



АјДи Дизајн 2012/ДООЕЛ Скопје
 Македонско медицинско електронско списание
 Волумен 2015; Статија ИД 50009, 8 страници
<http://dx.doi.org/10.3889/mmej.2015.50009>
 eISSN: 1857-9809
Ревиски труд

Соеви на *Clostridium difficile* асоцирани со нозокомијални инфекции – лабораториска дијагноза, преваленца, осетливост и молекуларна карактеризација на изолатите

Кирил Михајлов^{*}, Елена Трајковска Докиќ

Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Република Македонија

Извадок

Цитирање: Михајлов К, Трајковска Докиќ Е. Соеви на *Clostridium difficile* асоцирани со нозокомијални инфекции – лабораториска дијагноза, преваленца, осетливост и молекуларна карактеризација на изолатите. Макед Мед Електр С. 2015 Јул 15; 2015; 50009. <http://dx.doi.org/10.3889/mmej.2015.50009>

Клучни зборови: *Clostridium difficile*; нозокомијални инфекции.

***Кореспонденција:** Д-р Кирил Михајлов. Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Република Македонија. E-mail: ki_mi_81@yahoo.com

Примено: 08-Феб-2015; **Ревидирано** 12-Фев-2015; **Прифатено:** 19-Мар-2015; **Објавено:** 15-Јул-2015

Печатарски права: © 2015 Кирил Михајлов, Елена Трајковска Докиќ. Оваа статија е со отворен пристап дистрибуирана под условите на Нелокализирана лиценца (CC BY 3.0), која овозможува неограничена употреба, дистрибуција и репродукција на било кој медиум, доколку се цитираат оригинално(ите) автор(и) и изворот.

Конкурентски интереси: Авторите изјавуваат дека немаат конкурентски интереси.

Иако во минатото не и се придаваше големо значење на оваа бактерија, денес *Clostridium difficile* е еден од најзначајните агенси кои се поврзуваат со инфекции стекнати во болничката средина. Главната причина за ова е големата отпорност на *Clostridium difficile* како кон антибиотици, така и кон други надворешни влијанија како резултат на способноста за спорулација и секако способноста за лачење на токсини. Во Република Македонија нема податоци за преваленцата на инфекциите со оваа бактерија, ниту е одредена осетливоста и молекуларната карактеризација на изолираните соеви.

Анализирајќи 65 рецензирани трудови од оваа проблематика, најдени со пребарување низ базата на податоци од „Пабмед централ“ добиваме интересни сознанија за изолираните соеви на *Clostridium difficile* низ светот, најчесто од хоспитализирани пациенти со антибиотик асоцирана дијапеа.

Во однос на дијагнозата се препорачува триделниот алгоритам (директен скрининг на глутамат дехидрогеназа-ГДХ, плус фекална детекција на токсините А и В и токсикогена култура) како мошне ефикасен начин за детекција на овие инфекции. Со него би се опфатиле многу случаи кои би биле пропуштени со другите алгоритми. Можноста од детекција на повеќе случаи го намалува бројот на случаи по пат на трансмисија во болниците, а со тоа и вкупните трошоци како резултат на пролонгирана хоспитализација.

Стандардна терапија за инфекции со *C. difficile* е орално метронидазол или ванкомицин. Пациентите со тешки и рефракторни инфекции со *C. difficile* успешно се третираат интравенски со тигециклин. Тигециклин има најниски вредности за МИК90 за *C. difficile*, а понатаму следат даптомицин, метронидазол и ванкомицин (1 µg/ml). Клиндамициноот покажал највисоки МИК вредности од сите тестирани антимицробни агенси. Употребата на клиндамицин е поврзана со висок ризик за индуцирање на инфекција со *C. difficile*.

Во поголемиот број студии, сите соеви биле осетливи на метронидазол, ванкомицин, даптомици и тигециклин, а единствено соевите од риботипот 018 биле осетливи на на моксифлоксацин. Риботипот 018 е најчестиот риботип и сите изолати од овој риботип покажале резистенција на флуорокинолони, што укажува на тоа дека зголемената употреба на овие антибиотици одиграла главна улога во нивната селекција и ширење.

Епидемии на инфекции со *C. difficile*, посебно со токсикогни соеви како риботипот NAP1/027, многу често се пријавувани во Европа, САД и Канада.

***Clostridium difficile* Strains Associated with Nosocomial Infections - Laboratory Diagnosis, Prevalence, Susceptibility and Molecular Characterization of the Isolates**

Kiril Mihajlov^{*}, Elena Trajkovska Dokic

Institute of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Ss Cyril and Methodius University of Skopje, Skopje, Republic of Macedonia

Citation: Mihajlov K, Trajkovska Dokic E. [*Clostridium difficile* Strains Associated with Nosocomial Infections - Laboratory Diagnosis, Prevalence, Susceptibility and Molecular Characterization of the Isolates]. Maced Med Electr J. 2015 Jul 11; 2015;50009. [Macedonian] <http://dx.doi.org/10.3889/mmej.2015.50009>

Key words: *Clostridium difficile*; nosocomial infection.

***Correspondence:** Dr. Kiril Mihajlov. Institute of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Ss Cyril and Methodius University of Skopje, Skopje, Republic of Macedonia. E-mail: ki_mi_81@yahoo.com

Received: 08-Feb-2015; **Revised:** 12-Feb-2015; **Accepted:** 19-Mar-2015; **Published:** 15-Jul-2015

Copyright: © 2015 Kiril Mihajlov, Elena Trajkovska Dokic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Although there was not much attention about the role of this bacterium in the past, *Clostridium difficile* is one of the most important agents associated with nosocomial infections today. The main reason for this is its resistance against many antibiotics and environmental conditions as a result to its ability to form spores and to produce toxins.

There are no data for the prevalence of the infections with *Clostridium difficile* in the Republic of Macedonia. Also, the resistance and the molecular characterization of the isolated strains haven't been explored.

Using the "Pubmed Central" database, we have analyzed 65 peer reviewed articles concerning this topic and we have collected interesting information about *Clostridium difficile* strains that had been isolated from hospitalized patients from all over the world, suffering mostly from antibiotic associated diarrhea.

In terms of diagnosis, the tree-step algorithm has been recommended (direct screening of glutamate dehydrogenase- GDH, plus fecal detection of toxins A and B and toxigenic culture) as an effective way for the detection of this infection. That way, we would be able to detect many cases that would have been missed if using the other algorithms. As a result of this, direct transmission of *C.difficile* in the hospitals can be prevented and costs of prolonged hospitalization can be reduced.

Oral metronidazole or vancomycin is the standard therapy for *C. difficile* infection.

Patients with severe and refractory *C. difficile* infections have been treated successfully with intravenous tigecycline. Tigecycline had the lowest MIC₉₀ values for *C. difficile* and was followed by daptomycin, metronidazole, and vancomycin (1 µg/ml). Clindamycin showed the highest MICs of all antimicrobial agents tested. The use of clindamycin is associated with a high risk of inducing *C. difficile* infection.

In most of the studies, all of the strains have been susceptible to metronidazole, vancomycin, daptomycin and tigecycline whereas only strains belonging to ribotype 018 have been resistant to moxifloxacin. Ribotype 018 is the most frequent ribotype and all the isolates of this ribotype proved resistant to fluoroquinolones, suggesting that the increased use of this antibiotics has played a determinant role in selection and spread of this strains.

Outbreaks of *C. difficile* infections, particularly toxigenic strains such as ribotype NAP1/027, were often reported in the Europe, United States and Canada.

Вовед

Clostridium difficile е грам позитивна, спорогена, анаеробна бактерија, за првпат опишана во 30те години од минатиот век, кога била наречена *Bacillus difficilis* поради тешкотиите при култивирањето *in vitro*. *B. difficilis* најпрво се сметала како дел од нормалната интестинална флора на новороденчињата [1]. Сепак, во 1978 група научници ја поврзале оваа бактерија (тогаш веќе позната под сегашното име) со псевдомембранозен колитис [2]. Претходно, антибиотик асоцираниот колитис се сметало дека е предизвикан од *Staphylococcus aureus* [3, 4]. Од тогаш инфекцијата со *C. difficile* еволуира до ниво на една од најбрзорастечките и најзастрашувачки нозокомијални патогени низ целиот свет [5].

Clostridium difficile често го колонизира дебелото црево кај човекот кога нормалната цревна флора е нарушена од антибиотска терапија. Резултатот од колонизацијата може да биде асимптоматски, или може да доведе до болест и тоа од лесна дијареа, па се до псевдомембранозен колитис [6]. *Clostridium difficile* е битен нозокомијален патоген, одговорен за околу 20% од случаите на антибиотик асоцираната дијареа во развиените земји и е растечки проблем во земјите во развој [6, 7]. Инфекцијата најчесто се јавува кај постари хоспитализирани пациенти и скоро секогаш е асоцирана со давање на антибиотици [8]. Од друга страна оваа бактерија е одговорна за над 95 % од случаите на псевдомембранозен колит [9].

Голема епидемија со хипервирулентен сој на *Clostridium difficile* B1/NAP-1/027, се случила во Канада во 2003 [10] Инциденцата на инфекциите со *C. difficile* се зголемува во целиот свет по таа епидемија, а при тоа има и зголемување на морталитетот и тежината на клиничката слика. Патогеноста на *C. difficile* е поврзана со најмалку два егзотоксина А и В, и двата ја оштетуваат цревната мукоза кај луѓето. Токсините се транскрибирани од *tcdA* (А) и *tcdB* (В). Епидемијата во Канада беше поврзана со зголемена продукција на овие два токсина во сојот на *C. difficile* кој беше изолиран.

Претходно, истражувачите пријавувале дека околу две третини од пациентите колонизирани со *C. difficile*, ќе имаат перзистентна колонизација [11-12]. Било пресметано дека преваленцата на колонизација со *C. difficile* е 4.4–14% во време на прием при акутни состојби, а 4.6–20.4% во одделите за хронични заболувања [13-20]. Податоци за колонизација на пациентите во Македонија со *C. difficile* нема. Во други студии, 15% од пациентите без иницијална колонизација, добиле *C. difficile* за време на престојот [17]. Сепак, инциденцата на асимптоматско носителство на *C. difficile* кај

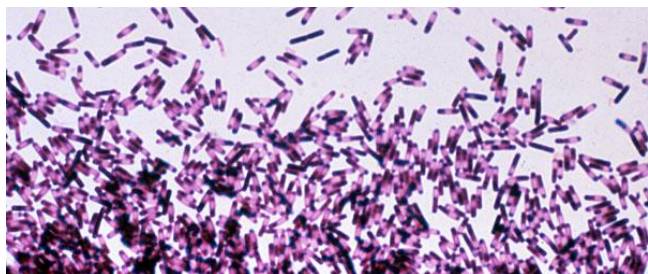
пациентите во одделенијата за долготрајна нега било до 51% [21]. Врската помеѓу претходната фекална колонизација со *C. difficile* и *C. difficile* асоцираната дијареа останува непозната. Има студии кои покажуваат дека колонизацијата со оваа бактерија е независен ризик фактор за *C. difficile* асоцираната дијареа [22], но во други студии, асимптоматската колонизација била асоцирана со мален ризик за добивање на истата болест [23]. Овие изолати на *C. difficile* од фецес, кои биле одговорни за колонизацијата не биле јасно идентификувани како токсикогени или нетоксикогени во студиите. Поради тоа, врската меѓу колонизацијата со токсикоген сој на *C. difficile* и последичната *C. difficile* асоцираната дијареа останува нејасна.

За да се намали преваленцата на *Clostridium difficile* и последиците од инфекцијата со истата, потребно е да се изведе брза и навремена дијагноза, да се следат добрите хигиенски протоколи, секојдневно да се дезинфицира околината и да се намали давањето антибиотици. Има многу пристапи кои би можеле да се искористат во лабораториската дијагноза на *Clostridium difficile* асоцираната дијагноза. Употребата на брзи имуноензимски тестови кои се изведуваат директно на примероците од фецес покажале слаба сензитивност [24].

Подоцна бил воведен скрининг на глутамат дехидрогеназата на *Clostridium difficile* како дел од дводелниот или триделниот алгоритам [25-26]. ГДХ скринингот се карактеризира со високо ниво на сензитивност (конститутивен ензим на *Clostridium difficile*) и ниско ниво на специфичност [27]. Поради тоа ГДХ позитивниот резултат мора да биде потврден со други тестови како на пример имуноензимски. Сепак, некои автори докажале слаба сензитивност на различни имуноензимски тестови како тест за потврда и неодамна е покажано дека сензитивноста на ГДХ скринингот во дводелниот алгоритам варира во зависност од тоа кои риботипови се вклучени во инфекцијата [28]. Најниска сензитивност на ГДХ е забележана кај риботиповите 002, 027 и 106 [29].

Неодамна, биле развиени нови молекуларни методи директно од фецес, за детекција на гените кои го кодираат токсинот В на *Clostridium difficile* или токсин регулаторните гени. Овие процедури покажале добра сензитивност и може да се користат како дел од дво или триделниот алгоритам за потврдување на ГДХ позитивните примероци [30-31]. Според тоа, со цел поставување точна дијагноза на инфекција со *Clostridium difficile*, потребно е да се користи комбинација на тестови.

Real-time PCR за детекција на токсинВ генот на *C. difficile* (*tcdB*) има висока сензитивност и специфичност при детекција на присуството на токсикогените изолати на *C. difficile* [32-33].



Слика 1: Микроскопски препарат од култура на *Clostridium difficile* обоен по Грам

Некои антибиотици резистентни соеви на *C. difficile* имаат поголеми можности за трансмисија и повисока вирулентност [34-35]. Клиндамицин и флуорокинолон резистентните изолати на *C. difficile* се најчесто асоцирани со големите епидемии [35]. Доминантниот сој BI/NAP1/027 на *C. difficile* кој е резистентен на флуорокинолони е поврзан со највисока стапка на морбидитет и морталитет [34]. Вирулентните соеви на *C. difficile* го носат локусот на патогеност (PaLoc), кој ги содржи гените за токсините. Како што спомнавме двата токсина се ентеротоксинот (TcdA) и цитотоксинот (TcdB), кодирани последователно од *tcdA* и *tcdB*. Генот *tcdC* е неативен регулатор на овие два токсина. Иако Warny et al. покажале дека делецијата на *tcdC* генот е поврзана со зголемена продукција на токсините А и В [36], наредните студии не можеле да ги поткрепат овие наоди [37-38], Улогата на бинарниот токсин кодиран од *cdtA* и *cdtB* останува нејасна [37-38].

Трите карактеристики на епидемскиот сој BI/NAP1/027 биле присуство на резистенција на флуорокинолони, бинарен токсин и зголемена продукција на токсините А и В, како и делеција на *tcdC* генот [34]. BI/NAP1/027 соевите покажуваат висока резистенција на гатифлоксацин и моксифлоксацин [39].

Дискусија

Во една студија во Канада, 4.4% од хоспитализираните пациенти е најдено дека имаат асимптоматска колонизација со *C. difficile* за време на приемот [13]. Во друга студија, 15% од пациентите без колонизација, го стекнале *C. difficile* за време на престојот во болница [17]. Преваленцата на колонизација со *C. difficile* може да биде и до 20.4% во оделенијата за хронична геријатриска нега [34] и до 51% кај оние што се тука на долготраен престој [40-41]. Најголем дел од овие студии се изведени во епидемски услови или високоризични популации. Епидемии на инфекции со *C. difficile*, посебно со токсикогни соеви како риботипот NAP1/027, се пријавувани во Европа, САД и Канада.

Во некои студии колонизацијата со *C. difficile* е независен ризик фактор за инфекција со оваа бактерија [22]. Сепак, во една друга студија има контрадикторен заклучок, кој покажал дека асимптоматската колонизација со *C. difficile* е асоцирана со намален ризик од последователна *C. difficile* асоцирана дијареа [23]. Студијата била изведена во 1998, и стапката на колонизација со *C. difficile* била одредувана со анаеробна култура. За Real-time PCR е покажано дека има висока сензитивност за детекција на изолатите на *C. difficile* со *tcdB* [32-33]. Анаеробните култури од фецес имаат пониска сензитивност за детекција на оваа бактерија, независно дали се работи за токсикогени или нетоксикогени изолати, од real-time PCR.

Табела 1: Антимикробна осетливост на 113 изолати [54] на *Clostridium difficile* кон 16 антимикробни агенси **

Антибиотик	МИК (µg/ml)			Бр. (%) на изолати			Гранични точки* за интерпретација на МИК (S/N/R)
	Опсег	50%	90%	S	I	R	
Пеницилин	0.12-16	2	4	1 (1)	18 (16)	94 (83)	≤8/1/≥2
Ампицилин-сулбактам	0.25-8	2	4	113 (100)	0 (0)	0 (0)	≤8/16/≥32
Цефметазол	0.06-128	16	64	61 (54)	39 (35)	13 (12)	≤16/32/≥64
Ертапенем	0.03-32	8	16	15 (13)	71 (63)	27 (24)	≤4/8/≥16
Импипенем	2-32	8	16	18 (16)	51 (45)	44 (39)	≤4/8/≥16
Меропенем	0.03-8	2	4	104 (92)	9 (8)	0 (0)	≤4/8/≥16
Дорипенем	0.25-8	4	4	NA	NA	NA	НП
Клиндамицин	0.06->256	4	>256	37 (33)	24 (21)	52 (46)	≤2/4/≥8
Ванкомицин	0.25-4	0.5	1	NA	NA	NA	НП
Метронидазол	0.03-4	0.5	1	113 (100)	0 (0)	0 (0)	≤8/16/≥32
Фузидинска к-на	0.5-32	1	2	NA	NA	NA	НП
Даптомидин	0.12-2	0.5	1	NA	NA	NA	НП
Моксифлоксацин	0.06-16	1	16	94 (83)	1 (1)	18 (16)	≤2/4/≥8
Гемифлоксацин	0.25->32	2	32	NA	NA	NA	НП
Немоноксацин	0.25-16	0.5	4	NA	NA	NA	НП
Тигециклин	0.03-0.25	0.06	0.06	NA	NA	NA	НП

*Граничните вредности за МИК се препорачани од Институтот за клинички и лабораториски стандарди (CLSI); **НП, за интерпретацијата на граничните вредности за МИК нема податок од CLSI; S, осетлив; I, интермедиерно осетлив; R, резистентен.

Појавувањето на дијареа асоцирана со *C. difficile* е поврзана со пролонгирана хоспитализација [22, 42, 43]. Во хроничните геријатриски одделенија, хоспитализацијата била подолга кај пациентите колонизирани со *C. difficile* потврден со култура, отколку кај неколонизираните (21.6 наспрема 11.7 денови, соодветно) [40]. Овие соеви сепак не биле евалуирани за продукција на токсин. Денес многу малку се знае за релативното влијание на должината на хоспитализација на последичната колонизација со токсикогени соеви на *C. difficile*. Исто така загрижува и зголемената стапка на морталитет поврзана со *C. difficile* асоцираната дијареа [44].

Воведувањето на триделниот алгоритам (директен скрининг на ГДХ плус фекална детекција

на токсините А и В, и токсикогена култура) донесе големо подобрување во дијагнозата на инфекциите со оваа бактерија [45]. Сензитивноста и специфичноста, позитивните и негативните прогностички вредности на тестовите за токсините А и В, беа последователно 78%, 99.1%, 91.7% и 97.1% [46]. Ако токсикогената култура се додаде на дводелниот алгоритам за дијагноза, можно е да се препознаат исто така и симптоматските пациенти со негативен имуноензимски тест од фецес за токсините А и В. Друг научник [47] објавил дека кога фецес негативен за токсините А и В се тестира и со токсикогена култура, има зголемување од 3.4% во стапката на детекција. Резултатот покажал дека токсикогената култура овозможува да се откријат 38/156 (24.4%) примероци од фецес со токсикоген *C. difficile*, кои би биле пропуштени доколку би се изведувал само имуноензимски скрининг, а сето тоа довело до зголемена преваленца на инфекција со *C. difficile* од 4.2%.

Лажно негативниот резултат од детекцијата на токсинот од фецес може да биде резултат на нееднаква дистрибуција на бактериите во примерокот и поради тоа количеството на токсини се менува во различните делови од фецесот.

Ова има импликации не само во однос на погрешната дијагноза, туку и во однос на контаминација на околината [48]. За подобрување на дијагностиката и превенција на епидемии подобро е систематско изведување на токсикогена култура. Искуствата ја потврдуваат исправноста на триделниот алгоритам, без разлика што процедурата за токсикогена култура треба допрва да се стандардизира. За жал, културата не се препорачува во некои упатства, најверојатно поради цената и техничките проблеми. Нозокомијалните инфекции со *C. difficile* доведуваат до пролонгиран болнички престој, а со тоа и повисоки општи трошоци. Триделниот алгоритам е мошне ефикасен начин за детекција на овие инфекции и би опфатил многу случаи кои би биле пропуштени со другите алгоритми. Можноста од детекција на повеќе случаи го намалува бројот на случаи по пат на трансмисија во болниците, а со тоа и вкупните трошоци како резултат на пролонгирана хоспитализација.

Културата е единствен начин за испитување на антимикробна осетливост и молекуларна типизација. И двете овие работи се од голем интерес во клиничкиот менаџмент на индивидуалните случаи и болничките епидемии. Типизирањето овозможува клонално следење на соевите и идентификација на посебни вирулентни групи [49], додека тестирањето на антимикробната осетливост може да стане задолжително во иднина како резултат на појавувањето на соеви со намалена осетливост кон ванкомицин или метронидазол. Иако за моксифлоксацинот е

пријавено дека има добро дејство кон Грам позитивните бацили вклучувајќи го *C. difficile*, намалената осетливост кон овој антибиотик е веројатно причината за ширење на одредени соеви на *C. difficile* во болничката средина, каде што флуорокинолоните многу често се употребуваат [50].

Во поголемиот број студии, сите соеви биле осетливи на метронидазол, ванкомицин, даптомици и тигециклин, а единствено соевите од риботипот 018 биле осетливи на моксифлоксацин [51]. Риботипот 018 е најчестиот риботип (90.1%), и сите изолати од овој риботип покажале резистенција на флуорокинолони, што укажува на тоа дека зголемената употреба на овие антибиотици одиграла главна улога во нивната селекција и ширење [52].

Некои PCR риботипови, како 027 или 078 имаат гени за бинарниот токсин. Овие два риботипа имаат *tcdA* и *tcdB* гени за бинарниот токсин, како и мутација на *tcdC* генот. Местата на мутација се разликуваат. Типот 027 има делеција од 18 базни парови и делеција на позиција 117 во *tcdC* генот. Типот 078 има делеција од 39 базни парови и точкеста мутација на 184 позиција. Неодамна, изолацијата на овие риботипови при епидемии покажала дека се резистентни на флуорокинолони [53]. Освен два изолата со делеција во *tcdC* генот, никој од изолатите во друга студија [54] не покажал резистенција на флуорокинолони. Само два изолата со делеција на 39 бп имале субституции на аминокиселините во GyrA и GyrB. Резултатите за МИК за кинолони на овие два изолата биле различни за гемифлоксацин (32 µg/ml наспрема >32 µg/ml) и моксифлоксацин (8 µg/ml наспрема 16 µg/ml), но идентични за немоноксацин (4 µg/ml).

Флуорокинолон резистентните *C. difficile* соеви имаат супституции на аминокиселините во GyrA и GyrB. Резистенцијата кон моксифлоксацин е најчеста од тие кај кинолоните во некои студии [54], а повеќето од тие изолати имаат супституција на Thr82 со Ile во GyrA (88%). Сепак, ниеден од овие изолати нема 18-бр делеција на *tcdC*. Помеѓу изолатите со резистенција кон кинолони, гемифлоксацинот покажал највисок МИК (72% изолати со МИК ≥32 µg/ml), а на второ место бил моксифлоксацинот. Промена на Asp426 со Val во GyrB претходно било пријавено во епидемија со токсин А негативен/токсин В позитивен сој на *C. difficile* [55].

Во другата студија [54], изолатите на *C. difficile* исто така покажале помала осетливост на кинолони, но нивните токсикоцени карактеристики се разликувале од тие на риботипот 027. Само два изолата имале бинарен токсин и делеција на гени во *tcdC*, но ниту еден некал делелеција на 18-бр. МИК на немоноксацин кон *C. difficile* биле пониски отколку тие на гемифлоксацин и моксифлоксацин

[54]. Можно објаснување за овој наод е дека за немоноксацинот се потребни мутации на три бактериски гени, *gyrA*, *gyrB* и *parC*, за разлика од двете потребни за флуорокинолоните [56]. Дали овие пониски МИК вредности за немоноксацин може да се применат како потенцијални терапевтски или превентивни бенефити на овој лек во справување со инфекциите со *C. difficile*, останува да се утврди.

Изолатите на *C. difficile* се универзално осетливи на метронидазол и ампицилин-сулбактам. Треба да се обрати внимание и на дистрибуцијата на антибиотикот во цревата. Метронидазолот е уште најкористен лек за овие инфекции, но има ниски концентрации во цревата дури и во присуство на дијареа [57]. Клиндамицинот покажа највисоки МИК вредности од сите тестирани антимикробни агенси. Употребата на клиндамицин е поврзана со висок ризик за индуцирање на инфекција со *C. difficile* [58]. Во една претходна студија, даптомицин покажал повисоки МИК вредности од метронидазол и ванкомицин [59]. Меропенем и дорипенем покажале релативно ниски МИК вредности, што укажува на низок ризик од развој на *C. difficile* инфекции при употреба на карбапенем. Други научници [60] објавиле дека меропенем и дорипенем имале ниски МИК₉₀ вредности (2 µg/ml), но не ги споредиле со тие на другите карбапенем.

Стандардна терапија за инфекции со *C. difficile* е орално метронидазол или ванкомицин. Стандардната терапија е помалку ефикасна кај хипервирулентните соеви [61]. Можни причини за ова би биле намалена осетливост кон стандардните антибиотици и хиперпродукција на токсини [61]. Сеуште нема предложено ефективни агенси за случаите каде што има неуспех со терапијата. Пациентите со тешки и рефракторни инфекции со *C. difficile* успешно се третираат интравенски со тигециклин [62]. Тигециклин има најниски вредности за МИК₉₀ за *C. difficile*, а понатаму следат даптомицин, метронидазол и ванкомицин (1 µg/ml). Фекалните концентрации на тигециклин во формирана столица се релативно високи [63]. Претходно објавените МИК₉₀ вредности на тигециклин кон *C. difficile* биле исто така ниски, движејќи се од 0.06 до 0.25 µg/ml [62].

Типизирањето со гер-PCR се смета дека е во добра корелација со PCR риботипизирањето за хипервирулентните соеви на *C. difficile* [64, 65]. Овие научници покажале дека сите изолати кои припаѓаат на PCR риботиповите 027 и 001 се групираат во посебни гер-PCR групи, што укажува дека со овој метод може да се откријат соевите од хипервирулентниот риботип VI/NAP1/027 [65]. Сите изолати кои припаѓаат на главните гер-PCR типови (А и С) не припаѓаат на хипервирулентниот риботип VI/NAP1/027 добиен со PCR риботипизација. Понатаму, гер-PCR типизацијата

како метод е едноставна за изведување, бара помалку време отколку PCR риботипизирањето или PFGE типизирањето и може да биде веродостојна опција од прв избор за молекуларна типизација во клиничките микробиолошки лаборатории [65].

Литература

- Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants. *Am J Dis Child.* 1935;49:390.
- Bartlett JG, Chang TW, Moon N, Onderdonk AB. Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing Clostridia. *Am J Vet Res.* 1978;39:1525–1530.
- Oeding P, Austarheim K. The occurrence of staphylococci in the intestinal content after treatment with antibiotics; a bacteriological and anatomical study of routine autopsy material. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1954;35:473–483
- Prohaska JV. Pseudomembranous enterocolitis; the experimental induction of the disease with *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin. *AMA Arch Surg.* 1959;79:197–206.
- Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Increase in adult Clostridium difficile-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000–2005. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:929–931.
- Surawicz CM. *Clostridium difficile* disease: diagnosis and treatment. *Gastroenterologist.* 1998; 6:60-5.
- Samore MH. Epidemiology of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhoea. *Journal of hospital infection.* 1999; 43:183-90.
- Zadik PM, Moore AP. Antimicrobial associations of an outbreak of diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *Journal of hospital infection.* 1998; 39:189-93.
- Barbut F, Lalande V, Daprey G, Cohen P, Marle N, Burghoffer B, Petit JC. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of Clostridium difficile-associated diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19: 481-484.
- Kelly CP, LaMont JT. Clostridium difficile—more difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008; 359:1932–1940.
- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. *N Engl J Med.* 1989; 320: 204–210.
- Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of Clostridium difficile by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis.* 1992; 166: 561–567.
- Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, et al. Host and pathogen factors for Clostridium difficile infection and colonization. *N Engl J Med.* 2011; 365:1693–1703
- Rudensky B, Rosner S, Sonnenblick M, van Dijk Y, Shapira E, et al. The prevalence and nosocomial acquisition of Clostridium difficile in elderly hospitalized patients. *Postgrad Med J.* 1993; 69: 45–47.
- Hutin Y, Casin I, Lesprit P, Welker Y, Decazes JM, et al. Prevalence of and risk factors for Clostridium difficile colonization at admission to an infectious diseases ward. *Clin Infect Dis.* 1997; 24: 920–924.
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of Clostridium difficile and serum levels of IgG antibody against

- toxin A. *N Engl J Med.* 2000; 342: 390–397.
17. Samore MH, DeGirolami PC, Tlucko A, Lichtenberg DA, Melvin ZA, et al. *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis.* 1994; 18: 181–187.
 18. Walker KJ, Gilliland SS, Vance-Bryan K, Moody JA, Larsson AJ, et al. *Clostridium difficile* colonization in residents of long-term care facilities: prevalence and risk factors. *J Am Geriatr Soc.* 1993; 41: 940–946.
 19. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. *J Infect Dis.* 1990; 162: 678–684.
 20. Arvand M, Moser V, Schwehn C, Bettge-Weller G, Hensgens MP, et al. High prevalence of *Clostridium difficile* colonization among nursing home residents in Hesse, Germany. *PLoS One.* 2012; 7: e30183.
 21. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 992–998.
 22. Lawrence SJ, Puzniak LA, Shadel BN, Gillespie KN, Kollef MH, et al. *Clostridium difficile* in the intensive care unit: epidemiology, costs, and colonization pressure. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28:123–130.
 23. Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet.* 1998; 351: 633–636.
 24. Alcalà L, Sanchez-Cambronero L, Catalan MP, Sanchez-Somolinos M, Pelaez MT, Marin M, Bouza E. Comparison of three commercial methods for rapid detection of *Clostridium difficile* toxins A and B from fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3833-3835.
 25. Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, Carroll KC. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3601-3605.
 26. Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, Borek AP, Hargrove JT, Carroll KC. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a twostep algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1145-1149.
 27. Sharp S, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the *C. Diff* Quik Chek Complete assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2082-2086.
 28. Gilligan PH. Is a two-step glutamate dehydrogenase antigen-cytotoxicity neutralization assay algorithm superior to the Premier toxin A and B enzyme immunoassay for laboratory detection of *Clostridium difficile*? *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1523- 1525.
 29. Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, Peterson LR, Davis T, Schreckenberger P, Fang FC, Dascal A, Gerding DN, Nomura JH, Goering RV, Akerlund T, Weissfeld AS, Jo Baron E, Wong E, Marlowe EM, Whitmore J, Persing DH. Impact of strain type on detection of toxigenic *clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3719.
 30. Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1996-2001.
 31. Thomson JR, Kaul KL. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2007;45:1152-1160.
 32. Kvach EJ, Ferguson D, Riska PF, Landry ML. Comparison of BD GeneOhm Cdiff real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 109–114.
 33. Knetsch CW, Bakker D, de Boer RF, Sanders I, Hofs S, et al. Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 227–231.
 34. Loo VG, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med.* 2005;353:2442-2449.
 35. McDonald LC, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2005;353:2433-2441.
 36. Warny M, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet.* 2005; 366:1079-1084.
 37. Clements AC, Magalhães RJ, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect. Dis.* 2010;10:395-404.
 38. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*—more difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008;359:1932-1940.
 39. Pépin J, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1254-1260.
 40. Rudensky B, Rosner S, Sonnenblick M, van Dijk Y, Shapira E, et al. The prevalence and nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* in elderly hospitalized patients. *Postgrad Med J.* 1993; 69: 45–47.
 41. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 992–998.
 42. Hornbuckle K, Chak A, Lazarus HM, Cooper GS, Kutteh LA, et al. Determination and validation of a predictive model for *Clostridium difficile* diarrhea in hospitalized oncology patients. *Ann Oncol.* 1998; 9: 307–311.
 43. Kent KC, Rubin MS, Wroblewski L, Hanff PA, Silen W. The impact of *Clostridium difficile* on a surgical service: a prospective study of 374 patients. *Ann Surg.* 1998; 227: 296–301.
 44. McGowan AP, Lalayiannis LC, Sarma JB, Marshall B, Martin KE, et al. Thirty-day mortality of *Clostridium difficile* infection in a UK National Health Service Foundation Trust between 2002 and 2008. *J Hosp Infect.* 2011; 77: 11–15.
 45. Moro ML, Mongardi M, et al. Prevenzione e controllo delle infezioni da *Clostridium difficile*. Documento di indirizzo SIMPIOS (Società Italiana Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie). *Giornale Italiano delle Infezioni Ospedaliere.* 2009;16: 2-40.
 46. Wilcox MH, Eastwood KA. Evaluation report: *Clostridium difficile* toxin detection assays. Centre for Evidence-based Purchasing publication no. CEP08054. Centre for Evidence-based Purchasing, NHS Purchasing and Supplies Agency, National Health Service, London, United Kingdom, 2009. http://www.pasa.nhs.uk/pasa/Doc.aspx?Path_%5bM%5d%5bSP%5d/NHSprocurement/CEP/CEP08054.pdf, (2009).
 47. Delmee M, Broeck JV, Simon A, Le Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol.* 2005;54:187-

- 191.
48. Mulligan ME, Rolfe RD, Finegold SM, George WL. Contamination of a hospital environment by *Clostridium difficile*. *Curr Microbiol.* 1979;3:173-175.
 49. Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:741-742.
 50. Kelly CP, Lamont JT. *Clostridium difficile*. More difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008;359:1932- 1940.
 51. Russello G, Russo A, Sisto F, Scaltrito MM, Farina C. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea and molecular characterization of clinical isolates. *New Microbiol.* 2012;35(3):307-16.
 52. Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, Mastrantonio P. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR-ribotype 018. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2892-2896.
 53. Goorhuis A, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1162-1170.
 54. Lin YC, Huang YT, Tsai PJ, Lee TF, Lee NY, Liao CH, Lin SY, Ko WC, Hsueh PR. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of clinical isolates of *Clostridium difficile* in taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1701-5.
 55. Drudy D, et al. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1264-1267.
 56. King CHR, Lin L, Leunk R. In vitro resistance development to nemonoxacin for *Streptococcus pneumoniae*, abstr. C1-1971. 48th Annu. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC)-Infect. Dis. Soc. Am. (IDSA) 46th Annu. Meet. American Society for Microbiology and Infectious Diseases Society of America, Washington, DC, 2008.
 57. Bolton RP, Culshaw MA. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. *Gut.* 1986; 27:1169-1172.
 58. Owens RC, Jr, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto C A. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46(Suppl. 1):S19-S31.
 59. Norén T, Alriksson I, Akerlund T, Burman LG, Unemo M. In vitro susceptibility to 17 antimicrobials among clinical *Clostridium difficile* isolates collected 1993-2007 in Sweden. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1104-1110.
 60. Hecht DW, et al. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2716-2719.
 61. Pépin J, Valiquette L, Gagnon S, Routhier S, Brazeau I. Outcomes of *Clostridium difficile*-associated disease treated with metronidazole or vancomycin before and after the emergence of NAP1/027. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2781-2788.
 62. Herpers BL, et al. Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1732-1735.
 63. Nord CE, Sillerström E, Wahlund E. Effect of tigecycline on normal oropharyngeal and intestinal microflora. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3375-3380.
 64. Klaassen CH, van Haren HA, Horrevorts AM. Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2002;40:101-104.
 65. Pasanen T, Kotila SM, Horsma J, Virolainen A, Jalava J, Ibrahim S, Antikainen J, Mero S, Tarkka E, Vaara M, Tissari P. Comparison of repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR with PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis in studying the clonality of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):166-75.