

ACTUALITĂȚI ÎN ETIOPATOGENIA, EPIDEMIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL INFECȚIEI CU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Asist. Univ. Drd. Dr. Liliana Baroiu^{1,2}, Șef Lucr. Dr. Alina Iancu^{1,2},
Conf. Dr. Miruna Drăgănescu^{1,2}, Conf. Dr. Mihaela Debita^{1,2},
Prof. Dr. Manuela Arbune^{1,2}, Prof. Dr. Sorin Rugina^{3,4,5}

¹Facultatea de Medicină și Farmacie, Universitatea „Dunărea de Jos”, Galați

²Spitalul Clinic de Boli Infecțioase, Galați

³Universitatea Ovidius, Constanța

⁴Academia Oamenilor de Știință din România

⁵Academia de Științe Medicale

REZUMAT

Infecția cu *Clostridium difficile* (ICD) este o cauză a gastroenteritei acute, cu potențial de evoluție severă către colită pseudomembranoasă, ileus și megacolon toxic. Inițial, ICD a fost considerată o infecție nozocomială, dar au fost dovedite și infecții comunitare. Susceptibilitatea la ICD este crescută în următoarele condiții: alterarea microbiotei intestinale după antibioterapie și imunosupresoare, compromiterea barierelor mucoase după intervenție chirurgicală, traumatism, proliferare tumorală, ischemie sau necroză, precum și în cazul scăderii rezistenței generale a organismului, cauzată de vârstă, alcoolism, diabet zaharat, neoplazii, imunosupresie, angiopatii. Îngrijorarea pentru apariția unor noi epidemii de ICD se menține ridicată, din cauza variabilității genetice bacteriene și a rezistenței sporilor în mediul extern. Diagnosticul ICD rămâne o provocare pentru clinicieni, bazându-se pe corelarea datelor clinice, epidemiologice și a investigațiilor complexe de laborator.

Cuvinte cheie: *Clostridium difficile*, toxine, controlul infecției, metode de diagnostic

INTRODUCERE

Clostridium difficile (CD) a fost prima dată izolat în anul 1935 din colonul nou-născuților sănătoși, dar prima documentare a patogenității bacteriei datează din anul 1978, când a fost asociată cu un caz de colită pseudomembranoasă postantibiotice (1,2). Clindamicina și betalactaminele cu spectru larg au fost inițial asociate diareei cu CD. Utilizarea extensivă a flurochinolonelor în ultimii 20 de ani a contribuit la emergența ribotipului hipervirulent 027 și creșterea cazurilor asociate de infecții cu *Clostridium difficile* (ICD) (3).

Interesul medical pentru ICD a crescut după anul 2001, odată cu răspândirea ribotipului 027,

identificat în Statele Unite ale Americii (SUA) și Canada (4). Epidemia din SUA a fost declarată o problemă de sănătate publică în anul 2011, când numărul cazurilor noi a crescut la 500.000/an, cu 15.000-30.000 decese/an, suplimentând costurile de spitalizare cu peste 4,8 miliarde \$ (3). În următorii ani, ribotipul 027 s-a extins și în Europa, apoi în întreaga lume, în contextul evident al consumului exagerat și al utilizării inadecvate a antibioticelor (5,6).

Deși spitalele din Anglia s-au confruntat cu creșterea semnificativă a morbidității ICD, după anul 2006 incidența acestei infecții a scăzut cu aproape 80%, datorită unui program de măsuri aplicate la nivel național privind controlul și transmite-

rea infecțiilor în spitale, dar și printr-o strategie de restrângere a utilizării unor antibiotice cu rol de trigger în declanșarea ICD (7). Aceste principii au fundamentat un program național din Canada, unde morbiditatea prin ICD a scăzut în perioada 2009-2015 cu 38,5% (8). În Uniunea Europeană sunt înregistrate anual peste 123.000 de cazuri, reprezentând a 8-a cauză de infecție asociată asistenței medicale, cu prevalența de 2,6 cazuri la 10.000 de pacienți-zi (5). În România, primele cazuri de ICD cu ribotip 027 au fost identificate în anul 2011, dar numărul acestor infecții a crescut progresiv. Prevalența ICD evaluată într-un studiu multicentric a fost de 5,2 cazuri la 10.000 de pacienți-zi (9).

ETIOPATOGENIE

Clostridium difficile (CD) este un bacil Gram pozitiv, strict anaerob, sporulat, toxigen, care colonează intestinul, mai ales când există dezechilibru microbial. În ciclul de viață al CD se distinge o formă vegetativă, responsabilă de producerea toxinelor patogene și o formă de spor dormant, rezistent la oxigen, uscăciune, temperaturi scăzute și la acțiunea celor mai mulți agenți dezinfectanți. Rezistența sporilor de CD în mediul exterior explică persistența bacteriei în natură și dificultățile de prevenire a infecției. Cultura CD se poate face din materiile fecale, dar și din sânge și țesuturi, necesitând medii speciale și condiții de anaerobioză. Denumirea „difficile“ indică dificultatea cultivării și identificării acestu microb (10).

Principalele modificări celulare evidențiate prin microscopie electronică după expunerea la toxinele CD sunt pierderea structurii citoscheletale, rotunjirea celulelor, întreruperea joncțiunilor intercelulare și apoptoza. Aceste modificări alterează bariera intestinală și contribuie la acumularea de lichid în lumenul intestinal, asociată cu boala diareică (11,12).

Factorii de virulență ai CD sunt reprezentați de capsula polizaharidică, adevine, enzime și toxine. Tulpinile de CD care nu produc toxină sunt nepatogene, nu produc infecții. Toxinele A și B sunt cei mai importanți factori de virulență și sunt codificate de genele *tcdA* și *tcdB*. După tipul toxinei, tulpinile de CD pot fi producătoare de toxină A (*tcdA*), toxină B (*tcdB*) sau toxină binară (13).

Rolul acestor toxine este de a regla numeroase procese biologice, și anume: secreția și menținerea

citoscheletului, adeziunea celulară, chemotactismul, stimularea secreției de citokine, TNF, IL-1, IL-6 și IL-8 (14). În patogeneza ICD, se presupune că IL-8 are un rol particular, prin recrutarea și activarea neutrofilelor, prezente în număr mare în zonele de inflamație asociate acestei infecții. Polimorfismul genei IL-8 a fost asociat cu susceptibilitatea la recurența ICD (15). În prezent, s-a dovedit că toxinele CD acționează prin glicozilarea proteinelor GTP-azei Rho, Rac și Cdc42 (16). Glicozilarea împiedică activarea acestor proteine și capacitatea lor de a regla polimerizarea actinei, alterând celulele gazdă, cu efecte citopatice, citotoxice și de răspuns imunologic (17). Totuși, această teorie nu poate explica în totalitate mecanismele moleculare ale toxinelor clostridiene, având în vedere complexitatea proteinelor Rho. Inactivarea proteinelor Rho blochează NFκB, transcripția și secreția TLRs induse de citokinele inflamatorii și de chemokine, dar care par să fie stimulate de toxinele CD (17). Variabilitatea genelor care codifică toxinele A (*tcdA*) și B (*tcdB*) poate fi evaluată prin toxinotipare, utilizând metode de genetică moleculară (PCR – RFLP). Se cunosc 34 toxinotipuri, caracterizate de modificarea PaLoc („pathogenicity locus”), constituit din regiunile de codare a *tcdA* și *tcdB*, alături de 3 gene reglatorii *tcdR*, *tcdC* și *tcdE* (18).

Descifrarea genomului bacterian a permis identificarea unui număr crescut de ribotipuri, rezultate după mutații punctiforme, deleții sau inserții ale transpozomilor. Acestea se deosebesc în privința virulenței, rezistenței la antibiotice și a interacțiunii cu gazda. Toxinotipurile se corelează cu ribotipurile. În lume, cele mai răspândite toxinotipuri sunt III (PCR ribotip 027), IV (PCR ribotip 023), V (PCR ribotip 078/126) și VIII (PCR ribotip 017) (13,19).

EPIDEMIOLOGIE

Epidemiologia ICD s-a schimbat în ultimii 20 de ani. Deși majoritatea cazurilor continuă să fie asociate îngrijirilor de sănătate, numărul infecțiilor comunitare este în creștere. Dintre infecțiile comunitare, 40% pot necesita spitalizare, devenind surse pentru infecții din spital (20).

Sursa ICD este reprezentată de intestinul persoanelor bolnave și sănătoase, intestinul diferitelor specii de animale, solul, apa sau obiectele contami-

nate. Transmiterea CD se face pe cale digestivă, în mod direct sau indirect, prin obiecte contaminate. Infecțiile apărute în spitale se realizează mai ales prin transmiterea între bolnavi sau între bolnavi și personalul medical, dar și după contactul cu instrumentar medical sau obiecte de vestimentație, mobilier sau pavimente contaminate (20,21). Infecțiile comunitare pot fi asociate cu expuneri variate în mediul exterior (praf, ape navigabile, ape reziduale, canale de irigație), din mediul casnic (suprafețe din bucătărie, frigider) și contactul cu animale sau alimente de origine animală (22,23). *Clostridium difficile* (mai ales ribotipul 078 și ribotipul 027) s-a izolat la vite, porci sau păsări crescute în gospodării, dar și la animale de companie și animale sălbatice (22).

Receptivitatea la ICD este condiționată de dezechilibrul microflorei intestinale, prin apariția unor „breșe” în compoziția microbiomului. Impactul CD variază în funcție de vârstă. Deși peste 50% dintre sugari sunt colonizați cu CD, infecția este rareori întâlnită la această vârstă, deoarece majoritatea cazurilor sunt asociate cu tulpini netoxigene (24). Sugarii alimentați artificial au un risc mai crescut de colonizare față de cei alimentați natural (25). Portajul intestinal al CD la adulții sănătoși este mult mai rar, întâlnit la 3-5% dintre persoane (26,27). Majoritatea cazurilor de infecții simptomatice sunt cunoscute după vârsta de 65 de ani, mai ales la pacienți cu intervenții chirurgicale, boli oncologice și boală cronică de rinichi (28).

Riscul infecțiilor comunitare cu CD este mai crescut la tineri, femei care îngrijesc sugari, persoane care primesc inhibitori de pompă de protoni sau antibiotice cu spectru larg, persoane care locuiesc în vecinătatea fermelor sau care cresc animale (20).

DIAGNOSTIC

Dificultatea diagnosticului ICD este influențată de rata crescută de colonizare asimptomatică la pacienții spitalizați, raportată între 7% și 26% (29). De aceea, evaluarea criteriilor clinice compatibile cu definițiile de caz este esențială pentru interpretarea corectă a investigațiilor realizate pentru diagnosticul ICD. Definiția clinică propusă de Dubberke și colaboratorii săi se referă la cel puțin 3 scaune emise în 24 de ore, cu consistență scăzută, evaluată cu scor 5-7 după scala Bristol și dureri ab-

dominale sau crampe (30). În prezent, definiția de caz recomandată de ghidurile practice cuprinde trei variante clinice, diaree, megacolon sau ileus sever și un test de laborator pozitiv sau aspect pseudo-membranos evidențiat endoscopic sau histopatologic (3,5,10).

Diagnosticul ICD poate fi un caz nou sau recurent, dacă urmează unui alt episod confirmat în ultimele 2-4 săptămâni (3). După relația între spitalizare și debutul simptomelor, diagnosticul ICD poate fi nozocomial, de la 48 ore după internare până la 28 zile după externare sau comunitar, peste 8 săptămâni de la externare. Infecția cu CD este nedeterminabilă, dacă debutul simptomelor are loc între 4 și 8 săptămâni de la externare (5,28,29). Complicațiile ICD sunt sindromul de deshidratare, chiar șocul hipovolemic, sepsisul și abdomenul acut. Factorii de risc pentru complicațiile ICD sunt vârsta înaintată, leucocitoza, insuficiența renală și comorbiditățile cronice.

Riscul de deces a fost asociat cu vârsta, comorbiditățile, hipoalbuminemia, leucocitoza, insuficiența renală și ribotipul 027. Scorul ATLAS cuantifică riscul decesului, luând în calcul vârsta, prezența febrei, severitatea leucocitozei și hipoalbuminemiei, precum și utilizarea antibioticelor sistemice (31).

Diagnosticul de laborator este indicat numai în cazurile care au factori de risc și îndeplinesc criteriile clinice, excluzând diareea medicamentoasă sau alte cauze de boala diareică. Nu este recomandat să se testeze pentru CD scaunul consistent, exceptând situația ileusului paralytic (32). Metodele indicate pentru diagnosticul ICD sunt cultura toxigenică (CT), testul de neutralizare a citotoxicității celulare (TNCC), testele imunoenzimatică (EIA) pentru toxinele A și B și pentru glutamat-dehidrogenaza (GDH) și testul de amplificare a acizilor nucleici (TAAN).

Totuși, niciuna dintre aceste metode nu este considerată standard de referință. În ultimii 30 de ani, diagnosticul ICD s-a bazat pe CT combinată cu TNCC, dar aceste metode sunt laborioase și necesită mult timp. Alte dezavantaje sunt interpretarea dificilă și reproductibilitatea slabă a rezultatelor, cauzată de specificitatea scăzută a culturii toxigenice, sensibilitatea dovedită a testului de neutralizare numai pentru toxina B (33).

Cultura în anaerobioză se realizează pe medii selective cu agar cicloserina-cefoxitina-fructoză,

după decontaminarea prealabilă a probei de scaun prin tratarea cu căldură sau alcool. După incubarea timp de câteva zile la temperaturi de 20-25°C, pot crește coloniile gălbui, plane, cu margini neregulate și cu aspect de sticlă mată. Sensibilitatea culturii poate crește până la 100% prin utilizarea mediului ChromoID, agar îmbogățit cu taurocolat de sodiu, gălbenuș de ou, tripticază-soia și sânge de berbec (34) (Figurile 1 și 2).



FIGURA 1. Cultură *Clostridium difficile* pe mediu agar-sânge, colonii non-hemolitice, de 2-4 mm în diametru, cu suprafață mată



FIGURA 2. Cultură *Clostridium difficile* pe mediu cromogen-chrom ID *C. difficile* agar (bioMérieux) – colonii negre

Din coloniile suspecte se realizează testele de prezumpție: morfologia coloniilor, aspectul microscopic la colorația Gram (Figura 3) și caracteristicile biochimice, cu pozitivarea testelor indol și hidroliza L-prolin-naftalamida. Testele de prezumpție

pozitive necesită confirmare prin metodele Rapid ANA (sistem de identificare rapidă a izolatelor anaerobe) sau MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) (35).



FIGURA 3. Frotiu colorat Gram – cultură *Clostridium difficile* – microscopie optică

Tulpinile identificate de CD pot fi netoxigene 20-25%. După identificarea tulpinilor de CD este necesară evaluarea potențialului patogen utilizând un test de toxigenză, TNCC, EIA sau TAAN (3).

Testul de neutralizare a citotoxicității celulare detectează toxina CD prin identificarea efectului citopatic pe culturi celulare McCoy, MRC-5 sau Vero. În prezența toxinei, celulele prezintă un efect citopatic reversibil după neutralizarea cu antitoxină (34).

Testele comerciale EIA pentru detectarea toxinelor A/B și GDH sunt rapide, au costuri relativ reduse, dar prezintă sensibilitate și specificitate scăzute și necesită utilizarea combinată. Testarea EIA-GDH este utilă pentru screening, având sensibilitate bună, dar nu diferențiază tulpinile toxigene de cele netoxigene și poate prezenta reacții încrucișate cu enzimele altor specii de clostridii (36).

Utilizarea TAAN identifică genele care codează TcdB, TcdA și/sau toxina binară, prin tehnica PCR (polymerase chain reaction) sau LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Avantajele TAAN sunt rapiditatea, complexitatea redusă și acuratețea foarte bună, dar prezintă dezavantajul detecției tulpinilor netoxigene, cu rata crescută de rezultate fals pozitive (37).

Societatea Europeană de Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase (ESCMID) recomandă utilizarea unui algoritm de diagnostic în doi pași, începând cu un test TAAN sau GDH-EIA, urmat de un test EIA de confirmare a toxinei (38).

Toxinele CD au fost asociate cu o inflamația intestinală, obiectivată prin prezența unor biomarkeri

în probele de scaun, lactoferina, mieloperoxidaza, citokinele și calprotectina. Acești biomarkeri ușor de determinat ar putea fi indicatori pentru severitate, dar nu sunt specifici pentru ICD și nu sunt recomandați de majoritatea ghidurilor practice (34).

Metodele endoscopice, sigmoidoscopia flexibilă și colonoscopia au utilitate limitată din cauza fragilității mucoasei colonului și a riscului de perforație a peretelui (39).

Examenul colonoscopic și anatomo-patologic al pieselor de biopsie, chirurgicale sau necroptice, poate stabili diagnosticul de ICD prin evidențierea aspectelor tipice, cu depozite gălbui și pseudomembrane (Figura 4). Microscopic, se descriu epiteliu distrus, cu arii focale de necroză, infiltrat neutrofilic la nivelul mucoasei și aglomerări de leucocite fragmentate, fibrină, mucus și detritusuri celulare (10,16).



FIGURA 4. Imagine de colonoscopie – infecție *Clostridium difficile*, inflamație de mucoasă cu arii acoperite de depozit gălbui 1-4 mm

Metodele imagistice sunt recomandate pentru diagnosticul ICD, când sunt suspectate complicații sau alte patologii intraabdominale asociate. Cel mai comun aspect evidențiat la tomografia computerizată abdominală este îngroșarea peretelui colonic, la care se pot asocia ascita și neregularitatea peretelui intestinului (Figurile 5 și 6). Radiografia abdominală este indicată pentru diagnosticul precoce al megacolonului toxic, mai ales la pacienții care prezintă criterii de sepsis (10,36).

Studiile actuale sunt orientate pentru dezvoltarea unor teste ultrasenzitive ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) care să permită detecția



FIGURA 5. Imagine de computer tomograf abdominal – colon ascendent – grosime perete 23,2 mm, diametru transversal 74,3 mm (41)

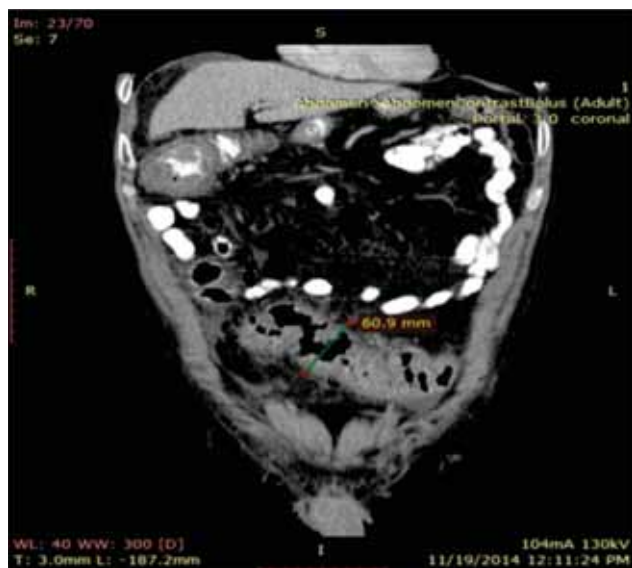


FIGURA 6. Imagine de computer tomograf abdominal – colon sigmoid, diametru 60,9 mm (secțiune coronală) (41)

cantitativă a celor două toxine, tcdA și tcdB. O altă direcție de cercetare o reprezintă analiza metabolomică din scaun și urină. Pornind de la ipoteza că microbiomul persoanelor cu ICD este alterat din cauza antibioticelor, analiza metabolomică a constatat că nivelul de colesterol și coprostanol din scaun este diferit față de persoanele sănătoase. În urină au fost studiați 53 de metaboliți, dintre care colina a prezentat o diferență semnificativă în ICD față de persoanele sănătoase (40).

În concluzie, epidemia ICD continuă să evolueze la nivel global, deși programele naționale de prevenție au reușit controlul infecțiilor noocomiale în unele țări ale lumii. Patogenia ICD este complexă

și dinamică, existând posibilitatea emergenței unor noi ribotipuri virulente. Diagnosticul ICD rămâne o provocare legată de dificultățile de identificare bac-

teriană și de interpretare a rezultatelor de laborator, care necesită întotdeauna corelația cu datele clinice și epidemiologice.