

Clostridium difficile асоциирана болест

Клиничен спектър, съвременни проблеми и мерки за ограничаването ѝ

Р. Вачева

Национален референтен център по ВБИ, НЦЗПБ - гр. София

Clostridium difficile (CD) е анаеробен бактерия, който е идентифициран като част от нормалната чревна флора на новородени през 1935 г. и може да бъде изолиран от фецес на здрави възрастни. Безсимптомното носителство варира при възрастни около 5% (до 20% при асимптоматични хоспитализирани пациенти) и при новородени, както и деца <1 год. - 50 до 79%^[6,26].

Широко разпространен е в почвата и чревния тракт на животните. Микроорганизмът е Грам-положителен и образува спори, които издържат 6 месеца в околната среда. Продуцира адхезини и хиалуронидаза.

През 1974 г. е установен като причинител на антибиотик-свързан псевдомембранозен колит и впоследствие като най-разпространен причинител на диария, свързана с медицинското обслужване, често предшествана от антибиотична терапия, която ерадикира нормалната чревна флора. Клиничният спектър на Clostridium difficile инфекцията (CDI) варира от умерена диария до потенциално животозастрашаващ псевдомембранозен колит, който може да прогресира до токсичен мегаколон, перфорация на колона и мултиорганни увреди. Използва се терминът Clostridium difficile-асоциирана болест (Clostridium difficile-associated Disease - CDAD)^[1,2,3]. Clostridium difficile-асоциираната болест се наблюдава предимно при възрастни пациенти (>65 г.) със съпътстващи заболявания, интубация, медикаментозна терапия или продължителен болничен престой^[1,2]. Патогенезата на тези процеси е обусловена от продукцията на токсини. Токсин-негативните щамове не причиняват заболяване. Рецидиви поради пролиферацията от спори или реинфекция има при 20% от пациентите^[16,17].

Пациентите, особено възрастните, се явяват чувствителни към инфекцията след терапия с антибиотици. Антибиотиците, най-често водещи до C. difficile инфекция, се отнасят към fluoroquinolones, серhalosporins, clindamycin и penicillins. C. difficile е в състояние "спокойно" да се намножава, отделя токсин, причинявайки потенциално животозастрашаваща диария и колит. Не всички C. difficile щамове носят гени за токсин. Заболяването невинаги е свързано с предварителна употреба на антибиотици. Налице е повишаване на случаите CDI, придобити в обществото при лица без предиспозиция. CDI се установява също така с повишена честота при различни животински видове. Предаването на C. difficile може да стане от пациент на паци-

ент, посредством контаминирани ръце на медицински персонал или пациенти, както и посредством контаминирана болнична среда.

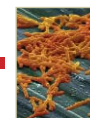
Влиянието на CDI върху модерното здравеопазване е значително. По отношение на разходите за лечение те варират от 5 000 до 15 000 евро за случай в Англия и \$1.1 млрд. годишно в САЩ. Ако общо населението на ЕС е приблизително 500 млн., то за CDI може да бъдат оценени приблизителни разходи за ЕС 3 млрд. евро годишно. Очаква се почти двукратното им нарастване в следващите четири декади^[26].

От 2003 г. се отбелязва повишаване на докладваните случаи в Канада и САЩ, с повече случаи с тежко протичане, по-висока смъртност и повече усложнения^[21]. Това се свързва с появата и разпространението на особено вирулентен щам на Clostridium difficile, принадлежащ на PCR риботип 027; токсинотип III и PFGE NAP1 тип и резистентен на флуорохинолони^[19].

Взривовите от тази инфекция са много трудни за контрол. Опитът от Канада показва, че възможностите за успех се увеличават, ако се комбинират мерките за контрол на инфекциите и оптимизирането на предписването на антибиотици^[11,16].

Този нов, високовирулентен щам C. difficile PCR риботип 027 е докладван в редица болници в много европейски страни: Белгия, Германия, Финландия, Франция, Ирландия, Люксембург, Холандия, Швейцария и Обединеното кралство (Англия, Уелс и Северна Ирландия). Доказани са също така и в Австрия, Дания, Унгария, Норвегия, Полша, Испания и Шотландия^[24,27].

Данните от европейското проучване сочат, че най-често срещан в Европа е PCR риботип 014 и 020 (в 19 страни), 001 (в 13 страни), 078 (18 страни); PCR риботип 027 е на шесто място и е открит в 6 страни^[7].



В българско проучване посредством метода PCR-риботипиране с 16S/23S праймери са характеризирани 40 щамове *C. difficile*: 25 референтни (колекция ECDC) и 15 клинични щамове. Анализът с капиларна гел електрофореза води до получаване на различен брой фрагменти за всеки отделен щам *C. difficile*. Полученият размер на фрагментите на *intergenic spacer regions* е от ~230 bp до ~690 bp и е сравним с размера на получените фрагменти при проучванията на *N. Sadeghifard, 2006* и *A. Indra, 2008*^[22,14]. Като най-често срещан PCR-риботип за страната е определен 017 (40%), следван от 002 и 014 (по 13%); 078, 046, 012 (7%). 13% от изолатите *C. difficile* са нетипирани. Трима от пациентите с инфекция, причинена от *C. difficile* риботип 017 са с летален изход^[4].

При първо за нашата страна проучване на клинични изолати *C. difficile* за доказване чрез метода EvaGreen Real time PCR на гени, детерминиращи продукцията на токсини са отиференцирани три токсигенни варианта: 46.67% (7/15) toxin A+B+; 46.67% A-B+ и 6.67% A-B-. Продукция на токсин А и В е доказана в 21.5%. Гени от типа *tcdA* са установени посредством Real-time PCR в 86.7%; делеция в *tcdA* gene е открита при 40% от щамове и те съответно са токсин А(-). В 46.7% *tcdA* генът е интактен, а щамове токсин А позитивни. Гени от типа *tcdB* са открити в 93.3% от щамове CD. Гени за бинарен токсин *cdtA* и *cdtB* са доказани в един изолат, A+B+^[10].

■ Clostridium difficile: вегетативни форми и спори

■ Вегетативни форми - метаболитно активни:

- Продуктират Токсин А и В.
- Някои антибиотици ги убиват.
- Наличието на кислород ги убива.

■ Спори - метаболитно неактивни:

- Не образуват токсин.
- Антибиотиците не им въздействат.
- Кислородът не ги убива.

Съобщаваната честота на CDAD е 0-15 случая на 100 пациенти, в епидемични периоди достига до 16-20/100. От болните, колонизирани с *Clostridium difficile* по време на хоспитализацията над 30% могат да развият диария. Заболяването може да доведе до токсичен мегаколон и екзистус. Леталитетът при класическа форма е 2-6%, докато при възрастни над 65 г. е до 25%!

■ Какво представлява Clostridium difficile инфекцията?

■ Дефиниция на случаи с Clostridium difficile-асоцирана

болест (CDAD): потвърден случай на CDAD е пациент на възраст 2 и повече години, за който могат да бъдат приложени 2 и повече от следните критерии:

- Диарийни изпражнения или токсичен мегаколон с и/или положителен резултат от лабораторно изследване за *Clostridium difficile* токсин А (TcdA) и/или токсин В (TcdB) в изпражненията.
- Също така доказване на токсин-продуциращ щам *C. difficile* в изпражненията посредством културелно или друг вид изследване.
- Псевдомембранозен колит (PMC), доказан при гастроинтестинална ендоскопия (Фиг. 4).
- Хистопатологични доказателства за *Clostridium difficile* инфекция (с или без диария) в биопсичен материал, получен посредством ендоскопия, колектомия или аутопсионен материал.

■ Роля за вирулентността имат:

➤ Ентеротоксин - токсин А.

Нарушава адхезията на клетките от мукозата към базалната мембрана, уврежда връхчетата на вилите, предизвиква химиотаксис. Образуване на цитокини, свръхсекреция на течности, хеморагична некроза. Кодира се от ген *tcdA*.

➤ Ентеротоксин - токсин В.

Цитотоксин, който предизвиква клетъчна апоптоза: деполимеризация на актина със загуба на клетъчния цитоскелет. Токсин А и В индуцират продукцията на интерлевкин 8 от моноцитите и макрофагите, с последваща тъканна инфилтрация с неутрофили. Кодира се от ген *tcdB*.

➤ Бинарен токсин.

Кодира се от ген *tcdA* (ензимен компонент) и *tcdB* (свързващ компонент). Бинарният токсин е наличен в хипервирулентния риботип 027^[1,3,8].

■ Щамове могат да бъдат:

- Токсин А и токсин В (+).
- Токсин А и токсин В (-).
- Токсин А (-) и токсин В (+).

Хипервирулентният щам 027 има ген за бинарен токсин *tcdB* и делеция в *tcdC*: липса на регулация и продукция на токсин А 16 пъти повече, а токсин В 23 пъти повече от класическия!

■ Дефиниране (Фиг. 5):

- Диарични изпражнения.
- Токсичен мегаколон.
- Позитивна проба за токсин на *Clostridium difficile*.



ФИГУРА 1



ФИГУРА 2



ФИГУРА 3



- Позитивна токсигенна култура.

Псевдомембранозен колит, доказан с гастроинтестинална ендоскопия.

Хистопатологични данни за инфекция с *Clostridium difficile* (ендоскопия, колектомия, аутопсия):

- *Рекурентна инфекция* - наличие на епизод, възникнал до 2 месеца от края на лечението на първоначалната инфекция.
- *Нозокомиална* - с начало на симптомите 48 ч. след приемане или до 1 месец след изписване.

Спорите на *Clostridium difficile* му позволяват да преживее в околната среда, извън организма. Спорите съществуват във външната среда, заобикаляща пациента: болничните легла, тоалетна, канал, тоалетна чиния, подлоги, миялно-дезинфекционна машина за подлоги, под и др. (Фиг. 1, 2, 3). Устойчиви на топлина и химични дезинфектанти, съответно са устойчиви на рутинните методи за почистване на повърхности, с изключение на 10% разтвор на белина. Тъй като персистират в болничната среда продължително време, за пациентите в ЛЗ съществуват възможности за контаминиране. Необходими са много строги мерки за контрол на инфекциите в тези случаи^[2,3,11,25] (Фиг. 6).

■ Какво трябва да предприемем, ако имаме пациент с *Clostridium difficile* инфекция? Как да поставим диагноза *Clostridium difficile* инфекция?

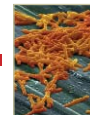
Тест за доказване на *Clostridium difficile* токсин:

- Изпращане на проба от диаричните изпражнения в лабораторията.
- Дефиниране на диария: когато се постави пробата фецес в контейнера, заема неговата форма.
- Не правете "тест за излекуване", за да проверите дали пробата за *Clostridium difficile* токсин е негативна след лечението.
- Културелно изследване в специализирана/референтна лаборатория на проба фецес.
- Хистопатологично изследване на биопсичен или аутопсионен материал.

■ Лабораторна диагностика.

Изоляцията на *C. Difficile* - чрез културелен метод.

- 0.5 g/0.5 ml фецес се обработва с 0.5 ml 99% етанол за 1 ч. на стайна температура (етанолов шок) и се инокулира на неселективана среда - Бруцела агар с 10% овнешка кръв.
- Втора проба фецес се инокулира директно (без ета-



нолов шок) на селективна среда - Бруцела агар с 10% овнешка кръв, цефокситин, циклосерин и амфотерицин Б.

Култивирането се извършва в анаеробни условия на 37°C за 2-5 дни.

Детекция на токсини във фецес чрез ензимен имуноанализ (EIA) токсините А и В на Clostridium difficile се извършва с Immuno Card Toxins A&B-EIA.

Идентификация на щамове Clostridium Difficile: оцветяване по Грам; латекс коагутинационен тест; Culturette TM CDTTM Test Kit (Becton Dickinson, USA)^[15,27].

За детекция и контрол на епидемичните взривове от CDAD се прилагат различни методи за типирание: PCR-риботипирание (PCR-ribotyping).

Използват се специфични праймери, които амплифицират спейсерните участъци (spacer regions, SRs) между 16S и 23S rRNA гените. SRs са хетерогенни, за разлика от консервативните рибозомни гени. Clostridium difficile има в генома си около 10-15 рибозомни оперона. Различия между щамове и отделните копия в един и същи геном. Дължината на получените ампликони варира между 238bp и 566bp^[4,9,10,18].

■ Превенция и контрол на инфекцията. Елементи на стандартни предпазни мерки

Изоляционни мерки при обгрижване на пациент с Clostridium difficile infection:

■ Настаняване на пациента.

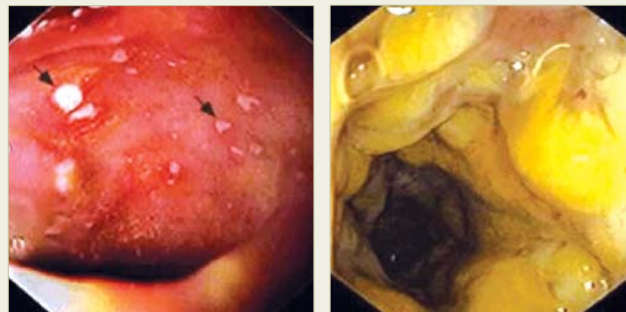
Самостоятелна стая - изолатор със собствен санитарен възел. Ако има съмнение за Clostridium difficile инфекция - не изчакайте положителен резултат от лабораторията!

Ако няма самостоятелен санитарен възел - да се използва комод (стол с гърне) за индивидуално използване от пациента. Да се постави на вратата на изолатора указание, с което се изисква от лицата, които ще влизат да докладват на дежурния персонал преди влизане.

■ Лични предпазни средства.

- Ръкавици за всички случаи на контакт с пациента или околната среда.
- Престилка за всички случаи на контакт с пациента или околната среда.
- Защита на лицето при риск от изпръскване с телесни течности (както при стандартните мерки).

ФИГУРА 4



ФИГУРА 5

Какво представлява Clostridium difficile инфекцията?

- *C. difficile* продуцира токсини, които предизвикват възпаление в чревния тракт:

Диария

Коремна болка
Повръщане
Псевдомембранозен
колит
Дехидратация

Диапазон от
симптоми,
вариращи при
различните
пациенти

ФИГУРА 6

Верига на инфекцията





■ Хигиена на ръцете.

- Да не се използва алкохолен гел за ръце. Не е ефективен срещу спорите.
- Стриктна хигиена на ръцете преди и след всеки контакт с пациента и обкръжаващата го среда.
- Измиване на ръцете със сапун и вода след отстраняване на ръкавиците.
- Течащата вода отмива спорите от ръцете.
- Последваща дезинфекция с алкохолсъдържащ дезинфектант.

Средствата за обгрижване на пациента (термометри, сфигмоманометри, стетоскопи, глюкометър и др.) индивидуално да се използват за пациента. Доколкото е възможно да се използват средства за еднократна употреба. Документацията на пациента/ЛИЗ да не се внася в стаята му. В стаята да се внася само най-необходимото оборудване и средства. Не се запасявайте, тъй като неизползваните запаси ще трябва да се изхвърлят.

Почистване и дезинфекция на оборудването: почиствайте и дезинфектирайте преди друг пациент или според правилата на производителя. Подлоги - да се използва миляно-дезинфекционна машина за подлоги. Да се използва машината за деконтаминация на подлогите. Поставете подлогата и съдържимото директно в машината. Подлогата трябва да изглежда видимо чиста след изваждане от машината. Машината да отговаря на определен стандарт и регулярен сервиз^[3,11,12 27].

■ Околната среда на пациента.

Ежедневно: пълно почистване на околната среда и средствата за обгрижване на пациента с неутрален детергент и дезинфекция със спороциден дезинфектант. Да се обработват със специално внимание често докосваните места и оборудване в непосредствена близост за пациента.

Ако трансферът в друго ЛЗ е спешен: да се информира персоналят, свързан с транспортирането (напр. портиер, персоналят на спешното отделение) и приемащото отделение/болница за необходимостта от изолационни мерки. Да се свалят контаминирани престилки, ръкавици, да се изхвърлят и да се извърши процедурата по хигиена на ръцете, преди транспортиране на пациента. Поставете престилка и ръкавици преди осъществяване на процедурата по трансфера. Средствата, използвани при транспортирането (като носилка, легло, инвалидна количка), трябва да бъдат почистени и дезинфектирани незабавно след използването им, преди използване за друг пациент.

■ Ако трансферът не е спешен.

Приемащото лечебно заведение трябва да приеме па-

циента, лекуван за Clostridium difficile, само ако той не е имал диария поне 48 часа и има оформени или нормални за самия него изпражнения.

■ Колко дълго да продължат изолационните мерки?

Когато пациентът не е имал диария в последните 48 часа и има оформени или нормални за самия пациент изпражнения, изолационните мерки могат да бъдат прекратени. Стандартните предпазни мерки, обаче трябва да продължат.

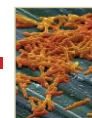
Взривовите от Clostridium difficile са много трудни за овладяване, но не и невъзможни за контрол. *Vonberg R-P et al., 2008* от името на Европейска работна група по контрол на инфекциите от *C. difficile* и European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) изработват ръководство по превенция и контрол на CDI и Clostridium difficile взривовите^[25]. Предлагат се следните препоръки за ограничаване на разпространението на Clostridium difficile:

- Ранна диагноза на CDI.
- Надзор на случаите CDI.
- Обучение на медицинския персонал, персонала по почистването, а също така пациенти и посетители.
- Прилагане на изолационни мерки.
- Хигиена на ръцете.
- Средства за индивидуална защита, защитно облекло.
- Почистване на болничната среда и медицинското оборудване.
- Отговорна употреба на антибиотичите.
- Специфични мерки по време на взривовите.

■ Лечение

Първата и най-важна стъпка е прекратяване приема на антибиотик, когато това е възможно. При по-леките случаи на умерена диария, това може да се окаже достатъчно за отзвучаване на симптомите. Но в много случаи пациентите се нуждаят от допълнително лечение. В по-тежките случаи се предприема лечение с други антибиотици: метронидазол или ванкомицин за 10 дни. Предпочита се метронидазол с оглед намаляване риска от развитие на резистентност към ванкомицин сред другите микроорганизми в ЛЗ. Рекурентна симптоматика се среща сред 7-20% от пациентите, като се дължи на релапс или реинфекция. Около 90% от първите епизоди на рекурентна инфекция се лекуват успешно, по същия модел, както първичната инфекция.

Хирургична интервенция се налага при пациенти със силна болка, органични увреждания и възпаление на обвивката на коремната стена, както и при необходимост от отстраняване на засегнатия участък от колона.



При упорити рекурентни инфекции (а това са около една четвърт от пациентите със CID) не се постига освобождаване от патогена, тъй като те се реинфектират с друг щам. В тези случаи възможностите са следните: няколко курса антибиотична терапия или един антибиотик, даван веднъж на два дни; пробиотик от типа *S. Boulardii*; "Stool transplant" - трансплантация на фецес от донор за възстановяване на нормалната чревна флора посредством колоноскопия или назогастрална сонда. Последният метод рядко се прилага, но има публикации със сериозни данни за позитивен ефект^[12,13,25,27]. ■

КНИГОПИС:

1. Боянова Л., Марина М., Кантарджиев Т., Митов И. Диагноза и терапия на *Clostridium difficile* - асоциираната болест. Съвр. мед. 2008; 59, 3, 71-80.
2. Боянова Л., Марина М., Кантарджиев Т., Митов И. *Clostridium difficile*-асоциираната болест - нарастваща тревога след появата на хипервирулентния щам. Съвр. мед. 2008; 59, 4, 70-78.
3. Вачева-Добревска, Р. Подходи за превенция и контрола на инфекцията при пациенти с *Clostridium difficile*-асоциирана болест. Нозоком. Инф., 2009, т.6, 1-2, 11-16.
4. Вачева-Добревска, Р., Е. Добрева, И. Иванов, К. Иванова, М. Марина, П. Петров, Т. Кантарджиев, Е. Кайпър. Подходи за характеризиране на изолати *Clostridium difficile* посредством PCR-риботипиране. Военна медицина, 2010, 3,13-18.
5. Alfa, M. J., *Clostridium difficile*: The Sinister Spore Saga!! St. Boniface Hospital, Winnipeg, Webber training, Dec.16, 2010.
6. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5:549-57.
7. Bauer et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 2011;377:63-73).
8. Barbut F, Mastrantonio P, Delmeete al. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1048-57.
9. Bidet, P., F. Barbaut, V. Lalande et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J. of Clin. Microb.*, 2000, 38, 2484-2487.
10. Dobрева E., I. Ivanov, R. Vatcheva-Dobrevska, K. Ivanova, M. Marina, T. Kantardjiev, E. Kuijper. Molecular characteriation of *Clostridium difficile* clinical strains from Bulgarian hospitals. *CMI*, vol. 17, issue supplement s4,497, P 1718.
11. Gravel, D., M. Gardam, G.Taylor et al. Infection control practices related to *Clostridium difficile* infection in acute care hospitals in Canada. *Am J Infect Contr*. 2009 Feb; 37(1):9-14.
12. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE: Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 34:516-22.
13. Hundal R. et al. Fecal transplantation for recurrent or refractory *Clostridium difficile* diarrhea.,*Editorial Group: Cochrane Inflammatory Bowel Disease and Functional Bowel Disorders Group Published Online: 7 SEP 2011.
14. Indra, A., S. Huhulescu, M. Schneeweis et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J. of Med. Microb.*, 2008, 57, 1377-1382.
15. Ivanova, K, P. Petrov, G. Aseva, E. Dobрева, I. Ivanov, R. Vatcheva-Dobrevska, M. Marina, V. Tolchkov, T. Kantardjiev, D. W. Notermans and E. J. Kuijper. First cases of severe hospital-acquired *Clostridium difficile* infections in Sofia, Bulgaria. *Problems of infectious and parasitic diseases*. 2010, 38, 1, 22-24.
16. Kuijper EJ, Coignard B, Till P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12 Suppl 6:2-18.
17. Kuipers, E., Surawicz, C. *Clostridium difficile* infection. *Lancet*. 2008; 371:1486-8.
18. Kuijper, E., R. J. van den Berg and S. Brasier. Comparison of Molecular Typing Methods Applied to *Clostridium difficile*. *Springer Protocols, Molecular Epidemiology of Microorganisms, Methods in Molecular Biology*, 2009, 551, 159-171.
19. Marsden, G., I. Davis, V. Wright et al. Array comparative hybridization reveals a high degree of similarity between UK and Europa clinical isolates of hypervirulent *C. difficile*., *BNC Genomics*, 2010, 11:389.
20. Metcalf DS et al., *C. difficile* in vegetables; Canada. *Lett Appl. Microbiol*. 2010;51:600-2.
21. Pipin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 2004;171:466-72.
22. Sedeghifard, N., V. Gurtler, M. Beer&J. Seviour. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variations in *Clostridium difficile* strains. *Appl. Environ. Microb.*, 2006, 72, 7311-7323.
23. Songer U. Clostridia as agents of zoonotic disease *Vet Microbiol* 2010;140:399-404.
24. Suetens C. *Clostridium difficile*: summary of actions in the European Union. *Euro Surveill*. 2008;13(31):pii=18944.
25. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Till P, Gastmeier P, et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 5:2-20.
26. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S, Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *J Hosp Infect*. 2008 Jul 2. [Epub ahead of print].
27. Update of *Clostridium difficile* due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Eurosurveill.* , Vol. 13, Issue 31, 31 July 2008.