas não-toxigênicas, mesmo que aparentemente não sejam clinicamente importantes, podem vir a serem potenciais patógenos dependendo das alterações na microbiota e podem se tornar toxigênicas através da transferência horizontal de genes do PaLoc, como demonstrado no estudo de Brouwer et al. (2013).

Percebeu-se com esse trabalho que os fatores de virulência não associados à produção de toxinas são pouco explorados quando se trata da caracterização de cepas epidêmicas. Segundo Lewis et al (2017), tem sido cada vez mais difícil identificar cepas de *C. difficile* que estão associadas à doença grave versus diarreia leve ou colonização assintomática, pois pacientes com infecção por *C. difficile* têm uma variedade de outras comorbidades, estados variáveis da função imunológica e geralmente receberam diversas combinações de antibióticos que causam perturbação da microbiota, variáveis clínicas complexas que dificultam a distinção do papel das diferentes cepas na gravidade da colite. Portanto, apenas a determinação da presença/ausência da produção de toxinas não é suficiente para compreender o potencial de patogenicidade da bactéria.

O estudo dos fatores de virulência em *C. difficile* também demonstra importância quando se trata de possíveis opções para profilaxia, como no caso da proteína Cwp84, que se demonstrou altamente imunogênica em pacientes com CDI, portanto poderia ser um alvo para desenvolvimento de vacina contra a doença (GOOYIT; JANDA, 2016).

A importância clínica de *C. difficile* também se deve à sensibilidade ou resistência das cepas frente aos antimicrobianos. Genes como *mefA* (resistência a macrolídeos) e *tetM* (resistência a tetraciclina), presentes nas amostras analisadas em nosso trabalho e no estudo de Isidro et al. (2018) demonstrando que a resistência a antibióticos desempenha um papel-chave na infecção e disseminação de *C. difficile*.

Para o tratamento de CDI, as opções de antimicrobianos recomendados são a vancomicina, o metronidazol, a rifaximina e a fidaxomicina. A resistência a vancomicina e ao metronidazol podem ser percebidas em nosso estudo, com cepas

consideradas resistentes tanto pelos critérios do CLSI quanto do BrCAST. Outros estudos também observaram a presença de cepas resistentes (PENG et al., 2017c), com taxas de 0,11 % de resistência ao metronidazol na Europa, 5,3 % no Irã e 15,1% na China para esse antibiótico. Um estudo chinês (JIN et al., 2017) relata a presença de uma cepa não-toxigênica com perfil de resistência ao metronidazol, como também foi observado em nosso estudo com a amostra 14 (CLSI e BrCAST) e amostra 36 (conforme BrCAST).

Em nosso estudo, a maioria das cepas testadas (toxigênicas e não-toxigênicas) apresentaram perfil de resistência à vancomicina. Assim como observado por nós, um aumento nas taxas de resistência a esse antibiótico foram publicados no Irã, com taxa de 8 % de prevalência entre os isolados (GOUDARZI et al., 2013) e taxa de 47 % em Israel (ADLER et al., 2015).

Além disso, a dosagem correta dos medicamentos parece ser um fator importante relacionado à expressão de toxinas, já que em um estudo recente (ALDAPE et al., 2019) foi observado que doses sub-inibitórias de vancomicina aumentaram a produção das toxinas A e B.

É importante ressaltar que a presença dos genes de resistência e genes associados a fatores de virulência nem sempre são indicativos da expressão gênica, podemos notar isso através dos testes fenotípicos (CIM), onde confirmamos a resistência de algumas cepas ao metronidazol mesmo não encontrando o gene na análise do WGS. Em contrapartida, as cinco amostras submetidas à análise do genoma completo que apresentaram os genes de resistência à vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanW* e *vanZ*) foram resistentes no teste fenotípico. Com isso, podemos concluir que a análise genômica deve ser associada a testes fenotípicos para confirmação dos resultados. Quanto aos fatores de virulência, através dos dados clínicos inferimos a virulência, pois a CDI foi confirmada em 19 indivíduos, com uma prevalência pontual de 3,0 por 1.000 pacientes-dia (IC 95 %, 1,9-4,8), sendo a proporção geral de pacientes com CDI entre os pacientes rastreados com diarreia de 11,8 % (IC 95 %, 7,6-17,8) (PIRES et al., 2019).

A CIM50 e CIM90 para o metronidazol em nosso trabalho obteve o resultado de 1 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, diferente dos resultados de Luo et al. (2018) que foram ambos de 0,25 µg/mL. Para a vancomicina, nosso resultado foi CIM50 de 4 µg/mL e CIM90 de 8 µg/mL, em contraste com a CIM50 de 0,5 µg/mL e CIM90 de 1 µg/mL também descritas pelo autor. Obtivemos concentrações inibitórias

mínimas mais altas que as encontradas nos isolados chineses e também maiores do que isolados da Europa, comparando um estudo que avaliou isolados da Alemanha com coletas em 2007 e 2017, conclui que as concentrações inibitórias mínimas de vancomicina eram estáveis nesse intervalo de dez anos (nenhum isolado resistente encontrado) e uma fluência significativa de CIM de metronidazol foi determinada (CIM50 = 0,047 em 2007 versus CIM50 = 0,094 em 2017), com apenas um isolado resistente a metronidazol (PIEPENBROCK et al., 2019). Em relação a isolados do Brasil, Fraga, Nicodemo & Sampaio (2016) encontraram o mesmo CIM50 para o metronidazol e para a vancomicina, e um CIM90 menor para ambos os antibióticos, de 2 µg/mL e 4 µg/mL respectivamente. Esse fato sugere uma tendência de aumento na CIM da vancomicina e do metronidazol no Brasil, já que avaliamos amostras de diferentes estados. Essa hipótese pode ser confirmada em um estudo com um maior número de isolados.

Cabe ressaltar que o presente estudo encontrou dificuldades em avaliar os perfis de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos visto que os pontos de corte do CLSI e BrCAST (EUCAST) diferem. Assim, é importante que haja um consenso entre os documentos para facilitar o entendimento do que é considerado sensível e resistente, para uma maior clareza da epidemiologia da CDI.

Quanto à filogenia, apesar das relações feitas pelo eBURST, essa plataforma produz uma hipótese sobre o modo como cada complexo clonal pode ter surgido e diversificado, e qualquer fenotipagem ou genotipagem adicional devem ser utilizadas para explorar a plausibilidade da ancestralidade proposta e padrões de descendência (FEIL et al., 2004). Isso pode ser notado quando comparado o resultado da relação da ST67 com ST1 (ambas clado 2 e hipervirulentas): no eBURST não é observado relação entre as duas, porém no dendrograma, elas aparecem com similaridade muito alta. Ambos os métodos são baseados nos sete genes *housekeeping* do MLST, porém eBURST baseia-se na comparação de alelos compartilhados e Neighbor-Joining na comparação das sequências alélicas concatenadas. Além do software BioNumerics (que gerou a árvore) ser mais robusto que eBurst.

7 CONCLUSÃO

➤ O estudo verificou a presença de *C. difficile* em 18/153 amostras de fezes diarreicas de pacientes internados em oito diferentes hospitais do Brasil;

➤ Verificou-se a ausência de *C. difficile* em quatro diferentes tipos de carnes seladas prontas para venda no município de Porto Alegre;

➤ Foi possível determinar 14 diferentes STs (*sequence type*) nos isolados de *C. difficile*: ST2, ST15, ST35, ST42, ST54 e ST67, além de oito novas STs.

➤ As STs 15 e 54 obtiveram sua primeira descrição no Brasil;

➤ Identificou-se a ST67 como uma cepa hipervirulenta, de clado 2;

➤ Identificou-se a ST42 como possível clone epidêmico e a ST54 como frequente no Brasil por ser identificada em dois estados diferentes;

➤ Identificou-se dez cepas toxigênicas e sete cepas não-toxigênicas.

➤ Das sete cepas toxigênicas que tiveram o seu genoma completamente sequenciado, diversos fatores de virulência foram observados;

➤ O perfil de susceptibilidade testado em treze amostras demonstrou um índice de resistência menor para o metronidazol e um alto índice de resistência para a vancomicina:

- De acordo com o BrCAST o metronidazol foi resistente em 5/13 (38,5%) isolados;
- Segundo os critérios do CLSI o metronidazol foi resistente em 3/13 (23%) isolados;
- A vancomicina obteve o mesmo resultado em ambos os documentos: resistente em 10/13 (77%) isolados.

8 PERSPECTIVAS

➤ O estudo pretende realizar uma análise genética dos Locus de Patogenicidade (PaLoC) de todos os genomas completamente sequenciados.

➤ Analisar a presença e ausência de toxinas binárias em todas as amostras, através da PCR *in house*.

➤ Realizar uma pesquisa mais aprofundada dos genes de resistência das cepas que tiveram o genoma completo sequenciado, avaliando proteínas hipotéticas;

➤ Depositar no banco de dados do PubMLST as informações sobre as STs encontradas no Brasil, bem como depositar as possíveis novas STs.

9 REFERÊNCIAS

ADLER, A. et al. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 21–24, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.05.015>>

ALCIDES, A. P. P. et al. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 53–59, 2007.

ALDAPE, M. J. et al. Sub-lethal doses of surotomycin and vancomycin have similar effects on *Clostridium difficile* virulence factor production in vitro. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 67, p. 1689–1697, 2019.

ARROYO, L. G. et al. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2005.

AWAD, M. M. et al. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 579–593, 2015.

BALASSIANO, I. T. et al. Anaerobe Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, [s. l.], v. 15, p. 61–64, 2009.

BALASSIANO, I. T. et al. 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**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 449–455, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017>>

BALASSIANO, I. T. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 249–255, 2011.

BARBUT, F. et al. Prospective study of *clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], 2007.

BARBUT, F. et al. Rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection by multiplex real-time PCR. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], 2011.

BARTLETT, J. G. Historical Perspectives on Studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], 2008.

BAUER, M. P.; KUIJPER, E. J. Potential Sources of *Clostridium difficile* in Human Infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 29–35, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.010>>

BIDET, P. et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], 1999.

BORREN, N. Z. et al. The emergence of *Clostridium difficile* infection in Asia: A systematic review and meta-analysis of incidence and impact. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1–16, 2017.

BRCAS. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e**

diâmetros de halos, 2017. Disponível em: <<http://www.brcast.org.br>>

BROUWER, M. S. M. et al. Horizontal gene transfer converts non-toxicogenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. **Nature Communications**, [s. l.], v. 4, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3601>>

BURNHAM, C. A. D.; CARROLL, K. C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: An ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], 2013.

CAMACHO-ORTIZ, A. et al. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. **PLoS ONE**, [s. l.], 2015.

CANÇADO, G. G. L. et al. Anaerobe Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, [s. l.], v. 54, p. 65–71, 2018.

CARMAN, R. J. et al. *Clostridium difficile* binary toxin (CDT) and diarrhea. **Anaerobe**, [s. l.], 2011.

CHAN, J. Z. M. et al. Genome sequencing in clinical microbiology. **Nature Biotechnology**, [s. l.], 2012.

CHENG, J. et al. The First Two *Clostridium difficile* Ribotype 027 / ST1 Isolates Identified in Beijing , China – an Emerging Problem or a Neglected. **Nature Publishing Group**, [s. l.], n. November 2015, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep18834>>

CHONG, P. M. et al. Proteomic analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* clinical isolate resistant to metronidazole. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2014.

CHOWDHURY, P. R. et al. Comparative genomic analysis of toxin-negative strains of *Clostridium difficile* from humans and animals with symptoms of gastrointestinal disease. **BMC Microbiology**, [s. l.], p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0653-3>>

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. C ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COHEN ET. AL. **Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of america (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)**, 2010.

COLLINS, D. E. A.; ELLIOTT, B. R.; RILEY, T. H. V. Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile*. **Pathology**, [s. l.], v. 47, p. 211–218, 2015.

COSTA, C. L. et al. Community-acquired diarrhea associated with *Clostridium difficile* in an HIV-positive cancer patient: First case report in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], 2014.

COSTA, C. L. et al. A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe**, [s. l.], 2016.

COSTA, C. L. et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, [s. l.], 2017.

CROBACH, M. J. T. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 22, p. S63–S81, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010>>

CURRY, S. R. et al. tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2007.

DAPA, T. et al. Multiple factors modulate biofilm formation by the

anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 195, n. 3, p. 545–555, 2013.

DAVIES, K. A. et al. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. **Euro Surveill**, [s. l.], v. 21, n. 29, p. 1–11, 2016.

DENÈVE, C. et al. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], 2009.

DINGLE, K. E. et al. Clinical *Clostridium difficile*: Clonality and Pathogenicity Locus Diversity. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 5, 2011.

DINIZ, A. N. et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anaerobe**, [s. l.], v. 56, n. December 2017, p. 34–39, 2019.

EASTWOOD, K. et al. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxic culture methods. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2009.

ECDC. *Clostridium difficile* infections. **ECDC**, [s. l.], n. June, 2018.

ELLIOTT, B. et al. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 49, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.018>>

FEIL, E. J. et al. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 5, p. 1518–1530, 2004.

FERREIRA, C. E. A. et al. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. June, p. 451–454, 2003.

FERREIRA, T. G. et al. Ribotypes associated with *Clostridium difficile* outbreaks in Brazil display distinct surface protein profiles. **Anaerobe**, [s. l.], 2017.

FRAGA, E. G.; NICODEMO, A. C.; SAMPAIO, J. L. M. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], 2016.

GHOSE, C. *Clostridium difficile* infection in the twenty-first century. **Journal Title**, [s. l.], v. 2, n. 000, p. 0, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emi.2013.62>>

GOOYIT, M. D.; JANDA, K. D. Modulation of the Surface-Layer Protein of *Clostridium difficile* through Cwp84 Inhibition. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 465–470, 2016.

GOUDARZI, M. et al. Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium Difficile* Clinical Isolates in Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, [s. l.], 2013.

GRIFFITHS, D. et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2010.

HENNEQUIN, C.; COLLIGNON, A.; KARJALAINEN, T. Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 255–260, 2001.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 2465–2466, 1988. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/>>

ISIDRO, J. et al. Genomic Study of a *Clostridium difficile* Multidrug Resistant Outbreak-Related Clone Reveals Novel Determinants of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. December, p. 1–9, 2018.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. **Anaerobe**, [s. l.], 2016.

JÍMENEZ, A. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in a national geriatric hospital in Costa Rica. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 99, p. 475–480, 2018.

JIN, D. et al. Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 801–810, 2017.

JOOST, I. et al. gene sequencing. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 33, p. 13–18, 2009.

KAI SOO TAN; BOON YU WEE; KEANG PENG SONG. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 613–619, 2001.

KATZ, K. C. et al. The evolving epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Canadian hospitals during a postepidemic period (2009-2015). **Cmaj**, [s. l.], v. 190, n. 25, p. E758–E765, 2018.

KECEROVA, Z. et al. Anaerobe *Clostridium difficile* isolates derived from Czech horses are resistant to enrofloxacin; cluster to clades 1 and 5 and ribotype 033 predominates. **Anaerobe**, [s. l.], v. 56, p. 17–21, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.01.005>>

KEEL, K. et al. Prevalence of PCR Ribotypes among *Clostridium difficile* Isolates from Pigs, Calves, and Other Species. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 1963–1964, 2007.

KHAN, R. et al. Impact of changes in antibiotic policy on *Clostridium difficile* -associated diarrhoea (CDAD) over a five-year period in a district general hospital. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 54, p. 104–108, 2003.

KILLGORE, G. et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein a gene sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2008.

KNETSCH, C. W. et al. **Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections** *Euro Surveill.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.eurosurveillance.org:pii=20381](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20381). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20381>>.

KOCIOLEK, L. K. et al. Comparative genomics analysis of *Clostridium difficile* epidemic strain DH/NAP11/106. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 245–253, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.004>>

LAWSON, P. A. et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe**, [s. l.], v. 40, 2016.

LEEDS, J. A. et al. In vitro selection, via serial passage, of *clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 41–44, 2014.

LEWIS, B. B. et al. Pathogenicity Locus, Core Genome, and Accessory

Gene Contributions to Clostridium difficile Virulence. **mBio**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1–15, 2017.

LIC, L. M.; RODRÍGUEZ, C.; GAMBOA-CORONADO, M. M. American Journal of Infection Control Molecular detection of Clostridium difficile on inert surfaces from a Costa Rican hospital during and after an outbreak. **AJIC: American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1517–1519, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.09.003>>

LIU, X. et al. Molecular Characterization of Clostridium difficile Isolates in China From 2010 to 2015. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. April, p. 1–8, 2018.

LOPARDO, G. et al. Epidemiology of Clostridium difficile: A hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], 2015.

LUK, S. et al. A cost-effective approach for detection of toxigenic Clostridium difficile: Toxigenic culture using ChromID Clostridium difficile agar. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2014.

LUO, Y. et al. Molecular epidemiology of Clostridium difficile in two tertiary care hospitals in Shandong Province, China. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 11, p. 489–500, 2018.

MACCANNELL, D. R. et al. Molecular analysis of Clostridium difficile PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2006.

MANZOOR, S. E. et al. Extended Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of Clostridium difficile Correlates Exactly with Ribotyping and Enables Identification of Hospital Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 10, p. 3523–3530, 2011.

MARCON, A. P.; GAMBA, M. A.; VIANNA, L. A. C. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 384–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059125>>

MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. Clostridium difficile infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 206–216, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>>

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. et al. Circulation of Highly Drug-Resistant Clostridium difficile. **MICROBIAL DRUG RESISTANCE**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 386–392, 2018.

MCCOLLUM, D. L.; RODRIGUEZ, J. M. Detection, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile Infection. **CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY**, [s. l.], v. 10, p. 581–592, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.03.008>>

MCDONALD, L. C. et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. e1–e48, 2018.

MCGOVERN, A. M. et al. Prevalence of binary toxin positive Clostridium difficile in diarrhoeal humans in the absence of epidemic ribotype 027. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1–10, 2017.

MONOT, M. et al. Clostridium difficile: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 1–13, 2015. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep15023>>

MONTEIRO, A. A. et al. A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], 2014.

MORADIGARAVAND, D. et al. Genomic survey of *Clostridium difficile* reservoirs in the East of England implicates environmental contamination of wastewater treatment plants by clinical lineages. **Microbial Genomics** **2018**;4, [s. l.], v. 4, p. 1–9, 2018.

MUÑOZ, M. et al. New insights into *Clostridium difficile* (CD) infection in Latin America: Novel description of toxigenic profiles of diarrhea-associated to CD in Bogotá, Colombia. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. JAN, p. 1–15, 2018.

MUSHER, D. M. et al. Relatively Poor Outcome after Treatment of *Clostridium difficile* Colitis with Metronidazole. **Clinical Infectious Diseases** **2005**;40:1586–90, [s. l.], v. 77030, p. 1586–1590, 2005.

MUSHER, D. M. et al. Detection of *Clostridium difficile* toxin: Comparison of enzyme immunoassay results with results obtained by cytotoxicity assay. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2007.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in a Large Teaching Hospital in Thailand. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1–11, 2015.

PaLoc e CDTLoc (Deneve, 2009). [s. l.], [s.d.].

PANCHOLI, P. et al. Detection of toxigenic *Clostridium difficile*: Comparison of the cell culture neutralization, Xpert C. *difficile*, Xpert C. *difficile*/Epi, and Illumigene C. *difficile* assays. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2012.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. ***Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins**, 2014.

Pathogenesis (Deneve, 2009). [s. l.], [s.d.].

PENG, Z. et al. Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 1998–2008, 2017. a.

PENG, Z. et al. Genome characterization of a novel binary toxin-positive strain of *Clostridium difficile* and comparison with the epidemic 027 and 078 strains. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–16, 2017. b.

PENG, Z. et al. Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 1998–2008, 2017. c.

PEREIRA, N. G. Infecção pelo *Clostridium difficile*. **JBM**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 27–49, 2014.

PERRY, J. D. **A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics**, 2017.

PIEPENBROCK, Y. et al. Changes in *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* PCR-Ribotype Distribution and Antimicrobial Resistance in a German Tertiary Care Hospital Over the Last 10 Years. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 0, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01654-3>>

PIRES, R. N. et al. *Clostridium difficile* infection in Brazil: A neglected problem? **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 459–460, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2013.10.012>>

PIRES, R. N. et al. Brief communication *Clostridium difficile* contamination in retail meat products in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 345–346, 2018. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.007>>

PIRES, R. N. et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 371–372, 2018. b.

PIRES, R. N. et al. High frequency of *Clostridium difficile* infections in Brazil: Results from a multicenter point-prevalence study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], p. 1–2, 2019.

PLANCHE, T.; WILCOX, M. **Reference assays for *Clostridium difficile* infection: One or two gold standards?**, 2011.

PLAZA-GARRIDO, A. et al. SHORT REPORT Predominance of *Clostridium dif fi cile* ribotypes 012 , 027 and 046 in a university hospital in Chile , 2012. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 144, n. July 2011, p. 976–979, 2016.

POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 51–58, 2004.

QUESADA-GÓMEZ, C. et al. Emergence of an Outbreak-Associated *Clostridium difficile* Variant with Increased Virulence. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1216–1226, 2015.

RAMÍREZ-VARGAS, G. et al. A *Clostridium difficile* Lineage Endemic to Costa Rican Hospitals Is Multidrug Resistant by Acquisition of Chromosomal Mutations and Novel Mobile Genetic Elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 1–12, 2017.

RAMÍREZ-VARGAS, G. et al. Novel Clade C-I *Clostridium difficile* strains escape diagnostic tests, differ in pathogenicity potential and carry toxins on extrachromosomal elements. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 13951, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-32390-6>>

RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], 2007.

ROLDAN, G. A.; CUI, A. X.; POLLOCK, N. R. Assessing the Burden of *Clostridium difficile* Infection in Low and Middle-Income Countries. [s. l.], p. 1–8, 2018.

RUPNIK, M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], 2007.

RUPNIK, M. et al. *Clostridium difficile* Toxinotype V, Ribotype 078, in Animals and Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 4500, 2008.

RUPNIK, M. VARIABILITY OF THE PaLoc AND ESTABLISHMENT OF. [s. l.], v. 54, n. 1, p. 13–18, 2016.

RYAN, A. et al. A role for TLR4 in *clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2011.

SALAZAR, C. L. et al. Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 591 , 106 and 002 , the dominant strain types circulating in Medellín , Colombia. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1–14, 2018.

SÁRA, M.; SLEYTR, U. B. S-Layer Proteins. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, [s. l.], v. 182, n. 4, p. 859–868, 2000.

SCHÄFFLER, H.; BREITRÜCK, A. *Clostridium difficile* - From colonization to infection. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. APR, p. 1–12, 2018.

SECCO, D. A. et al. *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. **Anaerobe**, [s. l.], 2014.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics Applications Note**, [s. l.], v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SILVA, R. O. S. et al. Clostridium difficile ribotypes in humans and animals in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 8, p. 1062–1065, 2015.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. August, p. 1–16, 2015.

SNYDMAN, D. R. Epidemiology, Impact, and Testing Friday, October 6, 2017: 12:30 PM Background. **Open Forum Infect Dis. 2017 Fall; 4(Suppl 1): S391.**, [s. l.], v. 4, n. Suppl 1, p. 2017, 2017.

SONGER, J. G. et al. Clostridium difficile in retail meat products, USA, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], 2009.

SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among Clostridium difficile clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2002.

SUNDRAM, F. et al. Clostridium difficile ribotypes 027 and 106: clinical outcomes and risk factors *. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 111–118, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.020>>

TASTEYRE, A. et al. Phenotypic and Genotypic Diversity of the Flagellin Gene (fliC) among Clostridium difficile Isolates from Different Serogroups Phenotypic and Genotypic Diversity of the Flagellin Gene (fliC) among Clostridium difficile Isolates from Different Serogrou. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 3179–3186, 2000.

TIAN, T. et al. Molecular Characterization of Clostridium difficile Isolates from Human Subjects and the Environment. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–13, 2016.

TICKLER, I. A. et al. Strain Types and Antimicrobial Resistance Patterns of Clostridium difficile Isolates from the United States , 2011 to 2013. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 4214–4218, 2014.

VIEIRA, A. M. et al. Clostridium difficile - Associated Diarrhea in a Central Hospital. **Jornal Português de Gastreenterologia**, [s. l.], v. 17, p. 10–17, 2010.

10 ARTIGO

Proposta de artigo que será submetido à revista “The Journal of Infectious Diseases”. Formato: Brief Report

Genetic relatedness and Antimicrobial Resistance of *C. difficile* strains from hospitalized patients in Brazil.

Authors: Gabriele Z. Saldanha^a Renata N. Pires, RN^{b,c} Ana P. Rauber^a Daiane de Lima-Morales, PhD^d Alessandro C. Pasqualotto, MD PhD^{b,c} Afonso Barth, Pharm PhD^d Andreza F. Martins, Pharm PhD^{a*}

- a. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- b. Universidade Federal de Ciências da Saúde De Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
- c. Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
- d. Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

* Address correspondence to Andreza Francisco Martins, Pharm, PhD. Laboratory Of Applied Microbiology. Av Sarmiento Leite 500, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, 90050170, Brazil. E-mail: andrezafm20@gmail.com.br. Phone: +55 51 992097448.

Abstract

Clostridium difficile infection (CDI) is recognized worldwide as a public health problem, related mainly with hypervirulent strains. In Brazil, there are a few studies about molecular epidemiology of *C. difficile*, so the objectives of this study were characterized the isolates obtained from hospitalized patients by MLST and identified virulence and resistance profiles associated with these. We identified 6 different STs, 5 belonging Clade 1 and 1 to Clade 2. Resistance (*ermB*, *tetM*, *VanW* and *nimb*) and virulence genes (*cwp84*, *cwp66*, *cwp2*, *fbpA* and *secA*) were found in toxigenic strains. We found high level resistance to vancomycin. These results suggest that the main circulating strains in Brazil belong to Clade 1 and have high pathogenicity potential.

Keywords: *Clostridium difficile*; MLST; virulence factors.

Background

Clostridium difficile infection (CDI) is a serious disease which reaches the inner surface of the colon, causing inflammation due to the production of toxins, which can lead to the development of pseudomembranous colitis (1). The main risk factor of the disease involves the previous use of broad spectrum antibiotics by the patients, which modify the gut microbiota, allowing the proliferation of *C. difficile* (2). Bacteria have been reported as the major cause of nosocomial diarrhea among adults in industrialized countries, and it is associated with significant morbidity, particularly among patients older than 65 years (3).

To understand the epidemiological distribution of *C. difficile*, the main methods used in the molecular typing are Ribotyping, PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*), MLVA (*Multilocus Variable-number Tandem-repeat Analysis*) and MLST (*Multilocus Sequencing Typing*) (4). The MLST technique consists of the analysis of *housekeeping* genes, which are highly conserved constitutive genes in bacterial species whose small variations can be used to distinguish strains so as to group them based on their evolutionary proximity and can be divided into clades (5). Currently, there are eight clades that separate the strains analyzed by the MLST according to the phylogenetic evolution of *C. difficile*: clades 1, 2, 3 and 5 consist mainly of toxigenic strains. Belonging to clade 2, we can highlight the epidemic and hypervirulent strain BI/NAP1/027 (6)

In Latin America, the dynamics of the CDI have been studied mainly in Chile, Uruguay, Costa Rica, Argentina, Mexico and Brazil. However, epidemiological data and surveillance systems are few for this region (7).

The aim of this research were characterized *Clostridium difficile* isolates from hospitalized patients in Brazil by MLST and identified virulence and resistance factors associated with these strains.

Methods

Data Collection

A total of 153 stool specimens from eight Brazilian hospitals located in Porto Alegre, Curitiba and São Paulo were collected in two pre-established days corresponding to summer and winter (March and July). The study was initiated after approval from the local Ethics Committees of the participating hospitals.

Microbiological Methods

The stools samples was treating to alcohol (absolut alcohol 1:1) at room temperature for 1 hour and subcultured in CM0601 *Clostridium difficile* agar (Oxoid), enriched with 7% of blood horse, D- Cycloserine and Cefoxitin for 48 hours in anaerobiosis atmosphere. The suspect colonies were identifying by MALDI-TOF MS (Bruker) to confirm the isolates as *Clostridium difficile*.

PCR to Toxins and PaLoC

DNA extraction was performed by thermal lysis, a few colonies were emulsified in TE (Tris-EDTA) buffer (Sigma-Aldrich) and heated at 80°C for 20 min. Debris was removed by centrifugation and the supernatant was removed for use in MLST. DNA was stored at -20°C.

PCR *in house* was performed to *tcdA*, *tcdB* and *tcdC* with the primers and methods developed by Griffiths et al. (5). Toxigenic samples were those that amplified *tcdA* and/or *tcdB* genes and PaLoC positive that amplified *tcdC*.

Multilocus Sequence Type (MLST)

Multilocus sequence typing was performed on all recovered isolates using the primers and methods through the sequencing of *housekeeping* genes by Sanger (Roche), according to literature (5). ST assignments were performed using the *C. difficile* database at pubMLST.

The Neighbor-Joining tree was performed using BioNumerics v7.3 software using a *plugin* of pubMLST.

Whole Genome Sequence

The MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA) was used for whole genome sequencing (WGS) for toxigenic strains. The paired-end library was performed with the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina). The run was performed with the MiSeq Reagent V2 kit (500 cycles) with a calculate coverage of 100x.

Denovo assembly of the genome was performed using SPAdes (v3.6.2; <http://cab.spbu.ru/software/spades/>). The file generated by the assembly was annotated on the RAST platform (<http://rast.nmpdr.org>) and Prokka. In addition, reference annotation (*C. difficile* 630 reference strain) was carried out in Geneious® software.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of the MIC was performed by Agar Dilution according to the protocol indicated in the CLSI (8) document M10 using the antimicrobials metronidazole (cutoff $\leq 8\mu\text{g/L}$ susceptible, $16\mu\text{g/L}$ intermediary and $\geq 32\mu\text{g/L}$ resistant) and vancomycin (cutoff $\leq 2\mu\text{g/L}$ susceptible and $\geq 4\mu\text{g/L}$ resistant).

Results

Identification and Definition of Toxigenic Strains

Of the 153 samples, 44 of them (28.75%) had a suggestive growth of *C. difficile*. According to the results by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), 18/153 (11.76%) were confirmed as *C. difficile*. Ten samples amplified the genes *tcdA*, *tcdB* and *tcdC* and were considered to be toxigenic strains and PaLoC positive

Multilocus Sequence Type (MLST) and Phylogenetic Analyses

MLST revealed 6 different STs, besides 8 novel STs. We do not able to obtain DNA for sequencing for 2 isolates. Among the STs found, ST67, Clade 2, hypervirulent is the most relevant. This ST was previously described and published by our group (9).

ST42 (Clade 1) was found in 2/16 isolates from the same hospital and the ST54 (Clade 1) in 2/16 isolates s from different hospitals (Table 1).

The Neighbor-Joining tree (figure 1) showed high levels of similarity between strains ($\geq 86.6\%$), forming tree groups: the samples NT14 and NT02 have similarity of 97.2%, forming group A. Within group B, samples T08 and NT34 have similarity of 98.3% among them. In group C, STs 42, 15, 2, 54, 35, 67, 1 (BI/NAP1/027), T48 and NT36 samples have similarities $\geq 99.1\%$.

Table 1. Sequence Type, Resistance and Virulence genes of *C. difficile* strains.

Sample	Hospital ^a	ST ^b	Clade ^c	Resistance Genes ^d	Virulence Factor ^e	MIC Metronidazol (range 0.5 – 32)	MIC Vancomycin (range 0.5 – 16)
Toxigenic samples submitted to the WSG							
12	H1	35	1	<i>tetW, tet32, VanW, VanA, Nimb, qnr</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, cwp84, cwp66, fbpA, GroEL</i>	S (1g/L)	R (4g/L)
26	H2	42	1	<i>tetW, tetO, VanW, VanZ, mefA, Nimb, MdtG, qnr</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, cwp2, cwp66, secA, slpA, GroEL</i>	NR	NR
66	H5	54	1	<i>ermB, tetW, tetM, VanZ, VanW, mefA, qnr</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, secA, fbpA, GroEL</i>	S (1g/L)	R (4g/L)
100	H2	42	1	<i>ermB, mefA, Mecl, MdtA, NorM, MdtG, MarR, tetA, VanB</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, cdtA, cdtB, cwp2, cwp66, cwp84, secA, slpA</i>	R (>32g/L)	R (4g/L)
113	H1	2	1	<i>mdtD, mdtG, NorM, VanB, Mecl</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, cdtB, cwp2, cwp66, cwp84, secA, slpA</i>	S (4g/L)	R (8g/L)
150	H3	54	1	<i>tetW, tetM, tetO, msrD, lnuC, ermB, VanW, Nimb</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, cdtA, cdtB, cwp2, cwp66, cwp84, secA, slpA, fbpA, GroEL</i>	NR	NR
153	H3	67	2	<i>VanW, VanB, MarA, Mecl, mecR, NorM, emrY, bmr3, mdtG</i>	<i>tcdA, tcdB, tcdC, cdtA, cdtB, secA, fbpA</i>	R (>32g/L)	R (>16g/L)
Toxigenic and non-toxic samples submitted to Sanger sequencing							
T01	H1	NS	NA	NA	<i>tcdA, tcdB, tcdC</i>	S (<0.5g/L)	S (<0.5g/L)
T08	H1	NS	ND	NA	<i>tcdA, tcdB, tcdC</i>	S (2g/L)	S (<0.5g/L)
T48	H2	NS	ND	NA	<i>tcdA, tcdB, tcdC</i>	S (<0.5g/L)	R (4g/L)
NT02	H1	NS	ND	NA	negative [†]	NR	NR
NT14	H1	NS	ND	NA	Negative [†]	R (>32g/L)	R (16g/L)
NT34	H2	NS	ND	NA	Negative [†]	NR	NR
NT36	H2	NS	ND	NA	Negative [†]	S (4g/L)	R (8g/L)
NT101	H7	NS	ND	NA	Negative [†]	S (<0.5g/L)	S (<0.5g/L)
NT119	H7	15	1	NA	Negative [†]	S (1g/L)	R (4g/L)

^aH1, H2 and H3 = Porto Alegre city, state of Rio Grande do Sul, Brazil; H4, H5 and H6 = São Paulo city, state of São Paulo, Brazil; H7 and H8 = Curitiba city, state of Paraná, Brazil.

^b Sequence Type according to PUBMLST; NS: ST not found in the database, probable the new ST.

^c Clade group according to PUBMLST;

^d Resistance Genes performed by WGS: *tetO*: Tetracycline-resistant ribosomal protection protein; *VanW*: Vancomycin B-type resistance protein VanW; *VanZ*: Teicoplanin resistance protein; *mefA*: Macrolide efflux A domain protein; *MecI*: Methicillin resistance regulatory protein; *Nimb*: Nitroimidazole antibiotic resistance protein Nimb; *MdtA*, *MdtC*, *MdtD* and *MdtG*: Multidrug resistance protein; *qnr*: Quinolone resistance protein; *VanA*: Vancomycin/teicoplanin A-type resistance protein VanA; *msrD*: Macrolide resistance; *emrY*: Multidrug resistance protein; *bmr3*: Multidrug resistance protein; *mecR*: Methicillin resistance *mecR1* protein; *InuC*: Lincosamide nucleotidyltransferase.; NT = This isolates were not submitted to WGS

^e Virulence Genes: *cwp2*: Cell wall binding protein; *cwp66*: Cell surface protein; *ermB*: Clindamycin resistance; *secA*: Protein translocase subunit *secA*; *slpA*: Precursor of the S-layer proteins; *tetW* and *tet32*: Tetracycline resistance protein; *GroEL*: Heat shock protein; *tcdA*: Toxin A; *tcdB*: Toxin B; *tcdC*: truncated *tcdC*.^f Negative = The isolates were negative for toxin genes performed by PCR in house.

S = susceptible; R = resistant

NR = Non-recovery: the isolates were not recovered to freeze for the tests.

T = toxigenic

NT = non-toxigenic

NA = Not applicable

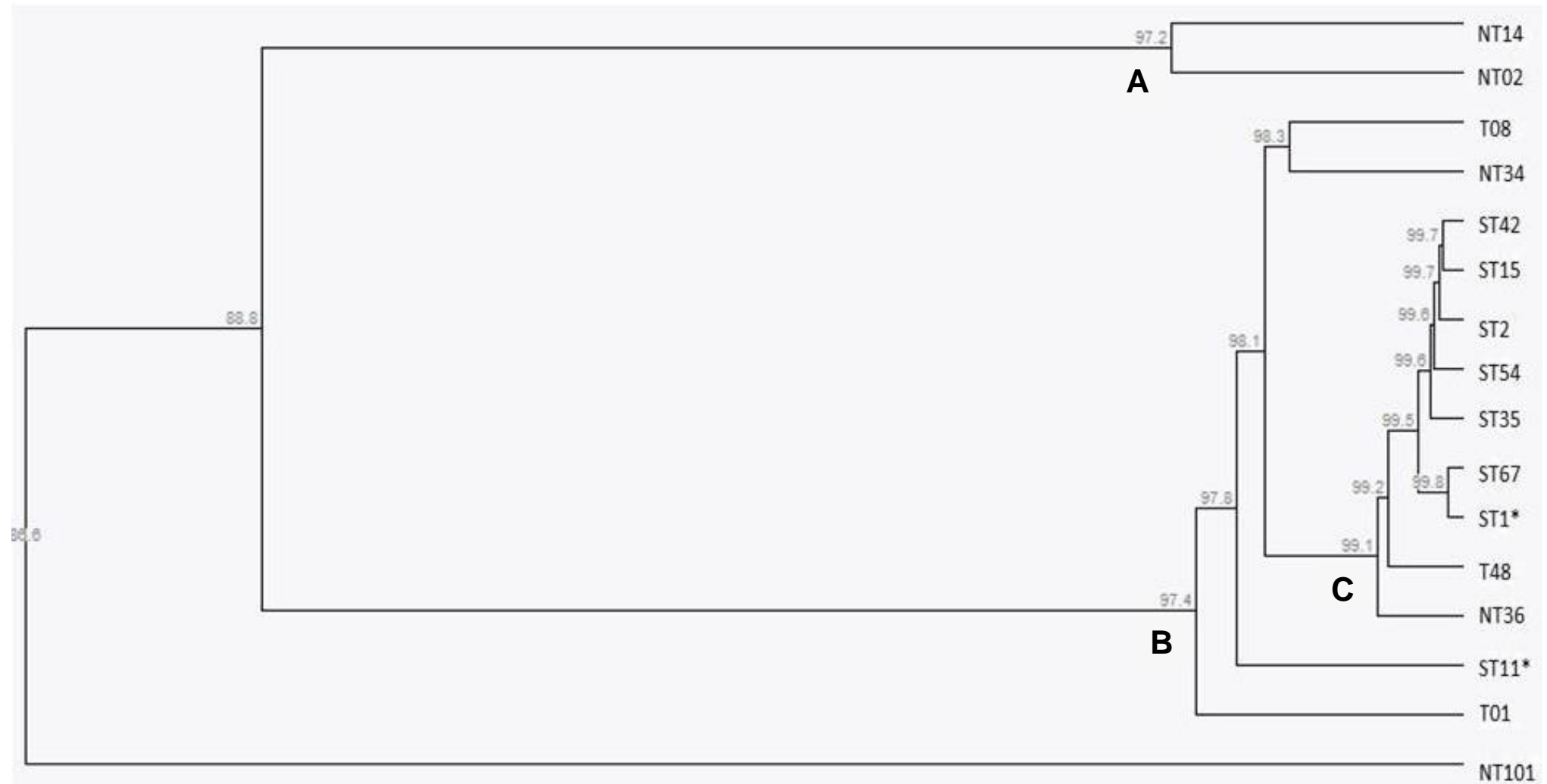


Figure 1. Neighbor-joining tree constructed using the concatenated sequences of the seven *loci* used in MLST. Bootstraps were generated using 50 replicates, and low values were removed for clarity. The STs forming tree groups, designated A to C, with similarity of 97.2% (A), 97.4% (B) and $\geq 99.1\%$ between them (C). * ST1/RT027 and ST11/RT078 hypervirulent strains used for comparison, Sequence Type deposited in pubMLST.org.

Virulence and Resistance Genes

It was possible to evaluate resistance and other virulence genes besides the production of toxins, in the seven samples that had the complete genome sequenced. The virulence factors linked to CWP proteins (*cwp84*, *cwp66* and *cwp2*) are all present in 3 isolates. The *secA* gene associate to CWP cluster appears in 5 isolates. The gene of the shock-thermal *groEL* and fibronectin gene *fbpA* were found in 4 isolates. Motile genes (flagellum proteins) appear in all analyzed samples. Binary toxin genes are present in 4 isolates included ST67. Clinically important resistance genes, such as the *Nimb* gene that confers resistance to Metronidazole, and the *Van* gene family, which confer Vancomycin resistance, appear in samples 12 (ST35), 26 (ST42) and 150 (ST54). *Van* genes are still present in samples 66 (ST54), 100 (ST42), 113 (ST2) and 153 (ST67).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

We were able to performed MIC to twelve samples (table 1). According to the CLSI breakpoint, only 2 isolates, showed the resistance profile to Metronidazole (≥ 32 g/L). For Vancomycin, only three isolates (2 toxigenic and 1 non-toxigenic) showed an antimicrobial susceptibility profile (≤ 2 g/L), while the other ten isolates had a resistance profile (≥ 4 g/L).

Discussion

Some studies already published in Brazil used Ribotyping for the characterization *C. difficile* strains (10; 11), but the MLST employed in few studies in the country (12; 13). With our work, it was possible to perform the MLST technique in isolates from different hospitals and describe for the first time STs 15 and 54 in our country. 2 samples from the same hospital, 1 collected in the summer and another in the winter, were identified as ST42, suggesting the persistence of an outbreak, and there is a need to expand the studies. Most STs identified belonged to clade 1, suggest this clade as predominant in Brazil, as well as that found by Diniz et al. (13). Clade 1 and clade 2 are considered the most virulent (14). The Neighbor-joining tree showed high similarity among the isolates, suggesting common ancestry.

The virulence factors associated with typing are poorly explored in the literature, and there are gaps in the understanding between CDI, virulence factors and Sequence Type. It has been increasingly difficult to identify strains of *C. difficile*

that are associated with severe disease versus mild diarrhea or asymptomatic colonization since patients with *C. difficile* infection have a variety of other comorbidities, varying states of immune function, and generally have received various combinations of antibiotics that cause disruption of the microbiota, complex clinical variables that make it difficult to distinguish the role of different strains in the severity of colitis. Therefore, only the determination of the presence/absence of toxin production is not sufficient to understand the bacterial pathogenicity potential (14).

In our study, most of the strains tested (toxigenic and non-toxigenic) had a resistance profile to vancomycin. High rates of vancomycin resistance have been observed in the country previously (15), which increases the concern about the treatment of CDI in the country, since vancomycin is the main drug recommended.

The present study is the largest ever performed in Brazil in relation to the number of participating hospitals and of different states of the national territory, encompassing states of the South and Southeast. Our findings need to be expanded in other studies, as well as the CDI investigation in other Brazilian states.

References

1. Pereira NG. Infecção pelo *Clostridium difficile*. JBM. 2014;102(5):27–49.
2. Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. Int J Antimicrob Agents. 2009;
3. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis. 2018;66(7):e1–48.
4. Burnham CAD, Carroll KC. Diagnosis of *clostridium difficile* infection: An ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. Clin Microbiol Rev. 2013;
5. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 2010;
6. Elliott B, Androga GO, Knight DR, Riley T V. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. Infect Genet Evol [Internet]. 2017;49:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.018>
7. Muñoz M, Ríos-Chaparro DI, Herrera G, Soto-De Leon SC, Birchenall C, Pinilla D, et al. New insights into *Clostridium difficile* (CD) infection in Latin America: Novel

- description of toxigenic profiles of diarrhea-associated to CD in Bogotá, Colombia. *Front Microbiol.* 2018;9(JAN):1–15.
8. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 28th ed. C. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018;
 9. Pires RN, Monteiro AA, Saldanha GZ, Falci DR, Caurio CFB, Sukiennik TCT, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* Strain Has Arrived in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2018;39(3):371–2.
 10. Balassiano IT, Miranda KR, Boente RF, Pauer H, Cristina I, Oliveira M, et al. Anaerobe Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro , Brazil. *Anaerobe.* 2009;15:61–4.
 11. Cançado GGL, Silva ROS, Rupnik M, Nader AP, Carvalho JS de, Paixão GM de M, et al. Anaerobe Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Anaerobe.* 2018;54:65–71.
 12. Costa CL, Mano de Carvalho CB, González RH, Gifoni MAC, Ribeiro R de A, Quesada-Gómez C, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. *Anaerobe.* 2017;48:232–6.
 13. Diniz AN, De Oliveira Júnior CA, Vilela EV, Figueiredo HCP, Rupnik M, Wilcox MH, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium*) *difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais , Brazil. *Anaerobe.* 2019;56(December 2017):34–9.
 14. Lewis BB, Carter RA, Ling L, Leiner I, Taur Y, Kamboj M, et al. Pathogenicity Locus, Core Genome, and Accessory Gene Contributions to *Clostridium difficile* Virulence. *MBio.* 2017;8(4):1–15.
 15. Fraga EG, Nicodemo AC, Sampaio JLM. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. *Brazilian J Infect Dis.* 2016;

11 APÊNDICES

11.1 Análise realizado pelo eBURST com o critério de agrupamento mais rigoroso, de 6/7 alelos compartilhados. FREQ = frequency; SLV = single locus variant; DLV = double-locus variants; TLV = three loci variants; SAT = satellites.

Profile Analysis Diagram								
eBURST Report - Fri Feb 22 17:13:42 BRT 2019								
No. isolates = 81 No. STs = 80 No. re-samplings for bootstrapping = 1000								
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def= 6 No. groups = 11								
Group 1: No. Isolates = 38 No. STs = 38 Predicted Founder = 28								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
28	1	8	16	11	2	2.18	61%	87%
48	1	7	19	10	1	2.13	43%	78%
3	1	6	14	14	3	2.37	12%	49%
17	1	6	7	14	10	2.75	15%	74%
76	1	5	10	15	7	2.64	10%	47%
16	1	5	8	12	12	2.86	5%	32%
42	1	4	15	15	3	2.45	0%	0%
8	1	4	9	15	9	2.81	1%	11%
2	1	4	9	14	10	2.83	1%	33%
29	1	4	8	13	12	2.91	0%	8%
45	1	4	7	10	16	3.08	5%	41%
78	1	4	5	9	19	3.32	1%	32%
18	1	3	9	13	12	2.94	0%	0%
6	1	3	9	10	15	3.05	1%	20%
69	1	3	7	17	10	2.91	0%	0%
53	1	3	6	19	9	2.94	0%	2%
14	1	3	5	9	20	3.40	0%	4%
46	1	3	4	10	20	3.43	0%	2%
71	1	3	4	10	20	3.43	0%	2%
7	1	2	12	19	4	2.67	0%	0%
9	1	2	12	16	7	2.75	0%	0%
64	1	2	12	16	7	2.75	0%	0%
10	1	2	8	21	6	2.83	0%	0%
T08	1	2	8	14	13	3.08	0%	0%
52	1	2	8	11	16	3.16	0%	0%
49	1	2	7	9	19	3.45	0%	0%
66	1	2	7	9	19	3.43	0%	0%
13	1	2	6	17	12	3.10	0%	0%
4	1	2	6	6	23	3.56	0%	0%
33	1	2	5	7	23	3.54	0%	0%
460	1	1	10	11	15	3.13	0%	0%
NT14	1	1	3	14	19	3.48	0%	0%
73	1	1	3	11	22	3.51	0%	0%
68	1	1	3	11	22	3.70	0%	0%
77	1	1	2	10	24	3.83	0%	0%
72	1	1	2	10	24	3.81	0%	0%
50	1	1	2	6	28	3.89	0%	0%
44	1	1	1	10	25	3.70	0%	0%

Group 2: No. Isolates = 5 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 5

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap	
							Group	Subgrp
5	1	3	0	0	0	1.0	77%	13%
455	2	1	2	0	0	1.66	0%	0%
25	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
22	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 3: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 41

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap	
							Group	Subgrp
41	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%
T48	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
67	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 4: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 32

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap	
							Group	Subgrp
32	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%
47	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
61	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 5: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
58	1	1	0	0	0	1.0
34	1	1	0	0	0	1.0

Group 6: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
57	1	1	0	0	0	1.0
12	1	1	0	0	0	1.0

Group 7: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
56	1	1	0	0	0	1.0
70	1	1	0	0	0	1.0

Group 8: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
462	1	1	0	0	0	1.0
461	1	1	0	0	0	1.0

Group 9: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
27	1	1	0	0	0	1.0
26	1	1	0	0	0	1.0

Group 10: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
24	1	1	0	0	0	1.0
20	1	1	0	0	0	1.0

Group 11: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
80	1	1	0	0	0	1.0
74	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 18

122

54

T01

114

NT101

NT36

NT34

NT02

464

463

38

37

36

35

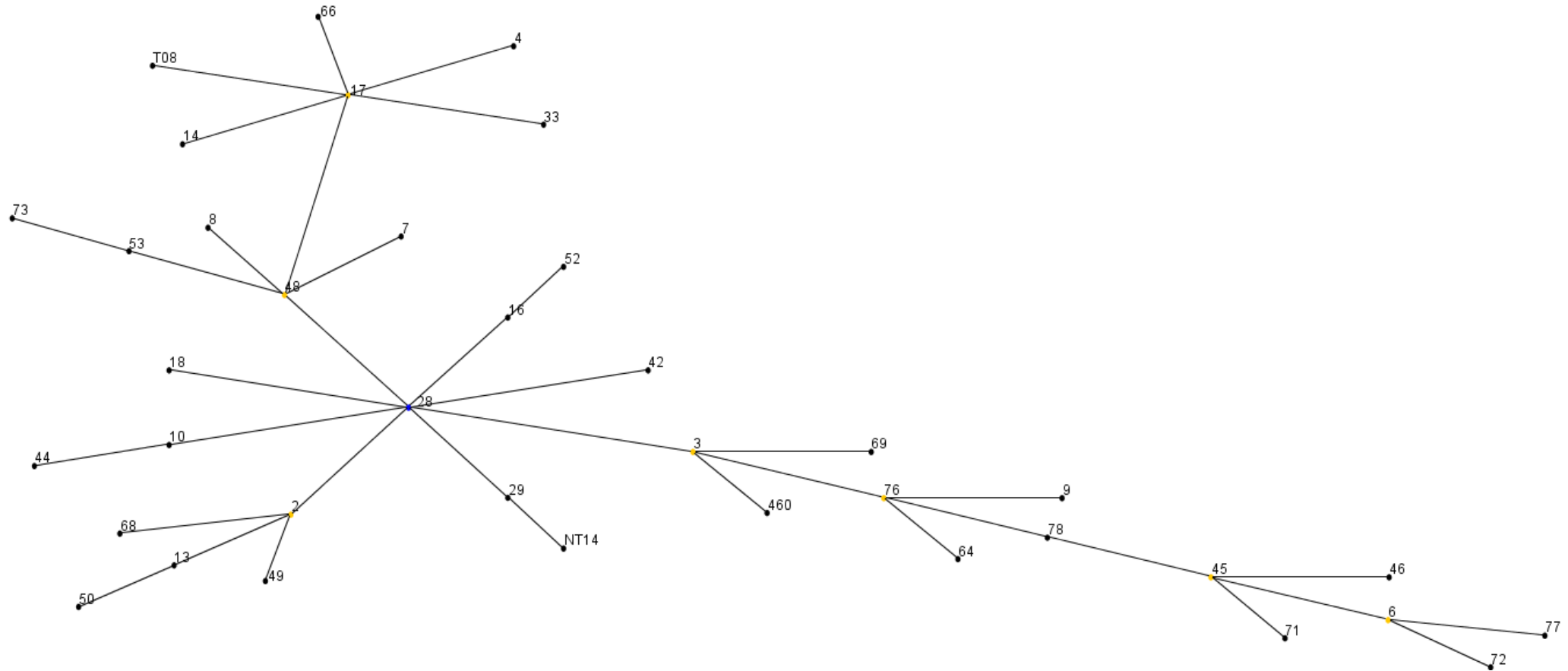
459

1

15

11

11.2 Diagrama realizado pelo eBURST com o critério de agrupamento mais rigoroso, de 6/7 alelos compartilhados. Nota-se que nem todas as STs foram representadas.



11.3 Análise realizado pelo eBURST com o critério de agrupamento menos rigoroso, de $\geq 5/7$ alelos compartilhados. FREQ = frequency; SLV = single locus variant; DLV = double-locus variants; TLV = three loci variants; SAT = satellites.

Profile	Analysis	Diagram					
eBURST Report - Fri Feb 22 18:11:05 BRT 2019							
No. isolates = 81 No. STs = 80 No. re-samplings for bootstrapping = 1000							
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 0 No. groups = 1							
Group 1: No. Isolates = 81 No. STs = 80 Predicted Founder = 28							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	
28	1	8	19	27	25	3.24	
48	1	7	21	20	31	3.31	
3	1	6	16	26	31	3.37	
17	1	6	8	24	41	3.64	
76	1	5	14	28	32	3.43	
16	1	5	8	23	43	3.74	
42	1	4	15	25	35	3.53	
8	1	4	10	19	46	3.82	
2	1	4	9	19	47	3.87	
29	1	4	8	24	43	3.77	
45	1	4	8	14	53	4.10	
78	1	4	5	13	57	4.16	
69	1	3	11	27	38	3.60	
6	1	3	11	13	52	4.06	
18	1	3	9	24	43	3.78	
53	1	3	6	24	46	3.98	
14	1	3	5	12	59	4.27	
46	1	3	4	12	60	4.32	
71	1	3	4	12	60	4.32	
5	1	3	0	0	76	6.01	
7	1	2	15	29	33	3.54	
64	1	2	15	26	36	3.58	
9	1	2	14	27	36	3.59	
10	1	2	9	25	43	3.93	
T08	1	2	9	22	46	3.86	
13	1	2	9	20	48	3.92	
52	1	2	8	13	56	4.05	
49	1	2	7	16	54	4.20	
66	1	2	7	13	57	4.15	
4	1	2	6	8	63	4.31	
32	1	2	5	28	44	3.86	
33	1	2	5	10	62	4.31	
41	1	2	4	11	62	4.32	
460	1	1	11	15	52	3.92	
27	1	1	8	31	39	3.73	
34	1	1	6	19	53	4.10	
NT14	1	1	4	23	51	4.03	
77	1	1	4	12	62	4.70	
462	1	1	4	10	64	4.48	
50	1	1	4	8	66	4.39	
73	1	1	3	15	60	4.26	
44	1	1	3	13	62	4.56	
72	1	1	3	13	62	4.60	
68	1	1	3	13	62	4.55	
58	1	1	3	11	64	4.39	
T48	1	1	3	11	64	4.39	
47	1	1	3	11	64	4.40	