

455757

A 53

doi:10.25143/prom-rsu_2011-11_pd



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Karīna Aksenoka

***Clostridium difficile* klīniskā un molekulārā epidemioloģija
Latvijā**

PROMOCIJAS DARBS

Medicīnas zinātņu doktora grāda iegūšanai

Specialitāte – klīniskā mikrobioloģija

Zinātniskie vadītāji:

**Dr. habil. med., LZA kor loc. Dace Gardovska, Rīgas Stradiņa
universitātes profesore**

**Dr. biol. Edvīns Miklaševičs, Rīgas Stradiņa universitātes asociētais
professors**

Rīga, 2011

A 53



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Karīna Aksenoka

***Clostridium difficile* klīniskā un molekulārā epidemioloģija
Latvijā**

PROMOCIJAS DARBS

Medicīnas zinātņu doktora grāda iegūšanai

Specialitāte – klīniskā mikrobioloģija

Zinātniskie vadītāji:

**Dr. habil. med., LZA kor loc. Dace Gardovska, Rīgas Stradiņa
universitātes profesore**

**Dr. biol. Edvīns Miklaševičs, Rīgas Stradiņa universitātes asociētais
professors**

Rīga, 2011

Recenzenti:

Dr. med., RSU profesore **Juta Kroiča**

Dr. habil. biol., LU profesors **Aleksandrs Rapoportis**

Dr. biol., LU profesors **Viesturs Baumanis**

Pētnieciskā darba finansējums un atbalsts



1. ESF projekts „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei RSU”, vienošanās Nr. 2009 /0147 /1DP /1.1.2.1.2. /09/IPIA/VIAA/009.
2. European *Clostridium difficile* infection (CDI) survey (ECDIS) Study, October 2008 – February 2009.
3. Tirgus orientētais pētījums „*Clostridium difficile* klīniskās diagnostikas, ribotipēšanas un toksīnu raksturošanas testu izstrādāšana un ieviešana medicīnas praksē”, 2007./2008. gads.
4. Valsts pētījuma programmas „Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošo galveno patoloģiju zinātniska izpēte ar multidisciplināra pētnieciskā konsorcijs palīdzību” projekts Nr. 7 “Bērnu mirstības samazināšana, uzlabojot dzīvībai bīstamu infekcijas slimību agrīnu diagnostiku, ārstēšanas rezultātus un profilaksi Latvijā, izmantojot modernās molekulārās bioloģijas, citometrijas un imūnģenētikas metodes”, 2007. gads.

Saturs

1. Izmantotie saīsinājumi	6
2. Ievads	7
2.1. Pētījuma aktualitāte	8
2.2. Darba mērķis	9
2.3. Darba uzdevumi	9
2.4. Pētījumam izvirzītie jautājumi	10
2.5. Darba zinātniskā novitāte	11
2.6. Darba struktūra	11
3. Literatūras apskats	12
3.1. Cilvēka kuņģa un zarnu trakta ekosistēma	12
3.1.1. Normāla ekosistēma	12
3.1.2. Disbakteriozi izraisošie faktori	14
3.1.3. Akūta infekcioza diareja	16
3.1.4. Akūtas infekciozas diarejas bērniem	17
3.2. <i>Clostridium difficile</i>	19
3.2.1. Etioloģija	19
3.2.2. <i>C. difficile</i> galvenie rezistences mehānismi	21
3.2.2.1. <i>C. difficile</i> makrolīdu rezistence	21
3.2.2.2. <i>C. difficile</i> fluorhinolonu rezistence	22
3.2.2.3. <i>C. difficile</i> citu veidu rezistence	22
3.2.3. <i>C. difficile</i> patogenitātes lokuss (PaLoc)	23
3.2.4. Ar antibiotiku lietošanu saistītā <i>C. difficile</i> saslimšana	27
3.2.5. <i>C. difficile</i> infekcija bērniem	29
3.2.6. Patoģenēze	30
3.2.7. Klīniskā aina	32
3.2.8. Terapija	33
3.2.9. Infekcijas kontroles iespējas	37
3.3. <i>C. difficile</i> diagnostikas un tipēšanas metodes	38
3.3.1. Endoskopiskā diagnostika	38
3.3.2. Radioloģiskā diagnostika	40

3.3.3. Klīniski laboratoriskās diagnostikas metodes.....	41
3.3.3.1. Mikrobioloģijas metodes.....	41
3.3.3.2. Šūnu kultūru citotoksicitātes tests (CCA), kultūru toksiskās aktivitātes tests (TC) un šūnu citotoksiskās neitralizācijas tests (CCNA).	42
3.3.3.3. Fēču gaistošo skābju tests	42
3.3.4. Imunoloģiskās diagnostikas metodes	43
3.3.5. PĶR diagnostikas metode.....	43
3.3.6. AGE – agarozes gēla elektroforēze	45
3.3.7. Tipēšanas metodes infekcijas uzraudzībai.....	46
3.3.7.1. Pulsējošā lauka elektroforēze.....	47
3.3.7.2. Toksinotipēšana.....	47
3.3.7.3. Ribotipēšana.....	47
3.3.7.4. MLST	48
3.4. <i>C.difficile</i> testēšanai ieteiktais algoritms [Barbut <i>et al.</i> , 2003].	49
4. Pētījuma materiāls un metodes	50
4.1. Pētījumā izmantoto atsauču avotu atlase	50
4.2. Pētījuma uzbūve.....	51
4.2.1. Bērnu grupas atlases kritēriji	52
4.2.2. Pieaugušo grupas atlases kritēriji.....	53
4.3. Pētījumā izmantotās metodes.....	54
4.3.1. <i>C.difficile</i> toksīna A eksprestests	54
4.3.2. DNS izdalīšana no fēcēm.....	54
4.3.3. Mikrobioloģiskā testēšana	55
4.3.4. DNS koncentrācijas noteikšana analizējamā baktēriju suspensijas paraugā.....	57
4.3.5. Vankomicīna rezistences gēnu noteikšana ar PĶR metodi un paraugu pārbaude uz <i>E.fecium</i> un <i>E.fecalis</i> gēnu klātbūtni	57
4.3.6. Toksinogēnu noteikšana ar PĶR metodi	61
4.3.7. Ribotipa noteikšana ar PĶR.....	62
4.3.8. Toksinotipēšana	64
4.3.9. MLST.....	66
4.4. Darba analīze un datu statistiskā apstrāde.....	68
5. Rezultāti.....	69
5.1. Bērnu grupas analīze.....	69

5.1.1. Ar akūtu zarnu infekciju hospitalizēto bērnu demogrāfisko datu analīze ...	69
5.1.2. Pacientu stacionēšanas un klīnisko diagnožu variācijas	69
5.1.3. Pacientu klīniskās ainas novērtējums stacionārā	71
5.1.4. Pacientu klīniski laboratorisko datu izvērtējums	72
5.1.5. Akūtas zarnu infekcijas riska faktoru izvērtējums.....	73
5.1.6. <i>C.difficile</i> prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diarejas klīniku	74
5.2. Pieaugušo grupas analīze	77
5.2.1. P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas nodaļas diagnostikas metožu pilnveidošanās no 2005. līdz 2009. gadam	77
5.2.2. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku demogrāfisko datu analīze	79
5.2.3. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku prevalence P. Stradiņa KUS nodaļās	80
5.2.4. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku iespējamo riska faktoru izvērtējums	81
5.2.5. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku klīnisko simptomu prezentācija	84
5.2.6. CDAD slimnieku stacionārā pavadīto gultasdienu analīze	85
5.2.7. <i>C.difficile</i> infekcijas slimniekiem izmantotās terapijas analīze	86
5.2.8. Slimnieku, kuriem attīstījās <i>C.difficile</i> reinfekcija, analīze	87
5.2.9. Vankomicīna rezistences gēnu analīze	87
5.2.10. <i>C.difficile</i> celmu filoģenētiskā analīze.....	89
5.2.11. MLST analīze	94
5.2.12. Toksinotipu variāciju analīze.....	95
6. Vadlīnijas <i>C.difficile</i> testēšanai	97
7. Diskusija	99
8. Secinājumi	108
9. Literatūras saraksts	109
10. Pielikums	124
11. Konferenču tēzes un prezentācijas par pētījuma tēmu.....	141
12. Publikācijas par pētījuma tēmu.....	142
13. Pateicības	143

1. Izmantotie saīsinājumi

- AAD – antibiotiku asociētā diareja
AGE – agarozes gēla elektroforēze
BKUS – Bērnu klīniskā universitātes slimnīca
C.difficile – *Clostridium difficile*
C. perfringens – *Clostridium perfringens*
CCA – šūnu kultūru citotoksicitātes tests
CDAD – *Clostridium difficile* asociēta diareja
CT – kompjūtertomogrāfija
CRO – C-reaktīvais olbaltums
DNS – dezoksiribonukleīnskābe
EDTA – etilēndiaminotetraetiķskābe
ELISA – enzīmātiska imūnfermentatīva reakcija
FliD – flagelāra vāciņu olbaltumviela
GDH – glutamātdehidrogenāze
GLC – gāzes hromatogrāfijas metode
Il-8 – interleikīns 8
MLSB – makrolīdu - linkozamīda - streptogramīna B grupas antibiotikas
MLST – multilokusu sekvenēšana
PaLoc – patogenitātes lokuss
PFGE – pulsējošā lauka elektroforēze
PMK – pseidomembranozs kolīts
PĶR /PCR – polimerāzes ķēdes reakcija
S.aureus – *Stafilococcus aureus*
ST-3 – sekvenču tips 3
TC – šūnu kultūru toksiskās aktivitātes tests
tcdA – toksinogēns A
tcdB – toksinogēns B
TM – toksisks megakolons
TT-1 – toksinotips 1

2. Ievads

C.difficile baktērijas izraisītās saslimšanas pēdējo trīs desmitgažu laikā ir kļuvušas par globālu un grūti risināmu problēmu. Šis fakts izskaidrojams ar to, ka klīnikās tiek lietots arvien plašāks antibiotisko preparātu un ķīmijpreparātu spektrs. Stacionāros slimnieku palātas arvien biežāk tiek kontaminētas ar *C.difficile* sporām, jo baktērija kļūst izturīga pret telpu tīrīšanas ķīmiskajiem līdzekļiem. Līdz ar infekcijas izplatību pilnveidojas arī tās diagnostikas metožu klāsts, kas ļauj rūpīgāk identificēt šo baktēriju vai tās darbības produktus [Bauer *et al.*, 2009].

Infekcijas izpausmes variē, sākot no asimptomātiskas kolonizācijas kuņģa un zarnu traktā līdz smagām diarejām. Var attīstīties tādi dzīvību apdraudoši stāvokļi kā pseidomembranozs kolīts (PMK), toksisks megakolons (TM), zarnu perforācija un nāve. *C.difficile* riska pacients ir cilvēks gados ar smagu pamatslimību, kas ilgstoši uzturas stacionārā, terapijā saņem antibakteriālos preparātus, antacīdus un pretčūlas līdzekļus, kuram ir bijusi ķirurģiska iejaukšanās gastrointestinālajā traktā vai kāda orgāna transplantācija, kura vienmēr ir saistāma ar imūnsupresiju [Durai *et al.*, 2007, Pudhota *et al.*, 2006].

Ar antibiotiku lietošanu saistītās diarejas apkopo angļu valodā termins Clostridium difficile associated disease jeb CDAD [Beangeri *et al.*, 2003, Gerding *et al.*, 1995]. Ar CDAD attīstību saistāmas gandrīz visas antibiotikas. Biežāk CDAD attīstās slimniekiem, kuriem terapijā tika nozīmēti šādi antibakteriālie līdzekļi: aminopenicilīni (ampicilīns, amoksicilīns), cefalosporīni (pirmais līdz ceturtās paaudzes), klindamicīns, makrolīdi (eritromicīns), tetraciklīns, sulfanilamīdi, trimetoprims, fluorhinoloni. Reti CDAD attīstās uz vankomicīna, metronidazola un parenterāli ievadāmo aminoglikozīdu fona [Cornaglia *et al.*, 2004].

2.1. Pētījuma aktualitāte

C.difficile infekcija pēdējos gados izraisa ļoti nopietnu slimību ar incidenci no 80 līdz 200 gadījumi uz 10 000 stacionētu pacientu. Ir palielinājies ar *C.difficile* saistītās saslimšanas smagums, jo radušies hipervirulenti, sevišķi patogēni, ciprofloksacīna, metronidazola multirezistenti celmi. Smags TM izraisa mirstību 24 –38% gadījumu [Poutanen *et al.*, 2004].

CDAD ir kļuvusi par globālu problēmu. Aktuāla kļūst baktērijas izpēte arī Latvijā, lai veiktu ne tikai šī mikroorganisma diagnostiku, bet arī veiktu padziļinātu molekulāri bioloģisku izpēti, lai nepieciešamības gadījumā uzsāktu adekvātu terapiju un veiktu preventīvos infekcijas kontroles pasākumus.

Latvijā *C.difficile* baktērija līdz šim nebija pētīta, tāpēc nav datu par *C.difficile* celmu cirkulāciju un baktērijas molekulāri ģenētisko tipu. Svarīgi ir izpētīt situāciju Latvijā, jo, pastāvot pat kādām nelielām cirkulējošā ierosinātāja mikrobioloģiskajām izmaiņām, arī slimības ārstēšanas process un gaita var atšķirties no citu valstu pieredzes.

2.2. Darba mērķis

Darba mērķis ir noteikt Latvijā cirkulējošās *C.difficile* molekulāri ģenētisko tipu, tās lomu infekciozo diareju attīstībā dažāda profila stacionāros un dažādās slimnieku vecuma grupās.

2.3. Darba uzdevumi

1. Veikt Latvijas *C.difficile* izolātu filoģenētisko analīzi, izveidojot celmu filoģenētisko koku.
2. Definēt un aprakstīt Latvijas apstākļiem raksturīgo *C.difficile* toksinotipu un sekvenču tipu.
3. Noteikt izolētajās *C.difficile* kultūrās vankomicīna rezistences gēnu klātbūtni.
4. Pielāgot laboratorijas apstākļiem baktēriju noteikšanas metodiku, ribotipu un toksinotipu metodes un izveidot laboratoriskās testēšanas algoritmu.
5. Veikt CDAD slimnieku, kuriem diagnoze pierādīta laboratoriski, klīnisko un epidemioloģisko datu analīzi.
6. Noteikt *C.difficile* lomu diareju attīstībā bērniem, kuri stacionēti ar diareju un/vai hemokolītu.
7. Izveidot izolēto *C.difficile* tīrkultūru celmu un baktēriju DNS (dezoksiribonukleīnskābe) kriobankas.

2.4. Pētījumam izvirzītie jautājumi

1. Vai *C.difficile* var uzskatīt par diareju ierosinātāju bērniem?
2. Vai literatūrā aprakstītie CDAD slimības riska faktori ietekmē *C.difficile* infekcijas attīstību Latvijas slimniekiem?
3. Kāds *C.difficile* toksinotips, ribotipi un MLST tips izplatīts Latvijā, tā salīdzinājums ar pasaulē atklātajiem?
4. Vai atklātie *C.difficile* celmi ir kādu rezistences gēnu nesēji?

2.5. Darba zinātniskā novitāte

1. Noskaidrota *C. difficile* prevalence stacionārā ārstētiem bērniem.
2. Izveidota *C. difficile* celmu tīrkultūru un DNS kriobankas.
3. Aprobētas jaunas laboratorijas apstākļiem atbilstošas, iepriekš Latvijā neizmantotas, molekulāri bioloģiskas *C. difficile* identifikācijas metodes.
4. Izveidots *C. difficile* ribotipu filoģenētiskais koks.
5. Latvijā atklāts pētāmās baktērijas 1. toksinotips (TT-1) un 3. sekvenču tips (ST-3).
6. Izveidots *C. difficile* testēšanas algoritms.
7. Izveidots sistemātisks literatūras apskats, balstoties uz jaunākajām zinātniskajām publikācijām.

2.6. Darba struktūra

Darbs uzrakstīts latviešu valodā un noformēts uz 143 lappusēm, iekļautas 28 tabulas un 30 attēli. Promocijas darbam ir klasiska uzbūve. Darbs ietver šādas sadaļas: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, izmantotās literatūras saraksts un pielikums.

3. Literatūras apskats

3.1. Cilvēka kuņģa un zarnu trakta ekosistēma

3.1.1. Normāla ekosistēma

Kuņģa un zarnu traktā dzīvo vairāk nekā 400 mikroorganismu sugu un vīrusu [Ramakrishna *et al.*, 2007]. Veselam cilvēkam kuņģa un zarnu traktā 15% ir patogēni vai nosacīti patogēni. Mikroflora gremošanas traktā iekļūst pirmo dzīves dienu laikā. Kamēr bērns uzturā lieto pienu, veidojas bifidoflora ar prevalējošām pienskābās rūgšanas baktērijām un fakultatīviem anaerobiem (*E.coli*). Zīdāim līdz ar uztura maiņu notiek arī radikālas izmaiņas mikroflorā, strauji samazinās fakultatīvi anaerobo baktēriju daudzums un palielinās īsto anaerobu skaits (*Bacteroides*, *Clostridium* u.c. sugas). Paralēli notiek kuņģa un zarnu trakta morfoloģiskā, funkcionālā un zarnu imunoloģiskā (veidojas T un B limfocīti) nobriešana.

Vesela cilvēka zarnu trakta mikroflorā dominē saharolītiskās baktērijas, bifidobaktērijas, laktobaciļi, peptostreptokoki. Saharolītiskās baktērijas sašķeļ ogļūdeņražus un veido īšķēžu taukskābes. Šīs taukskābes ir nepieciešamas zarnu epitēlija trofikai un diferenciacijai, tās arī nomāc pūšanas baktēriju augšanu. Taukskābes piedalās jonu un lipīdu vielmaiņā [Bartlett, 1992]. Pieauguša cilvēka normālas mikrofloras sastāvs un vides īpatnības dažādos kuņģa un zarnu trakta anatomiskajos rajonos ir mainīgs [Ramakrishna *et al.*, 2007] (Tabula 1).

Tabula 1. Kuņģa un zarnu trakta normālas mikrofloras sastāvs [Ramakrishna et al., 2007].

Anatomiskais rajons	Vides īpatnības	Mikroflora
kuņģis	skāba reakcija, pepsīns, lipāze, proteolītiskie fermenti	<i>Laktobacillus spp.</i> , <i>Helicobacter pylory</i> , <i>Strepcococcus spp.</i>
tievās zarnas <i>duodenum</i> , <i>jejunum</i> <i>ileum</i>	nedaudz skāba reakcija, žults, gremošanas fermenti, pH neitrāls, anaerobi apstākļi, žults, gremošanas fermenti	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Veilonella spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
resnās zarnas	pH neitrāls, anaerobi apstākļi, ļoti maz skābekļa	ļoti bagāta flora, regulāri var izdalīt ap 400 sugu, >90% ir anaerobi. <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus spp.</i>

Intestinālo ekosistēmu veido zarnu sienīgas lokālā imūnsistēma, barības vielas, gremošanas sekrēti un mikroflora, kas savstarpēji atrodas kompleksās sinerģiskās un antagonistiskās attiecībās. Baktērijas, kuras zarnu traktā ir pārsvarā, sauc par dominantajām. Dominantā flora sastāv no 10 līdz 20 anaerobo baktēriju sugām. Tās, kuru ir 100 un 1000 reižu mazāk, sauc par subdominantajām, parasti tās ir fakultatīvi anaerobas baktērijas. Relatīvi polimorfā tranzīta flora, izņemot dažus patoloģiskus stāvokļus, nekolonizē zarnu traktu, tās populācija ir ļoti zemā līmenī. Intestinālā flora ir svarīga barjera pret patogēniem izraisītājiem un to toksīniem, tā pārklāj gļotādu, konkurē ar patogēniem par barības vielām, tai piemīt trofiska un metaboliska nozīme. Intestinālā flora izmanto barības vielu degradācijas produktus, veidojot poliamīnus –

putrascīnu un kadaverīnu, īso ķēžu organiskās skābes, taukskābes un amonjaku [Barbut, Gariazzo *et al.*, 2007].

Mehānisms, kas nodrošina relatīvu intestinālās floras līdzsvaru, ir šķidrums plūsma. Pieauguša cilvēka zarnu traktā ik dienas nonāk apmēram 9 litri šķidrums – 2 litri tiek uzņemti ar pārtiku un 7 litri – ar gremošanas sekrētiem, kuru sastāvā ir ūdens, joni un enzīmi. Zarnu sienīgai peristaltējot, veidojas tā sauktais barības hīmuss, 90 – 95% no tā tiek reabsorbēts tievajās zarnās. Ja medikamentu iespaidā vai patoloģiska procesa iespaidā rodas intestinālā stāze, novēro tranzitorās vai subdominālās floras savairošanos [Heritage *et al.*, 2000].

Zarnu gļotāda veic vairākas aizsargfunkcijas. Tās sastāvā ir biķeršūnas, gļotu šūnas, oligomukoīdās šūnas, kas producē virsmu pārklājošu gļotu slāni. Zarnu gļotādas struktūrā ir daudz imūnkompetentu šūnu – T un B limfocīti, plazmas šūnas, makrofāgi un segmentkodolainie limfocīti. Limfoplazmatiskās šūnas ir grupētas Peijera plātnītēs, kuru īpaši daudz ir *ileum* cilpās, tāpēc zarnu traktu var uzskatīt par īstu limfātisku orgānu, tāpat kā, piemēram, liesu vai aizkrūtes dziedzeri. Gļotādas plazmas šūnas *lamina propria* veido IgA, kas enterocītos tiek savienots „pāros” kopā ar tā saukto sekretoro komponentu. Jaunveidotais komponents zarnu lumenā spēj sasaistīties ar toksīniem un baktērijām, veidojot imūnās aizsardzības pirmo līniju [Heritage *et al.*, 2000].

3.1.2. Disbakteriozi izraisošie faktori

Sabalansētai kuņģa un zarnu trakta mikroflorai ir liela loma organisma aizsardzībā. Antibakteriālās terapijas laikā var notikt dramatiskas izmaiņas normālas mikrofloras sastāvā, jo daļa no jutīgajiem mikroorganismiem aiziet bojā un vietā savairojas organismam kaitīgā mikroflora, tā radot kuņģa un zarnu trakta darbības traucējumus [Sussman *et al.*, 2002].

Visizplatītākās endogēnās infekcijas, kuras saistītas ar antibiotiku lietošanu, ierosina *Candida* ģints sēnes un *C.difficile*. *Clostridium perfringens* (*C.perfringens*), *Stafilococcus aureus* (*S.aureus*) minētas arī kā iemesls antibiotiku asociētām diarejām (AAD) [Gerding *et al.*, 2007]. *S.aureus* kā enterokolīta izraisītājs pirmo reizi aprakstīts 1950. gadā [Acha *et al.*, 2006]. *C.difficile* veido 33% no visām AAD, *C.perfringens* –

15%. *C. difficile* kā etioloģiskais aģents ir gandrīz visiem PMK gadījumiem [Vaichnavi, 2009].

Aplūkojot slimību variāblo pasauli, jāsecina, ka akūtas diarejas joprojām uzskatāmas par globālu problēmu. Akūta infekcioza diareja ir bieža saslimšana gan industriāli attīstītajās, gan mazattīstītajās valstīs. Akūta infekcioza diareja neatkarīgi no tā, vai tā ir virusālas, bakteriālas, parazitiskas vai toksiskas izcelsmes, izjauc zarnu ekoloģiskās sistēmas līdzsvaru [Kuijper *et al.*, 2008].

Normāla zarnu mikroflora spēj ierosināt arī slimības, jo vairums no floras pārstāvjiem ir nosacīti patogēni, kas ierosina slimības noteiktos apstākļos, izjaucot balansu starp mikroorganismiem un saimnieka organismu [Barbut *et al.*, 1996].

Dažādu slimību laikā mainās kvalitatīvās un kvantitatīvās zarnu mikrofloras sastāvs, un ne vienmēr ir viegli novērtēt, kura baktērija uzskatāma par patogēnu un kuru var uzskatīt par nekaitīgu. Termins „disbakterioze” tiek attiecināts uz jebkurām zarnu biocenozes izmaiņām, tomēr mūsdienu zinātnes attīstības līmenī to lietot būtu nekorekti, jo šis termins neatspoguļo galveno procesu, kas notiek zarnu lumenā un sienā, kā arī nedod risinājumu ārstēšanas metodes izvēlei. Var izdalīt vairākas slimības, kuras slēpjas zem termina „disbakterioze”:

- 1) AAD;
- 2) kairināto zarnu sindroms;
- 3) ceļotāju diareja;
- 4) zarnu kandidoze;
- 5) zarnu aspergilloze;
- 6) stafilokoku enterīts [Robertson *et al.*, 1992].

Katrai iepriekš nosauktajai saslimšanai ir savs etioloģiskais faktors, riska faktors, diagnostiskie kritēriji un ārstēšanas taktika [Bukharin *et al.*, 1997].

Atklājot antibiotikas, tās tika uzskatītas par maģiskām zālēm, kas radikāli var izmainīt infekcijas slimību ārstēšanas gaitu. Pagājušā gadsimta sešdesmitajos gados parādījās plaša spektra antibiotikas. Tagad daudzi eksperti ir norūpējušies, ka antibiotiku ēra ir beigusies. Kaut gan antibiotikas ir izglābušas vairāk dzīvību nekā jebkuras citas zāles, to lietošana ir devusi impulsus vislielākajām pārmaiņām populācijas ģenētikā, ir radušies antibiotiku rezistences gēni baktēriju populācijās. Rezistences gēni var būt iekļauti nelielās DNS daļās – transpozonos, kas ļauj tiem pārvietoties no vienas DNS daļas uz citu [Cornaglia *et al.*, 2004].

1988. gadā ASV visbiežāk izrakstītais medikaments bija amoksicilīns. 35% no 57,8 miljoniem medikamentu, kas tika parakstīti bērniem vecumā līdz 3 gadiem, bija antibakteriālie līdzekļi. Amerikas ārstu kolēģija secina, ka vairāk nekā 64% antibiotiku nozīmējumi slimnīcās nav nepieciešami vai tiek lietoti neatbilstošās devās [Wolfhagen *et al.*, 2000]. Nepareiza antibiotiku lietošana paaugstina blakusparādību rašanās risku. Šīs blakusparādības var būt specifiskas, piemēram, var radīt smadzeņu vai nieru bojājumus, un nespecifiskas, kas izpaužas kā hipersensitivitāte vai alerģiska reakcija. Galvenais – visi antibakteriālie līdzekļi izraisa normālas mikrofloras līdzsvara izjaukšanu, kas noved pie superinfekcijas, sēnīšu vai patogēno baktēriju augšanas [Wolfhagen *et al.*, 2000, John, 2002]. Viegļu pašlimitējošu diareju pēc antibakteriālās terapijas novēro samērā bieži, to izraisītāju bieži noteikt ir grūti. Tomēr ir gadījumi, kad uz antibiotiku lietošanas fona sākas smagas persistējošas diarejas un/vai attīstās PMK. Jāņem vērā, ka pretsēnīšu un pretvīrusu līdzekļi arī pieder antibiotiku grupai. [Starr *et al.*, 2005].

3.1.3. Akūta infekcioza diareja

Baktēriju populācijas spējīgas dubultoties 20 – 30 minūšu laikā, tāpēc baktērijas no subdominanta stāvokļa var pāriet dominantā stāvoklī. Intestinālo ekosistēmu var izjaukt, piemēram, saindēšanās ar pārtiku, uzņemot lielu daudzumu virulentu mikrobu, antibiotiku terapija, intestinālā stāze, zarnu gļotādas pārmaiņas, imūndeficīta stāvokļi, neadekvāta barošana, vecums. Jebkurš etioloģiskais faktors, kurš izraisa akūtu infekciozu diareju, izjauc normālo zarnu trakta mikrofloras līdzsvaru kungā un zarnu traktā [Barbut *et al.*, 2007, Chandler *et al.*, 2007].

Akūtu infekciozu diareju var izraisīt:

1) vīrusi

50 – 70% gadījumu. Visbiežāk tie ir *Rotavirus* (50 – 60% gadījumu), retāk *Adenovirus*, *Enterovirus*, *Coxsackie*, *Echovirus*, bet *Astrovirus* un *Calcivirus* vēl retāk;

2) baktērijas

20 – 25% gadījumu, visbiežāk *Campylobacter*, *Salmonella*, *Esherichia coli* grupa, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella*;

3) parazīti

mazāk par 5% no visiem gadījumiem, *Cryptosporidium* un *Giardia lamblia* ir biežāk minētie literatūrā no šīs grupas.

Katram no iepriekš uzskaitītajiem patogēniem ir atšķirīgs darbības mehānisms. Potenciāli patogēno aģentu sadalījums saistībā ar iespējamo darbības mehānismu organismā var būt citopātisks, citotoksisks vai enteroinvazīvs [Wilson *et al.*, 2002] (Tabula 2).

Tabula 2. Galvenie enteropatogēnu darbības mehānismi [Wilson *et al.*, 2002].

Citopātisks efekts	Citotoksisks efekts	Enteroinvazīvs efekts
<i>Rotavirus</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>C.jejuni</i>
<i>G.lambliae</i>	<i>C.difficile</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Cryptosporidium</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Shigella</i>
	<i>K.pneumoniae</i>	
	<i>C.freundii</i>	
	<i>Shigella</i> (toksīns)	

3.1.4. Akūtas infekciozas diarejas bērniem

Pasaulē ik gadu no akūtas diarejas mirst vairāk nekā 5 miljoni bērnu vecumā līdz pieciem gadiem.

Īpaša vērība jāpievērš bērniem, kuri ietilpst riska grupās un kuriem attīstās diareja. Tie ir pacienti ar novājinātu imūnsistēmu, bērni ar smagām fona saslimšanām un zīdaiņi vecumā līdz 12 mēnešiem. Virālās zarnu infekcijas pārsvarā sastopamas rudenī un ziemā, savukārt bakteriālas izcelsmes infekcijas sastopamas vasarā un rudenī [Bhan *et al.*, 1998].

Bērni līdz divu gadu vecumam pārsvarā slimo ar virālas dabas zarnu infekcijām, savukārt pirmskolas un skolas vecuma bērniem dominē bakteriālas dabas zarnu infekcijas. Akūtas diarejas infekciozie cēloņi bērniem var būt vīrusi, baktērijas un parazīti [Grove, 2004] (Tabula 3).

Tabula 3. Akūtas diarejas infekciozie cēloņi [Grope, 2004].

Vīrusi (50 – 70%)	Baktērijas (20 – 25%)	Parazīti (5%)
Kalīcivīruss	Aeromonas	Lamblijas
Korona vīruss	Kampilobaktērijas	Kriptosporīdijas
Rotavīruss	Klostrīdijas	Entaamēbas
Adenovīruss	Salmonellas	
Enterovīruss	Šigellas	
Astrovīruss	Jersinijas	
Norvalka vīruss	Stafilokoki	

Galvenās sūdzības ir sāpes vēderā, diareja un vemšana. Pirmajā dzīves gadā un agrīnajā bērnu vecumā reti sastop izolētus tievo vai resno zarnu bojājumus, parasti tiek bojāts viss zarnu trakts un slimība izpaužas kā akūts enterokolīts, jo akūta diareja ir šķidruma apmaiņas disbalanss zarnu gļotādā, pieaugot šķidruma zudumam pastiprinātas sekrēcijas un samazinātas absorbcijas dēļ [Walker-Smith *et al.*, 1997].

Veicot laboratoriskos izmeklējumus, vēlams veikt pilnu asins ainu, lai atdiferencētu virālu saslimšanu no bakteriālas, kā arī, lai izslēgtu sistēmiskas infekcijas iespēju. Būtisku nozīmi diagnozes precizēšanai var dot arī koprogrammas analīze. Leikocītu, eritrocītu un gļotu klātbūtne liecina par invazīvu vai citotoksiskus producējošu mikrobu klātbūtni (*C.jejuni*, *E.colli*, *C.difficile*, *Y.enterocolitica*). Šīs izmaiņas nav raksturīgas vīrusu diarejām. Visiem pacientiem ar akūtu diareju veic fēču bakterioloģisko izmeklēšanu uz patogēno mikrofloru. Pacientiem ar aizdomām par bakterēmiju vai sepsi veic asins kultūras izmeklēšanu [Loffler *et al.*, 2004].

Terapijas pamatprincips ir dehidratācijas novēršana. Antibakteriālās terapijas indikācijas bērniem ir:

- 1) pacienti ar bakterēmiju vai sepsi;
- 2) pacienti, kas jaunāki par 12 nedēļām;
- 3) pacienti ar smagu slimības gaitu, tajā skaitā hemokolītu;
- 4) pacienti ar vairāk nekā vienu infekciju;
- 5) pacienti ar novājinātu imūnsistēmu;
- 6) pacienti ar smagām fona saslimšanām;
- 7) pacienti ar klostridiozi, holēru, lambliozu, šigellozi [Dutta *et al.*, 1994].

3.2. *Clostridium difficile*

3.2.1. Etioloģija

Valsts: *Bacteria*

Šķirne: *Firmicutes*

Klase: *Clostridia*

Rinda: *Clostridiales*

Dzimta: *Clostridiaceae*

Ģints: *Clostridium*

Suga: *C. difficile* (The Merc Manual, 2006)

C. difficile ir grampozitīva, sporogēna, anaeroba bacillus ģints nūjiņa. Tā atrodas daudzos objektos, tāpēc to sauc par ubikvitāru (visuresošu) mikroorganismu [Johnson *et al.*, 1999, Lawrence *et al.*, 2007, Kuijper *et al.*, 2006, Kuijper, Suravicz *et al.*, 2008, McDonald *et al.*, 2007]. Baktērija atrodas līdz 21% augsnes paraugos, ūdenī, daudzu dzīvnieku zarnu traktā. Ne pārāk bieži, taču tā atrodama arī veselu cilvēku zarnu traktā – ne vairāk kā 5% veselu cilvēku no fēcēm var izdalīt *C. difficile* [Biller *et al.*, 2007, Vaischnavi, 2009]. Līdz 50% veselu jaundzimušo un bērniem jaunākiem par vienu gadu kuņģa un zarnu traktā var būt kolonizācija ar toksisku *C. difficile* celmu, neizraisot saslimšanu. To izskaidro ar augstu antivielu titru pret *C. difficile* bērna organismā, ko saņem no mātes [Alfa *et al.*, 1998]. Reizēm mikroorganismu sastop arī makstī un

urīnizvadkanālā. Gados vecākiem cilvēkiem, sevišķi tiem, kuri ārstējušies stacionārā, kolonizācijas procents var sasniegt 10 – 20%, jo slimnīcas vide bieži ir piesārņota ar *C.difficile* sporām. Veģetatīvās baktērijas aiziet bojā, bet sporas var dzīvot mēnešiem un pat gadiem ilgi [Kuijper, Surawicz *et al.*, 2008].

C.difficile pirmo reizi izolēja 1935. gadā. Līdz 1970. gadam to uzskatīja par nepatogēnu zarnu mikrofloras pārstāvi, kad noskaidroja *C.difficile* lomu CDAD attīstībā un 1978. gadā PMK attīstībā [Limbaro *et al.*, 2009].

Pirmsantibiotiku ērā *C.difficile* infekciju novēroja tikai pēc zarnu ķirurģiskām operācijām, jau vēlāk parādījās dati par infekcijas saistību ar antibakteriālo terapiju. Ir zināmi atsevišķi ziņojumi par sabiedrībā iegūtu *C.difficile* infekciju, kā arī par *C.difficile* diareju, kas nav saistīta ar iepriekšēju antibakteriālu terapiju [Barbut, Lalande *et al.*, 2007]. Uzņēmīgāki ir veci cilvēki, jo tiem zarnu kolonizācijas rezistence, kuru nodrošina zarnu normāla mikroflora, ir daudz zemāka, un antibiotiku iespaidā tā pazeminās vēl vairāk [Kuijper, Surawicz *et al.*, 2008].

Sastopamas toksiskās un netoksiskās *C.difficile* baktērijas. Tiek uzskatīts, ka smagas slimības sekas rada toksisko baktēriju formas, bet ir pētījums, kur hematoloģijas/onkoloģijas klīnikā tika izolēti 23 toksiski un 13 netoksiski *C.difficile* celmi, kuri izraisīja diarejas. No septiņiem pacientiem ar smagu diareju (10x dienā) četros gadījumos kā diarejas izraisītāja tika apstiprināta netoksiskā *C.difficile* baktērijas forma [Martirosani *et al.*, 2004].

Nokļūstot nelabvēlīgos apstākļos, baktērija spēj veidot sporas. Tās kļūst noturīgas pret izžūšanu, augstas temperatūras iedarbību, ķīmiskām un dezinfekcijas vielām. Sporām ir biezs apvalks, kas sastāv no lipīdiem, Ca sāļiem, minerāliem un brīvā ūdens. Sporu veidošanās process ilgst 18 – 20 stundas. Nonākot labvēlīgos apstākļos – barības vielu klātbūtnē, pietiekamā mitrumā un optimālā vides temperatūrā, sporas pāraug veģetatīvās formās. Tās uzbriest, apvalkā parādās spraugas, caur kurām izstiepj asniņš, kurš vēlāk pārvēršas par nūjiņu. Viss pārvēršanās process ilgst 4 – 5 stundas [Pepin, Amary *et al.*, 2005].

3.2.2. *C.difficile* galvenie rezistences mehānismi

3.2.2.1. *C.difficile* makrolīdu rezistence

Pazīstamākais un plašāk lietotais makrolīds ir eritromicīns. To 1952. gadā izdalīja no sēnes *Streptomyces erythreus*.

Makrolīdus terapijā izvēlas penicilīna, tā atvasinājuma un cefalosporīnu rezistences gadījumos. Visas makrolīdu-linkozamīda-streptogramīna B (MLSB) grupas antibiotikas piesaistās pie ribosomas 50S subvienības un kavē mikroorganismu proteīnu sintēzi. Tas nozīmē: ja ir rezistence pret vienu MLSB antibiotiku, rodas rezistence arī pret pārējām MLSB grupas antibiotikām [Rese *et al.*, 2000].

Gēni, kas nosaka rezistenci pret makrolīdiem, ir:

1. *mefA* gēns

Šis gēns rada rezistenci tikai pret makrolīdu grupas antibiotikām. Gēns kodē eflukss pumpja sistēmu, kas izvada makrolīdu antibiotikas no šūnas pirms to piesaistīšanās pie ribosomas. Visbiežāk šis gēns sastopams *Streptococcus* ģints mikroorganismiem, taču atklāti arī *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* un citām ģintīm [Rese *et al.*, 2000, Fluit *et al.*, 2001].

2. *erm* gēns

Pastāvīga rezistence fenotipiski izpaužas kā pilnīga rezistence pret visām MLSB grupas antibiotikām. Savukārt inducētā MLSB rezistence rodas vienai antibiotikai (eritromicīnam) inducējot citas antibiotikas (klindamicīna) rezistenci [Fluit *et al.*, 2001, Rese *et al.*, 2000]. Gēns *ermB* ir biežākais makrolīdu rezistences gēns, un tas sastopams *Enterococcus* un *Streptococcus* ģintīm, kā arī *Clostridium* ģintij [Pituch *et al.*, 2007]. Ir aprakstīts uzliesmojums Amerikas klīnikā, kur vairākiem *C.difficile* celmiem bija atklāts *ermB* rezistences gēns pret klindamicīnu [Johnson *et al.*, 1999].

3.2.2.2. *C.difficile* fluorhinolonu rezistence

Baktērijas DNS girāzes ir galvenais mērķis florhinoloniem. To plašā lietošana stacionāros ir galvenais riska faktors rezistences izveidē gan pret vecākiem šīs paaudzes preparātiem, gan pret jaunākām florhinolonu grupas antibiotikām. Īpaši moksifloksacīna un levofloksacīna lietošana ir saistīta ar *C.difficile* toksinotipa III, ribotipa 027 celma izplatību [Spigaglia *et al.*, 2009].

Divi gēni nosaka rezistenci pret fluorhinoloniem – *gyrA* un *gyrB*, tie ir reģionu substitūcijas, kurās ir aminoskābju secības izmaiņas, kas nosaka izturību pret florhinoloniem [Ackermann *et al.*, 2001]. Gēni *gyrA* un *gyrB* ir iesaistīti krusteniskā rezistencē pret ciprofloksacīnu un moksifloksacīnu [Dridi *et al.*, 2002].

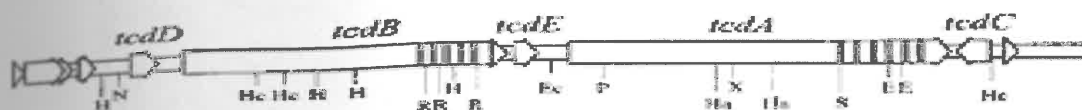
3.2.2.3. *C.difficile* citu veidu rezistence

C.difficile ir rezistenta pret visām antibiotikām, izņemot metronidazolu un vankomicīnu. Zinātnieki uzskata, ka jaunie bakteriālie celmi var kļūt rezistenti arī pret šīm antibiotikām [Wenisch *et al.*, 1996]. Aprakstīts infekcijas uzliesmojums Kanādā 2008. gadā, kur atkātajiem celmiem tika novērota pazemināta jutība pret metronidazolu [Martin *et al.*, 2008]. Ir aprakstīti *C.difficile* celmi, kuri uzrāda pilnu rezistenci pret metronidazolu. [Pelaez *et al.*, 2008].

Literatūrā ir ziņojumi par rifamicīna rezistentu *C.difficile* klonu rašanos pēc ārstēšanas neveiksmēm slimnīcās, kurās plaši lieto rifamicīnu [Curru *et al.*, 2009].

3.2.3. *C.difficile* patogenitātes lokuss (PaLoc)

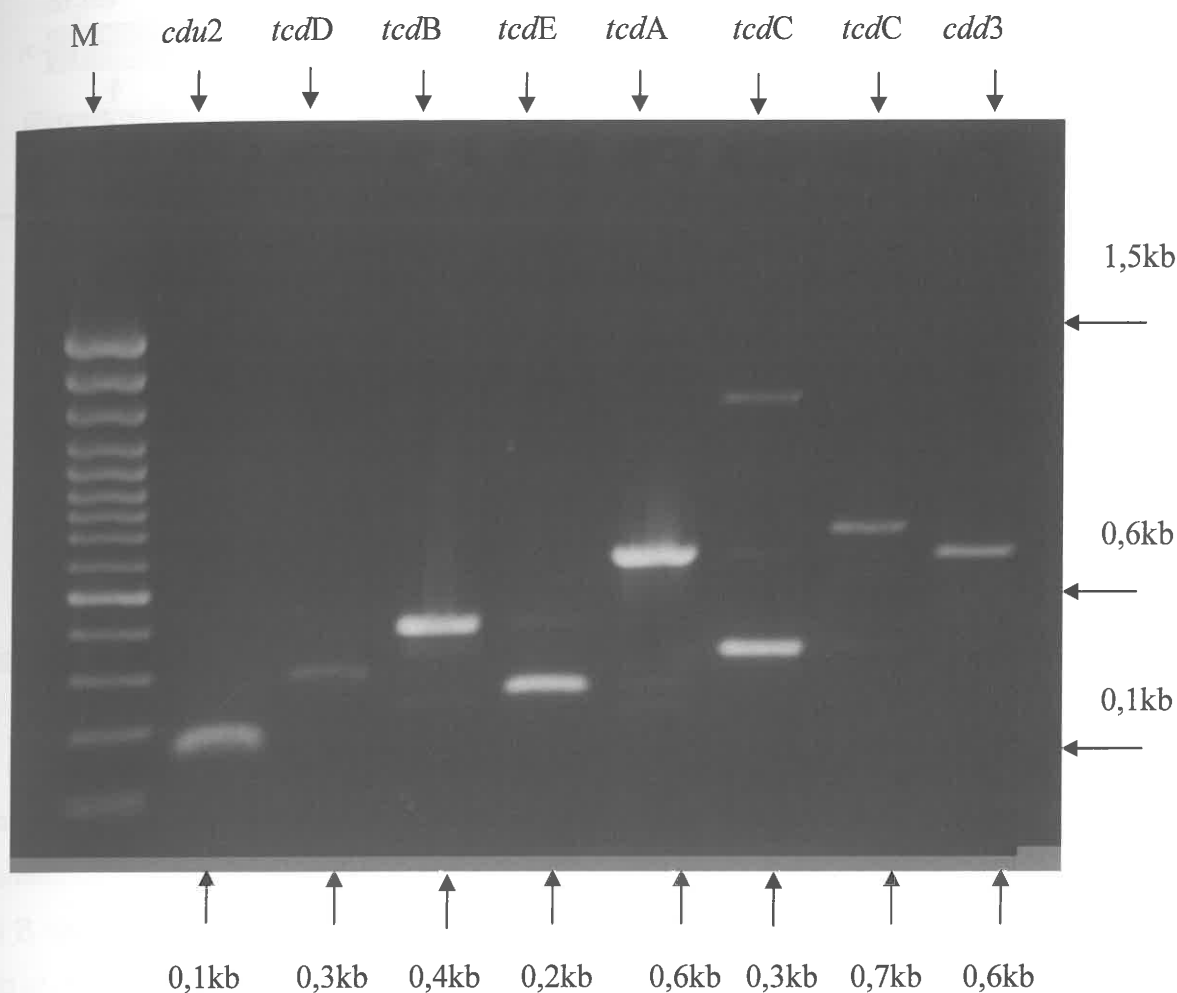
C.difficile PaLoc uzbūvi determinē toksinogēni A un B (*tcdA*, *tcdB*) un regulētājgēni D, E, C (*tcdD*, *tcdE*, *tcdC*), starp gēniem izvietotas restrikcijas saites. [Voth *et al.*, 2005, Spigaglia *et al.*, 2002, Moxon *et al.*, 1994] (Attēls 1).



Attēls 1. *Clostridium difficile* PaLoc uzbūve [Spigaglia *et al.*, 2002]:

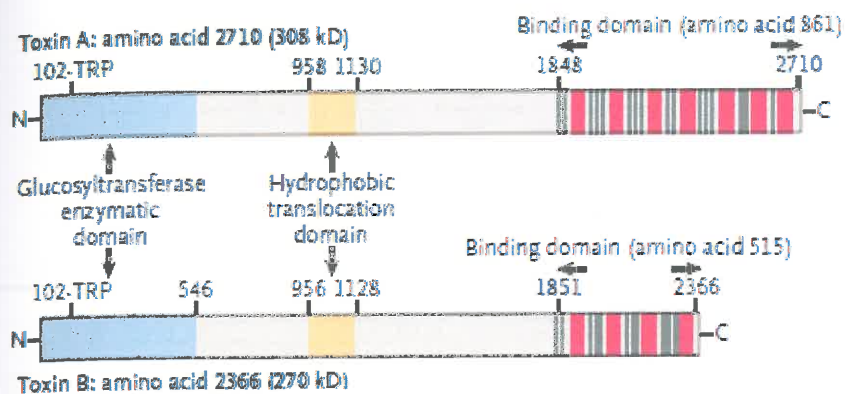
tcdA, *tcdB* – toksinogēni, *tcdD*, *tcdE*, *tcdC* – regulētājgēni.

PaLoc veidojošos gēnus (toksinogēnus, regulētājgēnus) amplificējot ar specifiskiem praimeru pāriem var identificēt zinot katra gēna fragmenta lielumu kb, ko vizualizē gēla elektroforēzē uz transiluminatora (Attēls 2).



Attēls 2. *C.difficile* toksinogēnu, regulētājgēnu PĶR amplifikācijas produkti un to izmēri kb.

C.difficile toksinogēni ir hromosomāli gēni. No šo gēnu ekspresijas pakāpes ir atkarīga toksīnu produkcija un mikroorganisma virulence. Atklātie divi toksinogēni ir enterotoksīns A un citotoksīns B. Pilna nukleotīdu secība toksīniem A un B ir noteikta vēsturiskajam references (VPI) celmam 110463 [Hamond *et al.*, 1995]. Toksīnu A kodē 2710 aminoskābes, tā izmērs ir 308kDa, tas ir garākais no bakteriālajiem toksīniem. Toksīnu B kodē 2366 aminoskābes, tā izmērs ir 270kDa. Toksīna daļa satur 63% variablās un 49% identiskās aminoskābes un trīs domēnus: enzīmu, saistošo un hidrofobo. Toksīnā A aminoskābju secība KAVTGxxTlxGxxYYFxxNGx atkārtojas 38 reizes, bet toksīnā B – 24 reizes [Kelly *et al.*, 2008] (Attēls 3).

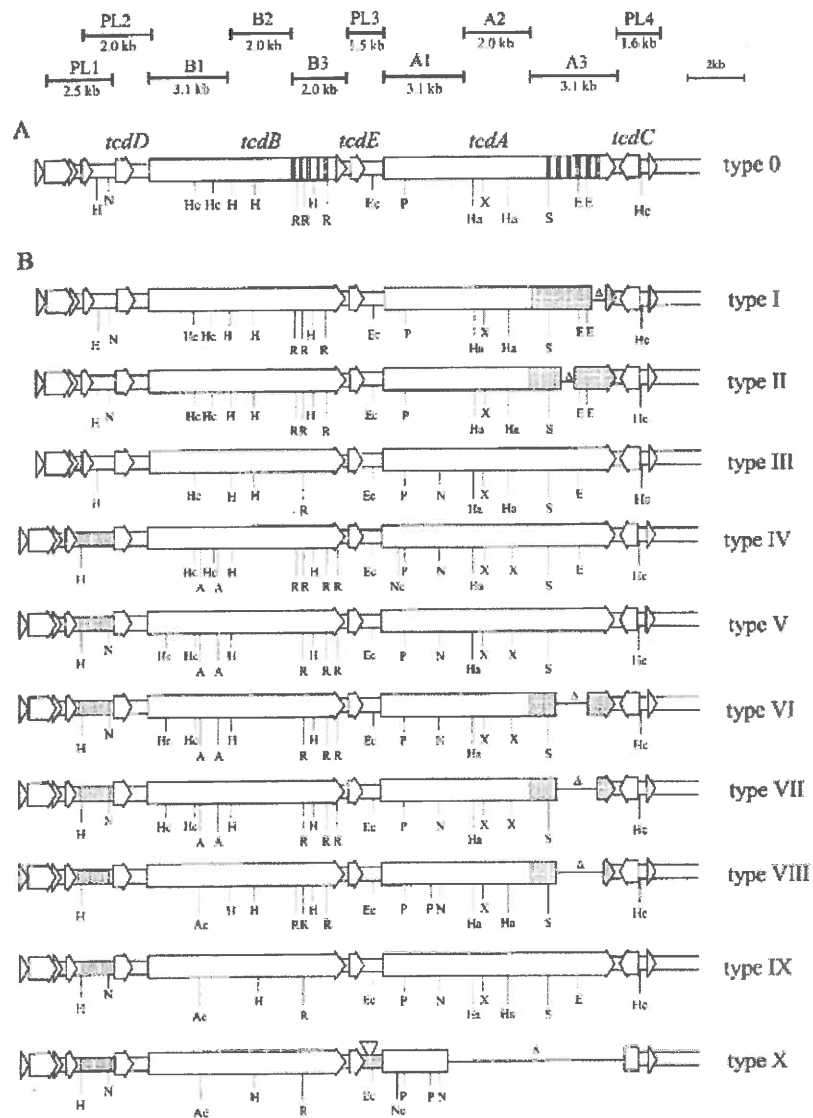


Attēls 3. Toksīnu A un B domēnu izmēri un shematiskais izvietojums [Kelly *et al.*, 2008].

Papildus A un B toksinogēniem atklātie regulētājkēni – *tcdC*, *tcdE* un *tcdD* ir atbildīgi par virulences gēnu transkripciju baktērijās. Toksīns A ir enterotoksīns, kurš izraisa šķīduma sekrēciju, gļotu bojājumus un iekaisumu. Tas cieši saistīts ar baktērijas dzīves mehānismiem un atbrīvojas no baktērijām šūnu sabrukšanas procesā. Tā ietekmē veidojas klīniskā aina ar paaugstinātu temperatūru un smagu vispārējo stāvokli. Toksīns B ir potents citotoksīns. Tiek uzskatīts, ka galvenais virulences faktors ir toksīns A, bet toksīns B sinerģiski ar to sadarbojas, un tie kopā spēj radīt smagas slimības izpausmes [Poxton *et al.*, 2001, Wolfhagen *et al.*, 2000].

Britu zinātnieki ir jau apstiprinājuši, ka pēc viņu pētījumiem *C.difficile* ir spējīga neiedomājami ātri uzkrāt mutācijas un apmainīties ar gēniem, tā nodrošinot savu dzīvotspēju. 10% genoma sastāv no mobiliem ģenētiskiem posmiem, tas ir, nukleotīdu secība var pārvietoties no viena organisma uz otru, tāpēc rodas baktērijas, kurām ir gēni, kas padara viņas tik patogēnas [Voth *et al.*, 2005, McDonald *et al.*, 2005].

Ir zināmi 11 *C.difficile* toksinotipi [Delme *et al.*, 2000] (Attēls 4). Viena toksinotipu grupa apvieno mikrobu celmus ar identiskām izmaiņām PaLoc reģionā. Ir pārstāvēti pieci lasīšanas rāmji ar diviem toksinogēniem (*tcdA* un *tcdB*) un trīs papildu gēniem (*tcdC*, *tcdD*, *tcdE*). VPI 10,463 celmu uzskata par 0 toksinotipu [Hamond *et al.*, 1995], bet ir vēl iespējami 10 PaLoc varianti (Attēlā 4 type 1 to 10). A3 fragmenta delēcija ir 1, 2, 4, 7 un 8 tipam, bet insercija 4 un 10 tipam [Rupnik *et al.*, 1998, Limbargo *et al.*, 2009].



Attēls 4. *C.difficile* 11 toksinotipi [Rupnik *et al.*, 1998].

PL1, PL2, PL3, PL4, B1, B2, B3, A1, A2 – baktērijas DNS fragmenti, kb – fragmenta lielums kilobāzēs; Type I – Type X – toksinotipu variācijas

3.2.4. Ar antibiotiku lietošanu saistītā *C.difficile* saslimšana

Infekcijas slimību ārstēšanā svarīga loma ir savlaicīgai diagnostikai. Tradicionālā mikrobioloģiskā metode – uzsējums, kaut arī ir precīza, tomēr prasa vairākas dienas. Tāpēc bieži slimība tiek izārstēta, pirms atnākusi izmeklējumu atbilde. Šāda empīriskā ārstēšana bez izraisītāja zināšanas noved pie plašāka spektra antibiotiku lietošanas un izmaksu palielināšanās, tiek radītas selektīvas priekšrocības pret antibiotikām rezistentiem mikroorganismiem un/vai atvieglota citu patogēnu nonākšana slimnieka organismā.

Atklājumu sākumā *C.difficile* infekcija tika uzskatīta par antibakteriālās terapijas rezultātu, nevis par dzīvībai bīstamu slimību. Cilvēks ir radījis apstākļus, kas ir labvēlīgi *C.difficile* attīstībai. Ķirurģiska profila pacienti veido 55 – 75% no visiem CDAD slimniekiem, jo šiem slimniekiem infekcijas profilaktiskajos nolūkos tiek bieži nozīmētas antibiotikas [Vaichnavi, 2009].

C.difficile uzskatāms par vienu no biežākajiem hospitālās diarejas un ar antibakteriālo terapiju saistītā kolīta iemesliem. Slimības izpausmes var variēt no asimptomātiskas nēsāšanas, vieglas vai vidēji smagas diarejas līdz pat dzīvību apdraudošajam PMK un TM ar perforāciju [Johnson *et al.*, 2001, Kelly *et al.*, 1991, Gerding *et al.*, 1995]. Asimptomātisku nēsātāju ir daudz vairāk nekā to, kuriem rodas smagas diarejas, šiem pacientiem ir liels skaits baktēriju koloniju zarnu traktā, bet zems toksīnu līmenis. Nav zināms, kāpēc dažiem cilvēkiem pēc inficēšanās ar *C.difficile* rodas smags kolīts, bet citiem pat neparādās klīniskie simptomi [McFarland *et al.*, 1989]. 60 – 70% gadījumu PMK ierosinātājs ir *C.difficile*.

Ar CDAD apzīmē šādu izpausmju kopumu:

- 1) diareja – neformētas fēces, kas pieņem paraugu savākšanas trauka formu;
- 2) TM – radioloģiski pierādīta resno zarnu dilatācija bez cita zināma etioloģiska aģenta, kas atbilst vienam vai vairākiem šādiem kritērijiem – fēču parauga laboratoriskā izmeklēšanā ir konstatēts pozitīvs *C.difficile* toksīns A un/vai B vai fēču paraugā tiek atrasts toksīnu ražojošs *C.difficile* celms;

- 3) PMK – kas redzams endoskopiskās izmeklēšanas vai operācijas laikā, kā arī PMK, kas noteikts patohistoloģiskās izmeklēšanas laikā [McDonald *et al.*, 2005].

No 1978. gada *C.difficile* tika atzīta par PMK izraisītāju, kā arī atklāta tās saistība ar antibakteriālās terapijas asociēto kolītu. CDAD rādītāji ir dramatiski pieauguši pēdējo divu desmitgažu laikā [Beer *et al.*, 2006]. *C.difficile* infekcijas attīstības riska pakāpe ir saistāma ar terapijā izmantotās antibiotikas veidu [Vaichnavi, 2009] (Tabula 4). Infekcija var attīstīties no 5 līdz 30% pacientu, kas saņem antibakteriālo terapiju. 5 – 10%, kuri saņem ampicilīnu, 10 – 25%, kuri saņem amoksicilīna/klavulanskābes kombinētās antibiotikas, 15 – 20%, kuri saņem cefiksīnu, un 25%, kuri saņem citas antibiotikas [O’Conor *et al.*, 2008]. Saslimstībai vērojama tendence pieaugt, antibiotiku spektram kļūstot plašākam. CDAD ir galvenais jatrogēno diareju uzliesmojumu cēlonis [Wilson *et al.*, 2006]. CDAD ievērojami palielina mirstību un izmaksas stacionāra pacientu ārstēšanā. 20% no hospitalizētiem pacientiem *C.difficile* infekciju iegūst stacionārā, un 30% no tiem attīstās diareja [Bartlett *et al.*, 1992].

Kvebekas epidēmijas laikā 8000 CDAD gadījumu gada laikā florhinolonu lietošana tika noteikta kā riska faktors infekcijas attīstībai [Pepin *et al.*, 2004]. Smagi CDAD gadījumi konstatēti Vācijā, un tie cieši saistīti ar antibakteriālo terapiju, jo īpaši ar cefalosporīnu un florhinolonu lietošanu, kuri saņemti trīs mēnešu laikā pirms simptomu parādīšanās [Weis *et al.*, 2008].

Tabula 4. Antibakteriālie preparāti un *C.difficile* infekcijas risks [Vaichnavi *et al.*, 2009].

Augsts risks	Vidējs risks	Zems risks
cefalosporīni	ampicilīns/amoksicilīns	aminoglikozīdi
klindamicīns	kotrimoksozols	metronidazols
	makrolīdi	antipseudomonu penicilīni
	tetraciklīni	hinoloni
		rifampīns
		vankomicīns

Ja cilvēka gremošanas traktā iekļūst *C.difficile* sporas, tas nebūt nenozīmē tālāku infekcijas attīstību, var būt šādi iznākumi:

- 1) izdalīšanās – *C.difficile* pilnībā izzūd no organisma;
- 2) asimptomātiska zarnu trakta kolonizācija;
- 3) diareja;
- 4) kolīts;
- 5) PMK;
- 6) *exitus letalis*.

Tieši attīstoties PMK, saslimšanai var būt letāls iznākums [Dallal *et al.*, 2002, Muto *et al.*, 2005, Warny *et al.*, 2005]. Pēdējo 10 gadu laikā mirstība 30 dienu laikā pieaugusi no 4,7 līdz 13,8% [Loo *et al.*, 2005]. PMK gadījumā resnās zarnas gļotādu klāj fibrinozas pseidomembrānas, kas ir toksīnu iedarbības sekas, jo PMK gadījumos slimnieku fēcēs 95% gadījumu atrod *C.difficile*. Pseudomembrānas ir veidotas no nekrotiskiem audiem, iekaisuma šūnām un fibrīna, kas producējas iekaisuma laikā [LaMont *et al.*, 2006].

3.2.5. *C.difficile* infekcija bērniem

C.difficile infekcija bērniem no 1997. gada līdz 2006. gadam ir pieaugusi no 7,24 gadījumiem līdz 12,80 gadījumiem uz 10 000 hospitalizētu bērnu. BI/NAP1/027 celms komplikācijas rada 4 reizes vairāk nekā citi celmi [Zilberg *et al.*, 2010].

Bērniem, jaunākiem par vienu gadu, toksīna B atrašana fēcēs ir klīniski maznozīmīga atradne, jo 50% bērnu var būt kuņģa un zarnu trakta kolonizācija ar toksisko baktērijas celmu bez klīniskās simptomātikas [Vaischnavi, 2009]. Līdz 50% zīdaiņu toksiskās *C.difficile* iegūst slimnīcās un bērnudārzos [Tracy *et al.*, 2003], nevis no mātes [Al-Jumaili *et al.*, 1984]. Lielāks risks saslimt ar *C.difficile* infekciju ir bērniem vecumā no 3 līdz 18 gadiem [Zilberg *et al.*, 2010, Zweiner *et al.*, 1989]. Bērni ar cistisko fibrozi var būt asimptomātiski *C.difficile* pārnēsātāji [Alfa *et al.*, 1998].

1988. gadā pētījumi ASV atklāja, ka 2% no 6546 bērniem, kuri tika hospitalizēti speciālās un vispārējās nodaļās (izņemot neonatālos un vēža slimniekus), konstatēja patoloģisku reakciju uz zālēm. No astoņām visbiežāk lietotajām zālēm, kas izraisīja blakusparādības, trīs bija antibakteriālie līdzekļi – ampicilīns, amoksicilīns,

kotrimaksozols. 1985. gada pētījums, kas ietvēra 4244 bērnus, parādīja, ka galvenā antibakteriālās terapijas izraisītā blakusparādība ir izsitumi un gastrointestinālie traucējumi. Ir ziņojumi ne tikai par smagiem kolītiem [Spivack *et al.*, 2003, Klein *et al.*, 2006, Rozkiewicz *et al.*, 2005], bet arī par ekstraintestinālām infekcijām bērniem, kuru izraisītāja ir *C.difficile* [Byl *et al.*, 1996, Feldman *et al.*, 1995, Garcia *et al.*, 2001]. 2003. gadā ziņots par gadījumu kādā Lielbritānijas klīnikā, kur tika hospitalizēts 10 gadus vecs, iepriekš vesels bērns ar sūdzībām par sāpēm vēderā, diareju un sāpēm labajā gūžā. Mājas apstākļos bērnam kakla mandeļu iekaisums tika ārstēts ar eritromicīnu (500 mg dienā), vēlāk ar penicilīnu (250 mg dienā). Trešajā slimības nedēļā sākās sāpes vēderā un labajā gūžā. Bērns tika hospitalizēts ar diagnozi kolīts un reaktīvs artrīts. Pēc laprotomijas, trešajā hospitalizācijas dienā fēču paraugā atklāja *C.difficile* toksinogēnus *tcdA+* /*tcdB+*. Tika uzsākta terapija ar metronidazolu (7,5mk/kg/i/v/3x dienā). Ceturtajā dienā šī terapija tika nomainīta uz perorālu metronidazola terapiju. Īsā laikā pēc terapijas uzsākšanas tika novērota uzlabošanās un izrakstīšanās. Kopumā bija vienpadsmit dienu terapija ar metronidazolu. Šis gadījums parāda klasisku *C.difficile* kolīta un reaktīva artrīta ainu [Durand *et al.*, 2009].

Ir ziņojumi no Francijas [Löffler *et al.*, 2004] un ASV [Zweiner *et al.*, 1989] par *C.difficile* izraisītu reaktīvu artrītu bērniem un *C.difficile* izraisītu plaušu empiēmu bērnam [Gravisse *et al.*, 2003]. Ir ziņojumi par histopatoloģiski un endoskopiski pierādītiem PMK gadījumiem bērniem, kuri slimo ar Hiršprunga slimību vai hematoloģiski ļaundabīgiem audzējiem [Vaichnavi, 2009].

3.2.6. Patogēnēze

Cilvēks ik dienas uzņem vidēji 1,5 litrus šķidruma. Kopā ar 1 litru siekalu, 2 litriem kuņģa sulas, žulti un 4 litriem zarnu un aizkuņģa dziedzera sulas veido 8,5 litrus šķidruma, kas ik dienas nonāk gremošanas traktā. Vairāk nekā 90% šķidruma uzsūcas tievajās zarnās, 4 – 5 litri šķidruma uzsūcas *jejunum*, 3 – 4 litri uzsūcas *ileum*. Resnajās zarnās nonāk apmēram 1 litrs šķidruma, no kura reabsorbējas vēl 800 mililitri dienā. Tādējādi ar fēcēm izdalās 200 mililitri šķidruma dienā, bet pārējos vairāk nekā 8 litrus absorbē kuņģa un zarnu trakts.

Normālai zarnu mikroflorai ir aizsargājoša loma. Izjūkot zarnu trakta baktēriju līdzsvaru, attīstās akūta diareja, kuras cēlonis ir hipersekrēcija tievajās un resnajās zarnās [John, 2002].

Visbiežākais riska faktors ir antibiotiku lietošana, kas nomāc dabīgo zarnu mikrofloru, bet nedarbojas uz *C.difficile*. CDAD var predisponēt arī citi iemesli, kas izjauc zarnu mikrofloras līdzsvaru – ķīmijterapija, ķirurģiska iejaukšanās, zarnu motilitātes samazināšanās [Bartlett *et al.*, 1992].

Sākumā notiek patogēnu piesaiste zarnu sienīņai. Kolonizējot resno zarnu, *C.difficile* ražo divus toksīnus – toksīnu A un toksīnu B [Volf *et al.*, 2005]. Toksīni izmaina epitēlija barjerfunkciju – epitēlijs kļūst jutīgāks un baktērijas spēj mijiedarboties ar receptoriem caur to virsmas proteīniem. Svarīgākie *C.difficile* virsmas proteīni ir adhezīns – Cwp66, flagelāra vāciņu olbaltumviela – FliD un proteāze – Cwp84. [Pechine *et al.*, 2005].

Toksīns A ir enterotoksīns, izraisa šķīduma sekrēciju, gļotu bojājumus un iekaisumu. Tā ietekmē veidojas klīniskā aina ar paaugstinātu temperatūru un smagu vispārējo stāvokli. Toksīns B ir potents citotoksīns. Tiek uzskatīts, ka galvenais virulences faktors ir toksīns A, bet toksīns B sinerģiski ar to sadarbojas, un tie kopā spēj radīt smagas slimības sekas [Poxton *et al.*, 2001, Wolfhagen *et al.*, 2000]. Toksīns B ir 1000 reižu citotoksiskāks nekā toksīns A. *C.difficile* toksīni veicina interleikīna 8 (IL-8) ekspresiju epitēlija šūnās, kas savukārt regulē neitrofilo leukocītu hemotrakciju un adhēziju, radot zarnu iekaisumu, šūnu nekrozi un olbaltumvielu zudumu. Toksīni traucē arī gļotādas olbaltumvielu sintēzi un palielina kapilāru caurlaidību un zarnu peristaltiku [Durai *et al.*, 2007, Mani *et al.*, 2001].

Ja netiek producēts toksīns A, tad tiek uzskatīts, ka slimības izpausmes būs vieglas un neradīs komplikācijas [Drudy, Fanning *et al.*, 2007, Limaye *et al.*, 2000, Pituch *et al.*, 2001], tomēr ir ziņojums par infekciju, kurā tika atklāti toksīna A negatīvie un toksīna B pozitīvie celmi, kuri radījuši smagus slimības uzliesmojums [Barak *et al.*, 1999, Alfa *et al.*, 2000].

Nav klīniskas nozīmes toksīnu negatīvajiem celmiem, kurus atklāj bērniem, bet ir ziņojumi par PMK uzliesmojumiem ar toksīnu negatīvajiem celmiem pieaugušiem pacientiem [Barbut *et al.*, 2003, Kato *et al.*, 1998, Limaye *et al.*, 2000, Sambol *et al.*, 2000].

Patogēnēzes ainu var iedalīt trīs tipos:

1. tips – tas ir visagrīnākais tips, kad parādās zarnu epitēlija nekrozes zonas, ko pavada fibrīna un neitrofīlo leikocītu izgulsnēšanās zarnu lumenā;

2. tips – izteiktāks eksudāts, kas nāk no epitēlija čūlas, apkārtējā gļotāda ir neskarta;

3. tips – difūza epitēlija nekroze un čūlas, ko pārklāj pseidomembrānas, kas sastāv no mucīna, fibrīna, leikocītiem un atmirušām šūnām [LaMont, 2006].

Toksīni stimulē īpaša paveida zarnu epitēlijšūnas – enterohromafīnās šūnas. Tās izdala serotonīnu (5-OH triptamīnu), šī bioloģiski aktīvā viela piepilda telpu starp epitēlijšūnām. Serotonīns kairina nervgalus, aktivizējot arī zarnu nervu sistēmu. Rezultātā aktivējas zarnu epitēlijšūnas, kuras aktīvi izdala sāļus (Cl^-) un ūdeni. Zarnu saturs kļūst šķidr un sākas diareja [Johnson *et al.*, 1998].

3.2.7. Klīniskā aina

Klīniskā aina atkarīga no:

1) ierosinātāju skaita, kas iekļuvuši organismā; jo labāka higiēna, jo mazāk ierosinātāju nokļūst organismā;

2) baktērijas virulences – jo stiprāka mikroorganisma kapsula, jo izdalās vairāk toksīna, jo lielākas izredzes diarejas attīstībai;

3) cilvēka organisma aizsargfaktoru un imunitātes stipruma.

Vēciem cilvēkiem un maziem bērniem risks inficēties ar *C.difficile* ir lielāks. Risks ir mazāks tiem, kuri regulāri ievēro personīgās higiēnas noteikumus. Svarīgs ir arī kuņģa skābes daudzums – jo skābes daudzums lielāks, jo labāk sagremojas arī mikroorganismi. Cilvēkiem, kuriem ir hipoacīds vai pat anacīds gastrīts un kuri lieto antacīdus, īpaši sodu, pieaug risks infekcijas attīstībai. Jo labāka zarnu peristaltika, jo mazāk iespēju inficēties. Aizcietējumu gadījumā mikroorganismi ilgu laiku pavada sev labvēlīgā vidē un vairojas, līdz rada klīniskas izpausmes. Normālai zarnu mikroflorai ir ļoti liela nozīme kā aizsargfaktoram. Visa mikroflora konkurē viena ar otru dzīves telpas dēļ, daudzi mikroorganismu pārstāvji producē īso ķēžu taukskābes, kas nomāc citus patogēnus. Specifiskā imunitāte izpaužas ar fagocītu, neitrofīlo leikocītu un makrofāgu darbību, kā arī T un B šūnu un humorālo imunitāti [Kelly *et al.*, 1991].

Simptomi sākas vai nu antibiotiku lietošanas laikā, vai vienu nedēļu pēc ārstēšanas kursa, retos gadījumos starplaiks var būt vairākas nedēļas. Pacienti visbiežāk ir viegla vai vidēji smaga pašlimitējoša diareja, var būt arī bieža ūdeņaina diareja ar slēptām asinīm. To pavada sāpes vēdera lejasdaļā. Palpācija pa resnās zarnas gaitu ir sāpīga. Var attīstīties smags kolīts bez pseidomembrānu veidošanās, kam raksturīga profūza, smaga diareja, sāpes vēderā un vēdera pūšanās, tad biežākie sistemātiskie simptomi ir nelaba dūša, drudzis, apetītes zudums, nogurums. Pacienti var attīstīties akūta vēdera aina. Muskuļu tonusa zuduma rezultātā var veidoties TM stāvoklis, kas parasti raksturīgs čūlainajam kolītam [Knoop *et al.*, 1993]. Attīstoties paralītiskajam ileusam un resnās zarnas diletācijai, vēro patoloģisku diarejas apjoma samazināšanos. Ja pastiprinās sāpes vēderā, jāizslēdz zarnu perforācija un peritonīts. Slimības simptomi var būt dažādi un mainīties ik pa stundām, tāpēc ir svarīga slimnieka novērošana un adekvāta situācijas novērtēšana.

No vispārējiem simptomiem novēro tahikardiju, hipotoniju, dehidratācijas un elektrolītu disbalansa pazīmes. Lielas diagnostiskas grūtības sagādātas, ja saslimšana manifestējas ar vispārējiem simptomiem – drebuļiem, kollapsu, bet zarnu simptomi parādās tikai vēlāk [Jones *et al.*, 1997].

Asins izmeklējumos smaga PMK izsīkuma stadijas gadījumos redz leukocitozi, neitrofilozi, ir paaugstināts C – reaktīvais olbaltums (CRO). Bioķīmiskos izmeklējumos ir hipoproteinēmija, hipokaliēmija. Koprokultūru izmeklējumos redz Šarko-Leidiga kristālus [Jones *et al.*, 1997].

3.2.8. Terapija

Akūtas diarejas ārstēšanas galvenais mērķis ir novērst ūdens un sāļu zudumu. To veic ar rehidratējošiem šķidrumiem perorāli vai intravenozi, vadoties pēc dehidratācijas pakāpes. Īpaši svarīgi tas ir bērniem, veciem cilvēkiem un pacientiem ar novājinātu imūnsistēmu. Kontrindikācijas perorālai rehidratācijai ir šoks, apziņas traucējumi, neskaidra diagnoze, spēcīga, nekontrolējama vemšana. Visos citos gadījumos vēlama perorālā rehidratācija [Strehlein *et al.*, 2004].

Diareju efektīvi mazina opiātu receptoru agonists – loperamīds. To lieto pa divām kapsulām pirmajā reizē un pēc tam pa vienai kapsulai pēc katras šķidras vēdera

izejas, bet ne vairāk kā 8 kapsulas dienā. Tomēr nav vēlams veikt pārlietu efektīvu diarejas mazināšanu, jo tiek kavēta zarnu trakta atbrīvošanās no patogēnajām baktērijām. Loperamīdu nenozīmē bērniem, veciem cilvēkiem vai slimniekiem ar smagu pamatdiagnozi [Strehlein *et al.*, 2004].

Diareju mazina ar smektu, šo medikamentu var nozīmēt bērniem un veciem cilvēkiem, tomēr jāņem vērā, ka smektas lietošanas laikā šķidruma zudums nemazinās, medikaments nepalīdz izvairīties no ūdens sāļu vielu maiņas zudumiem.

Diarejas mazināšanai lieto probiotikas. Tie ir bioloģiski preparāti, kuri nodrošina zarnu trakta sanāciju no *C.difficile* sporām. Uz trīs lieliem randomizētiem pētījumiem balstīti rezultāti pierāda, ka *Saccharomyces boulardii* lietošana terapijā spēj novērst antibiotiku radīto disbakteriozi. *Saccharomyces boulardii* terapeitiskais efekts balstās uz antagonistisku darbību pret *C.difficile*, kā arī tās piedalās zarnu trakta barjerfunkcijas atjaunošanā. 250 mg enterola satur 5 miljardus liofilizētu, dzīvotspējīgu *Saccharomyces boulardii* šūnu [Starr *et al.*, 2005].

Ja diareja ir smaga un visas iepriekšējās ārstēšanas metodes nedod uzlabojumus, ir jāizšķiras par antibakteriālu terapiju. *C.difficile* ārstēšanā lieto vankomicīnu, vieglākos gadījumos – metronidazolu. Ievades veids – perorāli vai parenterāli, var kombinēt abus preparātus [Pepin, Valiquette 2005 *et al.*, Blossom *et al.*, 2007]. Tomēr arī antibakteriālā terapija nedod garantiju veiksmīgai esošas infekcijas ārsēšanai un nenovērš recidīvu attīstību, jo antibiotikas nenodrošina pilnīgu zarnu eraditāciju no *C.difficile* sporām [Bouza *et al.*, 2006]. Pēc metronidazola/vankomicīna terapijas 8 – 10 nedēļu laikā infekcijas epizode atkārtojas 8 – 10% gadījumu. Recidīvi saistāmi ar ilgstošiem traucējumiem zarnu florā, sporu noturību, kā rezultātā nespēj pieaugt antivielu līmenis pret *C.difficile* toksīniem. Pašlaik trūkst alternatīvas ārstēšanai ar metronidazolu vai vankomicīnu, nav uz pierādījumiem balstītas ārstēšanas stratēģijas [Aslam *et al.*, 2005, Muscher *et al.*, 2005]. Vadlīnijas pagaidām rekomendē dažādu metronidazola/vankomicīna lietošanas grafikus [vanNood *et al.*, 2009]. Ir pētījumi arī par metronidazola rezistentiem heterogēniem *C.difficile* celmiem [Pelaez *et al.*, 2008]. Pēdējo 10 gadu laikā pieaug kuņģa un zarnu trakta kolonizācija ar vankomicīna rezistentiem enterokokiem un multirezistentiem *enterobacteriaceae*. Tā kā šīm baktērijām rezistences mehānismu veidošanās ir līdzīga ar *C.difficile* rezistences mehānismiem, nākotnē pastāv iespēja attīstīties vankomicīna rezistentām *C.difficile* [Hacek *et al.*, 2001].

Ir pētījumi par vakcinētu pret *C.difficile* govju piena sūkalu izmantošanu infekcijas terapijā [van Nood *et al.*, 2009, Eiseman *et al.*, 1998].

Pasaules praksē pašlaik izmanto šādas ārstēšanas vadlīnijas [vanNood *et al.*, 2009]:

1) Viegla vai vidēji smaga infekcija:

metronidazols 500mg/po/3xd/10–14dienas

vankomicīns 125mg/po/4xd/10–14dienas

2) Otrreizēja infekcija:

vankomicīns 125mg/po/4xd/10–14dienas → vankomicīns 125mg/po/2xd/7dienas →

vankomicīns 125mg/po/1xd/7dienas → vankomicīns 125mg/po/1x2d/8dienas →

vankomicīns 125mg/po/1x3d/15dienas

3) Trīsreizēja infekcija:

vankomicīns 125mg/po/4xd/10–14dienas, ja apvienojums ar kādu citu infekciju, imunoglobulīns 400mg/kg ķermeņa svara 1x/3nedēļās+rifamicīns 400mg/2xd/14dienas.

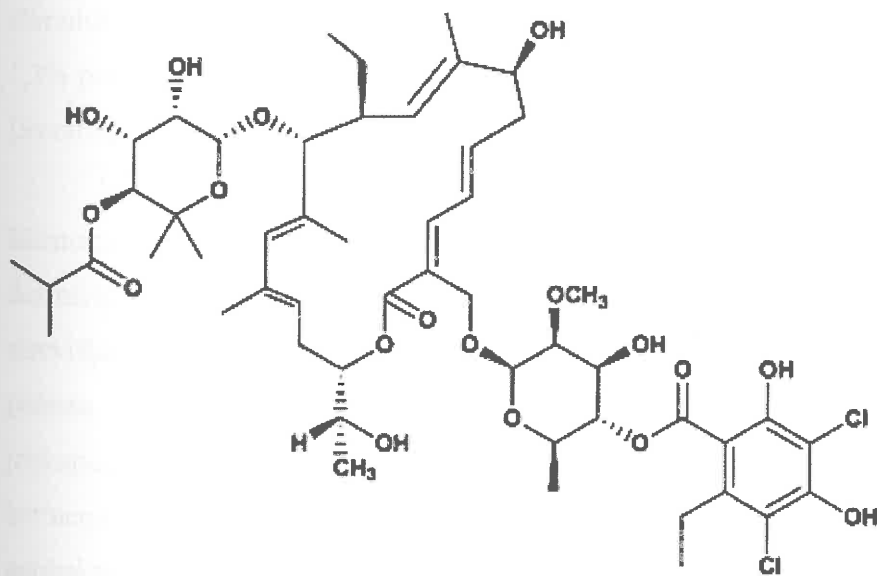
Standarta terapija ar vankomicīnu vai metronidazolu nav mainījusi kopš 1970. gada, recidīvu attīstības iespējas pēc antibakteriālās terapijas ir 15 – 30% gadījumu, tāpēc ir svarīgi rast jaunu pieeju cīņai pret šo baktēriju [Kyne *et al.*, 2010].

Daudzsološa ir vakcīnas izveide, bet tā vēl ir izmēģinājuma stadijā [Sougioltzis *et al.*, 2005]. Tā varētu būt jauna pieeja cīņai ar infekciju. Pasīva vai aktīva imunizācija ar monoklonālām antivielām der slimniekiem ar atkārtotu infekciju, jo šiem slimniekiem neveidojas antivielas pēc pārslimošanas [Ciaran *et al.*, 2008].

Imunoglobulīnus lieto kā papildu terapiju pie recidivējošām infekcijām pa 300 – 400mg/kg 1x3nedēļās [Wilcox *et al.*, 2004, Juang *et al.*, 2007]. Randomizētā, dubultmaskētā pētījumā no 200 *C.difficile* simptomātiskas infekcijas pacientiem tika izveidotas divas slimnieku grupas. Pirmā grupa, kurā ietilpa 101 pacients, tika ārstēta ar metronidazolu vai vankomicīnu, infūzijas veidā tika ievadītas monoklonālās antivielas pret *C.difficile* toksīnu A un toksīnu B (10mg/kg ķermeņa masas katra). Otrajā grupā ietilpa 99 slimnieki, kurus ārstēja antibiotikas + placebo (0,9% NaCl). Pacientiem „antibiotika + antiViela” grupā infekcijas atkārtšanās bija 7% gadījumu, bet grupā

„antibiotika + placebo” infekcijas atkārtšanās bija 38% gadījumu. Pētījuma rezultātā tika secināts, ka papildu terapija ar monoklonālām antivielām pret *C.difficile* ievērojami samazina *C.difficile* infekcijas recidīvu skaitu [Lowy *et al.*, 2010].

C.difficile celmi ar pazeminātu jutību pret metronidazolu/vankomicīnu bieži rada slimības recidīvus. Sakarā ar rezistences veidošanos *C.difficile* celmiem ir nepieciešams sintezēt jaunus preparātus. Viens no tādiem ir OPT-80 (fidaksomicīns), kura aktivitāte ir pārbaudīta *in vitro* uz *C.difficile* VPI 10463 references celmiem, *B.fragilis* ATCC 25285 references celmiem, *Eubacterium lentum* ATCC 43055 references celmiem un *Stafilococcus aureus* ATCC 29213 references celmiem [Louce *et al.*, 2009, Ackermann *et al.*, 2004]. III fāžu pētījumā 13,3% pacientu, kuri saņēma terapijā OPT-80 bija recidīvi ar *C.difficile* infekciju, bet tiem, kuri saņēma terapijā vankomicīnu, recidīvi bija 24,0% gadījumu ($p=0,004$). Tas atspoguļo preparāta nozīmīgumu infekcijas ārstēšanā. OPT-80 ir makrocikliskais nepiesātināts savienojums (Attēls 6). OPT-80 infibē baktērijas enzīmu RNS polimerāzes sintēzi [Ackermann *et al.*, 2004].



Attēls 6. OPT-80 uzbūve. 3-(((6-Deoksi-4-O-(3,5-dihloro-2-etil-4,6-dihidroksibenzoil)-2-O-metil-b-D-mannopiranozil)oksi)-metil)-12(R)-[(6-deoksi-5-C-metil-4-O-(2-metil-1-oksopropil)-b-D-likso-heksopiranozil)oksi]-11(S)-etil-8(S)-hidroksi-18(S)-(1(R)-hidroksietil)-9,13,15-trimetiloksacikloktadeka-3,5,9,13,15-pentaēns-2-ons.

Ir pieejama, uz praktiskiem pētījumiem balstīta, literatūra par teikoplanīna efektivitāti *C.difficile* reinfekcijas ārstēšanā [Nelson *et al.*, 2007, Wenisch *et al.*, 1996].

3.2.9. Infekcijas kontroles iespējas

Šajā desmitgadē *C.difficile* infekcijas kontrole veselības aprūpes vidē ir kļuvusi par globālu sabiedrības veselības problēmu [Kyne *et al.*, 2010].

Ar veselības aprūpi saistīto infekciju uzraudzība ir vērsta uz ārstēšanās kvalitātes uzlabošanu un ārstēšanās izmaksu samazināšanu. Efektīvai *C.difficile* infekcijas uzraudzībai ir nepieciešama multidisciplināra pieeja, nepieciešams mērķis, plāns un kontroles dienesta izveide, kas pārzina katra stacionāra un slimnieku aprites specifiku, lai efektīvi un mērķtiecīgi spētu ātri reaģēt uz infekcijas uzliesmojumu gadījumiem.

Galvenais veids, kā cīnīties ar *C.difficile* infekcijas izplatību stacionāros, ir ierobežot *C.difficile* sporu izplatīšanos. Inficēta slimnieka fēcēs ir vairāk par $10^5/g$ *C.difficile* baktēriju. Eksperimentālie dati liecina, ka palātā, kurā uzturējies inficēts slimnieks, trešdaļa vides paraugu satur baktērijas sporas, kamēr kontroles palātās tikai 1,3% paraugu ir pozitīvi. Higiēnai ir ļoti svarīga loma infekcijas izplatības ierobežošanā [Svenungsson *et al.*, 2003, Kuijper, Dissel *et al.*, 2007].

Svarīga ir palātas sienu, grīdu un galdu mazgāšana ar dezinfekcijas līdzekļiem. Jāizmanto dezinfektanti, kuri satur balinātāju, jo tas iznīcina *C.difficile* sporas, citi dezinfektanti ir neefektīvi pret *C.difficile* sporām. Ieteicams pacientu ar CDAD izolēt atsevišķā palātā. Vispirms jāizolē pacienti, kuri nespēj kontrolēt vēdera izeju un veikt pareizu roku mazgāšanas procedūru. Personālam jālieto cimdi, ja tas saskaras ar jebkuriem pacienta ķermeņa izdalījumiem. Personālam pēc saskarsmes ar pacientu, tā ķermeņa šķidrumiem vai apkārtējām virsmām jāmazgā rokas ar dezinfektantu vai antibakteriālām ziepēm [McDonald *et al.*, 2007]. Ja ir augsta saslimstība ar CDAD, iesaka nomainīt elektroniskos termometrus pret vienreizlietojamiem. [Alfa *et al.*, 1998]. Svarīgi ir ierobežot antibiotiku lietošanu, īpaši plaša spektra, kas ir viens no CDAD riska faktoriem [Samore *et al.*, 1996].

3.3. *C.difficile* diagnostikas un tipēšanas metodes

Ar *C.difficile* saistītu saslimšanu var diagnosticēt endoskopiski, radioloģiski, kā arī ar etioloģiskā aģenta noteikšanas un baktērijas darbības rezultātā radušos toksīnu noteikšanas testiem.

Pēdējo gadu laikā ļoti strauji pieaug dažādu *C.difficile* diagnostikas testu klāsts. Tomēr klīniskai diagnozei noteikti jābalstās uz klīnisko un laboratorisko datu komplicētu analīzi. Izvērtējot testus, tos var iedalīt:

- 1) *C.difficile* produktu noteikšanas testi – a) glutamātdehidrogenāzes (GDH) tests;
b) aromātisko taukskābju tests;
c) toksīnu noteikšanas testi.
- 2) *C.difficile* baktērijas kultivēšanas testi;
- 3) *C.difficile* gēnu noteikšanas tests – PĶR.

3.3.1. Endoskopiskā diagnostika

Endoskopija ir mūsdienīga iekšējo orgānu diagnostikas un ārstniecības metode, kuru veic ar speciālām optiskām ierīcēm. PMK endoskopijas aina atklāj resnās zarnas gļotādā dzeltenīgi baltas irdenas plāksnes, kuru diametrs ir pāris centimetru. Lielākā endoskopiju priekšrocība ir tā, ka ar to ātri un precīzi var uzstādīt PMK diagnozi. Šī metode var aizstāt ķirurģiskas manipulācijas vēdera dobumā diagnostiskiem nolūkiem.

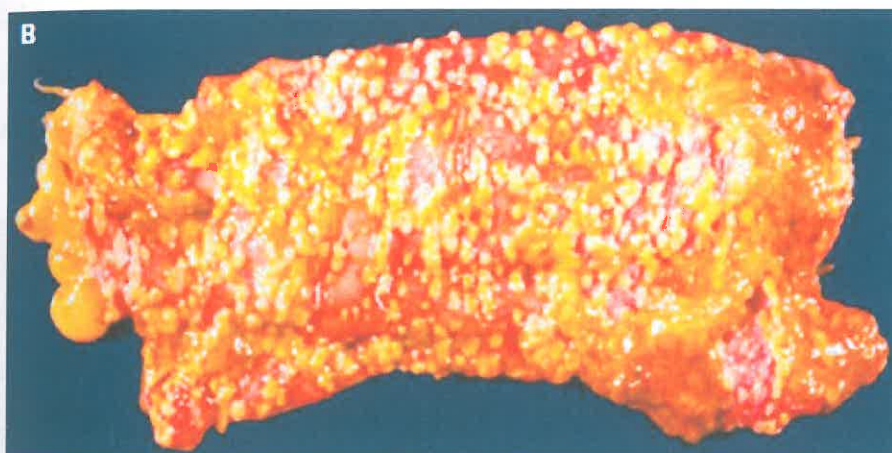
Sigmoidoskopijā redzams difūzs vai fragmentārs nespecifisks kolīts, kuram raksturīgas dzeltenas pseidomembrānas. 2 līdz 10 mm diametrā gļotāda starp tām izskatās vesela vai viegli eritematoza. *C.difficile* toksīnu izraisītās PMK izpausmes var iedalīt trīs tipos:

I tips – visagrākais bojājums, raksturīgas epitēlija nekrozes zonas, ko pavada fibrīna izgulsnēšanās un neitrofilie leukocīti zarnu lumenā;

II tips – izteikts eksudāts, kas nāk no epitēlija čūlas, apkārtējā gļotāda ir neskarta;

III tips – difūza epitēlija nekroze un čūlas, ko pārklāj pseidomembrānas, kas sastāv no mucīna, fibrīna, leikocītiem un atmirušām šūnām [Jones *et al.*, 1997].

Autopsijas ainā redzamas dzeltenas, multiplas membrānas, kas klāj zarnas sienīņu [Wolf *et al.*, 2005] (Attēls 7).

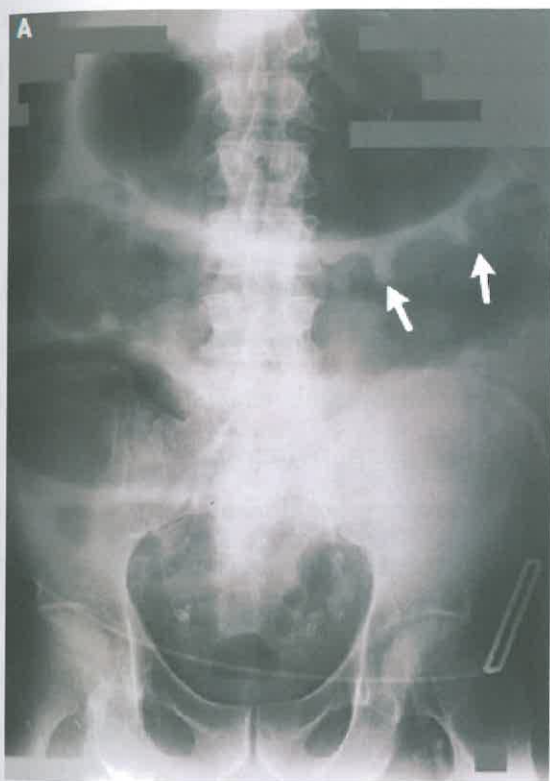


Attēls 7. Pseudomembranozā kolīta autopsijas aina [Wolf *et al.*, 2005].

10% gadījumu PMK paliek neatklāti, ja tiek veikta tikai sigmoidoskopija un netiek apskatīta proksimālā resno zarnu daļa, jo PMK izpausmes biežāk sastopamas proksimālajā zarnas daļā. Vieglākos gadījumos endoskopiskā aina tiek raksturota kā nespecifisks kolīts. Ja PMK ir apstiprināts, biopsijai nav būtiskas nozīmes. Tomēr, ja PMK nav konstatēts, biopsija ir vēlama, ja gļotādā parādās PMK tipiskas iekaisuma pazīmes. Perforācijas riska dēļ no endoskopijas jāizvairās pacientiem ar paralītisko zarnu nosprostošumu un pacientiem ar resnās zarnas paplašināšanās simptomiem. Endoskopijas trūkumi ir augstas procedūras izmaksas un īpaši resnās zarnas sagatavošanas pasākumi. Šo izmeklējumu labāk rezervēt īpašām situācijām, piemēram, ja pacients ir smagi slimis, diagnoze ir neskaidra, neinvazīvie testi ir negatīvi vai kavējas, bet aizdomas par *C.difficile* infekciju ir ļoti lielas [Vaischnavi, 2009]. Tomēr jāatzīmē, ka citi slimību izsaucēji arī var radīt pseidomembrānas, piemēram, citomegalovīrusu infekcija.

3.3.2. Radioloģiskā diagnostika

PMK var diagnosticēt pēc kompjūtertomogrāfijas (CT) datiem. Tā atklāj difūzu zarnu sabiezēšanu vai pietūkušas resnās un tievās zarnas sienīgas ar iekaisumu. CT ainā redzamas paplašinātas tievās un resnās zarnas [Volf *et al.*, 2005] (Attēls 8, norādīts ar bultiņām).



Attēls 8. *C.difficile* infekcijai raksturīga radioloģiskā izmeklējuma aina [Volf *et al.*, 2005].

3.3.3. Klīniski laboratoriskās diagnostikas metodes

3.3.3.1. Mikrobioloģijas metodes

C.difficile tīrkultūru pirmo reizi izolēja 1935. gadā, un tai tika piedāvāts nosaukums „*difficile*”, kas tulkojumā nozīmē „grūti”, jo baktērijas slikti auga uz barotnēm. 1940. gadā *C.difficile* izolēja no jaundzimušā. Tālākie izolēšanas gadījumi tika aprakstīti tikai 1960. gadā, kad *C.difficile* tika izolēts no roņa zarnām, bet 1962. gadā Smits un Kings ziņoja par organisma saistību ar cilvēka infekciju [Gerding, 2007]. Tradicionālā mikrobioloģiskā metode – uzsējums, kaut arī ir precīza, šīs baktērijas identifikācijai prasa vairākas dienas.

Pētījumos par barotnēm rutīnas baktērijas izolēšanai no fekālajiem paraugiem labus rezultātus dod agars, kas bagātināts ar fruktozi un olu dzeltenumu, kuram kā selektīvi aģenti pievienots D – cikloserīns un cefoxitīns [Tracy *et al.*, 2003]. Selektīvie aģenti inhibē lielākās daļas *Enterobacteriaceae bacilli*, kā arī *Streptococcus fecalis*, stafilokoku, gramnegatīvo sporu veidojošo un *Clostridia* sugu (izņemot *C.difficile*) augšanu, jo visi šie mikroorganismi ir sastopami fekālajos paraugos. Pirms baktēriju audzēšanas jāveic alkohola šoks. 7% zirga asiņu pievienošana agaram palielina *C.difficile* atdzīvošanos un veido lielākas kolonijas salīdzinājumā ar olu dzeltenuma emulsiju. Svarīga ir *C.difficile* tīrkultūras izdalīšana no koprokultūras, lai rezultātu interpretācija pēc koloniju augšanas rakstura, pēc Grama krāsošanas un pēc bioķīmiskajām īpašībām būtu precīza [Reyes *et al.*, 2007, Berg *et al.*, 2005, Robertson *et al.*, 1992]. Ļoti svarīga nozīme ir baktērijas tīrkultūras izolēšanai no fēcēm, lai varētu veikt tālāku baktērijas izpēti. Tomēr daudzas laboratorijas pasaulē ir atteikušās no baktērijas kultivēšanas, jo uzskata, ka ir lietderīgāk diagnostikā izmantot imunoloģiskos testus [Tracy *et al.*, 2003].

3.3.3.2. Šūnu kultūru citotoksicitātes tests (CCA), kultūru toksiskās aktivitātes tests (TC) un šūnu citotoksiskās neitralizācijas tests (CCNA).

CCA vai TC ir „zelta standarts” *C.difficile* diagnostikā [Zheng *et al.*, 2004]. Adu kultūru iegūšanas laiks un process ir laikietilpīgs (24 – 48 stundas), prasa speciālu šūnu kultūru iekārtas [Eastwod *et al.*, 2009]. Metodika nav standartizējama, jo katrā laboratorijā ir jāizstrādā savi diagnostiskie kritēriji [Shin *et al.*, 2009]. CCA ir citotoksiskās aktivitātes noteikšanas tests, ar kuru novēro toksīna B izraisītu citopātisku efektu, tas ir, bojātās šūnu sienīgas noapaļošanās pēc 24 – 48 stundām. Specifiskā citopātiskā efekta novērošanai izmanto šūnas neitralizāciju ar *C.difficile* antitoksīnu. TC baktērijas tiek audzētas uz CCFA (cefoksitīna fruktozes agara), pirms tam tiek veikta fēču apstrāde ar alkoholu un notiek tālāka inkubācija anaerobos apstākļos (24 – 48 stundas) [Ticehurst *et al.*, 2006, Turgeon *et al.*, 2003]. Šūnu kultūru testiem jutīgums ir 100%, specifiskums – 98,1% [Huang *et al.*, 2009]. Latvijā šī metode netiek attīstīta un pielāgota.

3.3.3.3. Fēču gaistošo skābju tests

GDH – glutamīndehidrogenāzi ražo gan toksiskās, gan netoksiskās baktērijas. Pētījumā, kurā tika noteikts GDH, 60% no visiem pozitīvajiem paraugiem bija pozitīvs arī šūnu kultūru tests [Zheng *et al.*, 2004].

Izovaleniskābi, izokaproisskābi un p-krezolu nosaka ar gāzes hromatogrāfijas metodi (GLC). 1983. gadā GLC tika piedāvāta kā skrīninga metode, lai izslēgtu *C.difficile* infekciju. 41% *C.difficile* kultūras satur izokaproisskābi vai p-krezolu, bet 85% – izovaleniskābi [Zheng *et al.*, 2004].

Ir izveidots un ieteikts divpakāpju *C.difficile* diagnostikas algoritms, lai atklātu toksiskās *C.difficile* baktērijas. Sākumā nosaka GDH antigēnu, tad antigēna pozitīvajām kultūrām veic CCA testu [Ticehurst *et al.*, 2006].

3.3.4. Imunoloģiskās diagnostikas metodes

Imunoloģiskie diagnostikas testi ir izplatītākie un biežāk izmantotie *C.difficile* antigēna noteikšanas eksprestesti. Tie ir lateksa aglutinācijas testi *C.difficile* asociēto slimību diagnostikai. Ar šiem testiem nosaka toksīnus producējošās un neproducējošās *C.difficile* baktērijas pēc av/ag reakcijas. Lateksa daļiņas ir klātas ar antivielām, kas reaģē ar *C.difficile* asociētiem antigēniem, veidojot redzamas aglutinācijas daļiņas izpārslojuma veidā. Ja *C.difficile* antigēna nav, vai tā līmenis ir zemāks par noteikšanas līmeni, aglutinācija nenotiek un fēču suspensija paliek vienmērīgi duļķaina.

Plaši tiek izmantots *C.difficile* toksīna A eksprestests. Tas paredzēts tiešai, kvalitatīvai *C.difficile* toksīna A noteikšanai fekālajos paraugos. Šis tests ir ātrs, bet *C.difficile* eksprestestam ir zema jutība, tikai 23% [Turgeon *et al.*, 2003].

Ir pieejami automatizētas *C.difficile* identifikācijas sistēmas paneļi VITEK 2 sistēmā un mini API sistēmā, taču tie uz *C.difficile* dod apšaubāmus rezultātus un ir zems apstiprināšanas procents abās sistēmās, tāpēc tas prasa papildus identifikācijas testus [Pabērza *et al.*, 2010].

Imunoloģiskajiem testiem ir augstāka jutība, salīdzinot ar citotoksicitātes pārbaudi [Muscher *et al.*, 2007, Vanpouske *et al.*, 2001].

3.3.5. PĶR diagnostikas metode

PĶR izmanto toksinogēnu – *tcdA*, *tcdB*, regulētājgēnu – *tcdC*, *tcdD* *tcdE* noteikšanai gan mikrobu kultūrās, gan izdalītajā DNS no fēcēm, izmantojot specifiskus praimerus [Lyne *et al.*, 2008]. PĶR jutība ir 86,3 – 93,4%, specifiskums 93,9 – 98,2%, un rezultāts ir vienas dienas laikā [Larson *et al.*, 2010].

PĶR veic, izmantojot programmētus termostatus. Par PĶR metodes izgudrošanu Karijs Mulliss 1993. gadā saņēma Nobela prēmiju ķīmijā. Lai PĶR procesā sintezētos gēnu fragmentus vizualizētu, izmanto agarozes gēla elektroforēzi (AGE).

PĶR tiek izmantoti 3 soļi:

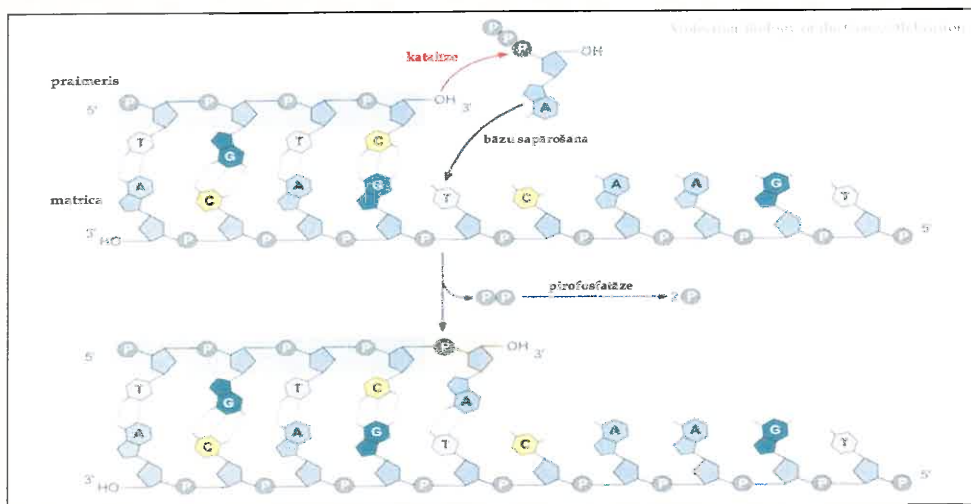
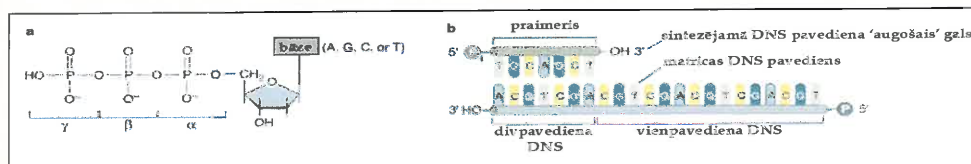
1. solis – denaturācija. DNS pavedienu atdalīšana 94°C temperatūrā. Temperatūras ietekmē matricēs DNS denaturējas, tiek sarautas saites starp bāzu pāriem un izveidojas divas vienpavediena DNS. Lai tas notiktu, ir nepieciešamas termostabīlas polimerāzes;

2. solis – specifisku praimeru piesaistīšana vienpavedienu DNS. Praimeri ir aptuveni 20 – 30 bāzu gari. Vienpavediena DNS fragmentā viens no tiem piesaistās vienai, bet otrs otram DNS vienpavediena molekulai tā, lai tie katrs no savas puses ietvertu nepieciešamo DNS fragmentu. Praimeru sekvenču ir specifiski piemērotas, lai piesaistītos noteiktos DNS rajonos. Piesaiestē temperatūra ir 40 – 60°C, tas atkarīgs no praimeru garuma un sekvenču;

3. solis – jauna DNS pavediena sintēze. Polimerāze sāk komplimentāri vienpavedienu DNS pievienot nukleotīdus, pagarinot praimerus interesējošā fragmenta virzienā. Šāda pagarināšanās notiek 72°C temperatūrā.

Šos trīs soļus atkārto 20 – 30 reizes. Tā vairākos ciklos fragments tiek pavairots ģeometriskā progresijā 1-2-4-8-16-32-64 utt. Pēc 20 cikliem ir izveidojies apmēram miljons DNS fragmentu kopiju, bet pēc 30 cikliem jau miljards DNS fragmentu kopiju.

Pēc šiem trim secīgiem posmiem no dubultspirāles DNS ir izveidojušās divas dubultspirāles DNS [Swindells *et al.*, 2010] (Attēlā 9).



Attēls 9. Jauna DNS pavediena sintēzes gaita [Swindells *et al.*, 2010].

Cepheid XPERT ir integrēta slēgta sistēma, nukleīnskābes amplifikācijas sistēma, kas automatizē paraugu sagatavošanu un ar reālā laika PĶR atklāj *tcdB* gēnus, šai sistēmai ir augsta jutība – 97,1% un specifiskums 93,0% [Novak–Weekley *et al.*, 2010, Fedorko *et al.*, 1999, O’Conor *et al.*, 2004].

3.3.6. AGE – agarozes gēla elektroforēze

AGE ir standartmetode, ar kuru iespējams atdalīt un identificēt DNS fragmentus. Agarozes gēlu lieto horizontālajā elektroforēzē. Elektroforēzes pamatā ir lādētu daļiņu pārvietošanās elektriskajā laukā. DNS ir negatīvi lādēta, tādēļ tā pārvietojas uz pozitīvi lādēto polu. DNS pārvietošanās ir atkarīga no gēla koncentrācijas – jo mazāka gēla koncentrācija, jo garākas DNS molekulas spēj atdalīties. Strāvas ietekme var mainīt fragmentu migrāciju, jo lielāka strāva tiks pievadīta, jo efektīvāk tiks atdalīti DNS fragmenti. Elektroforēzes DNS fragmentu migrāciju agarozē neietekmē bāzu secība un temperatūra. Parasti elektroforēzi veic istabas temperatūrā. Bufēris, ko izmanto DNS

elektroforēzē, satur etilēndiaminotetraetiķskābi (EDTA), pH=8,0, un trisborātu pH=7,5 – 7,8. Kā fluorescences krāsu izmanto etīdija bromīdu, kas interkalējas starp DNS bāzu pāriem un flooriscē UV gaismā.

AGE 1937. gadā ieviesa Arne Tiseliks (Zviedrija), kas 1948. gadā par šīs metodes izgudrošanu ieguva Nobela prēmiju.

3.3.7. Tipēšanas metodes infekcijas uzraudzībai

PQR ir iespējamās dažādas modifikācijas, to var izmantot gan mikroorganismu identificēšanai, gan tipēšanai. Tipēšanas metodes iedala četrās lielās grupās:

- 1) PCR – Restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP);
- 2) PCR – ribotipēšana;
- 3) Random Amplification of Polymorphic DNA (AP – PCR/RAPD);
- 4) Repetitive Palindromic Extragenic Elements PCR (Rep – PCR).

Ar PQR metodi var atrast noteiktus DNS fragmentus un tos pavairot, var izmantot toksinogēnu noteikšanai baktērijās [Kato *et al.*, 1991, Pantosi *et al.*, 1988, Swindells *et al.*, 2010].

RAPD metodes priekšrocība ir salīdzinoši vienkārša izmantošana un ātrs rezultātu iegūšanas ātrums. Izšķirtspēja ir atkarīga no nukleotīdu skaita praimeru sekvencē. Izmantojot tikai vienu praimeru, izšķirtspēja ir zema, taču, lietojot trīs vai vairākus praimerus, izšķirtspēja paaugstinās, tomēr paliek zemāka par pulsējošā lauka elektroforēzes (PFGE) izšķirtspēju. RAPD metode ir veiksmīgi izmantojama infekciju uzliesmojumu pētījumiem, lai sagrupētu epidemioloģiski radniecīgus izolātus.

Molekulāri epidemioloģiskai baktēriju tipēšanai var izmantot fenotipēšanas un genotipēšanas metodes. Pie fenotipēšanas metodēm pieskaita antibiotikogrammas, serotipēšanu, proteīnu elektroforēzi. Genotipēšanas metodes ir toksinotipēšana, ribotipēšana, pulsējošā lauka elektroforēze un multilokusu sekvenēšana (MLST).

3.3.7.1. Pulsējošā lauka elektroforēze

Metode balstīta uz bakteriālās DNS sagriešanu ar endonukleāzēm, kā rezultātā tiek iegūti lieli DNS fragmenti, kas nav sadalāmi parastajā elektroforēzē. Pulsējošā lauka elektroforēzē (PFGE) elektriskā lauka virziens tiek periodiski pulsveidīgi mainīts, ļaujot DNS fragmentiem sadalīties atbilstoši izmēriem. Šī procesa rezultātā lielākajiem fragmentiem ir nepieciešams ilgāks laiks, lai pārorientētos uz jaunu elektriskā lauka virzienu, savukārt mazākie fragmenti pārorientējas straujāk un turpina migrāciju ātrāk. [Lyne *et al.*, 2008].

Radnieciskas baktērijas sadalās vienāda izmēra fragmentos, un tā tās tiek identificētas. Šo metodi lietderīgi izmantot slimības uzliesmojumu izmeklēšanai un baktēriju tipēšanai.

3.3.7.2. Toksinotipēšana

Toksinotipēšana ir uz PĶR balstīta metode. Rezultātā *C.difficile* celmi tiek sagrupēti pēc atbilstošām izmaiņām, salīdzinot izmeklējamās baktērijas PaLoc ar references celma PaLoc [Rupnik *et al.*, 1998, Lemee *et al.*, 2004].

Viena toksinotipu grupa apvieno mikrobu celmus ar identiskām izmaiņām PaLoc reģionā. Ir zināmi 11 *C.difficile* toksinotipi. Galvenie toksinogēni, kas nosaka baktērijas virulenci ir *tcdA* un *tcdB*, no to ekspresijas pakāpes baktērijā ir atkarīga pacienta slimības attīstība un iznākums. Šo divu gēnu noteikšana ir galvenā, lai dotu atbildi par *C.difficile* toksinogēno vai netoksinogēno formu, un to var pielīdzināt diagnostiskai skrīning metodei [Kazakova *et al.*, 2006].

3.3.7.3. Ribotipēšana

Ribotipēšana ir metode, kas pamatojas uz 16S rRNS un 23S rRNS gēnu specifisko rajonu amplifikāciju un amplifikācijas produktu sadalījumu agarozes gēlā

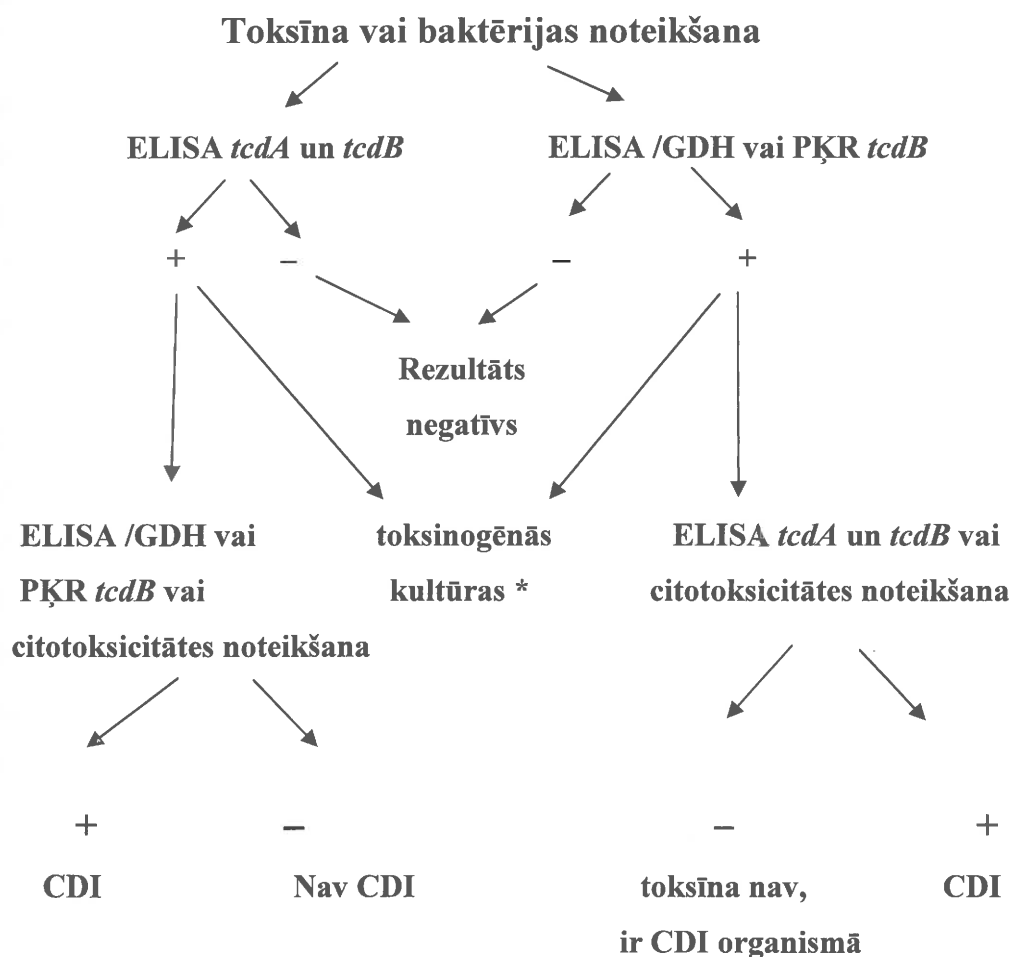
[Bidet *et al.*, 2000]. Tā ir stabila baktērijas genotipa noteikšanas metode, kurā datu filoģenētisko analīzi veic BioNumerics programmā [Berg *et al.*, 2004]. Ribotipēšanu uzskata par „pirkstu nospiedumu” metodi, ar kuras palīdzību var identificēt baktērijas ģints un sugu līmenī [Stubbs *et al.*, 1999].

3.3.7.4. MLST

MLST ir molekulāri bioloģiska baktēriju genotipa noteikšanas metode. Tā tika izstrādāta, pamatojoties uz multilokusu enzīmu elektroforēzes principu. Dažādas sekvences tiek uzskatītas par atbilstošām atšķirīgām gēnu allēlēm, kas tālākai identificēšanai tiek atzīmētas ar skaitļiem. Izolāts tiek tipēts pēc allēlēm [Weller *et al.*, 2000]. Analīzēm tiek izvēlēts noteikts gēnu skaits, parasti tie ir aptuveni 500 bp gari, tā sauktie mājturības (housekeeping) gēnu iekšējie fragmenti. Mājturības gēni tiek izvēlēti tādēļ, ka tie vienmēr ir neiztrūkstoši baktēriju genomā. MLST principa pamatā ir PĶR amplifikācija ar tālāku DNS sekvenēšanu. Šie gēni ir atbildīgi par šūnas sienas sintēzi, tās uzbūvi un šūnas fundamentalitāti. Visiem 7 gēniem ir jābūt visās tipējamās baktērijās, citādi šūna nav dzīvotspējīga [Griffiths *et al.*, 2010]. *C. difficile* MLST shēmā lieto septiņus mājturības gēnus: *aroE* (shikimate dehydrogenase), *ddl* (D-alanine:D-alanine ligase), *dutA* (dUTP pyrophosphatase), *gmk* (gualynate kinase), *recA* (recombinase), *sodA* (superoxide dismutase), *tpi* (triosephosphate isomerase). Katrs lokuss tiek amplificēts ar PĶR, izmantojot šiem gēniem atbilstošus praimeru pārus, kuri piesaistās konservatīvajam gēnu reģionam. Iegūtais PĶR produkts tiek sekvenēts, balstoties uz iegūto sekveni, tam tiek piešķirts iepriekš aprakstīts allēles numurs. Katru gēnu determinē allēļu pāris, katram mājturības gēnam ir unikāls allēļu profils. Iegūtās sekvences tiek salīdzinātas ar atbilstošiem allēļu profila šabloniem, kuri pieejami mikrobu datubāzēs, un dažādām kombinācijām tiek piešķirts savs sekvenču tips (ST). Ja iegūtā sekvenču iepriekš datu bāzē nav aprakstīta, tad sekvenču tiek definēta kā jauna. Atklātie ST ir apkopoti www.pasteur.fr mājaslapas izveidotajā datubāzē.

3.4. *C.difficile* testēšanai ieteiktais algoritms [Barbut *et al.*, 2003].

Šis algoritms balstās uz toksīnu un baktērijas noteikšanu analizējamos paraugos, ietverot tādas ekspresmetodes kā ELISA un GDH. Vadoties pēc eksprestestu rezultātiem, tiek izvērtēta tālākā testēšana ar citotoksicitātes testiem, kuru rezultāts tiek uzskatīts par apstiprinošu vai noraidošu diagnozi [Barbut *et al.*, 2003] (Attēls 10).



* Pozitīvas toksinogēnās kultūras liecina par toksīnu ražojošo baktēriju organismā, un tālākās pārbaudes nav nepieciešamas

Attēls 10. *C.difficile* testēšanai ieteiktais algoritms [Barbut *et al.*, 2003].

4. Pētījuma materiāls un metodes

4.1. Pētījumā izmantoto atsauču avotu atlase

Pētījumā tika veikts sistemātisks literatūras apskats par izvirzītajiem jautājumiem. Darba gaitā tika atlasīti un analizēti raksti medicīnas zinātniskajā literatūrā par *C.difficile* infekcijas aktualitātēm, epidemioloģiju, etioloģiju, patogēnēzi, diagnostiku un terapiju. Kā literatūra tika izmantotas: The Cochrane Library (www.cochrane.org), Pub Med Clinical Queries: Find Systematic Reviews (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query/static/clinical.shtml), EbscoHost (www.ebscohost.com) ar ieeju DynaMed (www.dynaweb.ebscohost.com), ProQuest (www.proquest.com) un MDConsult (www.MDConsult.com) datubāzes.

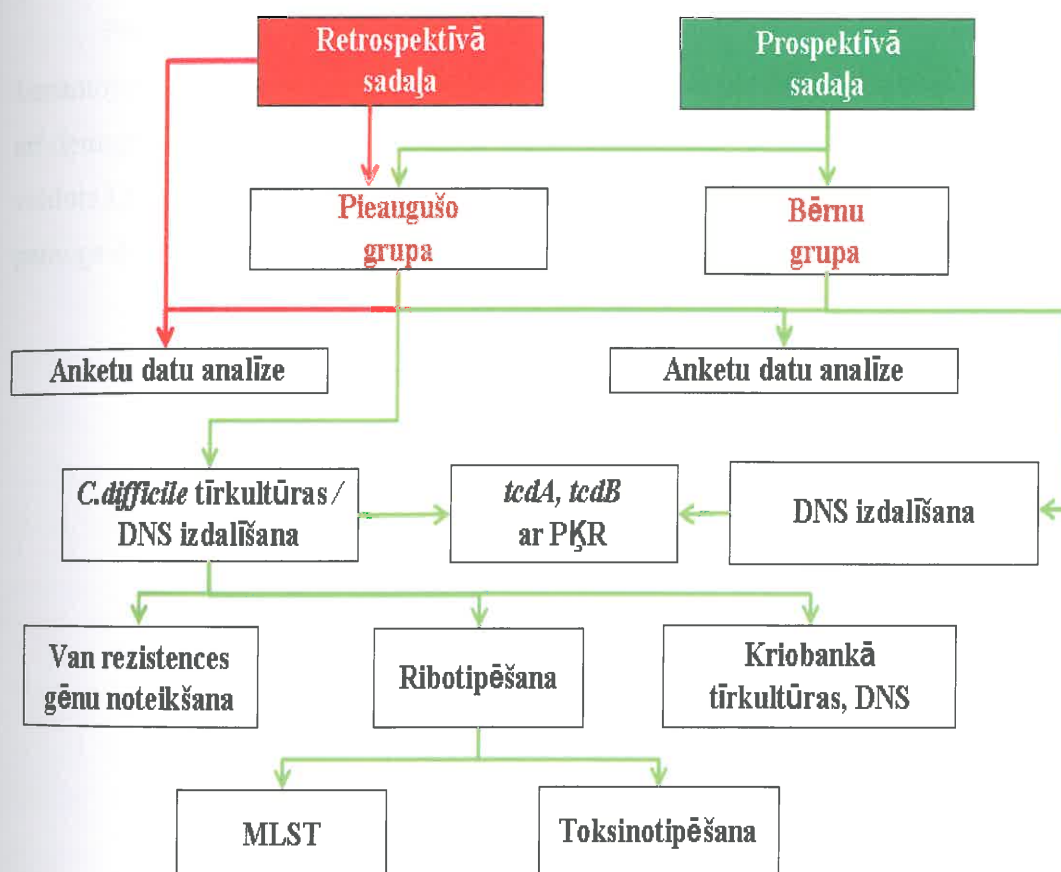
Atsauce tika izmantoti raksti no interneta žurnālu – Journal of Clinical Microbiology (<http://jcm.asm.org/>), New England Journal of Medicine (<http://nejm.org/>), Europe's Journal on Infectious disease Epidemiology, Prevention and Control (www.eurosurveillance.org) – publikācijām.

Kā atslēgvārdi tika lietoti vārdu salikumi: „*C.difficile* infection”, „CDAD”, ar MeCH datubāzē šaurākiem meklēšanas atslēgvārdiem: „strains”, „diarhea”, „toxinA”, „toxinB”, „childrens”, „neonates”.

Literatūras apskatā ietverti darbi, kas nav vecāki par 1985. gadu. Tika atlasīti raksti par *C.difficile* infekciju, kas atbilda dotā pētījuma mērķim. Tie tika iekļauti detalizēti sistemātiskā literatūras apskatā.

4.2. Pētījuma uzbūve

Pētījums sastāv no retrospektīvās sadaļas, kurā veikta slimības vēsturu datu analīze, un prospektīvās sadaļas, kurā veikta gan slimības vēsturu analīze, gan paraugu analīze laboratorijā. (Attēls 11).



Attēls 11. Pētījuma uzbūve.

Visi laboratorie izmeklējumi tika veikti VSIA „Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas” Centrālās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un ģenētikas nodaļā un Mikrobioloģijas nodaļā.

4.2.1. Bērnu grupas atlases kritēriji

Pētījumā tika izmeklēti 248 bērnu fēču paraugi. Slimnieku demogrāfiskā informācijas datu analīzē tika iekļauti 187 bērni, kuri laika posmā no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam tika stacionēti Bērnu klīniskā universitātes slimnīcā (BKUS) ar diagnozi kolīts, gastroenerokolīts vai enerīts.

Pēc iekļaušanas pētījumā katram bērnam tika piešķirts identifikācijas numurs. Izmantojot anketēšanas metodi, tika iegūti dati ne tikai par bērna slimības anamnēzi, bet arī demogrāfiskie dati un informācija par antibakteriālās terapijas vēsturi. Pētījums tika veidots kā prospektīvs, un datu analīze balstījās uz Microsoft Exel programmu. Anketas paraugs darba 10.1. pielikumā.

4.2.2. Pieaugušo grupas atlases kritēriji

Slimnieku datu analīzei tika izveidota anketa, kurā tika atzīmēti dati par pacientiem, kuri ārstējās P. Stradiņa KUS nodaļās laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada beigām. Anketēšanu izmantoja jau iepriekš apstiprinātiem slimības gadījumiem, tas ir, slimniekiem ar *C.difficile* infekciju. Tika iegūta informācija par slimības anamnēzi un demogrāfiskie dati. Tika izvērtēti literatūrā aprakstītie iespējamie infekcijas riska faktori: antibakteriālās terapijas vēsture, laboratoriskās izmeklēšanas secības dati, stacionārā uzturēšanās ilgums un veiktās manipulācijas. Rezultātā tika aizpildītas 175 anketas, kuru datu apkopošana un analīze veikta, izmantojot EpiInfo programmu.

Pētījuma laikā, pamatojoties uz literatūrā aprakstītu metodiku, tika izstrādātas un piemērotas metodes esošajiem laboratoriskajiem apstākļiem. Lai iegūtu ticamus un analīzei piemērotus rezultātus, darba gaitā viena parauga analīzei tika izmantotas vairākas diagnostikas metodes, kuru izstrāde un piemērošana notika paralēli ar paraugu vākšanu un atlasī. Lielākā daļa paraugu tika izmeklēti ar trim metodēm, un pētāmais materiāls tika iegūts, izmantojot divas dažādas metodes.

Pētījumā tika izmeklēti 500 fēču paraugi, kuri tika nosūtīti uz laboratoriju no Rīgas Austrumu klīniskās slimnīcas klīnikas „Gaiļezers”, „Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcas” un P. Stradiņa KUS ar aizdomām par *C.difficile* infekciju. Laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada beigām, vadoties pēc PQR un mikrobioloģiskajiem izmeklējumiem, pētījumā tika iekļauti 95 pozitīvi paraugi, kuri tika ribotipēti. Izvēles kārtībā celmiem ar vienādu ribotipu tika veikta MLST noteikšana, kā arī toksinotipēšana. Visi pozitīvie *C.difficile* celmi tika ievietoti kriobankā. Pētījums veidots kā retrospektīvi prospektīvs. Anketas veidlapa darba 10.3 pielikumā.

4.3. Pētījumā izmantotās metodes

4.3.1. *C.difficile* toksīna A eksprestests

C.difficile toksīna A eksprestests paredzēts tiešai, kvalitatīvai *C.difficile* toksīna A noteikšanai fekālajos paraugos. *C.difficile* A toksīnu nosaka, izmantojot *C.difficile* toxin A Detection Kitu (Oxoid, Anglija).

Testa vienība satur monoklonālas antivielas uz *C.difficile* toksīnu A. Ekstraģētais antigēns tiek pievienots plāksnītei parauga lodziņā 125 µl. Plāksnīte satur zilu lateksu, kas marķēts ar antivielu. Ja pētāmajā paraugā sastopams toksīns A, ekstrakts rehidratē kompleksu un antigēns reaģē ar antivielu. Kapilārā spēka rezultātā antivielas – antigēna komplekss pārvietojas pa teststrēmeli uz rezultāta lodziņu. Šis laukums satur imobilizētas monoklonālas antivielas uz *C.difficile* toksīnu A. Tālākā pozitīvā reakcija starp antigēnu – antivielu – lateksu ir novērojama zilas līnijas veidā rezultāta lodziņā. Ja paraugs nesatur *C.difficile* toksīnu A, rezultāta lodziņā neiezīmējas zila līnija.

4.3.2. DNS izdalīšana no fēcēm

DNS izdalīja no fēcēm, izmantojot kitu QIAamp DNA Stool Mini Kits (Qiagen, Vācija).

Pie 200 mg fēcū pieliek 2 ml Bufer ASL, sajauc, lai ir homogēns. Ja buferis duļķains, to uzkarsē 95°C temperatūrā. Paņem 1,6 ml no trauciņiem un pārnes uz 2 ml mēģenēm. Karsē suspensiju 5 minūtes pie 95°C temperatūras, iegūto suspensiju samaisa un centrifugē pie maksimālā apgriezīenu skaita 1 minūti. Paņem 1,2 ml šķidruma, nogulsnes paliek un pārnes 2 ml stobriņos. Pieliek inhibīcijas tableti un maisa, kamēr tablete izšķīst pilnībā. Centrifugē 3 minūtes. Pārnes supernatantu 1,5 ml mēģenēs un vēlreiz centrifugē 3 minūtes. Ņem jaunas 1,5 ml mēģenes. Ielej 200 µl supernatanta un pieliek 15 µl proteināzes K, samaisa. Pieliek 200 µl bufera AL, maisa 15 sekundes. Visu inkubē 10 minūtes 70°C temperatūrā. Pievieno 200 µl 96° etanola, samaisa. Visus 615 µl pārnes uz kolonnu un centrifugē 1 minūti. Pārliet kolonnu tīrā mēģenē un pieliek AW1 buferi, centrifugē 1 minūti. Kolonnu pārceļ citā ependorfā un pieliek 500 µl AW2 un

centrifugē 3 minūtes. Kolonnu izņem un pārliet citā ependorfā un centrifugē 1 minūti. Pārnes kolonnu tīros 1,5 ml ependorfos, iepipetē 200 mkl AE bufera, pagaida 1 minūti, tad 1 minūti centrifugē. Rezultātā iegūstam 200 μl DNS, kuru izmanto tālākiem pētījumiem.

4.3.3. Mikrobioloģiskā testēšana

Izmeklējamais materiāls ir svaigas fēces. Tās jānogādā laboratorijā 1 stundas laikā no savākšanas brīža. Ja tas nav iespējams, atļauts uzglabāt materiālu ledusskapī līdz nogādāšanai laboratorijā pie + 4°C.

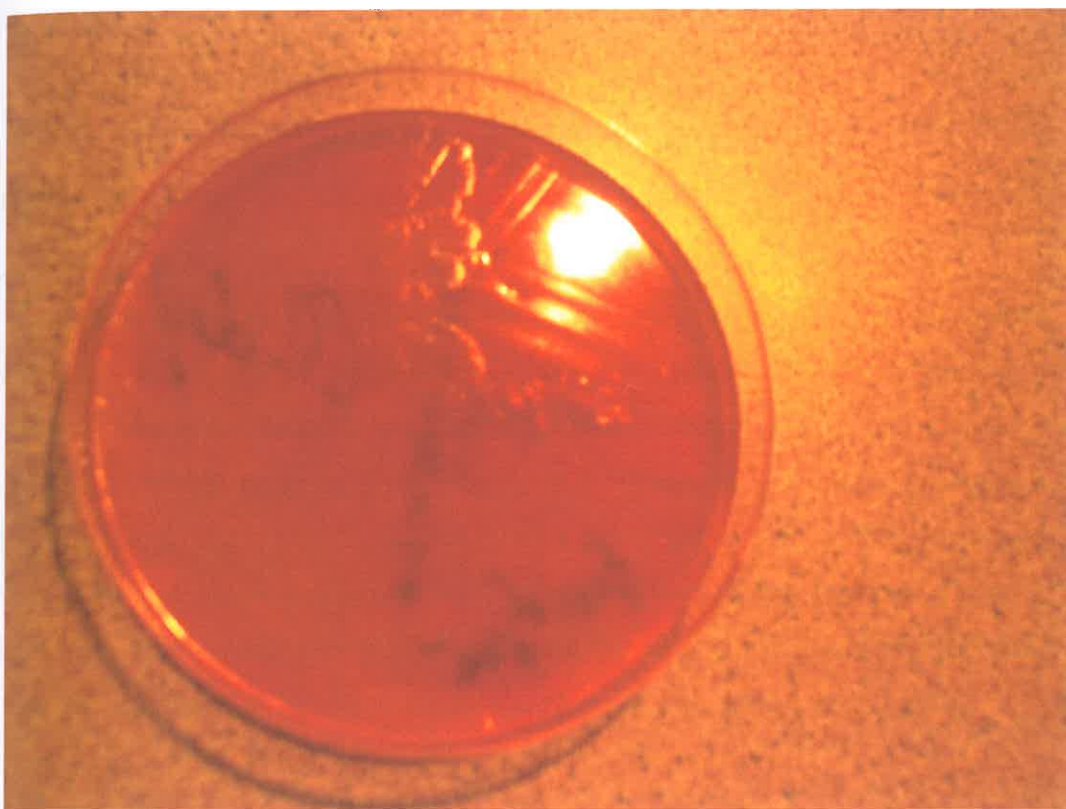
Alkohola šoka apstrāde sporu kultivēšanai:

1.5 ml 96° etilspirta sajauc ar 0,5 ml natīvām fēcēm un atstāj istabas temperatūrā uz 30 – 60 minūtēm. Ar alkohola šoku apstrādātās fēces un natīvās fēces katru sēj uz šādas veselas barotnes plates:

- 1) asins agara;
- 2) CNA asins agara;
- 3) *C.difficile* selektīvās barotnes.

Uzsējumus liek anaerostatā pie 36°C±1°C uz 2 līdz 5 dienām.

Uz asins agara un CNA asins agara *C.difficile* aug, veidojot kolonijas ar sabiezinātu, bālganu centru un caurspīdīgu, viļņainu zonu ap to (Attēls 12). Kolonijām jūtama raksturīgā „zirga smaka”, sevišķi uz asins agara.



Attēls 12. *C.difficile* tīrkultūra uz asins agara.

Uz *C.difficile* selektīvās barotnes kolonijas aug līdzīgi, bet fruktozes (mannozes) šķelšanās rezultātā mainās koloniju krāsa.

No raksturīgām kolonijām gatavo iztriepi, krāso pēc Grama krāsošanas metodes. Pozitīva rezultāta gadījumā mikroskopā redz rupjas Gram pozitīvās nūjiņas. Ar alkohola šoku apstrādātā materiāla uzsējumos mikroorganismi ir aizgājuši bojā, bet izaug *C.difficile* sporu formas tīrkultūras veidā. Raksturīgās kolonijas pārsēj, tīrkultūras iegūšanai, uz jaunas asins agara plates un liek termostatā anaerobos apstākļos pie $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ uz 2 – 3 dienām.

Ar raksturīgajām kolonijām liek prolīna – aminopeptidāzes testu. Pozitīva rezultāta gadījumā pēc 4 – 18 stundu inkubācijas termostatā un reaģenta pievienošanas stobriņā veidojas sāra krāsa.

No izaugušās mikroorganisma tīrkultūras liek *C.difficile* A toksīna eksprestestu.

Tīrkultūru sēj 2 ml TSA 15% glicerīna buljonā un liek ilgstošai uzglabāšanai kriobankā: -70°C ledusskapī.

4.3.4. DNS koncentrācijas noteikšana analizējamā baktēriju suspensijas paraugā

Suspensiju karsē pie 95°C temperatūras 10 minūtes. Suspensijas atdzesē istabas temperatūrā un centrifugē ar ātrumu 13 tūkstoši apgriezieni/minūtē. Supernatantu pārnes tīros vakutaineros. Materiāls ir gatavs DNS koncentrācijas noteikšanai.

100 ml stobriņā sajauc reaģentu attiecīgi 1X paraugu skaits + divi standarti un buferi 199 X paraugu skaits + divi standarti. Ņem 1,5 mkl ependorfus un divos pagatavo standartus – 190 µl + 10 µl standarts 1 un 2. Pagatavo paraugu maisījumus – 190 µl + 10 µl baktēriju suspensijas. Ar spektrofotometru, izvēloties atbilstošu programmu, nosaka DNS saturu paraugā. Spektrofotometrs uzrāda rezultātu mērvienībās µg/ml.

4.3.5. Vankomicīna rezistences gēnu noteikšana ar PĶR metodi un paraugu pārbaude uz *E.fecium* un *E.fecalis* gēnu klātbūtni

C.difficile vankomicīna rezistentu baktēriju noteikšanai izmanto PĶR ar tālāku produktu sadalīšanu 0,6% agarozes gēlā. Izmantojamo praimeru *vanA*–em396/397, *vanB*–em397/398, *vanC1/2*–399/400, *vanD*–401/402, *vanG*–403/404 un *ddl E.faecalis* em–405–406, *ddl E.fecium* em–407/408 izmēri redzami Tabulā 5. Sagatavo PĶR maisījumu, kurā izmantoti 2 µl testējamā DNS šķīduma, kam pievienoti 48 µl PĶR maisījuma, kopējais tilpums 50 µl PĶR maisījuma sastāva uz vienu reakciju (Tabula 6).

PĶR produktus sekvenē ar ģenētisko analizatoru ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), kurā izmanto 36cm kapilāru un polimēru POP7.

Tabula 5. Darbā izmantotie gēni un praimeru.

Gēni	Lab. Nr.	Praimeru nosaukums	Sekvences	Produkta izmērs (kb)	Literatūras avots
acd-2	em336	Tim5	CCACAGATGCTTTTAGCAGGAA	0,1	Spigaglia etal.,2002
	em337	Struppi5	TCCATCACTGCTCCAGC TAT		
acdD	em338	Tim3	AAAAGCGATGCTATTATAGAAA	0,3	Spigaglia etal.,2002
	em339	Struppi3	CCTTATTAACAGCTTGTCTAGAT		
acdB	em340	TB1	GAGCTGCTTCAATTG GAGAGA	0,4	Spigaglia etal.,2002
	em341	TB2	TAACCTACTTTCATAACACCAG		
acdE	em344	Tim1	GTTTAAGTGCAATAAAAAGTCGTA	0,62	Spigaglia etal.,2002
	em345	Struppi1	GGTAATCCACATAAGCACATATT		
acdA	em346	TA1	ATGATAAGGCAACTTCAGTGG	0,6	Spigaglia etal.,2002
	em347	TA2	TAAGTTCCTCCTGCTCCATCAA		
acdC	em350	Tim2	GCACCTCATCACCATCTTCAA	0,34	Spigaglia etal.,2002
	em351	Struppi2	TGAAGACCATGAGGAGGTCAT		
	em352	C1	TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCC	0,7	
	em353	C2	TCTAATAAAAAGGGAGATTGTATTATG		
acd-3	em354	Tim6	TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA3	0,62	Spigaglia etal.,2002
	em355	Struppi6	GGCTATTACACGTAATCCAGATA		
ribotyp	em272	16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT		Spigaglia etal.,2002
	em273	23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC		
PL1	em264	Tim5	CACAGATGCTTTTAGCAGGAA	0,25	Spigaglia etal.,2002
	em265	PrimexD	TCATCTACTGAGTTATTTCTTGCTA		
PL2	em266	Lok3	TTTACCAGAAAAAGTAGCTTTAA	0,2	Spigaglia etal.,2002
	em267	PrimexB	ACATATTCATCTTCTTGAGTACGA		
PL3	em268	Lok6	GTTGTTTAGATTTAGATGAAAAGA	0,15	Spigaglia etal.,2002
	em269	PrimexA	CTTGGTCTAATGCTATATATGCGAG		

Lok	em270	Lok5	TGGAGTAAAAGCCCCTGGGA	0,1	Spigaglia et al., 2002
	em271	Lok1	AAAATATACTGCACACATCTGTATAC		
B1	em342	B1C	AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAA	0,3	Spigaglia et al., 2002
	em343	B2N	A AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAA A		
A3	em348	A3C	TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG	0,3	Spigaglia et al., 2002
	em349	A4N	TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATAT C		
aroE	em350	aroE-F	CTAGTAGGTGAAAACTCTCTCA	0,4	Lemee et al., 2005
	em351	aroE-R	ACTGGTGTAGCATTTAATATTATATATC		
ddL	em352	ddL-F	CATAAACTTGTTTCATTCAGAAGG	0,42	Lemee et al., 2005
	em353	ddL-R	CTATGAGAAGTAAAGCCAGGAAT		
dutA	em354	dutA-F	CCTAATTTTGCTCACAAAGGT	0,3	Lemee et al., 2005
	em355	dutA-R	AAATCCAGTTGAGCCAAACC		
gmk	em355	gmk-F	TCAGGTGCAGGAAAAGGTAC	0,2	Lemee et al., 2005
	em356	gmk-R	TCTGTTTCTGTACCTCTTCCAAC		
sodA	em357	sodA-F	TATSWTATGATGCWYTWGARCC	0,4	Lemee et al., 2005
	em358	sodA-R	TARTAAGCATGYTCCCAAACATC		
tpi	em359	tpi-F	GCAGGAACTGGAAAATGCATAA	0,39	Lemee et al., 2005
	em360	tpi-R	CAGATTGGCTCATATGCAACAAC		
recA	em361	recA-F	CCAGATACAGGTGAACAGGC	0,37	Lemee et al., 2005
	em362	recA-R	TTTAACATTTTCTCTTCCTTGTC		
vanA	em396	vanA-F	GGGAAAACGACAATTGC	0,73	Depardien et al., 2004
	em397	vanA-R	GTACAATGCGGCCGTTA		
vanB	em398	vanB-F	ACGGAATGGGAAGCC	0,64	Depardien et al., 2004
	em399	vanB-R	TCCACCCGATTTTCGTTC		
vanC1/2	em400	vanC1/2-F	ATGGATTGGTAYTKGTAT	0,81	Depardien et al., 2004
	em401	vanC1/2-R	TAGCGCGAGTGMCYMGTA		

vanD	em402	vanD-F	TGTGGGATGCGCGATATTCAA	0,50	Depardien <i>et al.</i> ,2004
	em403	vanD-R	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		
vanE	em404	vanE-F	TGTGGTATCGGAGCTGCAG	0,43	Depardien <i>et al.</i> , 2004
	em405	vanE-R	ATAGTTTAGTTTAGCTGGTAAC		
vanG	em406	vanG-F	CGGCATCCGCTGTTTTTGA	0,94	Depardien <i>et al.</i> ,2004
	em407	vanG-R	GAACGATAGACCATGCCTT		
ddl	em408	Ddl-F	CACCTGAAGAAACAGGC	0,4	Depardien <i>et al.</i> ,2004
	em409	Ddl-R	ATGGCTACTTCAATTCACG		
ddl	em410	Ddl-F	GAGTAAATCACTGAACGA	1,0	Depardien <i>et al.</i> ,2004
	em411	Ddl-R	CGCTGATGGTATCGATTCAT		

Tabula 6. PĶR sastāvs *van* gēnu noteikšanai.

Sastāvdaļa	Daudzums
10x Taq polimerāzes buferis	5 µl
10mM dNTP maisījums	1,0 µl
Praimeris 396/397*	2 µl
DNS	2 µl
Taq polimerāze	0,2 µl
Destilēts ūdens	39,8 µl

* Mainās atkarībā no nepieciešamā *van* vai *ddl* gēna noteikšanas

PĶR mēģenes ievieto termoblokā un izvēlas programmu VAN ar noteiktiem apstākļiem (Tabula 7). PĶR maisījuma sastāvs un PĶR apstākļi tika veidoti, vadoties pēc ieteikumiem [Depardien *et al.*, 2004].

Sagatavo agarozes gēlu, paraugus ienes agarozes gēlā, amplifikācijas produktu sadalījumu agarozes gēlā vizualizē uz transiluminatora.

Tabula 7. PĶR apstākļi *van* gēnu noteikšanai.

Nr.	Cikla daļa	Temperatūra	Cikla ilgums
1	Uzkarsēšana	94 °C	3 minūtes
2	Denaturācija*	94 °C	1 minūte
3	Hibridizācija	54 °C	1 minūte
4	Polimerizācija	72 °C	1 minūte
5	Amplifikācijas nobeigums	72 °C	7 minūtes

*Cikls 2–4 tika atkārtots 30 reizes

4.3.6. Toksinogēnu noteikšana ar PĶR metodi

C.difficile toksinogēnu noteikšanai izmanto PĶR metodi ar reakcijas produktu sadalīšanu 1% agarozes gēlā. Izmantotie praimeris em 346/347–*tcdA* un em 340/341–*tcdB* (Tabula 5). Sagatavo PĶR maisījumu, kurā izmantoti 5 µl testējamā DNS šķīduma, kam pievienoti 20 µl PĶR maisījuma, kopējais tilpums 25 µl PĶR maisījuma sastāva uz vienu reakciju (Tabula 8).

Tabula 8. PĶR sastāvs toksinogēnu noteikšanai.

Sastāvdaļa	Daudzums
10x Taq polimerāzes buferis	2,5 µl
10mM dNTP maisījums	0,5 µl
Praimeris 340/341	1 µl
Praimeris 346/347	1 µl
DNS	5 µl
Taq polimerāze	0,5 µl
Destilēts ūdens	14,5 µl

PQR mēģenes ievieto termoblokā un izvēlas programmu TOXGEN ar noteiktiem apstākļiem (Tabula 9). PQR maisījuma sastāvs un PQR apstākļi tika veidoti, vadoties pēc ieteikumiem [Spigaglia *et al.*, 2002].

Sagatavo agarozes gēlu, paraugus ienes agarozes gēlā, amplifikācijas produktu sadalījumu agarozes gēlā vizualizē uz transiluminatora.

Tabula 9. PQR apstākļi toksinogēnu *tcdA* un *tcdB* noteikšanai.

Nr.	Cikla daļa	Temperatūra	Cikla ilgums
1	Uzkarsēšana	95 °C	5 minūtes
2	Denaturācija*	95 °C	1 minūte
3	Hibridizācija	55 °C	1 minūte
4	Polimerizācija	72 °C	1 minūte
5	Amplifikācijas nobeigums	72 °C	10 minūtes

*Cikls 2 – 4 tika atkārtots 30 reizes

4.3.7. Ribotipa noteikšana ar PQR

C. difficile ribotipu noteikšanai izmanto PQR ar tālāku reakcijas produktu sadalīšanu agarozes gēlā. Ribotipēšanu veic, kā aprakstīts [Spigaglia *et al.*, 2002], amplificējot 16S rRNS un 23S rRNS gēnus.

Reakcijai izmantoti praimeru em 272/273 (Tabula 5). Tiek sagatavots PQR maisījums. PQR tika izmantoti 2 µl testējamā DNS šķīduma, kam pievienoti 48 µl PQR maisījuma, kopējais tilpums 50 µl PQR maisījuma sastāva uz vienu reakciju (Tabula 10).

Tabula 10. PĶR sastāvs ribotipa noteikšanai.

Sastāvdaļa	Daudzums
10x Taq polimerāzes buferis	5 µl
10mM dNTP maisījums	1 µl
Praimeris 272/273	2 µl
DNS	2 µl
Taq polimerāze	0,5 µl
Destilēts ūdens	39,5 µl

Sagatavoto PĶR maisījumu mēģenes ievieto termoblokā un izvēlas programmu RIBOTAIP. PĶR maisījuma sastāvs un PĶR apstākļi (Tabula 11) tika veidoti, vadoties pēc ieteikumiem [Spigaglie *et al.*, 2002].

Sagatavo agarozes gēlu, paraugus ienes agarozes gēlā, amplifikācijas produktu sadalījumu agarozes gēlā vizualizē uz transiluminatora.

Tabula 11. PĶR apstākļi ribotipa noteikšanai.

Nr.	Cikla daļa	Temperatūra	Cikla ilgums
1	Uzkarsēšana	95 °C	5 minūtes
2	Denaturācija	95 °C	1 minūte
3	Hibridizācija	55 °C	1 minūte
4	Polimerizācija	72 °C	1 minūte
5	Amplifikācijas nobeigums	72°C	10 minūtes

Cikls 2 – 4 tika atkārtots 30 reizes

Iegūtie PĶR produkti tika attīrīti, izmantojot Qiagen MinElute 96UF PCR Purification Kit. Attīrītajiem PĶR fragmentiem tika mērīta koncentrācija ar Nanodrop1000. Sagatavo agarozes gēlu, paraugus ienes agarozes gēlā, amplifikācijas produktu sadalījumu agarozes gēlā vizualizē uz transiluminatora. Iegūto amplifikācijas

produktu fragmentu sadalījumu agarozes gēlā rezultātu interpretācijai salīdzina ar datu bāzē esošajiem, izmantojot programmu BioNumerics, tā nosakot ribotipu.

4.3.8. Toksinotipēšana

Toksinotipēšanu veic, kā aprakstīts [Spigaglia *et al.*, 2002].

Fragmentus PL1, PL2, PL3, PL4, B1, A3 amplificē ar specifiskiem praimeru pāriem. Šo specifisko praimeru pāru uzbūve redzama Tabulā 5. Tālāk nepieciešama iegūto fragmentu restrikcija. Gēna A3 DNS restrikcijas ferments ir EcoRI un SpeI; B1 DNS restriktāze ir HincII un AccI enzīmi; PL2 restriktāze ir HindIII; PL3 restriktāze ir EcoRI un PL4 restriktāze ir HincII.

PĶR tika izmantoti 2 μ l testējamā DNS šķīduma, kam pievienoti 48 μ l PĶR maisījuma, kopējais reakcijas tilpums 50 μ l PĶR maisījuma sastāva uz vienu reakciju (Tabula 12).

Tabula 12. PĶR sastāvs toksinogēnu noteikšanai.

Sastāvdaļa	Daudzums
10x Taq polimerāzes buferis	5 μ l
10mM dNTP maisījums	2,5 μ l
Praimeris em264/265*	5 μ l
DNS	2 μ l
Taq polimerāze	0,4 μ l
Destilēts ūdens	35,1 μ l

*Toksinotipēšanai izmantojamais praimeru pāra piemērs.

PĶR sastāvs citu toksinogēnu noteikšanai ir analogisks.

Sagatavoto PĶR maisījumu mēģenes ievieto termoblokā un izvēlas programmu TOXINOTAIP. PĶR maisījuma sastāvs dots Tabulā 12 un apstākļi doti Tabulā 13.

Tabula 13. PĶR apstākļi toksinotipa noteikšanai.

Nr.	Cikla daļa	Temperatūra	Cikla ilgums
1	Uzkarsēšana	93 °C	3 minūtes
2	Denaturācija	93 °C	15 sekundes
3	Hibridizācija	62 °C	30 minūte
4	Polimerizācija	68 °C	3 minūte
5	Amplifikācijas nobeigums	72 °C	10 minūtes

Cikls 2 – 4 tika atkārtots 35 reizes.

Sagatavo maisījumu, lai veiktu fragmentu attiecīgā gēna restrikciju ar specifiskām restriktāzēm (Tabula 14).

Tabula 14. Toksinotipēšanai nepieciešamais gēns un tam atbilstošās izmantotās restriktāzes.

Gēns	Restriktāzes
A3	EcoRI SpeI
B1	HincII AccI
PL1	HindIII
PL2	HindIII
PL3	EcoRI
PL4	HincII

Restrikcijas maisījuma kopējais daudzums ir 40 µl. Tā sastāvs redzams Tabulā 15.

Tabula 15. Maisījuma sastāvs gēnu fragmentu restrikcijai.

Sastāvdaļa	Daudzums
Paraugs	30 µl
Restriktāzes ferments*	1 µl
Restriktāzes buferis**	4 µl
Destilēts ūdens	5 µl

* katram gēnam atbilstošs restriktāzes ferments

** katrai restriktāzei atbilstošs buferis

Pēc 24 stundu restrikcijas 37°C termoblokā fragmentus vizualizē 1% gēlā uz transiluminatora. Sagatavo agarozes gēlu un paraugus ienes tajā. Amplifikācijas produktu sadalījumu agarozes gēlā vizualizē uz transiluminatora. Iegūto amplifikācijas produktu fragmentu sadalījumu agarozes gēlā rezultātu interpretācijai salīdzina ar datu bāzē esošajiem.

4.3.9. MLST

MLST veic, izmantojot kapilāra elektroforēzi, kur izmanto DNS atkarīgās polimerāzes in vitro. Kapilāra elektroforēzes sagatavošanai tika izmantoti 1,5 ng attīrīta PĶR produkta. Reakcijai izmanto jau gatavus Applied Biosystems Big dye v 3,1 fluorescences maisījumus, kas satur dNTP, iezīmētu buferi un polimerāzi [Lemee *et al.*, 2005, Killgore *et al.*, 2007].

C.difficile MLST shēmā lieto šādus septiņus mājturības gēnus: *aroE* (shikimate dehidrogenāze), *ddl* (D-alanīna:D-alanīna ligāze), *dutA* (dUTP pirofosfotāze), *gmk* (gualunāta kināze), *recA* (rekombināze), *sodA* (superoksīda bismutāze), *tpi* (tiofosfāta izomerāze). Nukleotīdu secība PĶR amplifikācijas praimeros redzama Attēlā 8.

PĶR ar fluoriscējošu krāsvielu maisījuma sastāvu (Tabula 16). Reakcijas tilpums 10 µl.

Tabula 16. PĶR produktu sekvenēšanai nepieciešamais reakcijas sastāvs.

Sastāvdaļa	Daudzums
2.5X buferis	1 µl
BIGDay v3.1.	3 µl
Praimeris*	1 µl
DNS(koncentrācija vidēji 5ng/ml)	1,5 µl
Destilēts ūdens	3,5 µl

*katram gēnam savs praimeru pāris

PĶR produktus sekvenēja ar ģenētisko analizatoru ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), kurā izmanto 36 cm kapilāru un polimēru POP 7. Tika izmantoti standarta apstākļi (Tabula 17), kā ieteikts Applied Biosystems instrukcijā. Sekvenču analīze tika veikta ar Sequencing analysis, un sekvences ievadītas www.pasteur.fr datubāzē un salīdzinātas ar tur esošajām. *C.difficile*. Ir pieejamas 2 datubāzes – allēļu profilu un izolātu struktūru. 2010. gada sākumā šeit bija apkopoti 539 izolāti un 48 sekvences tipi (ST).

Tabula 17. PĶR sekvenēšanas reakcijas apstākļi.

Nr.	Cikla daļa	Temperatūra	Cikla ilgums
1	Uzkarsēšana	95 °C	1 minūte
2	Denaturācija	94 °C	10 sekundes
3	Hibridizācija	46,5 °C	10 sekundes
4	Polimerizācija	60 °C	4 minūtes
5	Amplifikācijas nobeigums	4 °C	5 minūtes

Ciklu 2 – 4 atkārtoti 25 reizes

4.4. Darba analīze un datu statistiskā apstrāde

Pacientu datu analīzei tika izmantotas aprakstošās statistikas metodes.

Datu ievadei, uzkrāšanai un apstrādei pēc bioloģisko pētījumu apstrādē pieņemtajām standartmetodēm ar datora palīdzību tika izmantota speciāli pielāgota datu uzkrāšanas un analīzes sistēma EPI INFO 2000, Microsoft Excel 2003, SPSS 2000 un BioNumerics version 4.5. Statistiskajai apstrādei izmantoti bioloģisko un medicīnisko pētījumu statistiskajā apstrādē pieņemtie testi. Tika novērtēti centrālās tendences rādītāji – vidējais aritmētiskais, mediāna un moda, kā arī izkliedes rādītāji – standartnovirze, vidējā aritmētiskā standartklūda. Raksturlielumu atšķirības novērtētas ar ticamību $p < 0,05$. Simptomiem, ja tie statistiski ticami atšķirās ($p < 0,05$), tika novērtēta OR jeb izredžu attiecība.

Pētījuma gaitā tika ieviesta kvalitātes kontroles sistēma, lai nodrošinātu savākto datu precizitāti.

5. Rezultāti

5.1. Bērnu grupas analīze

5.1.1. Ar akūtu zarnu infekciju hospitalizēto bērnu demogrāfisko datu analīze

Pētījumā tika iekļauti 187 bērni, kuri stacionēti BKUS no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam. Pacientu vecums svārstījās no 3 dienām līdz 16 gadiem ar vidējo vecumu 2 gadi 11 mēneši. Vairums pacientu bija vecumā no 12 līdz 24 mēnešiem – 28,9% (n=54) un no 0 līdz 12 mēnešiem – 25,1% (n=47) (Tabula 18).

Tabula 18. Pētījumā iekļauto bērnu sadalījums pa vecuma grupām.

Vecuma grupa	Bērnu skaits	% sadalījums
0 – 12 mēn.	47	25,1
12 – 24 mēn.	54	28,9
2 – 4 gadi	48	25,6
4 – 18 gadi	38	20,3
Kopā	n=187	100

5.1.2. Pacientu stacionēšanas un klīnisko diagnožu variācijas

59,9% (n=112) pacientiem stacionēšanas diagnoze bija akūts gastroenterīts, 9,1% (n=17) – stacionēti ar diagnozi akūts gastroenterokolīts, 11,2% (n=21) – akūts enterīts, 10,2% (n=19) – akūts enterokolīts, 8,0% (n=15) – funkcionāli gremošanas traucējumi, bet 1,6% (n=3) bija cita stacionēšanas diagnoze ar akūtu zarnu infekcijas slimības klīniku (Tabula 19). 90,9% (n=170) pacientu tika stacionēti ar infekciju diagnozi.

Tabula 19. Diagnožu sadalījums stacionēšanas brīdī.

Diagnoze	Slimnieku sadalījums pa diagnozēm	% sadalījums
Akūts gastroenterīts	112	59,9
Akūts gastroenterokolīts	17	9,1
Akūts enterīts	21	11,2
Akūts enterokolīts	19	10,2
Funkcionāli gremošanas traucējumi	15	8,0
Cita diagnoze + akūta zarnu infekcija	3	1,6
Kopā	n=187	100

Veicot apskati stacionārā un uzstādot klīnisko diagnozi, pētījuma subjektu sadalījums bija šāds 55,6% (n=104) bērnu bija akūts gastroenterīts, no kuriem fēcēs 7 bērniem atklāja *C.difficile* baktērijas abus toksinogēnus un vienam bērnam tikai toksinogēnu B. 13,4% (n=25) – akūts gastroenterokolīts, šajā grupā atklāja vienam bērnam abus toksinogēnus un tikai toksinogēnu B arī vienam bērnam. 5,3% (n=10) – akūts enterīts. 9,1% (n=17) akūts enterokolīts. 11,8% (n=22) – funkcionāli gremošanas traucējumi, bet 4,8% (n=9) bija cita ar akūtām zarnu infekcijām saistīta klīniskā diagnoze, šajā grupā vienam bērnam diagnoze bija infekciozā mononukleoze ar *C.difficile* abu toksinogēnu laboratorisko atradni. 9,6% (n=18) pacientu bija konstatēts hemokolīts. (Tabula 20).

Tabula 20. Klīnisko diagnožu sadalījuma saistība ar atklāto *C.difficile*.

Diagnoze	Slimnieku sadalījums pa diagnozēm	% sadalījums	<i>C.difficile</i> atradne
Akūts gastroenterīts	104	55,6	8
Akūts gastroenterokolīts	25	13,4	2
Akūts enterīts	10	5,3	0
Akūts enterokolīts	17	9,1	0
Funkcionāli gremošanas traucējumi	22	11,8	0
Cita diagnoze, ar akūtu zarnu trakta infekciju saistīta	9	4,8	1
Kopā	n=187	100	11

Pacienti pēc klīniskās diagnozes apstiprināšanas ārstējušies BKUS vidēji 4,1 gultasdienu. Minimālais rādītājs – 1 diena, maksimālais – 90 dienas.

5.1.3. Pacientu klīniskās ainas novērtējums stacionārā

1,1% (n=2) pacientu tika stacionēti bez eksikozes pazīmēm, 79,1% (n=148) bija I pakāpes eksikoze, 18,2% (n=34) – II pakāpes eksikoze un 1,6% (n=3) pacientu tika stacionēti ar III pakāpes eksikozi (Tabula 21).

Tabula 21. Eksikozes pazīmes stacionējot.

Eksikozes stadija	pazīmes	Slimnieku skaits	% sadalījums
Nav eksikozes		2	1,1
I pakāpe		148	79,1
II pakāpe		34	18,2
III pakāpe		3	1,6
Kopā		n=187	100

Analizējot pacientu vispārējo stāvokli stacionēšanas brīdī, redzams, ka 1,1% (n=2) pacientu vispārējais stāvoklis bija viegls, 91,4% (n=171) vispārējais stāvoklis bija vidēji smags, savukārt 7,5% (n=13) pacientu stacionēti smagā vispārējā veselības stāvoklī.

5.1.4. Pacientu klīniski laboratorisko datu izvērtējums

- 97,3% (n=182) pacientu tika noteikts C reaktīvā proteīna (CRP) līmenis. CRP vidējā vērtība šiem pacientiem bija 22,2 mg/L (minimālā – 0,1 mg/L, maksimālā – 187,8 mg/L). Analizējot CRP vērtību sadalījumu pa intervāliem, redzams, ka 74,3% (n=139) pacientu CRP vērtība bijusi intervālā no 0 līdz 25,0 mg/L.
- 97,3% (n=182) pacientu bija noteikts kopējais leukocītu skaits, kura vidējā vērtība bija $12\,553 \times 10^6/L$, ar minimālo vērtību $1700 \times 10^6/L$ un maksimālo – $40\,030 \times 10^6/L$. Lielākajai daļai pacientu – 21,9% (n=41) leukocītu skaits svārstījās intervālā no 10 000 līdz $12\,500 \times 10^6/L$.
- 96,2% (n=180) fēču tika noteikts rotavīruss, un 29,4% (n=53) pacientu tas bija pozitīvs.
- 11,8% (n=22) pacientu fēcēs tika noteikti citu vīrusu antigēni, astoņiem pacientiem pierādīts norovīruss, vienam pacientam – adenovīruss.
- 94,1% (n=176) pacientu tika veikts fēču bakterioloģiskais uzsējums. 86,6% (n=162) gadījumu fēču uzsējums bija negatīvs, 6,4% (n=12) gadījumu tika izolēta

Salmonella enteritidis un pa vienam gadījumam – *Salmonella typhimurium* un *Shigella sonnei*. trīs gadījumos tika novērota jaukta infekcija – no fēcēm izolēta *Salmonella enteritidis* – un pierādīts rota vīrusa antigēns. Kopumā 41,1 % (n=77) pacientu tika pierādīts kāds no diareju izraisošajiem patogēniem.

➤ 3,7 % (n=7) pacientu tika veikta asins kulturēšana. vienā gadījumā asins kultūra bija pozitīva – tika izolēts *Lactococcus lactis*.

5.1.5. Akūtas zarnu infekcijas riska faktoru izvērtējums

➤ 11,2% (n=21) bērnu anamnēzē bija iepriekšēja stacionēšana, savukārt 12,8% (n=24) pirms stacionēšanas BKUS bija saņēmuši antibakteriālo terapiju mājās. Vienam no pacientiem iepriekš bija stacionēti arī citi ģimenes locekļi. 36,4% (n=68) bērnu apmeklēja pirmsskolas iestādi vai skolu.

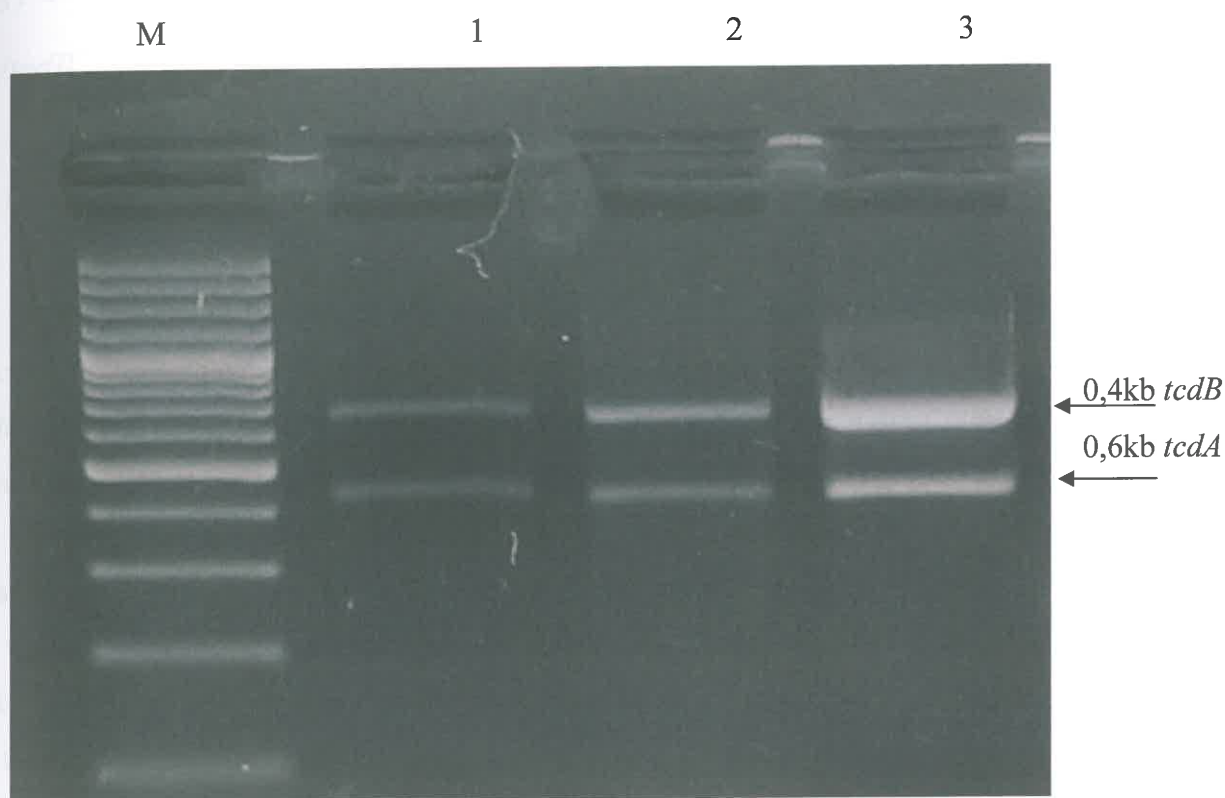
➤ Stacionāra etapā 82,9% (n=155) pacientu nesaņēma antibakteriālo terapiju, 10,7% (n=20) saņēma antibakteriālo terapiju ar vienu antibakteriālo līdzekli, 3,2% (n=6) terapijā tika izmantoti divi antibakteriālie līdzekļi, 2,1% (n=4) saņēma trīs antibakteriālos līdzekļus, savukārt piecus un sešus antibakteriālos līdzekļus saņēma attiecīgi pa vienam pacientam (Tabula 22).

Tabula 22. Stacionārā izmantoto antibakteriālo līdzekļu skaits.

Antibakteriālā terapija	Slimnieku skaits n=187	% sadalījums
Antibakt. terap. nesaņēma	155	82,9
1 antibakt. līdzeklis	20	10,7
2 antibakt līdzekļi	6	3,2
3 antibakt. līdzekļi	4	2,1
5 antibakt. līdzekļi	1	0,6
6 antibakt. līdzekļi	1	0,6

5.1.6. *C.difficile* prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diarejas klīniku

No pacientu fēču paraugiem (n=248) tika izdalīta DNS, izmantojot PĶR gēla elektroforēzes metodi tika noteikta *C.difficile* toksinogēnu *tcdA/tcdB* klātbūtne. Toksinogēns A gēla elektroforēzē marķējas 0,6 kb lielumā, savukārt toksinogēns B marķējas 0,4 kb lielumā. (Attēls 13).

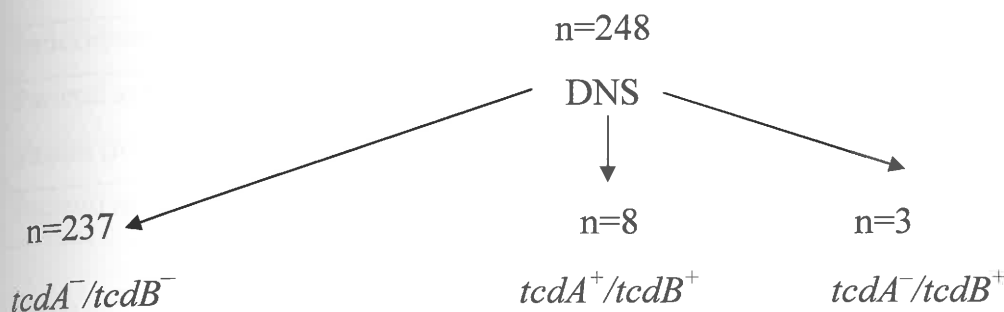


Attēls 13. *C.difficile* DNS amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gēlā.

M – marķieris, 1 – 3 *tcdA*⁺/*tcdB*⁺ paraugi

C.difficile saistība ar citiem diagnosticētajiem izraisītājiem, demogrāfiskajiem datiem un klīniskajām diagnozēm:

➤ *C.difficile* A un B toksinogēni vienlaikus tika konstatēti 3,2% (n=8) pacientu, savukārt tikai *C.difficile* B toksinogēns konstatēts 1,2% (n=3) pacientu (Attēls 14).



Attēls 14. IZanalizēto paraugu skaits un pozitīvās atradnes sadalījums.

➤ Vienā gadījumā tika novērota vienlaicīga rotavīrusa antigēna pierādīšana un *C.difficile* A un B toksinogēnu klātbūtne, savukārt vienā gadījumā tika vienlaikus pierādīts rotavīruss un *C.difficile* B toksinogēna klātbūtne. Pārējiem deviņiem *C.difficile* pozitīvajiem pacientiem netika pierādīti citi zarnu infekciju ierosinātāji.

➤ Pacientu, kuriem tika konstatēti A un B toksinogēni, vidējais vecums – 31 mēnesis jeb 2 gadi un 7 mēneši. Stacionārā tie pavadījuši vidēji 2,6 gultasdienas. Tikai viens no šiem pacientiem pirms stacionēšanas saņēmis piecu dienu ilgu antibakteriālu terapiju ar amoksicilīnu un piecu dienu kursu ar cefadroksilu. Stacionāra etapā antibiotiku terapiju saņēma tikai viens pacients – vienu dienu terapiju ar ampicilīnu.

➤ deviņu pacientu klīniskā diagnoze bija akūts gastroenterīts, vienam pacientam tika uzstādīta diagnoze – akūts gastroenterokolīts, bet vienam bērnam tika atklāts infekciozās mononukleozes sindroms ar funkcionāliem gremošanas traucējumiem. Visi šie pacienti tika stacionēti vidēji smagā vispārējā stāvoklī.

➤ Pacientiem ar pozitīvu *C.difficile* laboratorisko atradni vidējais leukocītu skaits asinīs bija $14\,524 \times 10^6/L$ un vidējās CRP vērtības – 17,42 mg/L. Salīdzinot pacientu kopējo leukocītu skaitu un CRP vērtības, nebija statistiski ticamu atšķirību starp

pacientu grupām ar pozitīviem *tcdA/tcdB* un pacientu grupu, kam tie bija negatīvi ($p>0.05$) (Tabula 23).

Tabula 23. CRP un leikocītu skaita diference pacientiem ar *C.difficile* un pacientiem ar citu atradni.

Izmeklējums	CRP	Leikocītu skaits
Pacienti ar pozitīvu <i>C.difficile</i> atradni (n=11)	17,42mg/L	14 524 x 10 ⁶ /L
Pacienti ar citu atradni (n=187)	22,24mg/L	12 553 x 10 ⁶ /L

- Analizējot *C.difficile tcdA/tcdB* pozitivitāti saistībā ar pacientu vecumu, bērnu iestādes apmeklēšanu, iepriekšējo stacionēšanu un citu ģimenes locekļu stacionēšanu, antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas, iestāšanās un klīnisko diagnozi, stāvokļa smagumu stacionējot, slimnīcā pavadītajām dienām, antibakteriālo terapiju stacionārā un tās ilgumu, kā arī izmantotajiem antibakteriālajiem preparātiem, Spīrmena rangu korelācijas analīzē netika novērotas statistiski ticamas sakarības ($p>0,05$).
- Šajā pētījumā starp *C.difficile tcdA* un *tcdB* pastāv cieša saistība (korelācijas koeficients $r_s=0,81$, $p<0,01$).

5.2. Pieaugušo grupas analīze

5.2.1. P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas nodaļas diagnostikas metožu pilnveidošanās no 2005. līdz 2009. gadam

P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas laboratorijā izmantotās *C.difficile* atklāšanas metodes gadu laikā ir mainījušās, jo pilnveidojies laboratorisko diagnostikas metožu piedāvājuma klāsts, kas ļauj izvēlēties precīzāko un specifiskāko.

P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas nodaļā 2005. gadā *C.difficile* identifikācijai izmantoja *C.difficile* antigēna noteikšanas eksprestestu (Rapid pour *C.difficile*, Francija). Gada laikā ar šo testu tika atklāti 78 pozitīvi *C.difficile* paraugi. 2006. gada beigās antigēna noteikšanas tests tika aizstāts ar toksīna A noteikšanas eksprestestu (*C.difficile* toxin A test, Vācija).

Uzsākot pētījumu 2006. gada augustā, tika izvērtētas metožu priekšrocības, tāpēc tika veikta divu testu salīdzināšana. 50 secīgi fēču paraugi, kuri tika nosūtīti uz laboratoriju ar aizdomām par *C.difficile* infekciju, tika analizēti, izmantojot divas metodes:

1. metode – eksprestests, Rapid pour *C.difficile*, ar kuru noteica *C.difficile* antigēnu slimnieka fēcēs;

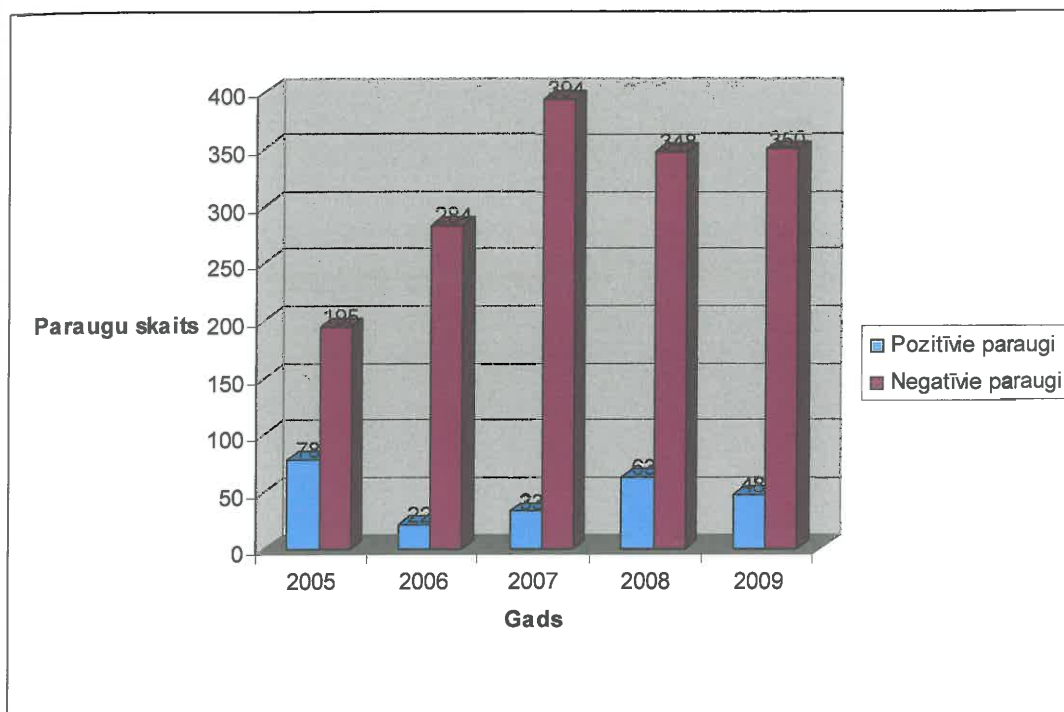
2. metode – balstīta uz PĶR, ar kuru noteica *tcdA* un *tcdB*.

Rezultātā ar eksprestestu pret *C.difficile* 4 paraugos atklāja antigēnus, bet 3 paraugos toksinogēnus, pārējie paraugi bija negatīvi (Tabula 24). Toksinogēnu atklāšana liecina par baktērijas klātbūtni organismā, un tā ir informatīvāka metode nekā antigēna atklāšana, kurš ir baktērijas darbības rezultātā radies produkts. PĶR ir augsta specifitāte, jo vienam paraugam, kurā tika atklāts antigēns, netika atklāti virulences faktori *tcdA* un *tcdB*.

Tabula 24. Pozitīvo *C.difficile* paraugu diagnostikas rezultātu salīdzinājums, nosakot antigēnu un toksinogēnus.

Parauga Nr.	<i>tcdA/tcdB</i>	Antigēns pret <i>C.difficile</i>
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	-

2008. gadā tika ieviesta *C.difficile* tīrkultūras iegūšanas metode, kurā izmanto bakteriju kultivēšanu specifiskās barotnēs. Metode savu prioritāti saglabājusi līdz šim brīdim. Laika posmā no 2005. līdz 2009. gadam *C.difficile* noteikšanas paņēmieni lielā mērā ir nomainījušies vairāki testi un pilnveidojušies esošie. Pozitīvo atbilžu skaits ir cieši saistīts ar testa principu, to var novērot periodā starp 2005. un 2006. gadu, kad, antigēna noteikšanas eksprestestu aizstājot ar toksīnu A noteikšanas testu, krasi samazinājās pozitīvo atbilžu skaits, no 78 – 2005. gadā uz 22 – 2006. gadā. Savukārt, ieviešot kultūru testu un PĶR testu, pozitīvo atbilžu skaits kļuva lielāks. Attēlā 15 ir redzama pozitīvo atbilžu skaita dinamika P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas laboratorijā no 2005. līdz 2009. gadam.

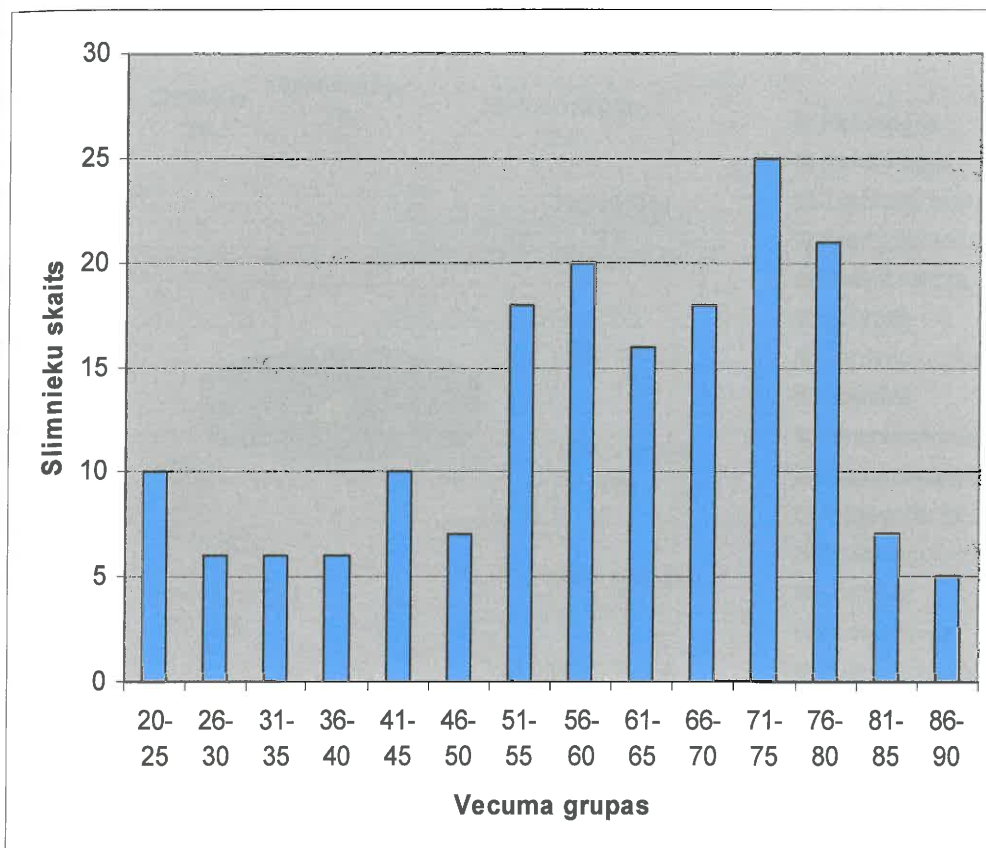


Attēls 15. Pozitīvo atbilžu skaita dinamika P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas laboratorijā no 2005. līdz 2009. gadam.

Uzsākot pētījumu 2006. gada augustā, P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas dati un materiāls kļuva par pamatu tālākiem *C.difficile* molekulāri epidemioloģiskajiem izmeklējumiem.

5.2.2. *C.difficile* infekcijas slimnieku demogrāfisko datu analīze

- Stacionēto slimnieku sadalījums: sievietes 58,5% (n=103), vīrieši 41,1% (n=72).
- Vidējais slimnieka vecums – 60,12 gadi, minimālais vecums – 20, maksimālais – 90 gadi (Attēls 16).
- Pacientu minimālais atrašanās laiks stacionārā 2, maksimālais – 90 dienas.
- 162 pacientiem ārstēšanās stacionārā noslēgusies ar izrakstīšanos, miruši 12 pacienti.

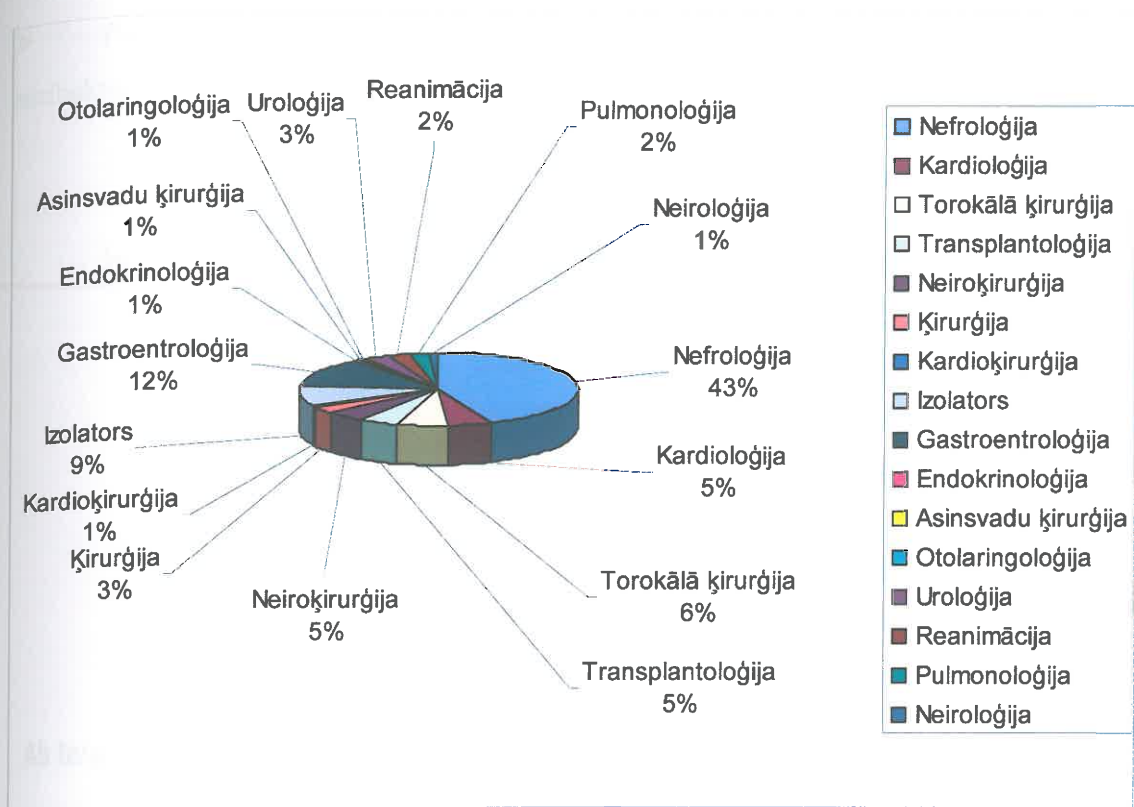


Attēls 16. Slimnieku skaita sadalījums pa vecuma grupām.

5.2.3. *C.difficile* infekcijas slimnieku prevalence P. Stradiņa KUS nodaļās

Rezultāti balstās uz anketu datu analīzi, kuri apstrādāti EpiInfo programmā. Anketas veidlapu skatīt pielikumā 10.3. Laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada beigām pētījumā tika iekļauti 175 slimnieki, kuriem tika laboratoriski pierādīta *C.difficile* infekcija.

Pacientu relatīvajā sadalījumā pēc nodaļas profila atklājās, ka *C.difficile* kā CDAD izsaucēja tika pierādīta 43% nefroloģijas nodaļas slimnieku (Attēls 16).

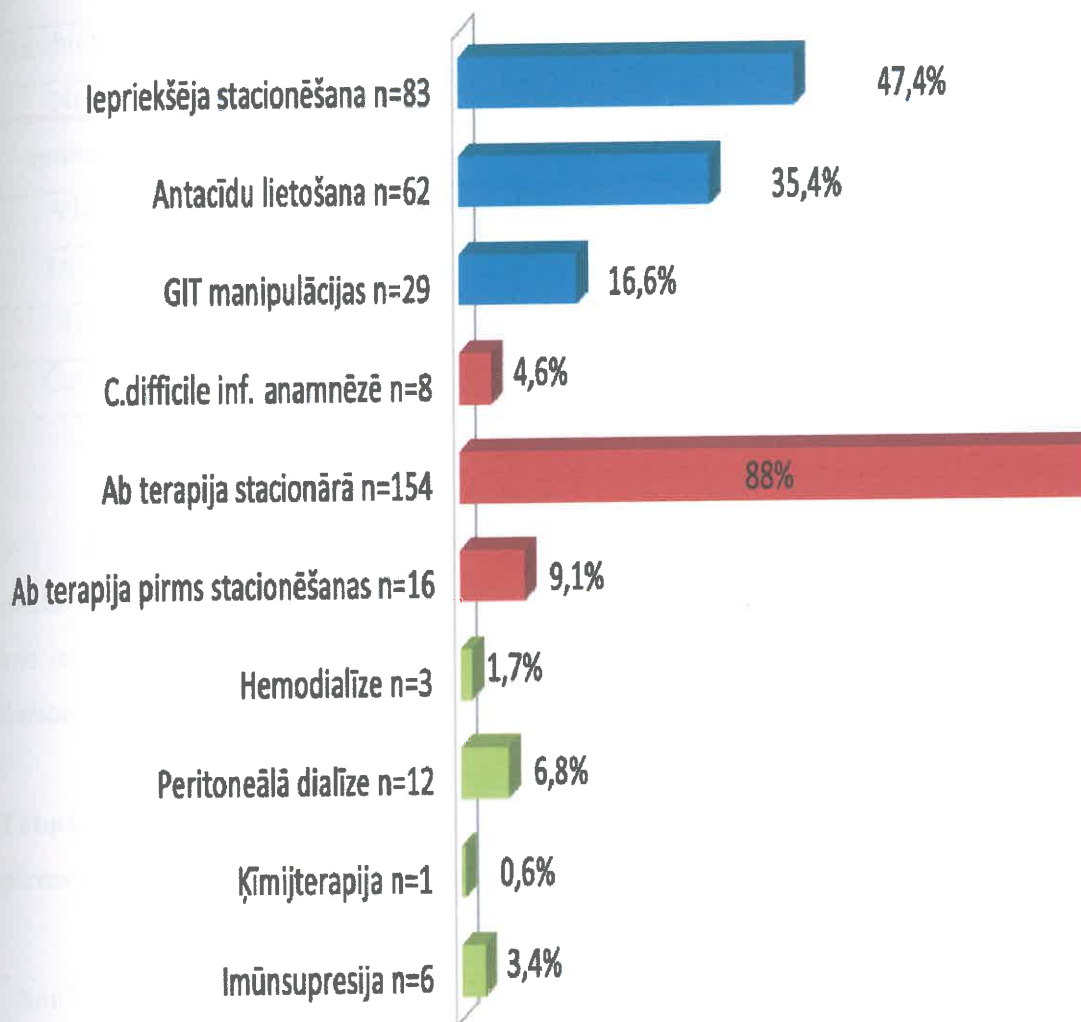


Attēls 16. Pacientu relatīvais sadalījums pēc nodaļas profila.

5.2.4. *C.difficile* infekcijas slimnieku iespējamo riska faktoru izvērtējums

- Iepriekšēja hospitalizācija bija 47,4% (n=83) slimnieku.
- Ambulatori antibiotikas bija lietojuši 9,1% (n=16) slimnieku.
- Gastrointestinālā trakta manipulācijas pirms infekcijas uzliesmojuma bija veiktas 16,6% slimnieku (n=29).
- 4,6% slimnieku (n=8) *C.difficile* infekcija bija jau anamnēzē.
- Antacīdos līdzekļus pirms infekcijas attīstības bija lietojuši 35,4% slimnieku (n=62).
- Kā cita riska faktori tika klasificēta ķīmijterapija n=1, imūnsupresija n=6, peritoneālā dialīze n=12, hemodialīze n=3, hroniska kuņģa čūla n=1, ileuss n=1.
- 154 no 175 anketētajiem pacientiem stacionārā pirms paraugu paņemšanas uz *C.difficile* infekciju tika izmantota antibakteriālā terapija (Attēls 17).

➤ Pirms CDAD simptomu parādīšanās 30,8% slimnieku (n=54) tika izmantota antibakteriālā terapija ar vienu vai vairākām antibiotikām (Tabula 24).



Attēls 17. *C.difficile* infekcijas riska faktoru izvērtējums.

Tabula 24. Antibiotiku skaits terapijā.

Antibiotiku skaits terapijā	Slimnieku skaits n=175	% sadalījums
Netika izmantota antibakteriālā terapija	21	12,0
Viena antibiotika	65	36,0
Divas antibiotikas	59	33,7
Trīs antibiotikas	24	13,7
Četras antibiotikas	6	3,4

➤ Stacionārā ārstēšanā visbiežāk izmantoja ciprofloksacīnu (n=74). Citu antibiotiku lietojuma biežums ārstēšanā redzams Tabulā 25. Ciprofloksacīns ir hinolons, kas ir iedarbīgs *in vitro* pret lielu skaitu gramnegatīvu aerobo baktēriju, kā arī pret dažiem grampozitīviem organismiem.

Tabula 25. Antibiotiku sadalījums pēc biežuma, kuras tika izmantotas ārstēšanā, pirms *C.difficile* infekcijas atklāšanas.

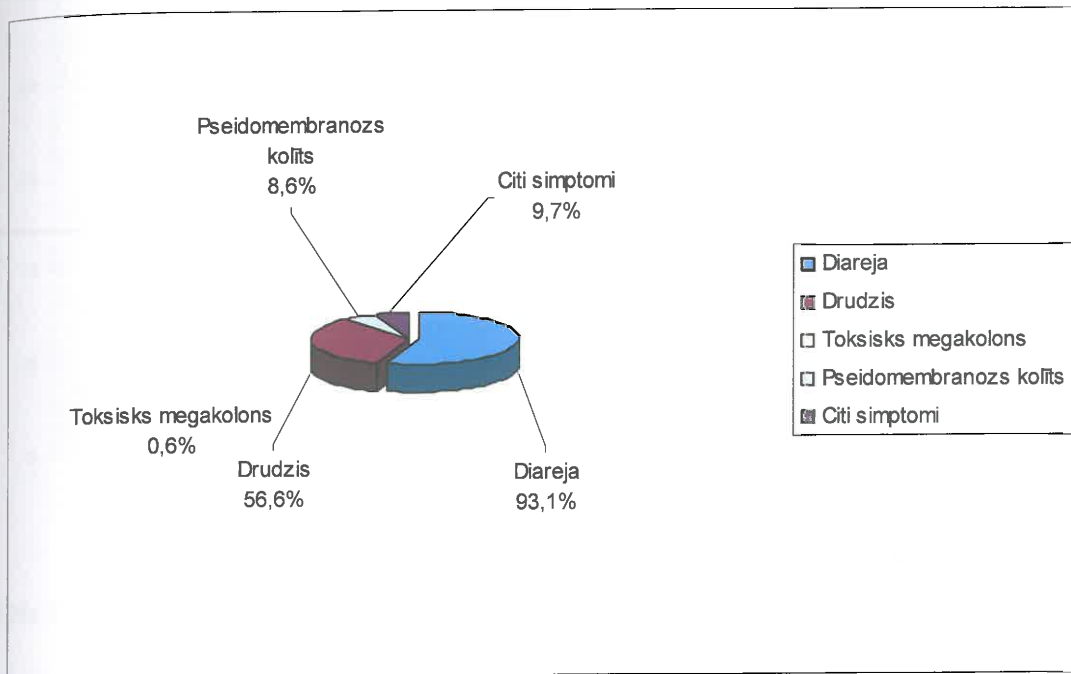
Antibiotikas nosaukums	Frekvence	% sadalījums
Amikacīns	4	1,5
Amoksiklāvs	25	9,3
Amoksicilīns	3	1,1
Ampicilīns	13	4,9
Ampicilīns/ Sulbaktāms	1	0,4
Azetronāms	1	0,4
Cefaklors	2	0,7
Cefaleksīns	1	0,4
Cefazolīns	40	14,9
Cefepīms	1	0,4
Cefotaksīms	1	0,4

Ceftazidīns	7	2,6
Ceftriaksons	28	10,4
Ciprofloksacīns	74	27,6
Klaritromicīns	1	0,4
Klindamicīns	5	1,9
Kloksacilīns	1	0,4
Doksiciklīns	2	0,7
Eritromicīns	3	1,1
Fucidīns	2	0,7
Gentamicīns	16	6,0
Imipenēms	3	1,1
Meropenēms	3	1,1
Metronidazols	16	16,0
Oksacilīns	5	1,9
Rifampicīns	2	0,7
Vankomicīns	8	3,0

5.2.5. *C.difficile* infekcijas slimnieku klīnisko simptomu prezentācija

Klīnisko simptomu analīze:

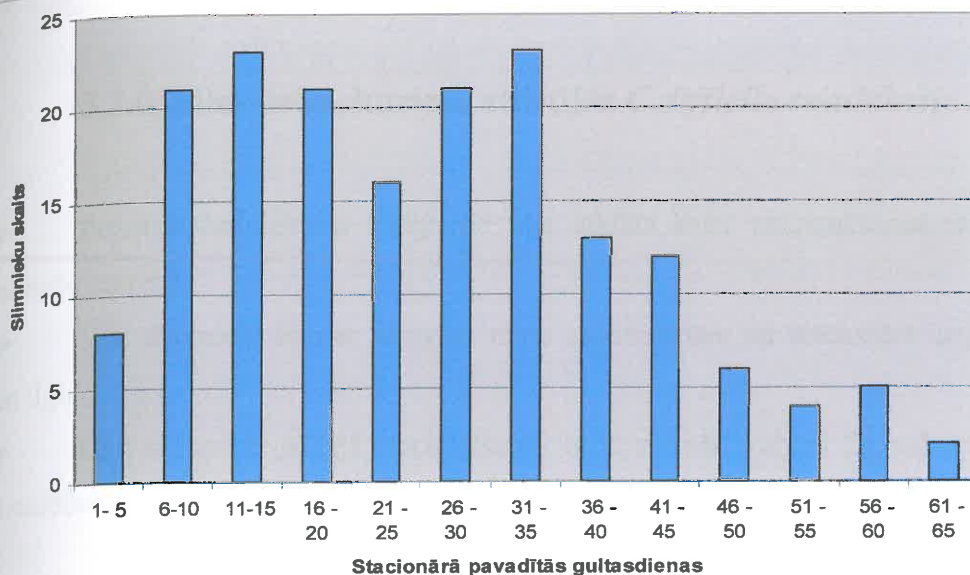
- drudzi, kas vidēji ilga 5 dienas novēroja 56,6% gadījumu (n=99).
- galvenais simptoms šai infekcijai ir diareja, un to novēroja 93,1% slimnieku (n=163), PMK diagnoze tika pierādīta 8,6% gadījumu (n=15), bet TM diagnoze – 0,6% gadījumu (n=2).
- 9,7% gadījumu (n=17) tika novēroti arī citi simptomi, piemēram, sāpes vēderā, intoksikācija, slikta dūša un vemšana (Attēls 18).



Attēls 18. Klīnisko simptomu izpausmes CDAD slimniekiem.

5.2.6. CDAD slimnieku stacionārā pavadīto gultasdienu analīze

P. Stradiņa KUS stacionārā ārstēto pacientu skaits gadā ir aptuveni 48 000 un vidēji slimnīcā tiek pavadītas 5 gultasdienas, kas ir divas reizes mazāk nekā vidēji Latvijā. CDAD slimnieks stacionārā vidēji pavada 26 gultasdienas, kas ir 4 reizes vairāk par vidējo P. Stradiņa KUS. Tas apliecina, ka CDAD slimnieks pieder smagu saslimšanu un grūti ārstējamu pacientu kategorijai. Attēlā 19 redzams anketēto CDAD slimnieku (n=175) skaits saistībā ar pavadītajām gultasdienām stacionārā.



Attēls 19. Anketēto CDAD slimnieku gultsdienas.

5.2.7. *C.difficile* infekcijas slimniekiem izmantotās terapijas analīze

- Saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile* infekciju, iepriekšējā terapija tika apturēta 15,5% gadījumu (n=27), izmainīta 35,4% (n=62) gadījumos un atstāta nemainīga iepriekšējā terapija 49,1% (n=86) gadījumu.
- 97 gadījumos, saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile*, terapijā tika nozīmēts metronidazols 61,8% (n=97) un 18,5% (n=29) gadījumos vankomicīns.
- Zāļu ievades veids – perorāli – bija 7,6% slimnieku (n=12), intramuskulāri 74,5% (n=117) un intravenozi 17,8% slimnieku (n=28).
- Probiotikas ārstēšanā izmantoja 35,4% gadījumu (n=62). Tika lietotas gan jogurta kapsulas, gan enterols, gan acidofīlās baktērijas, gan lineks.

5.2.8. Slimnieku, kuriem attīstījās *C.difficile* reinfekcija, analīze

- Pieciem slimniekiem *C.difficile* tika atklāta katrā stacionēšanas reizē vairāku mēnešu garumā.
- Visi slimnieki bija ar smagām nieru saslimšanām un stacionārā uzturējās bieži un ilgi.
- Divi slimnieki pēdējā stacionēšanas reizē miruši. Tabulā 26 redzams pacientu uzturēšanās ilgums.

Tabula 26. Reinfekcijas attīstības laika intervāls pieciem slimniekiem.

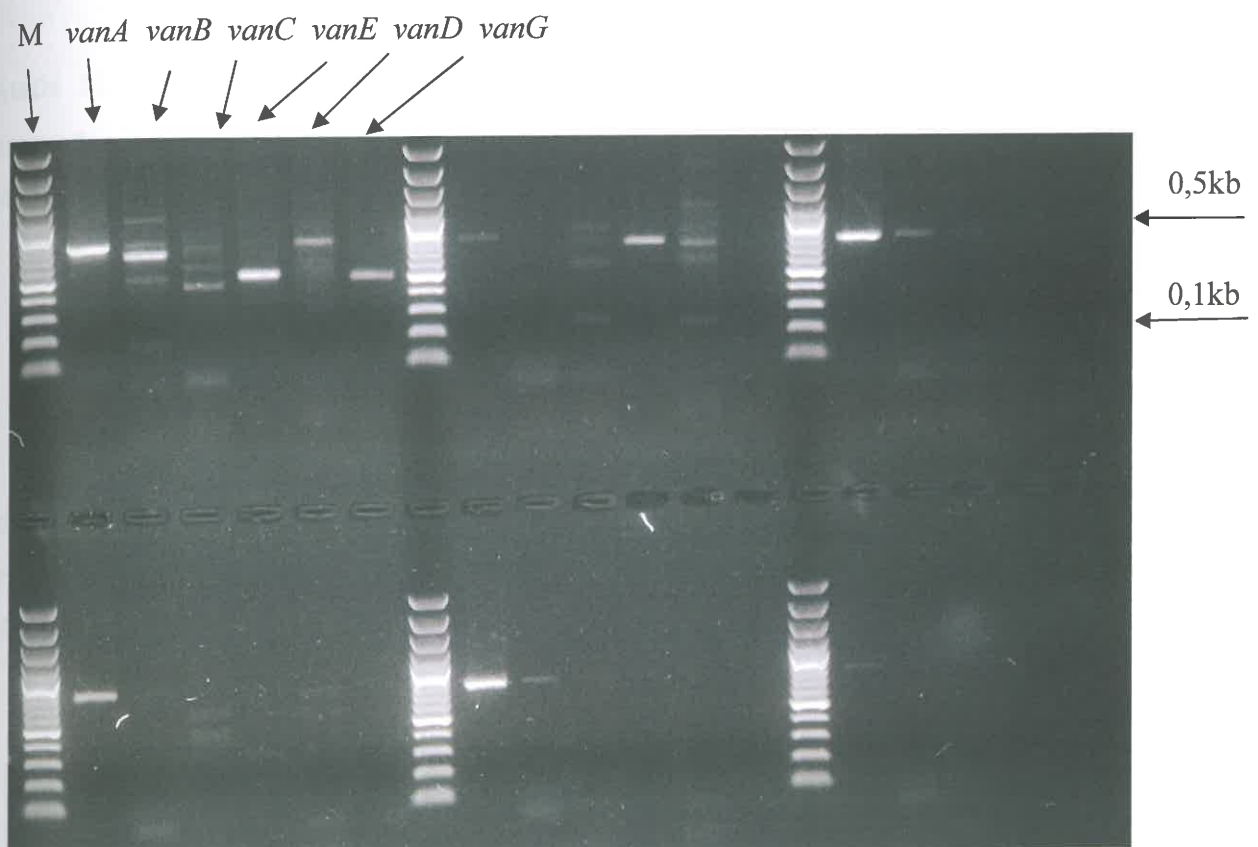
Pacienta Nr.	Pirmā epizode	Reinfekcija	Laika intervāls
1	08.01.2007.	01.09.2007.	9 mēneši
2	12.02.2007.	16.08.2008.	18 mēneši
3	19.11.2007.	12.11.2008.	12 mēneši
4	15.07.2007.	15.07.2008. 01.03.2009.	12 mēneši 8 mēneši – miris
5	03.12.2008.	23.03.2009.	3 mēneši – miris

5.2.9. Vankomicīna rezistences gēnu analīze

Laika periodā no 2006. gada līdz 2009. gada beigām, aizpildot ankešu datu daļu par P.Stradiņa KUS stacionārā izmantoto *C.difficile* infekcijas ārstēšanu, atklājās ka 8 slimniekiem no 175 slimniekiem ar pierādītu *Clostridium difficile* asociēto diareju (CDAD) ārstēšanas nolūkam tika nomainīta terapija no vankomicīna uz metronidazolu. Šāda ārstēšanas taktikas maiņa lika domāt par to, ka tā ir vērsta pret *C.difficile* vankomicīna rezistentiem celmiem. No astoņiem slimniekiem, DNS materiāls bija pieejams sešiem slimniekiem. Pieciem paraugiem konstatēja kādu no van gēniem - 1. paraugam *vanA*, *vanB*, *vanE*, *vanD* un *vanG*; 2. paraugam *vanE*; 3, 4 un 5. paraugam *vanA* (Attēls 20).

Izmeklējot *C.difficile* paraugus ar specifiskiem praimeriem *ddlE* uz enteroku gēniem, atklājās, ka sešos klostrīdiju pozitīvajos paraugos ir enterokokiem - *E.faecalis* un *E.faecium* raksturīgie gēni (Attēls 21). Tas norāda, visticamāk, ka vankomicīna rezistences gēni pieder enterokokiem, nevis klostrīdijām. Literatūrā ir dati par to, ka bieži *C. difficile* ir grūti identificēt fenotipiski, tāpēc jāveic genotipiska izpēte.

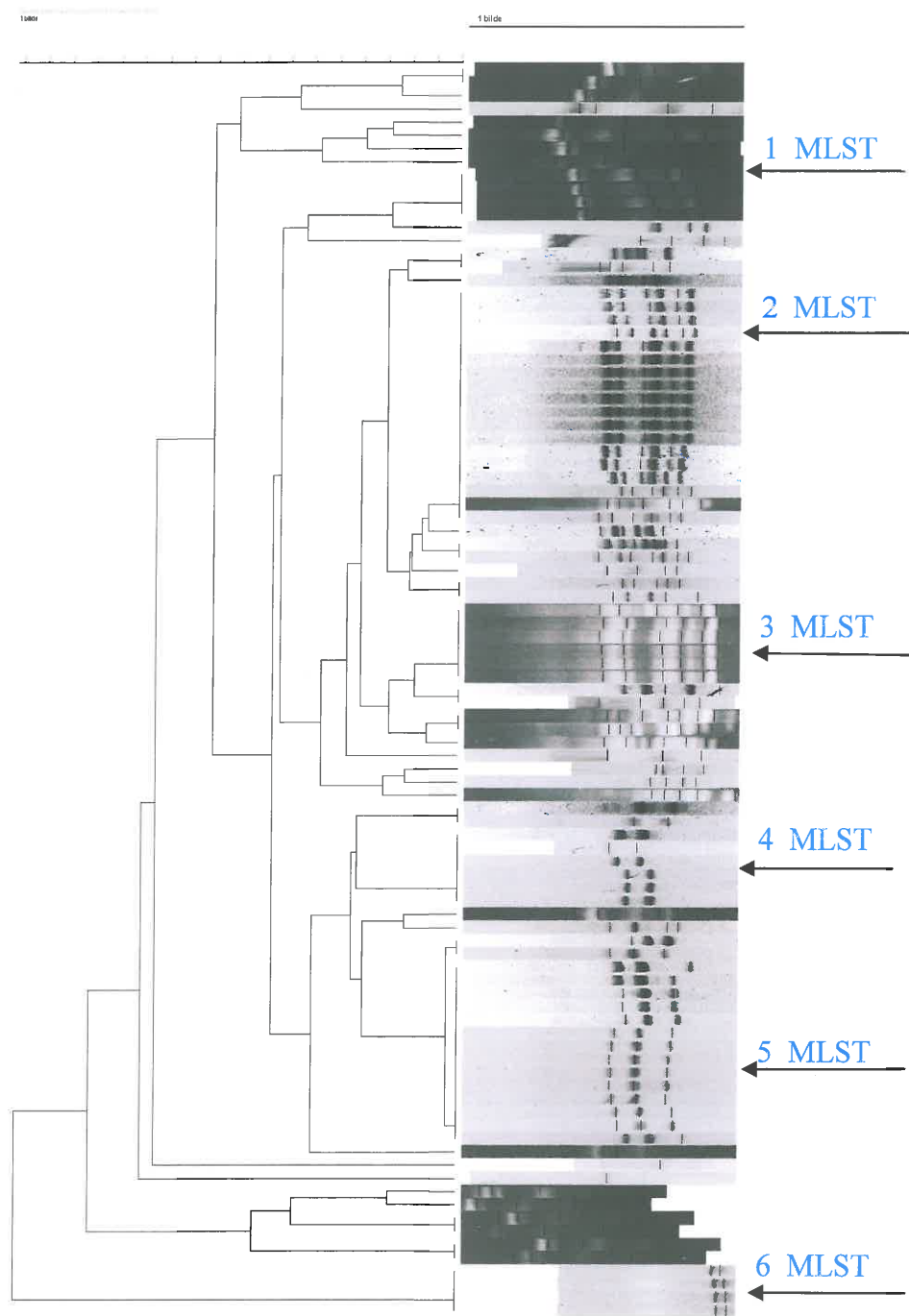
Produktus sekvenējot un iegūtos rezultātus salīdzinot ar NCBI datu bāzē esošajām sekvencēm, konstatējām, ka visas gēnu sekcences atbilst *E.faecalis*. Skatīt pielikumā 10.5 – *vanB* sekvenēšanas piemēru. Pielikumā 10.6 – *vanB* gēna BLAST analīzes piemēru.



Attēls 20. *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanE*, *vanD* un *vanG* gēnu noteikšanas piemērs 6 paraugiem.

Baktēriju elektroforēzes rezultāti tika ievadīti BioNumerics programmā, kurā izveidots ribotipu filoģenētiskais koks, ietverot šādus etapus:

1. Katra parauga elektroforēzes dati, izvēloties programmā rīkjoslau „Strips”, tiek atdalīti ar joslām.
2. Automātiskā fragmentu meklēšanas rīkjoslā „Bend” visu paraugu marķētie fragmenti tiek automātiski iezīmēti ar zaļu krāsu.
3. Katram elektroforēzes paraugam tiek pevienoti par slimnieku zināmie dati.
4. Elektroforēzes dati tiek savietoti kokā, apvienojot vienādos ribotipus. Savukārt līdzīgie ribotipi ar līniju palīdzību tiek savienoti radniecīgos ribotipos, izveidojot filoģenētisko koku (Attēls 23). Datu ievades piemēru skatīt pielikumā Nr. 10. 4.



Attēls 23. *C.difficile* celmu filoģenētiskais koks.

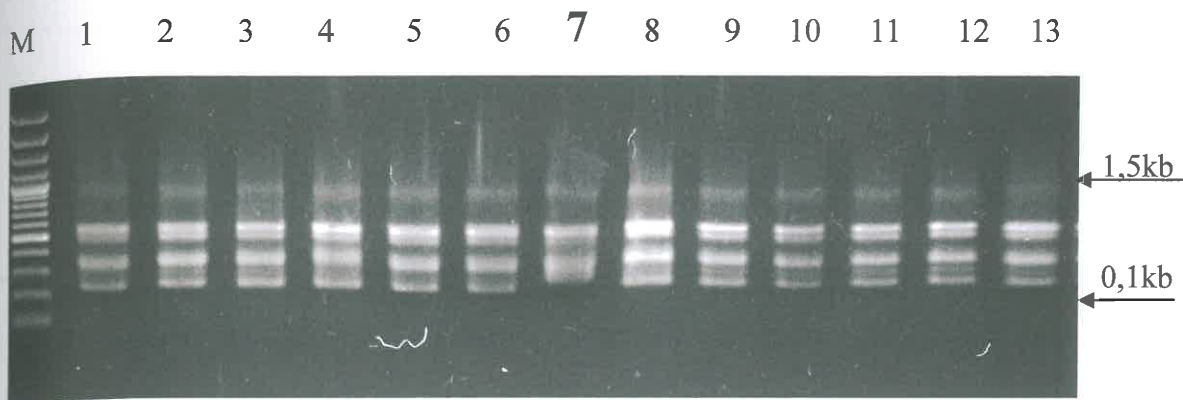
Latvijā atkāti 39 ribotipi, kuros apvienojas 95 *C.difficile* celmi. Iezīmējas 6 galvenās ribotipu grupas, kur vislielākā grupa apvieno 18 celmus. Šai ribotipu grupai ir dots kods LV13. Baktērijas celmu skaita apvienojums ribotipu grupās redzams Tabulā 27. Ribotipu nosaukumi ir izveidoti pēc kārtas, skaitļa priekšā liekot LV – Latvijas valsts.

Tabula 27. Izolātu sadalījums ribotipos.

Ribotips	Izolātu skaits
LV1	2
LV2	1
LV3	1
LV4	1
LV5	1
LV6	1
LV7	1
LV8	4
LV9	1
LV10	1
LV11	2
LV12	1
LV13	18
LV14	1
LV15	2
LV16	1
LV17	2
LV18	6
LV19	2
LV20	2
LV21	1
LV22	1
LV23	1
LV24	1

LV25	1
LV26	2
LV27	6
LV28	1
LV29	1
LV30	2
LV31	14
LV32	1
LV33	1
LV34	1
LV35	1
LV36	1
LV37	2
LV38	2
LV39	4

Ārējās kvalitātes kontroles nolūkos un projekta European *Clostridium difficile* infection (CDI) survey (ECDIS) Study, October 2008 – February 2009 13 paraugi tika testēti Laidenes universitātē (Leiden University Medical Center (LUMC)) Nīderlandē. Projekta pamatā bija mēneša laikā atklātos pozitīvos *C.difficile* paraugus un datus par slimniekiem, aizpildot speciālas anketas, sūtīt uz LUMIC. Anketas veidlapa pielikuma 10.2. sadaļā. Šajā projektā tika iekļauti 13 paraugi. Rezultātā LUMIC laboratorijā tika atklāti 12 identiski ribotipi un viens atšķirīgs. LUMIC noteica GDH paraugos un ribotipus. Šo 13 paraugu elektroforēzes dati redzami Attēlā 24. Vienam paraugam no trīspadsmit ir cits ribotips, bet visiem pozitīva GDH atradne.



Attēls 24. Ribotipu gēla elektroforēze 13 paraugiem.

M – marķieris, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 – paraugi ar vienu ribotipu, 7 – paraugs ar atšķirīgu ribotipu

5.2.11. MLST analīze

MLST analīzei no ribotipu filoģenētiskā koka lielākajiem zariem tika izvēlēti seši celmi. Attēlā 23 izvēlētie celmi norādīti ar bultiņām un ciparu 1 MLST līdz 6 MLST.

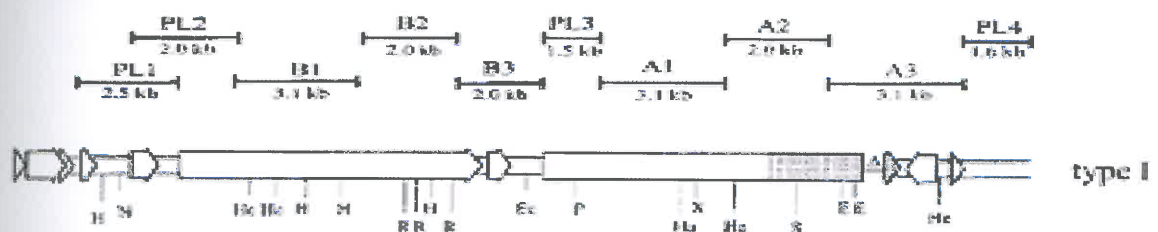
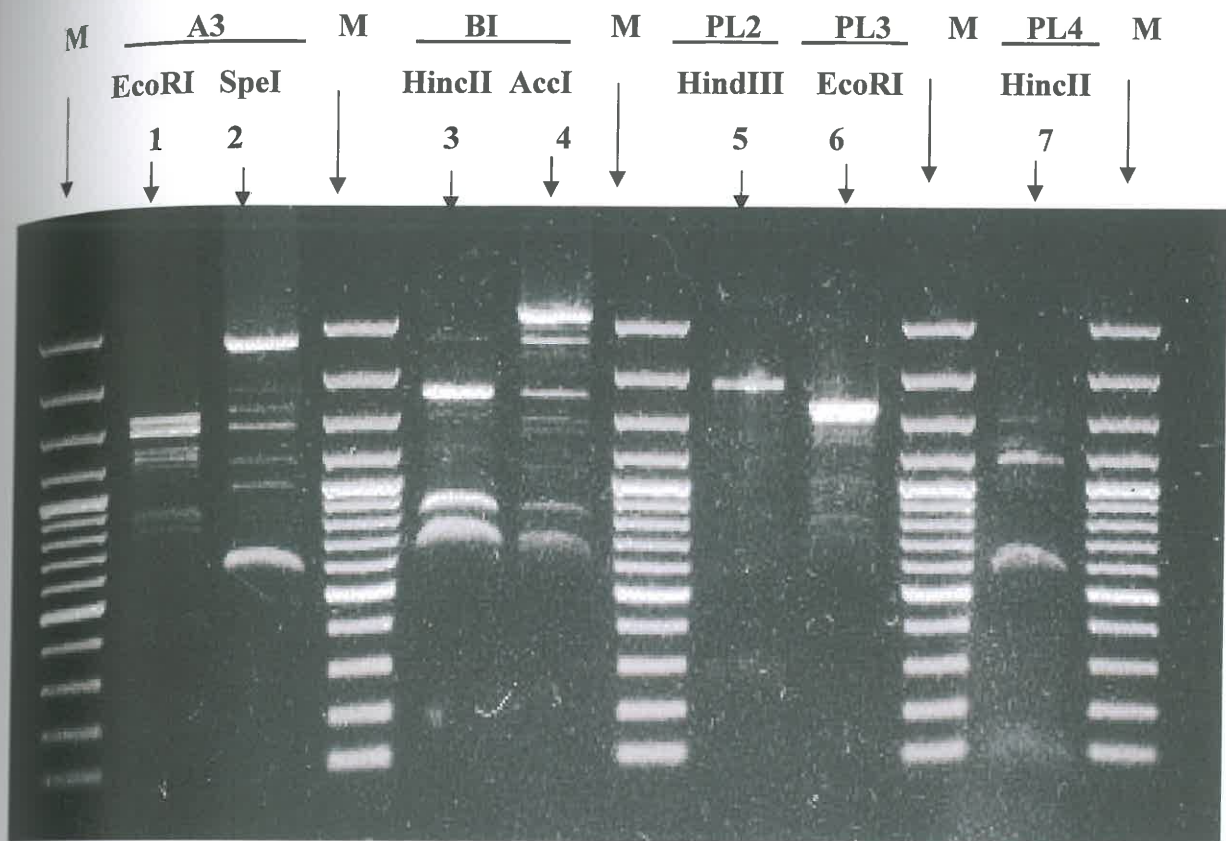
C.difficile MLST shēmā lieto septiņus mājturības gēnus: *aroE* (shikimate dehydrogenase), *ddl* (D-alanine:D-alanine ligase), *dutA* (dUTP pyrophosphatase), *gmk* (gualynate kinase), *recA* (recombinase), *sodA* (superoxide dismutase), *tpi* (triosephosphate isomerase). Katrs lokuss tiek amplificēts ar PQR, izmantojot šiem gēniem atbilstošus praimeru pārus, kuri piesaistās konservatīvajam gēnu reģionam. Rezultātā, iegūtos datus ievadot www.pasteur.fr MLST sekvenču datubāzes shēmā, no 7 gēniem iegūstam, ka visiem sešiem paraugiem ir identiska allēļu kombinācija un tie pieder vienam sekvenču tipam – ST-3 (Tabula 28).

Tabula 28. *C.difficile* MLST rezultāti.

Paraugs	<i>aroE</i>	<i>ddl</i>	<i>dutA</i>	<i>gmK</i>	<i>recA</i>	<i>solA</i>	<i>spI</i>	ST
140	2	2	2	1	1	5	1	3
107	2	2	2	1	1	5	1	3
177	2	2	2	1	1	5	1	3
189	2	2	2	1	1	5	1	3
190	2	2	2	1	1	5	1	3
192	2	2	2	1	1	5	1	3

5.2.12. Toksinotipu variāciju analīze

No ribotipēšanas rezultātā iegūtā filoģenētiskā koka pretējo zaru lielākām grupām selektīvi izvēlētām sešām kultūrām tika veikta genoma fragmentu PL1, PL2, PL3, PL4, A3 un B1 amplifikācija un restrikcija ar specifiskiem praimeru pāriem un gēla elektroforēzi. Attēlā 25 redzams toksinotipēšanas elektroforēzes piemērs vienam paraugam.



Attēls 25. M – marķieris, 1 – 7 genoma fragmenti pēc restrikcijas ar attiecīgo restriktāzi, A3, BI, PL2, PL3, PL4 – genomu fragmenti, EcoRI, SpeI, HincII, AccI, HindIII – restriktāzes.

Salīdzinot gēla elektroforēzes datus ar literatūrā pieejamajiem rezultātiem, iegūstam vienu raksturīgo genoma PaLoc ainu, kas atbilst pirmajam toksinotipam. Raksturīgajā genomā ir A3 fragmenta delēcija, kas atbilst I toksinotipam (TT-1) (Attēls 25).

Iegūtos PL3 un PL4 sekvenču datus ievadot sekvenču datubāzē, iegūstam, ka paraugi atbilst references celmu ATCC 630 un ATCC 43594 PaLoc, kuri atbilst TT-1.

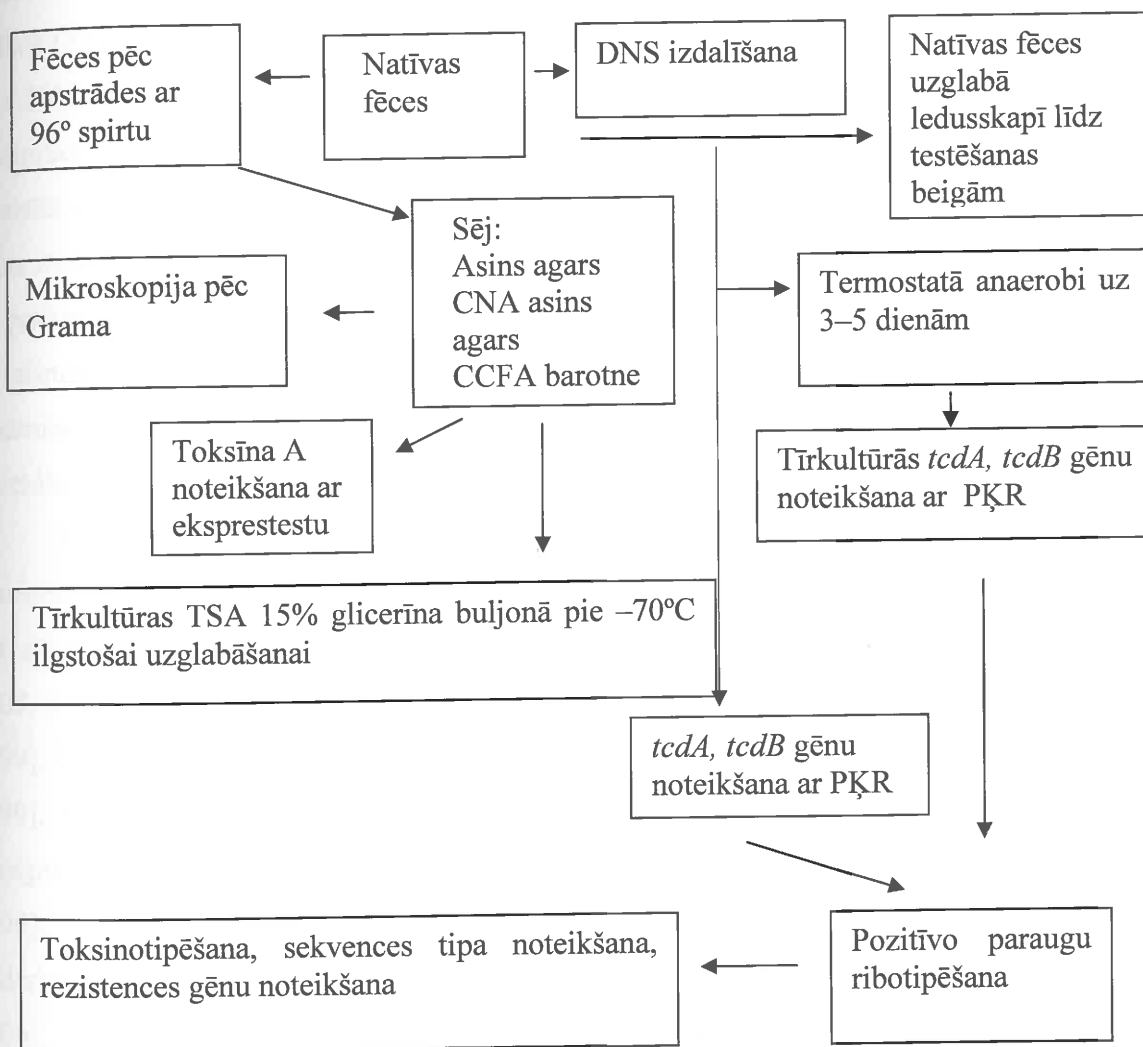
6. Vadlīnijas *C.difficile* testēšanai

Materiāla savākšanas noteikumi stacionārā un nogādāšanas noteikumi laboratorijā *Clostridium difficile* identifikācijai

1. Materiāls – slimnieka fēces, kuram ir aizdomas par *C.difficile* izraisītu diareju.
2. Materiāla nogādāšanas laiks laboratorijā – 1 stundu pēc savākšanas vai nedēļas laikā, materiālu uzglabājot pie temperatūras +4 C.
3. Materiāla nogādes forma laboratorijā – trauciņā ar brūno vāciņu un karotīti 400 mg, divas pilnas karotītes.
4. Uz trauciņa jābūt pacienta identifikācijas kodam.

C.difficile mikrobioloģiskās un molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas algoritms

Algoritms izstrādāts, pamatojoties uz darba gaitā izveidotajām laboratoriskajām diagnostikas metodēm, un pielāgots P. Stradiņa KUS CL Mikrobioloģijas un Molekulārās bioloģijas un ģenētikas nodaļas iespējām.



Attēls 26. *C.difficile* mikrobioloģiskās un molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas algoritms.

7. Diskusija

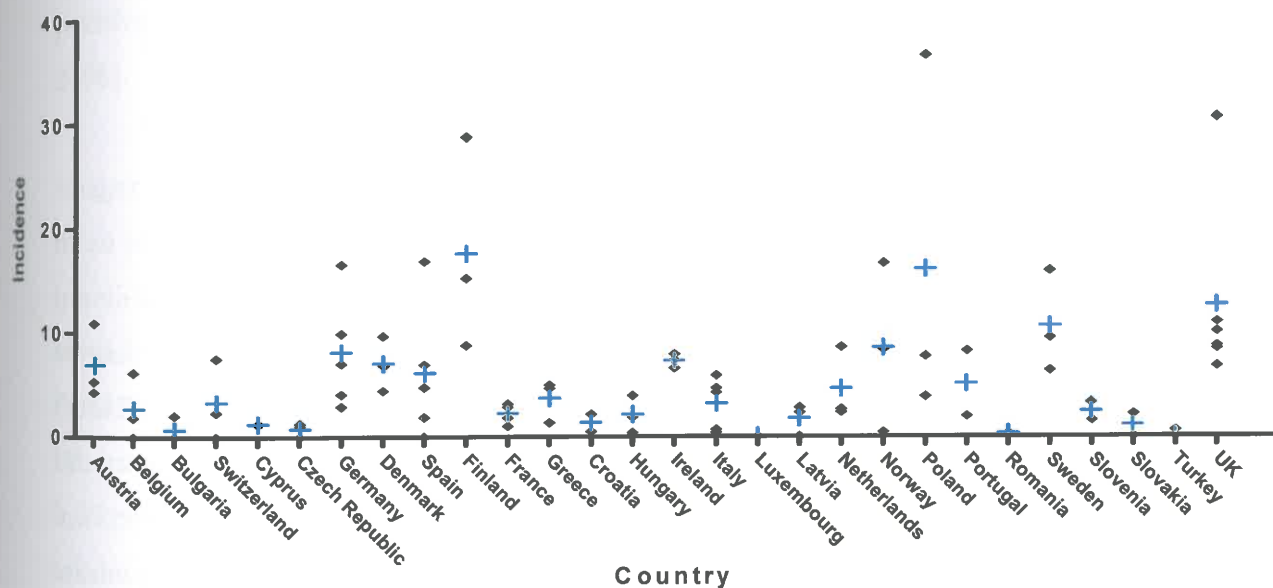
C.difficile ir galvenais cēlonis hospitālo diareju attīstībā ASV un citās industriālajās valstīs [Lyerlu *et al.*, 1998, Loo *et al.*, 2005]. Katru gadu *C.difficile* infekcija rada apmēram 3 miljonus diarejas un kolīta gadījumus ASV, kā rezultātā ik gadu veselības aprūpes sistēmā ārstēšanai papildus tiek tērēts vairāk nekā miljards ASV dolāru [Zheng *et al.*, 2004, Kyne *et al.*, 2002]. PMK gadījumā mirstība svārstās no 6% līdz 30%. Lielbritānijā laika periodā no 2000. līdz 2007. gadam ar *C.difficile* saistīto saslimšanu skaits ir pieaudzis no 15 081 līdz 42 901 [Fawley *et al.*, 2005]. *C.difficile* izraisītā diareja tiek konstatēta 1 līdz 10 gadījumos uz katriem 1000 uzņemtajiem pacientiem, palielinot mirstības rādītājus un ārstēšanas izmaksas (Fawley *et al.*, 2005). Šo pacientu hospitalizācija no 18 dienām vidēji pagarinājusies līdz 30 dienām, un katra šīs slimības epizode izmaksā papildus 4101 mārciņu, kā aprēķinājuši Lielbritānijas zinātnieki [Djuretic *et al.*, 1999], un 3340 dolārus, kā aprēķinājuši ASV zinātnieki [Archibald *et al.*, 2004].

Kopš 2002. gada īpašu uzmanību saista *C.difficile* hipervirulentais celma III toksinotips, 027 ribotips, tas ir multirezistents ciprofoksacīna, metronidazola celms, kas sākotnēji izplatījās ASV un Kanādā [Chandler *et al.*, 2007 Pepin, Sahele *et al.*, 2005, Pepin *et al.*, 2004, MacCannell *et al.*, 2006, Hubert *et al.*, 2007, Barak *et al.*, 1999], bet tagad jau ir izraisījis hospitālos uzliesmojumus Lielbritānijā [Djuretic *et al.*, 1999], Beļģijā [Joseph *et al.*, 2005, Delme *et al.*, 2006, Dijck *et al.*, 1996], Francijā [Coignard *et al.*, 2006, Barbut *et al.*, 1996, Tachon *et al.*, 2006], Austrijā [Indra *et al.*, 2006], Īrijā [Long *et al.*, 2007], Vācijā [Soes *et al.*, 2009, Arvand *et al.*, 2009], Nīderlandē [Hensgens *et al.*, 2009, vanSteenbergen *et al.*, 2005 Kuijper, Berg *et al.*, 2006], Japānā [Kato *et al.*, 2001]. Pacienti, kuri inficēti ar 027 ribotipu *C.difficile*, slimnīcā bija spiesti uzturēties vidēji par 10,7 dienām ilgāk, un mortalitāte to vidū bija ievērojami augstāka [Kuijper, Barbut *et al.*, 2008]. Zviedrijā laika posmā no 1997. līdz 2002. gadam PQR ribotips 027 veidoja 0,2% no visiem izolātiem, un šis tips ražoja 3 – 13 reizju vairāk toksīna nekā citi tipi [Akerlund *et al.*, 2008]. Ir pierādīts, ka in vitro baktērijas hipervirulentais celma III toksinotips, 027 ribotips ražo vairāk toksīna nekā

citi ribotipu celmi, bet, vai tas atbilst in vivo ainai, vēl nav noskaidrots [Loe *et al.*, 2005].

Latvijā šis multirezistentais celms nav radījis infekcijas uzliesmojumus stacionārā un situācija tiek kontrolēta ar infekcijas slimību kontroles pasākumiem. Ir jāņem vērā arī citu ribotipu hipertoksigenitāte, jo ir aprakstīti gadījumi, kad ribotips 01 ir galvenais uzliesmojuma cēlonis Kalifornijā [Brazier *et al.*, 2001] un Japānā [Kato *et al.*, 2001].

Praktiski visās Eiropas valstīs pastāv *C.difficile* ar dažādiem toksinotīpiem izraisītas infekcijas problēmas. Attēlā 27 redzama CDAD slimnieku incidence uz 10 000 pacientu dienām.



Attēls 27. CDAD slimnieku incidence Eiropas valstīs uz 10 000 pacientu dienām [Bauer *et al.*, 2010].

Pētījumā tika analizēti dati par *C.difficile* lomu diarejas attīstībā bērniem, kas stacionāri BKUS no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam. *C.difficile* A un B toksinogēni vienlaikus tika konstatēti 3,2% (n=8) pacientu, savukārt tikai *C.difficile* B toksinogēns konstatēts 1,2% (n=3) pacientu. Šie dati atšķiras no literatūrā norādītajiem datiem par *C.difficile* diarejas biežumu stacionāros, kas, iespējams, saistīts ar atšķirīgo pētījuma populāciju; tiek uzskatīts, ka 80% no visiem *C.difficile* diareju

gadījumiem sastopami vecuma grupā virs 65 gadiem [Kelly *et al.*, 2008, Kuijper *et al.*, 2006].

Pētot bērnu populāciju, bija bērni, kuriem konstatēja toksinogēno *C.difficile*, bet, konsultējoties ar viņu ārstējošajiem ārstiem, tika noskaidrots, ka klīniskajā ainā dominē viegla diareja, kas tiek ārstēta simptomātiski un neprasa radikālāku terapiju. Svarīgi ir arī tas, ka bērniem atrod tikai toksinogēnu B, bet nav toksinogēna A. Ņemot vērā iepriekšējos zinātniskos pētījumus, gūts apstiprinājums, ka toksīns B rada sarežģījumus tikai sinerģiski sadarbojoties ar toksīnu A, bet, ja netiek producēts toksīns A, tad tas izskaidro, kādēļ bērniem nav raksturīgās *C.difficile* infekcijas ainas. Pēc literatūras datiem ir zināms, ka bērni līdz divu gadu vecumam var būt *C.difficile* nēsātāji [Connor *et al.*, 2001].

Pacientu ar pozitīvu *C.difficile* A un B toksinogēnu atradni vidējais vecums bija 31 mēnesis, tādēļ šī pētījuma dati atšķiras no citu autoru pētījuma, kurā tika pierādīts pozitīvs *C.difficile* B toksīns bērniem, kuru vidējais vecums bija 18 mēneši [Klein *et al.*, 2006].

Literatūrā CDAD izpausmes tiek aprakstītas kā ļoti variablas, sākot no vidēji smagas līdz smagai diarejai ar nogurumu, sāpēm vēderā, nelabu dūšu un vemšanu. Pēc mūsu pētījuma rezultātiem grūti izteikties par CDAD klīniku. *C.difficile* pacientu grupa ir neliela un jādodomā, ka šie pacienti ir stacionēti ar citu akūtas zarnu infekcijas klīniku, savukārt pierādītā *C.difficile*, iespējams, uzskatāma par normālas mikrofloras pārstāvi. Paraklīniskajos rādītājos par *C.difficile* infekciju varētu liecināt leukocitoze. Bouza un līdzautori min, ka leukocitoze augstāka par 15 000 ir papildus pazīme *C.difficile* infekcijai. Pētījuma pacientu vidū, kam tika pierādīti pozitīvi *C.difficile* A un B toksinogēni, vidējais leukocītu skaits bija $14\,524 \times 10^6/L$, un, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas analīzi, netika pierādīta statistiski ticama saistība starp kopējo leukocītu skaitu un *C.difficile* toksīnu pozitivitāti ($p > 0,05$).

Par vienu no svarīgākajiem riska faktoriem *C.difficile* infekcijai tiek uzskatīta antibakteriālā terapija arī bērnu populācijai [Blossom *et al.*, 2007]. Pētījumā bērnu grupā, kam bija pozitīvi *C.difficile* toksinogēni, tikai vienam pacientam no vienpadsmit pirms stacionēšanas bija saņēmis antibakteriālu terapiju, savukārt antibakteriālā terapija stacionārā tika nozīmēta tikai vienam pacientam. Analizējot saistību starp *C.difficile* toksīnu pozitivitāti un antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas ar Spīrmena rangu korelāciju analīzes metodi, netika iegūta statistiski ticama saistība ($p > 0,05$). Poļu autoru

grupas pētījumā, analizējot *C.difficile* toksīna A pozitivitāti bērniem ar akūtu diareju, arī netika atklāta saistība starp iepriekšējo antibakteriālo terapiju un pierādītiem *C.difficile* toksīniem [Rozkiewicz *et al.*, 2005].

Analizējot šajā pētījumā iegūtos rezultātus, nevar izdarīt viennozīmīgus secinājumus par *C.difficile* diarejas sastopamību bērniem. Izvērtējot *C.difficile* A un B toksinogēnu sastopamību bērniem, jāņem vērā arī asimptomātiskas nēsāšanas iespēja, kas visbiežāk 40 – 60% gadījumu sastopama zīdaiņa vecumā. Tā samazinās pēc pirmā dzīves gada, bet ir iespējama arī pieaugušā vecumā – tās biežums atšķiras dažādu autoru pētījumos, sākot no 2% Zviedrijā līdz 15% Japānā [Gerding *et al.*, 1995].

Analizējot pieaugušo slimnieku datus ar eksprestestu, *C.difficile* antigēnus atklāja četros paraugos un toksinogēnus – trīs paraugos, pārējie paraugi bija negatīvi. Toksinogēnu atklāšana liecina par baktērijas klātbūtni organismā un ir informatīvāka metode nekā antigēna atklāšana, kurš ir baktērijas darbības rezultātā radies produkts un kura produkcija saglabājas vēl pēc gēnu eliminācijas no organisma [Rozkiewicz *et al.*, 2005].

Vidējais slimnieka vecums bija 60,12 gadi, minimālais – 20, bet maksimālais – 90 gadi. Lowy *et al* (2010) pētījumā vecākais slimnieks bija 101 gadu vecs, bet vidējais vecums – 64 gadi.

Literatūrā aprakstītie CDAD riska faktori tika iekļauti izvērtēšanā kā iespējamie riska faktori pētāmās pieaugušo grupas slimniekiem. Analīze rāda: iepriekšējā hospitalizācija bija 47,4% (n=83) slimnieku. Ambulatori antibiotikas bija lietojuši 9,1% (n=16) slimnieku. Gastrointestinālā trakta manipulācijas pirms infekcijas uzliesmojuma bija veiktas 16,6% slimnieku (n=29). 4,6% slimnieku (n=8) *C.difficile* infekcija bija jau anamnēzē. Antacīdos līdzekļus pirms infekcijas attīstības lietoja 35,4% (n=62) slimnieku (n=113). Kā citi iespējamie riska faktori tika klasificēta ķīmijterapija n=1, imūnsupresija n=6, peritoneālā dialīze n=12, hemodialīze n=3, hroniska kuņģa čūla n=1, ileuss n=1. 154 no 175 anketētajiem pacientiem pirms paraugu paņemšanas uz *C.difficile* infekciju stacionārā tika izmantota antibakteriālā terapija. Pirms CDAD simptomu parādīšanās 30,8% slimnieku (n=54) tika izmantota antibakteriālā terapija ar vienu vai vairākām antibiotikām. Stacionārā ārstēšanā visbiežāk izmantoja ciprofloksacīnu (n=74). Ciprofloksacīns ir hinolons, kas ir iedarbīgs *in vitro* pret lielu skaitu gramnegatīvu aerobo baktēriju, kā arī pret dažiem grampozitīviem organismiem. Ciprofloksacīnam raksturīga strauja baktericīda iedarbība, inhibējot DNS girāzi, kā

rezultātā notiek DNS sintēzes inhibēšana. Ciprofloksacīns pēc iekšķīgas ievadīšanas tiek ātri un efektīvi absorbēts. Starp devu un koncentrāciju plazmā ir lineāra korelācija. Pacientiem ar sarežģītām urīnceļu infekcijām (UCI) pašlaik izmanto empīrisku ārstēšanu ar plaša spektra antibiotiku (fluorhinolonu) un potenciālu tālāko 10 – 14 dienu ilgu ārstēšanu, vadoties no urīna kultūras un jutības. Lai izvairītos no neveiksmes ārstēšanā un rezistences parādīšanās, priekšnoteikums ir adekvāta pacienta reakcija un dozēšana. Arī medicīniskā literatūra apliecina, ka *C.difficile* pacients ir cilvēks gados ar smagām pamatslimībām un variablu lietoto medikamentu klāstu ārstēšanā [Kuijper *et al.*, 2006]. O'Connor *et al* (2004) Minsteres reģionā, geriatrijas klīnikā no 1992. līdz 2002. gadam veica pētījumu un pierādīja, ka intravenoza cefalosporīnu lietošana ir vislielākais risks CDAD attīstībā veciem cilvēkiem, tāpēc ieteica izmainīt antibakteriālās terapijas politiku jau sākumā. Autors pneimoniju un glomerulonefrītu ārstēšanā ieteica lietot pipercilīnu – tazobaktāmu intravenozi vai moksifloksacīnu – perorāli.

Pētījumā iekļauto pacientu minimālais atrašanās laiks stacionārā divas dienas, maksimālais 90 dienas. Barbut *et al.*, 1996. gadā atzīmēja, ka stacionēšana ilgāka par vienu nedēļu ir viens no galvenajiem CDAD infekcijas attīstības cēloņiem. Vajadzētu samazināt vidējo stacionēšanas laiku arī P. Stradiņa KUS nodaļās. Jo ilgāk slimnieks ir slimnīcas vidē, jo pieaug risks inficēties ar *C.difficile* sporām. Jāievēro arī inficēto slimnieku izolācijas princips, jo iespējamība inficēties slimniekam no slimnieka ir ļoti liela. P. Stradiņa KUS nefroloģijas nodaļā pētījuma laikā atklāja visvairāk *C.difficile* slimnieku. Šajā nodaļā ievēro visus higiēnas un slimnieku izolēšanas principus, un infekcijas uzliesmojumi netika atklāti, bet visi gadījumi bija individuāli. *C.difficile*, iespējams, ir lielāka izplatības prevalence arī citās nodaļās, bet analīzi pieprasa reti un diagnoze paslīd garām. Barbut *et al.*, 1996. gadā atzīmē, ka Francijas slimnīcās izmeklējums uz *C.difficile* tiek pieprasīts reti un, pēc autora uzskatiem, tas ir saistīts ar personāla zināšanu trūkumu par šo infekciju.

Analizējot klīnisko simptomu - drudzi, kurš vidēji ilga piecas dienas, to novēroja 56,6% gadījumu (n=99). Galvenais simptoms šai infekcijai ir diareja, un to novēroja 93,1% slimnieku (n=163). Tika novēroti arī citi simptomi: sāpes vēderā, intoksikācija, slikta dūša un vemšana. Visi simptomi ir raksturīgi zarnu infekcijai, tāpēc svarīgi klīnisko simptomātiku izvērtēt kopā ar laboratoriskajām diagnostikas metodēm. Bartlett

et al., 1992. gadā atzīmē, ka 20% no hospitalizētajiem pacientiem *C.difficile* infekciju iegūst stacionārā un 30% no tiem attīstās diareja.

Saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile* infekciju, iepriekšējā terapija tika apturēta 15,5% gadījumu (n=27), izmainīta 35,4% (n=62) gadījumu, bet saglabāta iepriekšējā terapija 49,1% (n=86) gadījumu. 97 gadījumos, saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile*, terapijā tika nozīmēts metronidazols 61,8% (n=97) un 18,5% (n=29) gadījumu – vankomicīns. Zāļu ievades veids – perorāli – bija 7,6% slimnieku (n=12), intramuskulāri 74,5% slimnieku (n=117) un intravenozi 17,8% (n=28).

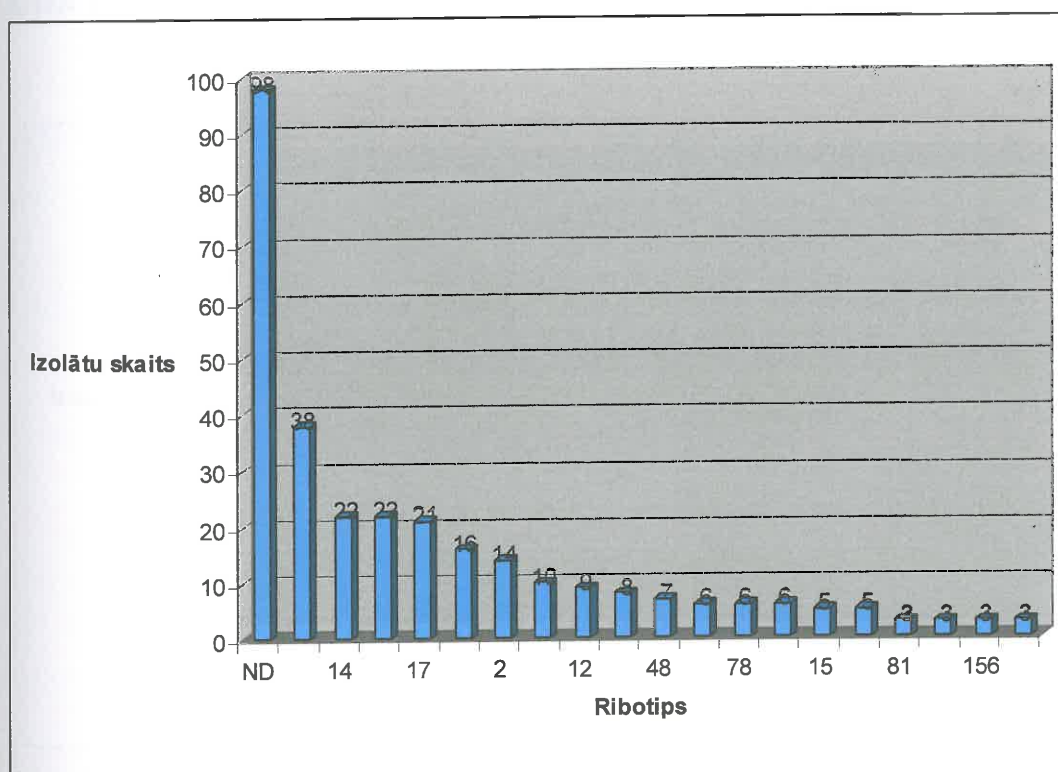
Probiotikas ārstēšanā izmantoja 35,4% gadījumu (n=62). Tika lietotas gan jogurta kapsulas, gan enterols, gan acidofilās baktērijas, gan lineks. Mūsdienās *C.difficile* baktērija ir rezistenta pret visām antibiotikām, izņemot metronidazolu un vankomicīnu, bet, tā kā tās genoms ir spējīgs ātri uzkrāt mutācijas un mainīties, nav izslēgta iespēja, ka tā kļūs rezistenta arī pret šīm antibiotikām [Cornaglia *et al.*, 2004].

Pētījumā seši *C.difficile* paraugi tika testēti ar enterokoku specifiskiem *van* rezistenci kodējošiem praimeriem, un piecos *C.difficile* paraugos atklāja šos gēnus. Izmeklējot *C.difficile* paraugus ar specifiskiem praimeriem uz enteroku gēniem, atklājās, ka sešos klostrīdiju pozitīvajos paraugos ir enterokokiem – *E.faecalis* un *E.faecium* raksturīgie rezistences gēni. Šī pētījuma rezultāts apliecina to, ka pašlaik Latvijas stacionāros nav izplatīti vankomicīna rezistenti *C.difficile* celmi. Literatūras dati liecina, ka pasaulē arī nav vēl pierādīti *C.difficile* rezistenti celmi pret vankomicīnu un rezistence pret metronidazolu ir reti sastopama [Ciaran *et al.*, 2008]. Pētījumā Vācijas klīnikā no 164 *C.difficile* pozitīvajiem fēču paraugiem 17 paraugos atklāja vankomicīna rezistentu enterokoku gēnus. Tā kā enterokokiem ir plazmīdas, kas spēj nodot rezistences gēnus gan stafilokokiem, gan klostrīdijām, pastāv iespēja, ka gēnu pārvades rezultātā var rasties arī vankomicīna rezistenti klostrīdiju kloni [Hacek *et al.*, 2001].

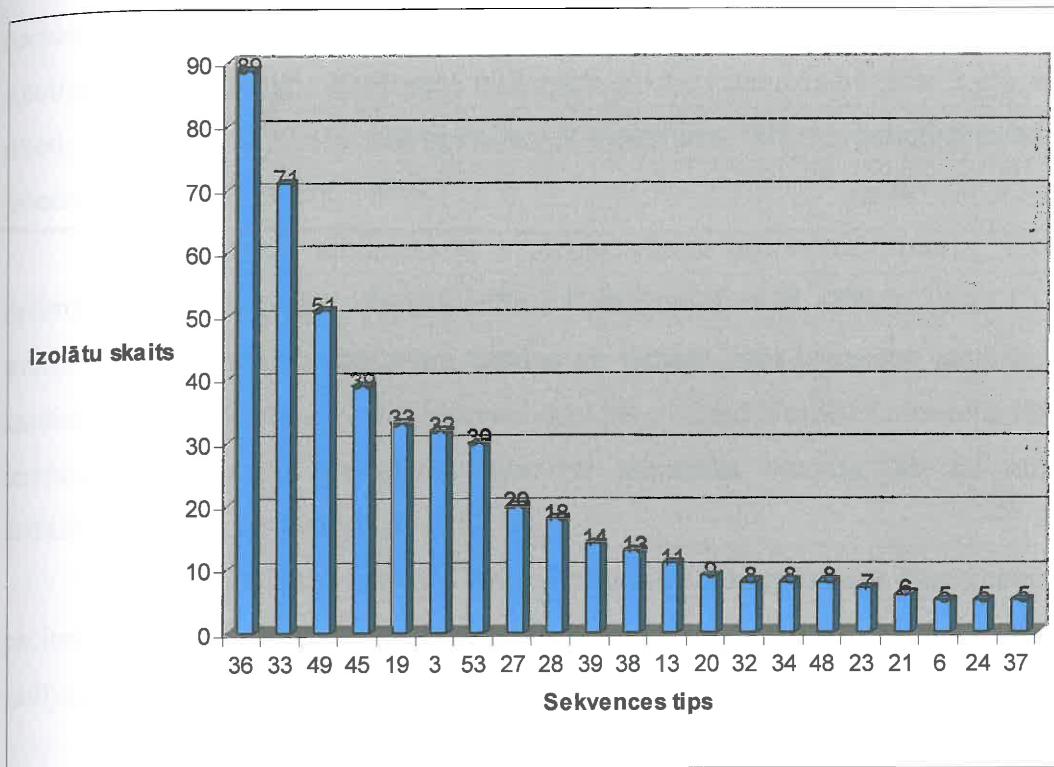
Šajā pētījumā pieciem slimniekiem *C.difficile* tika atklāta katrā stacionēšanās reizē vairāku mēnešu garumā. Pēc literatūras datiem zināms, ka atkārtota infekcija parasti veidojās 4 nedēļas pēc terapijas pārtraukšanas, un atkārtotu infekciju var izsaukt arī cits baktērijas celms [Ciaran *et al.*, 2008]. Šajā pētījumā iekļautie visi slimnieki bija ar smagām nieru saslimšanām un stacionārā uzturējās bieži un ilgi. Pēdējā stacionēšanās reizē divi slimnieki miruši. Reinfekcijas gadījumi ir bīstami gan slimniekiem, gan apkārtējiem [Kelly *et al.*, 2008]. Atkārtotas infekcijas risks palielinās pacientiem,

kuriem jau bijusi viena atkārtota epizode. Risks palielinās par 20% pēc sākotnējās epizodes, par 40% pēc pirmās atkārtotās un par 60% pēc divām un vairākām epizodēm. Recidīvi pēc ārstēšanas ar vankomicīnu iespējami 18,4% gadījumu un 20,2% gadījumu pēc ārstēšanas ar metronidazolu [Ciaran *et al.*, 2008].

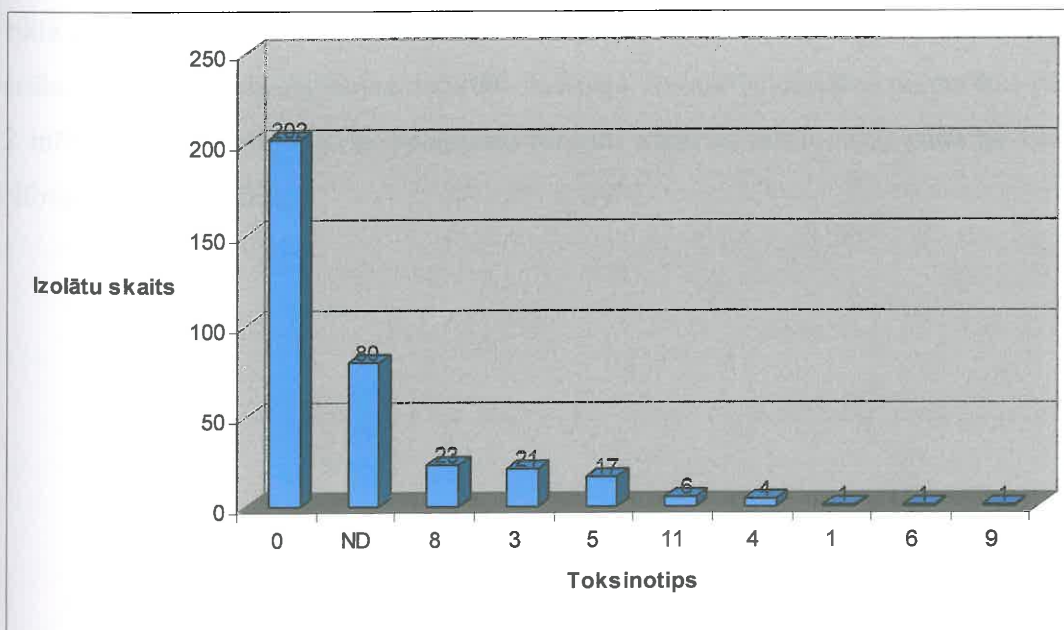
Latvijā atklāti 39 *C.difficile* ribotipu cemi ar vienu raksturīgo ST. Iezīmējas 6 galvenās ribotipu grupas, kur vislielākā grupa apvieno 18 celmus, šai ribotipu grupai ir dots kods LV 13. Ribotipu nosaukumi ir izveidoti pēc kārtas skaitļa priekšā liekot LV – Latvijas valsts. Arī pasaulē ribotipu nosaukumi katrā laboratorijā tiek piešķirti pēc saviem principiem, jo uz ribotipēšanu nevar attiecināt vienotu standartizāciju visām laboratorijām. Uz 2010. gada 1. janvāri www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdlent.plfile=Cdifficile2_isolates ir apkopojusi 57 ribotipus, ietverot arī ribotipu nediferencētos celmus (Attēls 28) un ST (Attēls 29). Latvijā izplatīts ST-3, kas pasaules mērogā pēc izplatības ieņem 6 vietu. No vienpadsmit zināmajiem toksinotīpiem 0 toksinotips ir visizplatītākais (Attēls 30). Latvijā atklātais TT-1 www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdlent.plfile=Cdifficile2_isolates datubāzē reģistrēts vienā gadījumā.



Attēls 28. Galvenie reģistrētie ribotipi.



Attēls 29. Galvenie reģistrētie sekvences tipi.



Attēls 30. Reģistrētie toksīnotipi.

2005. gadā Nīderlandē tika izstrādāta *C.difficile* infekcijas uzraudzība un nacionālās vadlīnijas, kuru ietvaros no 2005. gada aprīļa līdz 2009. gada jūnijam tika ribotipēti 2 758 paraugi. 2009. gadā 027 veida ribotips samazinājās līdz 3,0%, bet 001 ribotips pieauga līdz 27,5%, 014 tips bija 9,3% gadījumu, 078 tips palielinājās līdz 9,1% [Steenbergen *et al.*, 2005].

Visiem CDAD slimniekiem ir nepieciešama individuāla pieeja, izveidojot optimālāko un efektīvāko terapijas režīmu [Lozniewski *et al.*, 2001]. Tā kā CDAD ir smaga infekcijas slimība un prasa daudzu un dažādu zāļu lietošanu: antibakteriālos, kardioloģiskos, pretsāpju, pretiekaisuma līdzekļus u.c., tad klīniskā farmaceita klātbūtne terapijas gaitā varētu ievērojami optimizēt slimnieka terapiju, kā arī samazināt ārstniecības izmaksas [Marsh *et al.*, 2006].

1999. gadā CDAD infekcija Anglijā tika minēta kā galvenais nāves cēlonis 499 pacientiem, un šis skaits pieauga līdz 1998 nāves gadījumiem 2005. gadā un 3393 nāves gadījumiem 2006. gadā [Ciaran *et al.*, 2008].

Latvijā salīdzinājumā ar citām Eiropas Savienības dalībvalstīm CDAD problēma nav sasniegusi valstiskas problēmas līmeni. Par vienu kā stāvokli labvēlīgi ietekmējošu faktoru varētu uzskatīt to, ka Latvijā salīdzinājumā ar pārējām Eiropas Savienības dalībvalstīm ir zemāki antibiotiku lietošanas rādītāji. Tā liecina Eurobarometra pētījums, ko Latvijā veikusi sociālo un mediju pētījumu aģentūra „TNS Latvija”. Aptauja tika veikta no 2009. gada 13. novembra līdz 9. decembrim un tika aptaujāti 1004 iedzīvotāji vecāki par 15 gadiem. Aptaujas rezultāti liecināja, ka antibakteriālos preparātus pēdējo 12 mēnešu laikā lietojis 31% aptaujāto, turpretī vidējais antibiotiku patēriņš Eiropas dalībvalstu vidū ir 40%.

8. Secinājumi

1. Latvijā atklāti 39 dažādi *C.difficile* ribotipi, kuros apvienoti 95 *C.difficile* celmi.
2. Latvijas reģionam raksturīgs baktērijas trešais sekvenču tips (ST-3) un pirmais toksinotips (TT-1).
3. Pacientiem ar apstiprinātu *C.difficile* infekciju, DNS paraugi satur enterokokiem raksturīgos vankomicīna rezistences gēnus. Latvijā pagaidām nav atklāti vankomicīna rezistentie *C.difficile* celmi.
4. *C.difficile* diagnostikas algoritms apvieno jaunākās metodes, kuras ir aprobētas laboratorijas apstākļos.
5. *C.difficile* infekcijas attīstās slimniekiem uz smagi norītošu, hronisku slimību fona, kuri saņem florhinolonu vai cefalosporīnu grupas antibiotikas.
6. Bērnu vecuma grupā *C.difficile tcdA/tcdB* pozitivitātei saistībā ar pacientu vecumu, bērnu iestādes apmeklēšanu, iepriekšējo stacionēšanu, antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas, iestāšanās un klīnisko diagnozi, stāvokļa smagumu stacionējot, slimnīcā pavadītajām dienām, antibakteriālo terapiju stacionārā un tās ilgumu, kā arī izmantotajiem antibakteriālajiem preparātiem pēc Spīrmena rangu korelācijas analīzes nenovēro statistiski ticamas sakarības ($p>0,05$), tāpēc bērnus uzskata par *C.difficile* baktērijas nēsātājiem.
7. Kriobankas izveide nodrošina *C.difficile* celmu tīrkultūru un DNS kolekciju Latvijā.

9. Literatūras saraksts

1. Acha N, Tompkins D, Wilcox M. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea to *C.difficile*, *C.perfringens*, and *Staphulococcus aureus* // *J Clin Microbiol*, 2006; 44:2785–2791.
2. Ackermann G, Tang Y, Kueper R, et al. Resistance to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA* // *ACC*, 2001; 45(8):2348–3353.
3. Ackermann G., Loffler B., Adler D, et al. In vitro activity pf OPT-80 against *C.difficile* // *AAChem*, 2004; 48:2280–2282.
4. Akerlund T, Persson I, Unemo M et al. Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027 // *J Clin Microbiol*, 2008; 46:1530–1533.
5. Alfa M, Du T, Beda G, et al. Survey of incidence of *Clostridium difficile* infection in Canadian hospitals and diagnostic approaches // *J Clin Microbiol*, 1998; 36:2076–2080.
6. Al-Jumaili J, Shibley M, Lishman A, et al. Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates // *J Clin Microbiol*, 1984; 19:77–78.
7. Archibald L, Banerjee S, Jarvis W, et al. Secular trends in hospital-acquired *Clostridium difficile* disease in the United States // *J Infect Dis*, 2004; 189:1585–1589.
8. Arvand M, Hauri A, Zaiss N, et al. *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *Clostridium difficile* infection in Hesse, Germany // *Euro Surveill*, 2009; 14(45):pii=19403.
9. Aslam S, Hamill R, Musher M. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapien and new strategies // *Lancet Infect Dis*, 2005; 549–557
10. Barak A, Embil J, Dyck B, et al. An outbreak of toxin A neg, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital // *Can Commun Dis. Rep*, 1999; 25(7):65–69.

11. Barbut F, Corthier G, Charpak Y, et al. Prevalence and pathogenicity of *Clostridium difficile* in hospitalized patients // *J Clin Microbiol*, 1996; 156(13):1449–1454.
12. Barbut F, Delmee M, Brazier J.S, et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile* // *J Clin Microbiol*, 2003; 9:989–995.
13. Barbut F, Gariazzo B, Bonne L, et al. Clinical features of *Clostridium difficile* – associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000–2004 // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28(2):131–139.
14. Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, et al. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adult and children with diarrhea in France // *J Clin Microbiol*, 2007; 40:2079–2083.
15. Bartlett J. Antibiotic-associated diarrhea // *Clin Infect Dis*, 1992; 15:573–581.
16. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: the first pan-European hospital-based survey // *Lancet* 2010 [Accepted for publication].
17. Bauer M.P, Kuijper E.J, Disse L J.T. European society of clinical microbiology and infectious diseases (ECMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection // *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15:1067–1079.
18. Beangerie L, Flahault A, Barbut F, et al. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community // *AP&T*, 2003; 17(7):905–912.
19. Beer M. *The Merc Manual of diagnosis and therapy* / 18th.ed, 2006.–P.1500.
20. Berg R, Claas E, Oyile D, et al. Characterization of toxin A-neg, toxin-B positive *Clostridium difficile* isolates from Outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping // *J Clin Microbiol*, 2004; 42:1035–1041.
21. Berg V, Coppens S, Gerritsen H, et al. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients // *J Clin Microbiol*, 2005; 43:5338–5340.

22. Bhan M, Bhandari N. The role of zinc and vitamin A in persistent diarrhea among infants and young children // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1998; 26(4):446–453.
23. Bidet P, Lalande V, Salauze B, et al. Comparison of PCR - ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulse - field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile* // *J Clin Microbiol*, 2000; 38:2484–2487.
24. Biller P, Shank B, Lind L, et al. Moxifloxacin therapy as a risk factor for *Clostridium difficile* - associated disease during an Outbreak: attempts to control a new epidemic strain // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28:199–201.
25. Blossom D, McDonald. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection // *Clin Infect Dis*, 2007; 45:222–227.
26. Bouza E, Burillo A, Munoz P. Antimicrobial therapy of *Clostridium difficile*-associated diarrhea // *Med Clin North America*, 2006; 90:1141 – 1163.
27. Brazier J. Typing of *Clostridium difficile* // *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7:428–431.
28. Bukharin OV, Valyshev AV. Factors of intestinal microflora persistence in dysbacteriosis // *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 1997; 3:19–22.
29. Byl B, Jacoles F, Struelens M, et al. Extraintestinal *Clostridium difficile* infection // *Clin Infect Dis*, 1996; 22:712.
30. Chandler R, Hedberg K, Cieslak P. *Clostridium difficile*-associated disease in Oregon: increasing incidence and hospital-level risk factors // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28(2):116–122.
31. Ciaran P, Kelly MD, LaMont T. *C. difficile*-more difficult than ever // *N Engl J Med*, 2008; 359:1932–1940.
32. Coignard B, Barbut F, Blanckaert K, et al. Emergence of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 - associated disease, France, 2006 // *Euro Surveill*, 2006; 11(9):pii=060914.
33. Connor D, Hynes P, Cormican M, et al. Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea // *J Clin Microbiol*, 2001; 39:2846–2849.
34. Cornaglia G, Hryniewicz W, Jarlien V, et al. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance // *Clin Microbiol Infect*, 2004; 10:349–383.

35. Curru S, March I, Shutt K, et al. High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital // *Clin Infect Dis*, 2009; 48(4):425–429.
36. Dallal R, Harbrecht K, Boujoukas A, et al. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications // *Ann Surg*, 2002; 235:363–372.
37. Delme M, Ramboer I, Van Broeck I, et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in Belgium // *Euro Surveill*, 2006; 11:pii=3045.
38. Delme M, Avesani V. Virulence of ten serogroups of *Clostridium difficile* // *J Med Microbiol*, 2000; 33:85–90.
39. Depardien F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the vanA alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR // *J Clin Microbiol*, 2004; 58:57–5860.
40. Dijck P, Avesani V, Delmee M, et al. Genotyping of outbreak-related and sporadic isolates of *Clostridium difficile* belonging to serogroup C // *J Clin Microbiol*, 1996; 34:3049–3055.
41. Djuretic T, Wall P, Brazier S. *Clostridium difficile* an update on its epidemiology and role in hospital outbreaks in England and Wales // *J Hosp Infect*, 1999; 41:215–218.
42. Dridi L, Tankovic J, Burghoffer B, et al. gyrA and gyrB mutations are implicated in cross-resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile* // *ACC*, 2002; 46:3418–2421.
43. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* // *IJID*, 2007; 11:5–10.
44. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, et al. Isolation and characterization of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile* in Dublin, Ireland // *Clin Microbiol Infect*, 2007; 13:298–304.
45. Durai R. Epidemiology, Pathogenesis, and management of *Clostridium difficile* infection // *Dig Dis Sci*, 2007; 52:2958–2962.
46. Durand C, Miller P. Severe *Clostridium difficile* colitis and reactive arthritis in a ten-year-old child // *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2009; 28(8):750–751.

47. Dutta P, Niyogi SK, Mitra U et al. Clostridium difficile in antibiotic associated diarrhea // Indian Pediatr, 1994; 31(2):121–126.
48. Eastwood K, Else P, Charlett A et al. Comparison of nine commercially available C. difficile toxin detection assays, a real-time PCR assay for C. difficile tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods // J Clin Microbiol, 2009; 3211–3217.
49. Eiseman B, Silen V, Bascom G, et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis // Surgery, 1998; 44(5):854–859.
50. Fawley W, Parell P, Verity P, et al. Molecular epidemiology of endemic Clostridium difficile infection and the significance of subtypes of the United Kingdom epidemic strain (PCR RibotypeI) // J Clin Microbiol, 2005; 43:2585–2696.
51. Fedorko D, Engler H, Shanghnessy E, et al. Evaluation of two rapid assays for detection of Clostridium difficile toxin A in stool specimen // J Clin Microbiol, 1999; 37:3044–3047.
52. Feldman R, Kallich M, Weinstein P, et al. Bacteremia due to Clostridium difficile: case report and review of extraintestinal Clostridium difficile infection // Clin Infect Dis, 1995; 20:1560–1562.
53. Fluit A.C, Visser M.R, Schmitz F.J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance, Clinical Microbiology Reviews, 2001, p. 836–871.
54. Garcia-Lechuz J, Hernangomez S, San Juan R, et al. Extra-intestinal infections caused by Clostridium difficile // Clin Microbiol Infect, 2001; 7:453–457.
55. Gerding D. New definition will help, but cultures are critical for resolving unanswered questions about Clostridium difficile // Infect Control Hosp Epidemiol, 2007; 28(2):113–115.
56. Gerding D, Johnson S., Peterson R, et al. Clostridium difficile - associated diarrhea and colitis // Infect Control Hosp Epidemiol, 1995; 16:459–477.
57. Gravisse J, Barnaud G, Hanan-bercot B, et al. Clostridium difficile brain abscess after prolonged intestinal carriage // J Clin Microbiol, 2003; 41:509–511.
58. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, et al. Multilocus sequence typing of Clostridium difficile // J Clin Microbiol, 2010; 48(3):770–778.
59. Grope I. Akūtas diarejas bērniem // Medicine, 2004; 5:13–16.

60. Hacek DM, Bednaze P, Noskin GA et al. Yield of vankomicin-resistant enterococci and multidrug-resistant enterobacteriaceae from stools submitted for *C. difficile* testing compared to results from a focused surveillance program // *J Clin Microbiol*, 2001; 39:1152–1154.
61. Hamond G.A, Johnson J.L. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463 // *Microb Pathog*, 1995; 19:203–213.
62. Hensgens M, Goorhuis A, Notermans D, et al. Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands // *Euro Surveill*, 2009;14(45):pii=19402.
63. Heritage J, Evens G, Killington R. *Microbiology in action* // Cambridge University Press. 2000, 290.
64. Huang H, Weintraule A, Fang H et al. Comparison of a commercial multiplex real-time PCR to the cell cytotoxicity neutralization assay for diagnosis of *C.difficile* infection // *J Clin Microbiol*, 2009; 3729–3731.
65. Hubert B, Loo G, Bourgault A, et al. A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec // *Clin Infect Dis*, 2007; 44:238–244.
66. Indra A, Huhulescu S, Hasenberger P, et al. First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Austria // *Euro Surveill*, 2006; 11:pii=3046.
67. John G. Antibiotic associated diarrhea // *NEJM*, 2002; 346:334–339.
68. Johnson S, Gerding D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea // *Clin Infect Dis*, 1999; 28:936–937.
69. Johnson S, Kent S, Leary K, et al. Fatal pseudomembranous colitis associated with a variant *Clostridium difficile* strain not detected by toxin A immunoassay // *Ann Intern med*, 2001; 195:434–438.
70. Johnson S, Samore H, Farrow K, et al. Epidemic of diarrhoea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals // *N Engl J Med*, 1998; 341:1645–1651.
71. Jones E, Kirkpatrick B, Feeney R, et al. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhoea // *Lancet*, 1997; 19; 349(9059):1176–1177.

72. Joseph R, Demeyer D, Vanrenterghem D, et al, First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotyp III in Belgium // *EuroSurveill*, 2005; 10:pii=2815.
73. Juang P, Skledar S, Zgheile n, et al. Clinical outcomes of intravenous immune globulin in sever *Clostridium difficile*-associated diarrhea // *Am I Infect Control*, 2007; 3592:131–137.
74. Kato H, Kato K, Watanabe K et al. Identification of toxin A-negative, toxin B positive *Clostridium difficile* by PCR // *J Clin Microbiol*, 1998; 36:2178–2182
75. Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan // *J Clin Microbiol*, 2001; 39:1391–1395.
76. Kato N, Kato H, Bartby S et al. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction // *J Clin Microbiol*, 1991; 29:33–37.
77. Kazakova S, Ware K, Baughman B et al. A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemicstrain of *C. difficile* // *Arch Intern Med*, 2006; 166:2518–2524.
78. Kelly C, LaMontT. *C.difficile*—more difficult than ever // *N Engl J Med*, 2008; 359:1932–1940.
79. Kelly P, Pothoulakis C, LaMont T. *Clostridium difficile* colitis // *NEJM*, 1991; 330:257–262.
80. Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: REA, PFGE, PCR-ribotyping, MLST, MLVA, AFLP, and slpAST // *J Clin Microbiol*, 2008; 46:432–437.
81. Klein E, Boster D, StappJ, et al. Diarrhea etiology in a childrens hospital emergency department: a prospective cohort study // *Clin Infect Dis*, 2006; 43:807.
82. Knoop F, Owens M, et al. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis // *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6:251–265.
83. Kuijper E, Barbut F, Brazier J, et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008 // *Euro Surveill*, 2008; 13(31):pi=18942.

84. Kuijper E, van den Berg J, Debast S, et al. Clostridium difficile ribotype 027, toxinotype III the Netherlands // *Emerg Inf Dis*, 2006; 12:827–830.
85. Kuijper E, van Dissel T, Wilcox M, et al. Clostridium difficile: changing epidemiology and new treatment options // *Curr Opin Infect Dis*, 2007; 20:3760383.
86. Kuijper E.J, Coignard B, Tüll P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe // *CMI*, 2006; 12:2–18.
87. Kuijper J, Surawicz M. Clostridium difficile infection // *Lancet*, 2008; 371:1486–1488.
88. Kyne L, Hamel M, Polavaran R, et al. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to Clostridium difficile // *Clin Infect Dis*, 2002; 34:346–353.
89. Kyne L. C.difficile—beyond antibiotics // *N Engl J Med*, 2010; 362:264–265.
90. LaMont T. Pathophysiology and epidemiology of Clostridium difficile infection //2006.
91. Larson M, Fung A, Fang F. Evaluation of tcdB real-time PCR in a tree-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic C. difficile // *JCM*, 2010; 48:124–130.
92. Lawrence S, Puzniak L, Shadel N, et al. Clostridium difficile in the intensive care unit: epidemiology, costs, and colonization pressure // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28:123–130.
93. Lemee L, Bourgeois I, Ruffin E, et al. Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of Clostridium difficile // *J Clin Microbiol*, 2005; 46:3171–3180.
94. Lemee L, Dhalluin A, Pestel Caron M, et al. Multilocus sequence of various toxigenic types // *J Clin Microbiol*, 2004; 42(6):2609–17.
95. Limaye A, Turgeon D, Cookson B, et al. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A⁻ toxin B⁺ strain of Clostridium difficile // *J Clin Microbiol*, 2000; 38:1696–1697.
96. Limbargo B, Long C, Thompson A, et al. Clostridium difficile from community-associated infection // *J Clin Microbiol*, 2009; 47:3004–3007.

97. Loe V, Poirier L, Miller M, et al. A predominantly clonal multi-institutional of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality // *N Engl J Med*, 2005; 353:2442–2449.
98. Löffler H, Pron B, Mouy R, et al. *Clostridium difficile*-associated reactive arthritis in two children // *Joint Bone Spine*, 2004; 71:60–62.
99. Long S, Fenebon L, Fitzgerald S, et al. First isolation and report of clusters of *Clostridium difficile* PCR 027 cases in Ireland // *Euro Surveill*, 2007; 12:pii=3183.
100. Loo V, Poitier L, Miller M, 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.
101. Louce T, Miller M, Donskey C, et al. Clinical outcomes, safety and pharmacokinetics of OPT-80 in a phase 2 trial with patients with *Clostridium difficile* infection // *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53(1): 223–228.
102. Lowy I, Molrine D, LeavB, et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins // *N Engl J Med*, 2010; 362:197–205.
103. Lozniewski A, Rabaud C, Dotto E, et al. Laboratory diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea and colitis // *J Clin Microbiol*, 2001;39(5):996–998.
104. Lyerly D, Neville L, Evans D, et al. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* toxA/B test // *J Clin Microbiol*, 1998; 36:184–190.
105. Lyne M, Duresko B, Gustafson D, et al. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *C. difficile* infection // *JCM*, 2008; 46:1996–2001.
106. Mac Cannell D, Louse T, Gregson D, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada // *J Clin Microbiol*, 2006; 44:2147–2152.
107. Mani N, Dupuy B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:5844–5849.
108. Marsh I, Leary M, Shutt K, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in hospitals // *J Clin Microbiol*, 2006; 44:2558–2566.

109. Martin H, Willey B, Low D, et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from patients in Ontario, Canada, from 2004 to 2006 // *J Clin Microbiol*, 2008; 46(9):2999–3004.
110. Martirosani G, Srecesny A, Cohen SH, et al. Isolation of non-toxigenic strains of *C.difficile* from cases of diarrhea among patient hospitalized in hematology/oncology ward // *Pol J Microbiol*, 2004; 53(3):197–200.
111. McDonald K, Killgore G. An epidemic, toxin gene variant strain of *Clostridium difficile* // *NEJM*, 2005; 352(23):2433–2441.
112. McDonald L, Coignard B, Dubberke E, et al. Recommendations for Surveillance of *Clostridium difficile* - associated disease // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28(2):140–245.
113. McFarland L, Mulligan M, Kwok Y, et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection // *Neng J Med*, 1989; 320:204–210.
114. Moxon R, Rainey P, et al. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria // *Curent Biology*, 1994; 4:24–33.
115. Muscher D, Aslam S, Logan N, et al. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole // *Clin Infect Dis*, 2005; 40:1586–1590.
116. Muscher D, Manhas A, et al. Detection of *Clostridium difficile* toxin: comparision of enzyme immunoassay results with results obtained by citotoxicity assay // *J Clin Microbiol*, 2007; 45:2737–2739.
117. Muto C, Pokrywka M, Shutt K, et al. A large outbreak of clostridium difficile associated disease with an unexpected proportion of death and colectomis at a teaching hospital following increased fluoquinolone use // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005; 26:273–280.
118. Nelson R. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*–associated diarrhea in adults // *Cochrane Database Syst Rev*, 2007; (3):CD004610.
119. Novak-Weekley S, Marlove E, Miller J, et al. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithm // *J Clin Microbiol*, 2010; 48:889–893.
120. O'Connor J, Galang M, Sambol S, et al. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*, *AAC*, 2008; 52(8):2813–2817.

121. O'Connor KA, Kingston M, O'Donovan M, et al. Antibiotic prescribing policy and *C.difficile* diarrhoea // *O J Med*, 2004; 97:423–429.
122. Pabērza R, Pakarna G, Lužbinska L, et al. VITEK 2 Systems grampozitīvo, gramnegatīvo mikroorganismu un raugu identifikācijas paneļu validācija // RSU zinātniskā konference, 2010; 169.
123. Pantosi A, Cerquetti M, Gianfrilli M. Electrophoretic characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from antibiotic-associated colitis and other conditions // *J Clin microbiol*, 1988; 26:540–543.
124. Pechine S, Janoir C, Collignon A. Variability of *C. difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *C. difficile* associated disease // *J Clin Microbiol*, 2005; 43:5018–5025.
125. Pelaez T, Cercenado E, Alcala L, et al. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous // *J Clin Microbiol*, 2008; 46:3028–3032.
126. Pepin I, Amary L, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada // *Clin Infect Dis*, 2005; 40:1591–1597.
127. Pepin J, Sahele M, Colombo M et al. Emergence of *C. Difficile*-associated diarrhoea: a cohort study during an epidemic in Quebec // *Clin Infect Dis*, 2005; 41:254–260.
128. Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributed to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec // *CMAJ*, 2005; 170:1037–1042.
129. Pepin J, Valiquette L, Alary E, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity // *CMAJ*, 2004; 171:466–472.
130. Pituch H, Braak N, Leeuwen W, et al. Clonal dissemination of a toxin A-neg, toxin B-pos *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland // *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7:442–446.
131. Pituch H, van Leeuwen W, Maquelin K, et al. Toxin profiles and resistances to macrolides determinants of clinical isolates of *Clostridium difficile* from Warsaw, Poland // *ICM*, 2007; 45(5):1607–1610.
132. Poutanen SM, Simor AE. *C.difficile*-associated diarrhea in adults // *CMAJ*, 2004; 171:51–58.

133. Poxton R, McCouberey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile* // *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7:421–427.
134. Pudhota SG, Loambiase LR, Vega KJ, et al. Detection of *Clostridium difficile* pseudomembranous colitis in the absence of diarrhoea with an early use of endoscopy in elderly patients. *J Gen Intern Med* 2006; 31:196.
135. Ramakrishna S. The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation // *J Clin Gastr*, 2007; 41:pps2–s6.
136. Reese R.E, Betts R.F, Gumustop B. *Handbook of Antibiotics*, Third edition, Lippincott Williams & Wilkins 2000.
137. Reyes R, John M, Ayotte D, et al. Performance of Teclab *Clostridium difficile* QUIK CHEK and TechLab *Clostridium difficile* toxin A/B for the detection of *Clostridium difficile* in stool samples // *Diag Microbiol Infect Dis*, 2007; 59:33–37.
138. Robertson D, Meyer F. Genetic variation in pathogenic bacteria // *Trends Genet*, 1992; 8:422–427.
139. Rozkiewicz D, Zaremba M, Fiedoruk K, et al. *Clostridium difficile* toxin A and other enteropathogens in stool specimens of children hospitalized due to acute diarrhoea: abstract // *Przegl epidemiol*, 2005; 59(3):711–721.
140. Rupnik M, Aveseni V, Janc M, et al. Toxinotyping schema and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates // *J Clin Microbiol*, 1998; 23:2240–2247.
141. Sambol S, Merrigan M, Lyerly D, et al. Toxin A gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical diseases // *J Clin Microbiol*, 2000; 68:5480–5487.
142. Samore M, Venkataraman L, Degirolami C, et al. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered case of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea // *Am J Med*, 1996; 100:32–40.
143. Shin B, Knak E, Lee E, et al. Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection // *J Clin Microbiol*, 2009; 47:2952–2956.
144. Soes L, Mollak K, Trobek S, et al. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Denmark // *Euro Surveill*, 2009; 14:pii=19183.

145. Sougioltzis S, Kyne L, Drudy D et al. Clostridium difficile toxoid vaccine i recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea // *Gastroenterology*, 2005; 128(3):764–770.
146. Spigaglia P, Barbanti F, Louce T, et al. Molecular analysis of the gyrA and gyrB quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant Clostridium difficile mutants selected in vitro // *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009; 53(6):2463–2468.
147. 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 // *J Clin Microbiol*, 2002; 3470–3475.
148. Spivack J, Eppes S, Klein J. Clostridium difficile-associated diarrhea in a pediatric hospital // *Clin Pediatr*, 2003; 42:347–352.
149. Starr J. Clostridium difficile associated diarrhoea: diagnosis and treatment // *British Med J*, 2005; 331:498–501.
150. Strehlein J. Treatment of Clostridium difficile infection // *Current Treatment Options Gastroenterol*, 2004; 7(3):235–239.
151. Stubbs S, Brazier S, O'Neill L, et al. PCR targeted the 16S-23S RNA gene intergenic spacer region of Clostridium difficile and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes // *J Clin Microbiol*, 1999; 37:461–463.
152. Sussman M, *Molecular Medical Microbiology*, Edited by, 2002; 1153–1158.
153. Svenungsson B, Burman L, Jalaks-Pörmull K, et al. Epidemiology and molecular characterization of Clostridium difficile strains from patients with diarrhea: low disease incidence and evidence of limited cross-infection in a Swedish teaching hospital // *J Clin Microbiol*, 2003; 41:4031–4037.
154. Swindells J, Brenwald N, Reading N, et al. Evolution of diagnostic tests for Clostridium difficile infection // *J Clin Microbiol*, 2010; 48:606–608.
155. Tachon M, Cattone C, Balanckaert K, et al. First cluster of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 27 associated disease in France: preliminary report // *Euro Surveill*, 2006; 11:pii=2951.
156. *The Merck Manual of diagnosis and therapy*/ Editor Mark H. Beers-18th ed.-Whitehouse Station, NJ; Merck Research Laboratories, 2006; P.1500.

157. Ticehurst J, Airid D, Dann L, et al. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin // *J Clin Microbiol*, 2006; 44(3):1145–1149.
158. Tracy D, Lyerly V, Lyerly D, et al. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still, challengig // *J Clin Microbiol*, 2003; 41:531–534.
159. Turgeon D, Novicki T, John Q, et al. Six Rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast Ceytotoxicity assay // *J Clin Microbiol*, 2003; 41:667–670.
160. Vaishnavi C. Established and potential risk factor for *C.difficile* infection // *IJMM*, 2009; 27(4):289–300.
161. Van Nood P, Speelman P, Kuijper E, et al. Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: in donor feaces the solution? // *Euro Surveill*, 2009; 14(34):pii=19316.
162. Van Steenberg J, Debast S, van Kregten E, et al. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherland after incincrease in *Clostridium difficile* associated diarrhoea // *Euro Surveill*, 2005; 10(28): pii=2745.
163. Vanpoucke H, Baere T, Claeys m, et al. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens // *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7:55–64.
164. Voth D, Ballard D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease // *CMR*, 2005; 18:247–263.
165. Walker-Smith J, Sandhu B, Isolauri E, et al. Guidelines prepared by the ESPGAN working group on acutediarrhoea. Recommendations for feeding in childhood gastroenteitis // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1997; 24(5):619–620.
166. Warny M, Pepin J, Frang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of sever disease in North America and Europe // *Lancet*, 2005; 366:1079–1084.
167. Weis B, Kleinkauf V, Neuman M, et al. Risk factor for *C.difficile* ribotype 027 infectin in Germany. Preliminary results of a retrospective case-control study. 18-th European congress of Clin. Mikrobiol and Infections diseases. Barselona. Sain Abstract. 2008; p.1480.

168. Wenisc C, Parschalk B, Hasenhundl M, et al. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea // *Clin Infect Dis*, 1996; 22:813–818.
169. Wilcox M. Descriptive study of intravenous immunoglobulin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea // *J Antimicrobiol Clin*, 2004; 53(5):882–884.
170. Wilson M, McNab R, Hendersen B. Bacterial disease mechanisms // Cambridge University press, 2002;656.
171. Wilson M. *Clostridium difficile* and childhood diarrhea; cause, consequence, or confounder // *Clin Infect Dis*, 2006; 43:814–816.
172. Wolf PL, Kasyan A. Pseudomembranous colitis associated with *C. difficile* // *N Engl J Med*, 2005; 353:23.
173. Wolfagen M, Torensma R, Fleuit A, et al. Toxins A and B of *Clostridium difficile* // *FEMS Microbiol Rev*, 2000; 13:59–64.
174. Zheng L, Keller S, Lyerly D. Multicenter Evaluation of a New screening test detect *Clostridium difficile* in fecal specimens // *J Clin Microbiol*, 2004; 42:3837–3840.
175. Zilberg M.D, Tillostson GS, McDonald C. *C. difficile* infections among hospitalized children, United States, 1997–2006 // *EID*, 2010; 16:604–609.
176. Zweiner R, Belknap W, Quan R. Severe pseudomembranous enterocolitis in a child: case report and literature review // *Pediatr Infect Dis J*, 1989; 8:876–882.

10. Pielikums

Pielikums 10.1.

Nosūtījums izmeklējumam uz *Clostridium difficile* bērniem

AS P. Stradiņa KUS CL Molekulārās bioloģijas un ģenētikas laboratorija
Pilsoņu iela 13, Rīga, LV – 1002, tel.7069980

Nosūtījums izmeklējumam uz *Clostridium difficile*

Materiāls fēces

Slimnieka vārds, uzvārds _____

Personas kods _____

Slimības vēstures Nr. _____ Nodaļa _____

Diagnoze _____

Stacionēšanas

datums _____

AB terapija uzsākta pirms stacionēšanas

pirmajā stacionēšanas dienā

Imūnsupresija ir nav

Klīniskā aina:

diareja kolīts hemokolīts

pseidomembranozais kolīts drudzis toksisks megacolon

Nosūtīja _____

Pielikums 10.2.

ECDIS studiju programmas komentāru forma pacientu iekļaušanai ECDIS studiju programmā

1. Pacienta kods: LVNNYY

LV – valsts kods

NN – divciparu slimnīcas kods

YY – divciparu secīgais slimnieka numurs

2. Lokālais parauga numurs: slimnīcas parauga numurs parastā veidā _____

3. Fēču parauga datums: dd-mm-gggg _____

4. Dzimums m – vīrietis f – sieviete

5. Vecums: gadi _____

6. Kur tika iegūti diarejas vai CDI simptomi: sadzīvē slimnīcā aprūpes iestādē citur

6.1 Ja slimnīcā: pirmajās 48 stundās pēc uzņemšanas vēlāk

7. Vai CDI tests tika skaidri prasīts jā nē

8. Vai pacientam jau bija CDI iepriekšējās 8 nedēļās jā nē

9. Vai patients bija hospitalizēts parauga paņemšanas laikā: jā nē

9.1 Ja „nē”, tad kad tika hospitalizēts: dd-mm-gggg _____

10. Cik ilgu laiku pacientam bija diareja pirms parauga paņemšanas: _____

11. Vai pacientam bija diareja ar asiņu piejaukumu nedēļu pirms parauga paņemšanas jā nē

12. Vai pacientam bija drudzis dienā, kad tika paņemts paraugs jā nē

13. Vai pacientam bija ileuss nedēļas laikā pirms parauga paņemšanas jā nē

14. Pēdējais periferālo asiņu leikocītu skaits nedēļas laikā pirms parauga paņemšanas, ja ir dati _____

15. Neitrofilu % leikocītos pēdējā asins analīzē, ja ir dati _____

16. Vai seruma kreatinīna līmenis pirms parauga paņemšanas pieauga par vairāk nekā 50%, salīdzinot ar tā līmeni pirms CDI simptomu parādīšanās, ja ir dati _____

17. Pēdējais arteriālā seruma laktāta līmenis pirms parauga paņemšanas, ja ir dati _____

18. Vai šīs CDI laikā tika veikta sigmoidoskopija vai kolonoskopija

Ja „jā” 18.1. Datums kad tika veikta _____

18.2. Vai bija redzamas pseidomembrānas jā nē

18.3. Vai čūlošana bija redzama jā nē

19. Vai tika veikta vēderdobuma CT šīs CDI laikā

Ja „jā” 19.1. Datums kad tika veikta _____

19.2. Vai redz resnās zarnas rievu sabiezējumu jā nē

19.3. Vai redz ap resno zarnu tauku slāņa dzīslu jā nē

19.4. Vai redz zarnu izplešanos jā nē

Ja „nē” 19.1. Vai tika veikta vēderdobuma radiogrāfija šīs CDI laikā jā nē

Ja „jā” 19.1.1. Datums, kad tika veikta _____

19.1.2. Vai redz zarnu izplešanos jā nē

20. Vai pacients bija hospitalizēts 3 mēnešu laikā pirms parauga paņemšanas (neskaitot šo hospitalizāciju) jā nē

Ja „jā” 20.1. Kad tika izrakstīts _____

21. Vai pacients uzturējās aprūpes iestādē 3 mēnešu laikā pirms parauga paņemšanas: jā nē

Ja „jā” 21.1. Kad pacients pēdējo reizi uzturējās aprūpes iestādē _____

22. Vai pacients lietoja antibiotikas NE PRET *C. difficile* 3 mēnešu laikā pirms parauga paņemšanas jā nē

Ja „jā” 22.1. Antibiotiku grupas:

dabīgie penicilīni

penicilināzes rezistentie penicilīni

aminopenicilīns

aminopenicilīns/ beta-laktamāžu inhibitori

antipseidomonālais penicilīns

antipseidomonālais penicilīns/beta-laktamāzes inhibitori

- 1 ģenerācijas cefalosporīni
- 2 ģenerācijas cefalosporīni
- 3 ģenerācijas cefalosporīni
- ceftazidims
- 4 ģenerācijas cefalosporīni
- carbapenems
- monobaktāms
- aminoglikozīdi
- hloramfenikols
- kolistīns
- daptomicīns
- kvinoloni ar 2 ģenerācijas fluorkvinonoliem
- 3 un 4 ģenerācijas fluorkviloni
- fosfomicīns
- gliceropeptīds
- linkozamīds
- linezolīds
- makrolīdi
- tigecilīns
- kotrimaksozols
- rifamicīns
- cita _____

Ab lietošanas ilgums:

- profilaktiski max 24 stundas
- <1 nedēļu ilgs ārstniecības kurss
- 1 – 2 nedēļas ilgs ārstniecības kurss
- >2 nedēļām ilgs ārstniecības kurss

23. Vai pacientam bija aknu ciroze, kas definēta kā hroniska saslimšana pēc APACHE II punktu tabulas, parauga paņemšanas laikā? jā nē

24. Vai slimniekam bija 4 klases sirds nepietiekamība ar stenokardiju pēc NYHA, kas definēta kā hroniska sirds nepietiekamība pēc APACHE II punktu tabulas, kad tika paņemts paraugs? jā nē

25. Vai slimniekam bija hroniska plaušu saslimšana, kas definēta pēc APACHE II punktu tabulas, kad tika paņemts paraugs? jā nē

26. Vai slimnieks bija imūnkompromitēts, kas definēta kā hroniska saslimšana pēš APACHE II punktu tabulas, kad tika paņemts paraugs? jā nē

27. Vai slimnieks bija dialīzes pacients pēc APACHE II, kad tika paņemts paraugs? jā nē

28. Vispārējas piezīmes par slimnieka stāvokli

Pielikums 10.3.

C.difficile aptaujas anketas veidlapa EpiInfo datubāzē

C.difficile aptaujas anketa

Informācija par pacientu

Vestnesis numurs: Nodales numurs: Nodales profils:

Vecums: Dzimums: Klīniskā diagnoze:

Uzmanības datums: Izsekurots:

Izrakstīšanas datums:

Riska faktori

Iepriekšēja hospitalizācija
 Antibiotiku lietošana
 GIT manipulācijas
 C. difficile anamnēze
 Antacidu lietošana
 Citi riska faktori:

Antibiotiku skaits:

Antibiotikas pirms *C. difficile* "A" parauža pārņemšanas:

Antibiotika	Dzīvā ilg	Reizes dienas	Ievades veids	Ilgums

Laboratoriskā izmeklēšana

Pozitīvs toksāns:
 Pozitīvs antigēns:
 PCR tests:
 Kultūra:
 Parauža pārņemšanas datums:
 Atbildes saņemšanas datums:
 Dabīgi pēc hospitalizācijas:

Klīniskā aina

Diarēja Ilgums:
 Drudzis Ilgums:
 Toksisks megakolons
 Pseudomembrānozo kolīts
 Perforācija
 Citi simptomi:

Terapija

Iepriekšēja antibakteriāla terapija

Apturēta
 Izņemta
 Nav izņemta

Probiotiku lietošana Probiotiks:

Antešanai nozīmētas antibiotikas

Antibiotika	Dzīvā ilg	Reizes dienas	Ievades veids	Ilgums

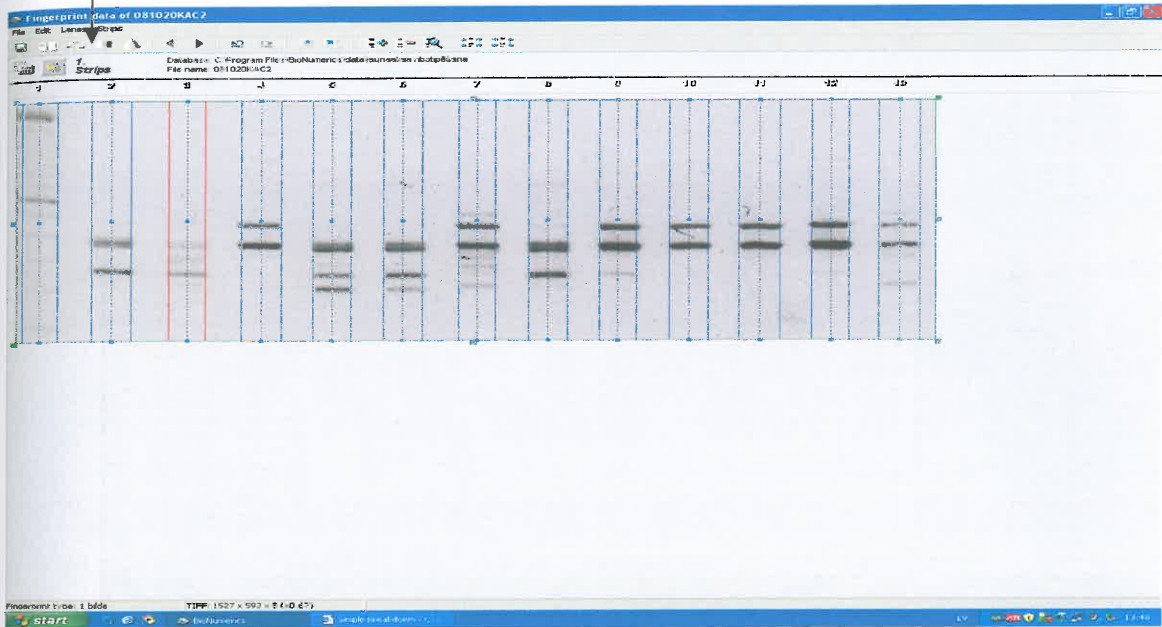
Cita terapija:

Legālvārds: db1 mdo = *C. difficile*

Pielikums 10.4.

Datu apstrādes piemērs BioNumerics programmā

Rīkjosla „Strips”



Rīkjosla „Band”



VanB gēna sekvences analīze



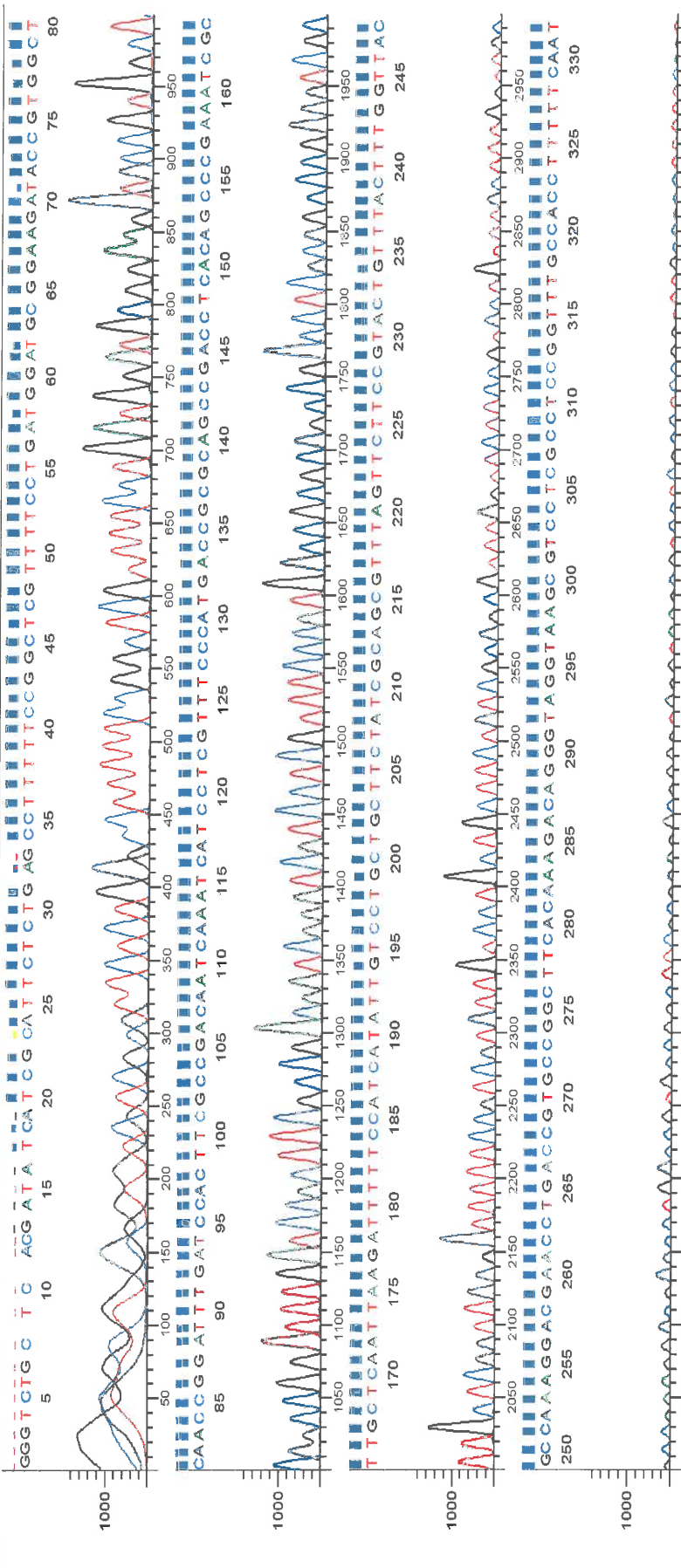
Cl.dif129+399_003.ab1

Cl.dif129+399

Signal: G:357 A:218 T:263 C:316 AvgSig: 288

C#:3 W:C8 Plate Name:090825

KB 1.4.0 KB.bcp
KB_3130_POP7_BDTV3.mob
TS:52 CRL:529 QV20+502



Inst Model/Name:3130/3130-19344-013
Sequence Scanner v1.0

Pure Base QVs: 15.20
Mixed Base QVs: 10.16

Printed on: Jan 27, 2011 15:46:04 EET
Electropherogram Data Page 1 of 4

Pielikums 10.6.

vanB gēna BLAST analīzes rezultāts

Descriptions

Legend for links to other resources: [UniGene](#) [EGEO](#) [Gene](#) [Structure](#) [Map Viewer](#) [PubChem BioAssay](#)

Sequences producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
AY665551.1	Enterococcus faecalis VanB gene, partial cds	992	992	98%	0.0	99%	
AY665550.1	Enterococcus faecalis VanB gene, partial cds	992	992	98%	0.0	99%	
AE016830.1	Enterococcus faecalis V583, complete genome	992	992	98%	0.0	99%	
U94527.1	Enterococcus faecium vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	992	992	98%	0.0	99%	
U35369.1	Enterococcus faecalis vancomycin resistance genes, response regulator (vanRB), protein histidine kinase (vanSB), D,D-carboxypeptidase (vanYB), putative D-2-hydroxyacid dehydrogenase (vanHB), D-Ala:D-Lac ligase (vanB), and putative D,D-dipeptidase (vanXB) genes, complete cds	992	992	98%	0.0	99%	
U00456.1	Enterococcus faecalis vanB gene, complete cds	965	965	98%	0.0	98%	
AY655712.1	Clostridium sp. MLG480 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	894	894	97%	0.0	96%	
AF192329.1	Enterococcus faecalis transposon Tn1.549, complete sequence	878	878	97%	0.0	95%	
FJ767776.1	Enterococcus faecium strain BM4661 vancomycin resistance operon, complete sequence						

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<u>Z70527.1</u>	S.bovis biotype II partial vanB2 gene	878	878	97%	0.0	95%	
<u>AB374546.1</u>	Enterococcus faecalis plasmid pMG2200 DNA, complete sequence	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY655716.1</u>	Clostridium sp. MLG661 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY655715.1</u>	Clostridium sp. MLG392 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY655714.1</u>	Ruminococcus sp. MLG080-3 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY655713.1</u>	Clostridium sp. MLG080-1 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY655710.1</u>	Clostridium sp. MLG856-1 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AJ306727.1</u>	Enterococcus faecium plasmid pVREM3123/00 partial vanHB gene and partial vanB2 gene	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AF310957.1</u>	Enterococcus faecium CG4248 transposon Tn5382 ligase VanB2 (vanB2) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AF310955.1</u>	Enterococcus faecalis T4059 transposon Tn5382 ligase VanB2 (vanB2) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AF310953.1</u>	Enterococcus faecium VRE-1 transposon Tn5382 ligase VanB2 (vanB2) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>U94526.1</u>	Enterococcus faecium vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY958220.1</u>	Enterococcus faecium D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	872	872	97%	0.0	95%	
<u>AY772783.1</u>	Clostridium sp. CCRI-9842 transposon Tn5382-like vanB2 gene locus, complete sequence; and unknown genes	872	872	97%	0.0	95%	
<u>EU908677.1</u>	Enterococcus faecium strain CNM604_06 ST17 transposon Tn5382 D-alanine:D-lactate ligase VanB2 gene, partial cds	867	867	97%	0.0	95%	

Sequences producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
<u>AY655721.2</u>	Enterococcus faecium strain MLG229 transposon Tn1549-like VanRB (vanRB), VanSB (vanSB), Van YB (van YB), Van W (van W), VanHB (vanHB), D-alanine:D-lactate ligase (vanB), VanXB (vanXB), Xis (xis), and Int (int) genes, complete cds, and unknown genes	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY655720.2</u>	Clostridium sp. MLG245 transposon Tn1549-like VanRB (vanRB), VanSB (vanSB), Van YB (van YB), Van W (van W), VanHB (vanHB), D-alanine:D-lactate ligase (vanB), VanXB (vanXB), Xis (xis), and Int (int) genes, complete cds, and unknown genes	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY655719.1</u>	Clostridium sp. MLG101 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY655717.1</u>	Clostridium sp. MLG055 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY655711.1</u>	Enterococcus faecium strain MLG856-2 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, complete cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY704417.1</u>	Enterococcus faecium VanB gene, partial cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY145441.1</u>	Enterococcus faecium UI709 D-alanine:D-lactate ligase (vanB2) gene, complete cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AJ306726.1</u>	Enterococcus faecium plasmid pVREM2497/00 partial vanHB gene and partial vanB2 gene	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AF310956.2</u>	Enterococcus faecium response regulator (vanRB2), protein histidine kinase (vanSB2), D,D-carboxypeptidase (van YB2), Van WB2 (van WB2), D-2-hydroxyacid dehydrogenase (vanHB2), D-alanine:D-lactate ligase (vanB2), and D,D-dipeptidase (vanXB2) genes, complete cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AF310954.1</u>	Enterococcus faecium SLH475 transposon Tn5382 ligase VanB2 (vanB2) gene, complete cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>U94528.1</u>	Enterococcus faecium vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<u>Z83305.1</u>	<i>E. faecium</i> vanB2, vanHB2 and vanXB2 genes	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>U94530.1</u>	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>U94529.1</u>	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>U81452.1</u>	<i>Enterococcus faecium</i> putative D-2-hydroxyacid dehydrogenase (vanHB2) gene, partial cds, D-alanine:D-alanine ligase-related protein (vanB2) gene, complete cds, <u>867</u> and putative D,D-dipeptidase (vanXB2) gene, partial cds	<u>867</u>	867	97%	0.0	95%	
<u>AY655718.2</u>	<i>Eggerthella lenta</i> strain MLG043 transposon Tn1549-like VanRB (vanRB), VanSB (vanSB), VanYB (vanYB), VanHB (vanHB), D-alanine:D-lactate ligase (vanB), VanXB (vanXB), Xis (xis), and Int (int) genes, complete cds, and unknown genes	<u>861</u>	861	97%	0.0	95%	
<u>AF550667.1</u>	<i>Enterococcus faecium</i> strain BM4524 D-alanine:D-lactate ligase (vanB), D,D-dipeptidase (vanXB), transposon IS150-like putative transposase and transposition-related protein genes, complete cds; and unknown genes	<u>861</u>	861	97%	0.0	95%	
<u>U72704.1</u>	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin resistance protein (vanB) gene, partial cds	<u>845</u>	845	97%	0.0	94%	
<u>L06138.1</u>	<i>Enterococcus faecalis</i> VANB gene sequence	<u>813</u>	813	80%	0.0	99%	
<u>AY786179.1</u>	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	<u>806</u>	806	90%	0.0	95%	
<u>L15304.1</u>	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin resistance vanB2 gene, complete cds	<u>736</u>	736	83%	0.0	95%	
<u>FJ830869.1</u>	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin resistance protein B (vanB) gene, partial cds	<u>647</u>	647	73%	0.0	95%	
<u>AY035705.1</u>	<i>Streptococcus gallolyticus</i> strain 4-G10 Tn5382-like transposon ligase VanB2 (vanB2) gene, partial cds	<u>616</u>	616	68%	6e-17	95%	3
<u>AY035704.1</u>	<i>Streptococcus gallolyticus</i> strain 4-C11 Tn5382-like transposon ligase VanB2 (vanB2) gene, partial cds	<u>616</u>	616	68%	6e-17	95%	3
<u>AY035703.1</u>	<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain 5-F9 Tn5382-like transposon ligase VanB2 (vanB2) gene, partial cds	<u>616</u>	616	68%	6e-17	95%	3

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY697424.1	Enterococcus faecium VanB (vanB) gene, partial cds	<u>580</u>	580	65%	2e-16	95%	
AY960704.1	Staphylococcus epidermidis strain NC1 D-alanine:D-lactate ligase (vanB) gene, partial cds	<u>416</u>	416	47%	7e-11	95%	

Alignments

Select All Get selected sequences Distance tree of results [Multiple alignment](#)

```

> gb|AY665551.1| Enterococcus faecalis VanB gene, partial cds
Length=732

Score = 992 bits (537), Expect = 0.0
Identities = 544/547 (99%), Gaps = 1/547 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 11  ACGAT-ATCATCGCATTCCTGAGCCTTTTCCGGCTCGTTTTCCCTGATGGATGCGGAAG 69
        ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 689  ACGATAATCATCGCATTCCTGAGCCTTTTCCGGCTCGTTTTCCCTGATGGATGCGGAAG 630

Query 70  ATACCGTGGCTCAACCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAAATCAAATCATCCTCGTTTCCC 129
        ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 629  ATACCGTGGCTCAACCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAAATCAAATCATCCTCGTTTCCC 570

```

Query	130	ATGACCGCGCAGCCGACCTCACAGCCCGAAAATCGCTTGCTCAATTAAGATTTTCCATCA	189
Sbjct	569	ATGACCGCGCAGCCGACCTCACAGCCCGAAAATCGCTTGCTCAATTAAGATTTTCCATCA	510
Query	190	TATTGTCCCTGCTGCTTCTATCGCAGCGTTTAGTTCTTCCGTACTGTTACTTTGGTTACG	249
Sbjct	509	TATTGTCCCTGCTGCTTCTATCGCAGCGTTTAGTTCTTCCGTACTGTTACTTTGGTTACG	450
Query	250	CAAAGGACGAACCTGACCGTGCCGGCTTCAAAAAGACAGGTFAGGTAAGCGTCCCTCGCC	309
Sbjct	449	CAAAGGACGAACCTGACCGTGCCGGCTTCAAAAAGACAGGTFAGGTAAGCGTCCCTCGCC	390
Query	310	TCCGGTTTGCCACCTTTTCAATCACTTGAAAATTCGGGGACGGGATGCCCGCATTTTTT	369
Sbjct	389	TCCGGTTTGTCACCTTTTCAATCACTTTGAAAATTCGGGGACGGGATGCCCGCATTTTTT	330
Query	370	GTAAGAAATGTAGGCCAGTGATTTGTCCATGCAAGCTGCGGAGCTTTGAATATCGCAGCCT	429
Sbjct	329	GTAAGAAATGTAGGCCAGTGATTTGTCCATGCAAGCTGCGGAGCTTTGAATATCGCAGCCT	270
Query	430	ACATAGGGGATACCAGACAAATCAAAACAGACCCTGTATCGCACCATCCTCCCCGGCATTTG	489
Sbjct	269	ACATAGGGGATACCAGACAAATCAAAACAGACCCTGTATCGCACCATCCTCCCCGGCATTTG	210
Query	490	CCATGCAAAAACCGGGAAAAGCCACGTCATAATACGCCGAGTTTCGGTATTCITCTTTTCATG	549
Sbjct	209	CCATGCAAAAACCGGGAAAAGCCACGTCATAATACGCCGAGTTTCGGTATTCITCTTTTCATG	150
Query	550	ACAAGCA	556
Sbjct	149	ACAAGCA	143

> gb|AY665550.1| Enterococcus faecalis VanB gene, partial cds
Length=815

Score = 992 bits (537), Expect = 0.0
Identities = 544/547 (99%), Gaps = 1/547 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	11	ACGAT-ATCATCGCATTCCTGAGCCCTTTTCCGGCTCGTTTTCCTGATGGATGCGGAAG	69
			186
Sbjct	127	ACGATAATCATCGCATTCCTGAGCCCTTTTCCGGCTCGTTTTCCTGATGGATGCGGAAG	186
Query	70	ATACCGTGGCTCAACCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAAATCAAAATCATCCTCGTTTCCC	129
			246
Sbjct	187	ATACCGTGGCTCAACCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAAATCAAAATCATCCTCGTTTCCC	246
Query	130	ATGACCGCGCAGCCGACCTCACAGCCCGAAATCGCTTGCTCAATTAAGATTTTCCATCA	189
			306
Sbjct	247	ATGACCGCGCAGCCGACCTCACAGCCCGAAATCGCTTGCTCAATTAAGATTTTCCATCA	306
Query	190	TATTGTCTGTGCTTCTATCGAGCGTTTAGTTCTTCCGTACTGTTTACTTTGGTTACG	249
			366
Sbjct	307	TATTGTCTGTGCTTCTATCGAGCGTTTAGTTCTTCCGTACTGTTTACTTTGGTTACG	366
Query	250	CCAAAAGGACCAACCTGACCGTGCCGGCTTCACAAAAGACAGGGTAGGTAAGCGTCCCTCGCC	309
			426
Sbjct	367	CCAAAAGGACCAACCTGACCGTGCCGGCTTCACAAAAGACAGGGTAGGTAAGCGTCCCTCGCC	426
Query	310	TCCGGTTTGCCACCTTTTCAATCACTTGAAATTCGGGGACGGCGATGCCCGCATTTTTT	369
			486
Sbjct	427	TCCGGTTTGTCACCTTTTCAATCACTTTGAAATTCGGGGACGGCGATGCCCGCATTTTTT	486
Query	370	GTAAGAATGTAGGCCAGTGATTTGTCCATGCAAGCTGCGGAGCTTTGAATATCGCAGCCT	429
			546
Sbjct	487	GTAAGAATGTAGGCCAGTGATTTGTCCATGCAAGCTGCGGAGCTTTGAATATCGCAGCCT	546

Query	430	ACATAGGGGATACCAGACAAATTCAAAACAGACCCTGTATCGCACCATCCTCCCGCATTTG	489
Sbjct	547	ACATAGGGGATACCAGACAAATTCAAAACAGACCCTGTATCGCACCATCCTCCCGCATTTG	606
Query	490	CCATGCAAAACCGGGAAAGCCACGTCAATACGCCGAGTTTCGTATTCTCTTTTCATG	549
Sbjct	607	CCATGCAAAACCGGGAAAGCCACGTCAATACGCCGAGTTTCGTATTCTCTTTTCATG	666
Query	550	ACAAGCA	556
Sbjct	667	ACAAGCA	673

11. Konferenču tēzes un prezentācijas par pētījuma tēmu

K. Aksenoka, A. Balode, U. Dumpis, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *C.difficile* izraisītās disbakteriozes aģenta noteikšana ar PĶR un eksprestestu, rezultātu interpretācija // 2007; RSU 6. zinātniskās konferences tēzes, 151 lpp.

Aksenoka K, Goonewardene S, Pujate, Miklasevics E, Dumpis U. Surveillance of *C.difficile* infection in Latvian multidisciplinary teaching hospital // 2008; 18th European congress of clinical microbiology and infectious diseases (ECMID), Abstract-P1485.

K. Aksenoka, I. Grope, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* prevalence bērniem ar diarejas klīniku // 2008; RSU 7. zinātniskās konferences tēzes, 129 lpp.

K. Aksenoka, A. Balode, D. Gardovska, U. Dumpis, E. Miklaševičs, *Clostridium difficile* molekulārā tipēšana // 2009; RSU 8. zinātniskās konferences tēzes, 127 lpp.

K. Aksenoka, A. Balode, I. Grope, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* Latvijas izolātu patogenitātes lokusa analīze // 2010; RSU 9. zinātniskās konferences tēzes, 179 lpp.

K. Aksenoka. *Clostridium difficile* Latvijas slimnīcās // 2010, 17. novembrī. Konference „Slimnīcā iegūto infekciju un antibiotiku patēriņa aktualitātes Latvijā”.

K. Aksenoka. Promocijas darba aprobācija RSU Pediatrijas katedras, RSU Infektoloģijas un dermatoloģijas katedras un RSU Pārmantotā vēža institūta apvienotajā sēdē, 22.09.2010.

12. Publikācijas par pētījuma tēmu

D. Gardovska, L. Eihvalde, I. Grope K. Aksenoka, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diareju // *RSU Zinātniskie raksti 2008*, 2008; 205–211.

Aksenoka K, Balode A, Grope I, Obidenova T, Gardovska D, Miklasevics E. *Clostridium difficile* Associated Disease Clinical and Molecular Data // *Acta Chirurgica Latviensis 2009*, 2009; 9:56–61.

K. Aksenoka, A. Balode, I. Grope, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* Latvijas izolātu molekulārā tipēšana // *RSU Zinātniskie raksti 2009*, 2009; 250–254.

Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT and Kuijper EJ, for the ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: the first pan-European hospital-based survey. *The Lancet*, 2010; 377, No.9759:63–73.

13. Pateicības

Siltus pateicības vārdus veltu promocijas darba vadītājiem profesorei Dacei Gardovskai un asociētajam profesoram Edvīnam Miklaševičam par padomiem, ieteikumiem, jaunām idejām un radošu ieguldījumu darba izstrādes procesā.

Augstu novērtēju CL Mikrobioloģijas nodaļas vadītājas Artas Balodes izpalīdzību un kompetenci.

Liels paldies Rīgas Stradiņa universitātes Pediatrijas katedras docentei Ilzei Gropei un LU asociētajam profesoram Ugam Dumpim par palīdzību publikāciju tapšanas procesā.

Paldies profesorei Ludmilai Vīksnai par konkrētu, pamatotu aizrādījumu uzskaitījumu un ieteiktajiem vēlamajiem labojumiem.

Paldies RSU zinātņu proktorei profesorei Ivetai Ozolantei, RSU Doktorantūras nodaļas vadītājam profesoram Aigaram Pētersonam un RSU doktora studiju programmas „Medicīna” vadītājai profesorei Sandrai Lejniecei par atbalstu doktorantūras laikā un pamudinājumiem sasniegt izvirzīto mērķi savlaicīgi.

Pateicos RSU Fizikas katedras vadītājam profesoram Uldim Teibem par palīdzību statistisko datu apstrādē.

Liels atbalsts un praktiski palīgi ir un būs mani kolēģi P. Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas CL Mikrobioloģijas laboratorijā un Molekulārās bioloģijas un ģenētikas laboratorijā, viņu iedvesma vienmēr būs kopā ar mani.

Pateicos KUS „Gaiļezers” mikrobioloģijas laboratorijas ārstēm Dacei Rudzītei un Elvīrai Lavrinovičai par palīdzību pētāmā materiāla atlasē.

Pateicos P. Stradiņa KUS Infekcijas uzraudzības dienesta epidemioloģei Elīnai Dimiņai par sadarbību.

Paldies maniem radniekiem par sapratni, morālu, sirdstīru un pašizliedzīgu palīdzību grūtos brīžos un patiesu prasmi priecāties par maniem sasniegumiem.

Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based

survey

Daan W Notermans, Birgit H B van Benthem, Jon S Brazier, Mark H Wilcox, Maja Rupnik, Dominique L Monnet, Jaap T van Dissel, for the ECDIS Study Group*

Summary Little is known about the extent of *Clostridium difficile* infection in Europe. Our aim was to obtain a more complete overview of *C difficile* infection in Europe and build capacity for diagnosis and surveillance.

Methods We set up a network of 106 laboratories in 34 European countries. In November, 2008, one to six hospitals, relative to population size, tested stool samples of patients with suspected *C difficile* infection or diarrhoea developed 3 or more days after hospital admission. A case was defined when, subsequently, toxins were identified in stool samples. Detailed clinical data and stool isolates were collected for the first ten cases per hospital. After 4 weeks, clinical data were followed up.

Results The incidence of *C difficile* infection varied across hospitals (weighted mean 4.1 per 10 000 patient-days per hospital, range 0.0–36.3). Detailed information was obtained for 509 patients. For 389 of these patients, isolates were available for characterisation. 65 different PCR ribotypes were identified, of which 014/020 (61 patients [16%]), 001 (37 patients [9%]), and 078 (31 [8%]) were the most prevalent. The prevalence of PCR-ribotype 027 was 5%. Most patients had a previously identified risk profile of old age, comorbidity, and recent antibiotic use. At follow up, 101 (22%) of patients had died, and *C difficile* infection played a part in 40 (40%) of deaths. After adjustment for potential confounders, an age of 65 years or older (adjusted odds ratio 3.26, 95% CI 1.08–9.78; $p=0.026$), and infection by PCR-ribotypes 018 (6.19, 1.28–29.81; $p=0.023$) and 056 (13.01, 1.14–148.26; $p=0.039$) were significantly associated with a complicated disease outcome.

Conclusion PCR ribotypes other than 027 are prevalent in European hospitals. The data emphasise the importance of multicountry surveillance to detect and control *C difficile* infection in Europe.

Key words: European Centre for Disease Prevention and Control.

Introduction

Clostridium difficile infection is prevalent in health-care facilities throughout the developed world, but also occurs as large outbreaks. Less often, it is acquired in the community from an unknown source. It characteristically occurs in elderly patients with comorbidity in whom the intestinal flora has been disrupted by previous use of antibiotics.^{1,2} Since early 2003, increasing rates of *C difficile* infection have been reported in Canada and the USA, with a larger proportion of severe and recurrent cases occurring in these countries than previously reported. The raised incidence and virulence of such infection have probably been explained by the spread of fluoroquinolone-resistant strains belonging to the PCR-ribotype 027.^{3–5} In addition to the usual toxins A and B, these fluoroquinolone-resistant strains produce a binary toxin, with a hitherto uncertain pathogenic significance.^{1–6} In Europe, PCR-ribotype 027 was first reported in 2005 in England and thereafter in the Netherlands.^{7,8} Subsequently, epidemics of *C difficile* infection caused by PCR-ribotype 027 have been recognised in hospitals in many European countries.⁹

Despite the attention given to this infection, diagnostic procedures in hospitals, presence and methodology of national surveillance, and availability of typing vary widely

across Europe, which hampers comparisons between countries.^{9,10} We did this study to obtain a more complete overview of the situation in Europe and build capacity for diagnosis and surveillance of *C difficile* infection both nationally and Europe-wide.

Methods

Study design and patients

With support from the European Centre for Disease Prevention and Control, we appointed national coordinators for 34 European countries (including 27 member states, three candidate states, and four European-Free-Trade-Association countries) who selected hospitals in each country, relative to the country's population size. No randomisation was used for this selection. The aim was to include one hospital for countries with fewer than two million inhabitants, three for those with between two and 20 million inhabitants, and five for those with more than 20 million inhabitants, with a balance between academic and non-academic institutions. A study protocol noting all procedures was distributed to national coordinators and coordinators in all hospitals. Hospitals and laboratories completed a web-based questionnaire (webappendix pp 1–5) with epidemiological data, including numbers of patient-days,



Published Online
November 16, 2010
DOI:10.1016/S0140-6736(10)61266-4

See Online/Comment
DOI:10.1016/S0140-6736(10)61885-5

*Members listed at end of paper
Centre for Infectious Disease Control Netherlands, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands (M P Bauer MD, D W Notermans PhD, B H B van Benthem PhD); Centre for Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands (M P Bauer, E J Kuijper PhD, Prof J T van Dissel PhD); Anaerobe Reference Laboratory, National Public Health Service for Wales, Microbiology Cardiff University Hospital of Wales, Cardiff, UK (J S Brazier PhD); Department of Microbiology, Old Medical School, Leeds General Infirmary and University of Leeds, Leeds, UK (Prof M H Wilcox MD); Institute of Public Health Maribor, Centre for Microbiology, Maribor, Slovenia (Prof M Rupnik PhD); and Scientific Advice Unit, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden (D L Monnet PhD)
Correspondence to: Dr Martijn P Bauer, Leiden University Medical Centre, Infectious Diseases, Albinusdreef 2, Leiden, 2300 RC, Netherlands
m.p.bauer@lumc.nl

See Online for webappendix

admissions, and stool samples tested for *C difficile* infection in November, 2008, and technical data such as assays and culture methods used.

Procedures

Hospitals were asked to test for *C difficile* infection in outpatients and inpatients suspected of having the infection by their treating physician and all inpatients who developed diarrhoea 3 days or more after admission.

Clinical grounds on which to suspect recurrence were left to the attending physicians' judgment, who could use the definition of *C difficile* infection according to the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) treatment guidance for *C difficile* infection.¹¹ Only patients aged 2 years or older were included in the study. Patients with suspected *C difficile* infection and diarrhoea, whose stool samples were positive for toxin A, B, or both (EIA, cytotoxicity test, or PCR) or revealed

	Number of toxin-positive cases/number of patients tested	Number of patients tested per 10 000 patient-days	Number of participating hospitals*	Weighted mean health-care-associated <i>C difficile</i> infection incidence rate per hospital (minimum to maximum range)†		Percentage of health-care-associated <i>C difficile</i> infection cases in health-care-associated and community-associated <i>C difficile</i> infections	Number of complicated cases/number of cases with available data (%)	Toxin tests used (number of hospitals)
				Per 10 000 patient-days	Per 10 000 admissions			
Austria	53/330 (16%)	52	3	7.5 (4.3-10.9)	36 (20-46)	92%	4/26 (15%)	A+B (2); A+B and Cu (1)
Belgium	16/283 (6%)	55	3	2.8 (0.0-6.2)	19 (0-39)	91%	0/11 (0%)	A+B (1); Cy and A+B (1); A (1)
Bulgaria	2/9 (22%)	3	3	0.6 (0.0-2.1)	3 (0-10)	100%	1/1 (100%)	A+B (3)
Bosnia	22/197 (11%)	41	3 (2)	0.7 (0.5-2.1)	6 (4-20)	18%	1/14 (7%)	A+B (2)
Cyprus	1/28 (4%)	34	1	1.2	5	100%	0/1 (0%)	A+B (1)
Czech Republic	10/152 (7%)	17	3	1.1 (0.0-1.3)	7 (0-9)	100%	2/7 (29%)	A+B (3)
Denmark	28/330 (8%)	74	3	5.5 (4.4-9.6)	18 (10-25)	88%	1/19 (5%)	A+B (1); Cu (2)
Finland	52/351 (15%)	141	3	19.1 (8.7-28.5)	80 (30-132)	91%	2/22 (9%)	A+B and Cu (1); Cu (1); A&B (1)
France	37/626 (6%)	42	5 (4)	2.1 (1.0-3.1)	15 (6-27)	84%	4/34 (12%)	A+B (2); Cu (1); Cy (1)
Germany	93/602 (15%)	72	6 (5)	7.4 (2.9-16.4)	60 (25-276)	91%	2/24 (8%)	A+B (3); Cu (1); Cy (1)
Greece	21/288 (9%)	60	3	3.7 (1.3-4.9)	29 (9-44)	84%	0/17 (0%)	A+B (3)
Hungary	22/333 (7%)	38	3	2.0 (0.4-3.9)	9 (1-23)	68%	1/25 (4%)	A+B (3)
Iceland	6/0	..	1	100%	0/6 (0%)	..
Ireland	38/493 (8%)	94	3	7.3 (6.5-7.9)	63 (39-92)	100%	5/21 (24%)	A+B (3)
Italy	57/533 (11%)	39	5	3.6 (0.4-5.8)	22 (2-61)	85%	5/18 (28%)	AB (2); GluD and A+B (1); Cy (1)
Lithuania	13/64 (20%)	10	3	1.9 (0.0-2.8)	13 (0-20)	91%	0/13 (0%)	A (2); A+B (1)
Luxembourg	0/28 (0%)	49	1	0.0	0	NA	0	A+B
Netherlands	18/309 (6%)	69	3	4.0 (2.3-8.5)	23 (13-43)	100%	1/15 (9%)	A+B (2); Cy (1)
Norway	37/241 (15%)	50	3	7.6 (0.4-16.5)	56 (3-229)	100%	1/16 (6%)	A+B (3)
Poland	102/263 (39%)	45	3	12.5 (3.8-36.3)	76 (29-189)	79%	1/11 (9%)	A+B (2); Cu (1)
Portugal	14/158 (9%)	45	3 (2)	2.6 (1.9-8.2)	13 (13-14)	86%	0/10 (0%)	A+B (3)
Romania	1/11 (9)	3	5 (1)	0.3	2	100%	0/1 (0%)	A+B (2)
Slovakia	10/91 (11%)	16	3 (2)	1.4 (0.0-2.1)	11 (0-15)	71%	0/5 (0%)	A (1); Cu (1)
Slovenia	24/123 (20%)	17	3 (2)	2.8 (1.5-3.2)	19 (10-23)	67%	1/10 (10%)	A+B (2)
Spain	46/485 (9%)	45	5	4.3 (0.0-16.7)	30 (0-47)	100%	5/28 (18%)	A+B (2); Cu (1); A+B and Cy and Cu (1); A+B and Cu (1)
Sweden	69/430 (16%)	74	3	9.8 (6.3-15.7)	50 (28-71)	86%	2/30 (7%)	A+B (2); Cy (1)
Switzerland	16/150 (11%)	45	3	4.8 (0.0-7.5)	50 (0-84)	100%	0/12 (0%)	A+B (2); Cu (1)
United Kingdom	4/105 (4%)	4	5	0.0 (0.0-0.6)	0 (0-4)	20%	0/4 (0%)	A+B (3); A (1)
United States	164/1695 (10%)	115	6	10.6 (6.7-30.3)	50 (44-135)	92%	5/40 (13%)	A+B (3); Cy (3)
Total	NA	NA	97 (87)	4.1 (0.0-36.3)	23 (0-276)	NA	44/442 (10%)	NA

Abbreviations: A=enzyme immunoassay for *C difficile* toxin A and B. A+=enzyme immunoassay for *C difficile* toxin A only. Cu=toxigenic culture. Cy=cytotoxicity test. GluD=enzyme immunoassay for *C difficile*-specific glutamate dehydrogenase. NA=not applicable. ..=data not available. *Number of hospitals on which incidence data are based is shown in parentheses. The remaining hospitals did not provide denominator data. †Weighted mean incidence per 10 000 patient-days=number of patient-days, weight factor for weighted-mean incidence per 10 000 admissions=number of admissions. The UK and Germany were each recruited one extra hospital. In Poland, three hospitals rather than five were recruited. No hospitals were recruited in Lithuania, and one was recruited in Malta. From Estonia, Liechtenstein, and the Former Yugoslav Republic of Macedonia no data or isolates were received.

Table 1: Summary of *Clostridium difficile* infection in countries and hospitals

presence of toxin-producing *C difficile* were defined as having *C difficile* infection.

A web-based questionnaire (webappendix pp 5–9) was used to gather additional information about demography, clinical data, and risk factors associated with the infection in the first patients to be diagnosed, with a maximum of 10 patients included per participating hospital. If patients had episodes of *C difficile* infection in the previous 12 weeks, they were reported as having recurrent disease at admission. Stool samples from the first ten patients were cultured for *C difficile* according to local protocols, and the isolates were sent to a central laboratory (Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands) for further characterisation.

3 months after diagnosis, follow-up clinical data were obtained as part of the web-based questionnaire, including overall mortality, mortality attributable to *C difficile* infection, colectomy, intensive-care-unit (ICU) admission, and recurrences during follow-up. Clinical grounds on which to suspect recurrence were left to the attending physicians' judgment, who could use the definition of recurrence according to the ESCMID treatment guidance for *C difficile* infection.¹¹ All patients suspected of recurrence, who had toxin-positive-stool samples, were reported as having recurrence. No attempt was made to differentiate between relapses and reinfections.

Identification of *C difficile* was confirmed by an in-house PCR test for the glutamate dehydrogenase gene specific to *C difficile*.¹² Isolates were further characterised by PCR ribotyping.¹³ Since PCR-ribotypes 014 and 020 are nearly identical and differ only by one band on a specific agarose-gel electrophoresis, the types were reported together as ribotype 014/020. The presence of toxin A, toxin B, and binary toxin genes were investigated with standardised PCRs.^{14,15} Isolates that were difficult to type were sent to the Anaerobe Reference Laboratory in Cardiff, UK, for further characterisation by the Cardiff PCR-ribotyping library, which currently consists of more than 300 ribotypes.¹⁶ These isolates, and isolates of PCR ribotypes for which the toxinotype was unknown, were sent to the Institute of Public Health in Maribor, Slovenia, for toxinotyping.¹⁷ No attempt was made to identify more than one causative ribotype, because infection by *C difficile* resulting from more than one ribotype is thought to be rare.

We adhered to the epidemiological recommendations defined by the ad hoc *C difficile* surveillance working group.^{1,18} Briefly, *C difficile* infection is divided into health-care-associated cases (ie, occurring in a hospital or nursing home after 48 h of admission or within 4 weeks after discharge from such a facility), community-associated cases (ie, occurring in the community, provided that the patient had not been admitted to a health-care facility in the previous 12 weeks), and an indeterminate group for infections occurring between 4 and 12 weeks after discharge from a health-care facility. Furthermore, complicated disease was defined as *C difficile* infection

that contributed to or caused ICU admission or death, or led to colectomy. Severe comorbidity was defined as having a chronic-health points score over 0, as defined by the Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation (APACHE) II score.¹⁹ Quinolones were classified as old quinolones (nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin) and new quinolones (levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin).

Statistical analysis

For all hospitals, incidence rates of health-care-associated *C difficile* infection were obtained by dividing the number of health-care-associated occurrences in November, 2008, (extrapolated by multiplication of the proportion of health-care-associated infection in the questionnaires with all

	n/N (%)
Epidemiological characteristics	
Female	287/509 (56%)
Age ≥65 years*	319/509 (63%)
Epidemiological association	
Health-care associated	408/506 (80%)
Community associated	70/506 (14%)
Indeterminate association	28/506 (6%)
Explicit request to test for infection	441/507 (87%)
Use of an antibiotic not directed at <i>C difficile</i> infection	
Any antibiotic not directed at <i>C difficile</i> infection	366/463 (79%)
Aminopenicillin	28/463 (6%)
Aminopenicillin-β-lactamase inhibitor combination	86/463 (19%)
Antipseudomonal penicillin-β-lactamase inhibitor combination	38/463 (8%)
Second-generation cephalosporin	60/463 (13%)
Ceftazidime	78/463 (17%)
Any cephalosporin	155/463 (34%)
Carbapenem	41/463 (9%)
Aminoglycoside	27/463 (6%)
Old quinolone	80/463 (17%)
New quinolone	29/463 (6%)
Any quinolone	104/463 (23%)
Intravenous glycopeptide	33/463 (7%)
Lincosamide	28/463 (6%)
Macrolide	27/463 (6%)
Co-trimoxazole	25/463 (5%)
Use of any antibiotic not directed at <i>C difficile</i> infection during previous 3 months	426/463 (92%)
Comorbidity	
Severe comorbidity (APACHE II CHP >0)	204/468 (44%)
Liver cirrhosis (APACHE II)	21/488 (4%)
Heart disease (APACHE II)	47/484 (10%)
Pulmonary disease (APACHE II)	54/480 (11%)
Chronic dialysis (APACHE II)	30/496 (6%)
Immunocompromised status (APACHE II)	106/488 (22%)
Treatment for inflammatory bowel disease	21/492 (4%)
Episodes of infection in previous 8 weeks	68/431 (16%)

(Continues on next page)

	n/N (%)
(Continued from previous page)	
Disease characteristics	
Outpatient	56/509 (11%)
Duration of diarrhoea	
<1 week	334/461 (73%)
1 to 3 weeks	92/461 (20%)
>3 weeks	35/461 (8%)
Diarrhoea mixed with blood at any time in previous week	48/416 (12%)
Fever (temperature >38.5°C)	167/446 (37%)
Ileus at any time in previous week	20/509 (4%)
Last leucocyte count in previous week $\geq 15 \times 10^9$ per L†	122/428 (29%)
Serum creatinine rise >50% from baseline before onset of symptoms	31/395 (8%)
Sigmoidoscopy or colonoscopy‡	
Pseudomembranes	7/29 (24%)
Ulceration	13/29 (45%)
Imaging‡	
Colonic wall thickening on CT	26/63 (41%)
Pericolonic fat stranding on CT	7/63 (11%)
Bowel distension on plain abdominal radiograph or CT	27/117 (23%)
Microbiological characteristics	
Most frequent PCR-ribotypes of toxigenic isolates	
014/020	61/389 (16%)
001	37/389 (10%)
078	31/389 (8%)
018	23/389 (6%)
106	20/389 (5%)
027	19/389 (5%)
002	18/389 (5%)
012	17/389 (4%)
017	14/389 (4%)
015	13/389 (3%)
126	12/389 (3%)
023	10/389 (3%)
046	8/389 (2%)
003	7/389 (2%)
011	6/389 (2%)
053	6/389 (2%)
056	6/389 (2%)
Presence of either or both binary toxin genes in toxigenic isolates	90/389 (23%)
Toxin A negative, toxin B positive strains in toxigenic isolates	13/389 (3%)
<p>All time periods mentioned are related to the time of collection of the stool sample. Only antibiotics that were administered to more than 5% of patients are given. APACHE II=acute physiology, age, chronic health evaluation version two. CHP=chronic health points. N=total number of patients for whom information was available. *Median 71 (IQR 56–81). †Leucocyte count distribution $\times 10^9$ per L (11, 11–15). ‡Data apply to current episode of <i>C difficile</i> infection. If several procedures were done during an episode, only the first was considered. §Two patients were treated for inflammatory bowel disease.</p>	
Table 2: Characteristics of patients with <i>Clostridium difficile</i> infection for whom questionnaires were completed	

cases recorded in November, 2008) by the number of patient-days in November, 2008. Health-care-associated *C difficile* infection incidence rates were also calculated with the total number of admissions as the denominator. Weighted mean incidence rates per hospital were calculated for each country from the incidence rates of all hospitals in that country, using the number of patient-days and the number of admissions per hospital as a weighting factor.

The associations of patient and pathogen characteristics with two outcome measures (complicated infections or recurrence within the 3-month follow up) were investigated. Since patients were nested within hospitals and might be exposed to common characteristics of their hospitals that could be important determinants of outcome, we could not assume independence of observations. Therefore, we chose a two-level multilevel-regression method, which takes into account within-group (hospital) and between-group relations, and allows for integration of hospital and patient variables. Since the outcome (complicated infection or recurrence) was binary, we used the logistic form of the multilevel-regression model. An odds ratio with a 95% CI was calculated for all associations between a patient or pathogen characteristic and an outcome—ie, complicated infection or recurrence. Cases in which non-toxigenic strains were cultured were classified as culture negative, since these strains were not thought to be the cause of symptoms. Many of the associations reported in the analysis could be subject to confounding. For example, an association between the acquisition of *C difficile* infection in a health-care facility (as opposed to the community) and a complicated outcome might be confounded by age. To adjust the odds ratios for such potential confounders, we did a multivariate analysis for a selection of variables, again using a two-level logistic-regression model. As potential confounders, we selected variables for which a role as a confounder was biologically plausible and that were correlated to outcome with an alpha level less than 0.2, since significance-selection strategies to select for possible confounders do best at this level.²⁰ We tested whether confounders were highly collinear (variance inflation factor >10), in which case only one of them would be introduced as a covariate in multivariate analysis. Generally, statistical significance was declared for p values less than 0.05. Data were analysed with Stata 10.1.

Role of funding source

The study was funded by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) through a specific service contract (ECD.894) to the Centre for Infectious Disease Control Netherlands, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands. The decision to submit for publication was taken by the study coordinator in the Netherlands. ECDC provided support on the study design, suggested national coordinators, and provided comments on the analysis and the final report.

Results

In total, 97 hospitals provided patients or epidemiological data, or both. Because some hospitals were unable to supply denominator data, we could not calculate incidences for all hospitals (table 1). Most hospitals were large, as judged by the number of patient-days and admissions (median number of admissions per month 545; IQR 1808–4257); 62 hospitals (67%) were academic hospitals. The estimated incidence of health-care-associated infection varied widely between hospitals. We calculated the proportion of health-care-associated *C difficile* infection by the sum of health-care-associated and community-associated infections (table 1).

We tested associations between high-incidence hospitals (>10 per 10000 patient-days) and antibiotics used by the patients in the month preceding inclusion. Use of aminopenicillins (odds ratio [OR] 2.70, 95% CI 1.17–6.22), first-generation cephalosporins (6.98, 1.83–26.62), or second-generation cephalosporins (2.40, 1.28–4.50) was significantly associated with high-incidence hospitals.

395 isolates from 73 hospitals in 26 countries were available for detailed characterisation. 65 different PCR ribotypes were identified (figure), including six new PCR ribotypes: 228, 229, 230, 231, 232, and 234. The most common PCR ribotypes were 014 and 020 (found in 9 countries), 001 (in 13 countries), and 078 (in 8 countries); PCR-ribotype 027 ranked sixth (in six countries; table 2). Some commonly encountered PCR ribotypes were identified in a few countries and their distribution suggested regional spread (figure). Among these were PCR-ribotype 106, which was reported in the UK (13 isolates), Ireland (five), and Spain (two), and PCR-ribotype 018, which was recorded in Italy (19), Spain (two), Austria (one), and Slovenia (one). 12 different toxinotypes were identified. Of these, toxinotype 0 was most prevalent, representing 248 (65%) of 383 isolates; toxinotype III was identified predominantly in PCR-ribotype 027 strains (9 isolates) and only in five isolates belonging to rare PCR ribotypes (075, 099, 176, and 208); toxinotype IV was predominantly in PCR-ribotype 023; and toxinotype V in PCR-ribotypes 078 (30 isolates) and 126 (12); toxinotype XII fully correlated with PCR-ribotype 056. 13 (3%) isolates were *C difficile*-toxin-A negative and *C difficile*-toxin-B positive. 11 of these isolates belonged to PCR-ribotype 017 and one each to the newly identified PCR-ribotypes 032 and 234. Six (2%) isolates were non-toxigenic and were not included in further analyses.

Most cases were health-care associated or community associated, leaving 6% of indeterminate association (table 2). Most patients fitted the previously established risk profile, with almost two-thirds aged 65 years or more, about two-fifths having severe comorbidity, and almost all having received antibiotics during the 3 months before their infection, most commonly cephalosporins, quinolones, and aminopenicillin-β-lactamase-inhibitor combinations (table 2). 68 (16%) of 431 patients had recurrent *C difficile* at inclusion.

Data after 3-months' follow-up were obtained for about 90% of patients (table 3). An exact number cannot be provided, since follow-up was incomplete for some patients and therefore the number of patients with follow-up data differs for each variable. Of the 101 patients who had died, 40 (40%) of 101 deaths were judged to be related to *C difficile* infection.

All seven patients who died from *C difficile* infection as a main cause were aged 75 years or older and their infection was health-care associated. Six of them had severe comorbidity (four had pulmonary disease, three were immunocompromised, and two had heart disease). Two of these patients had a recurrent episode of infection at presentation. Two had leucocyte counts of 30×10^9 per L or greater and two of 4×10^9 per L or less. The strains causing these infections belonged to PCR-ribotypes 015, 018, 027 (two patients), and 056. No isolate could be obtained for two patients.

An age of 65 years or older, severe pulmonary comorbidity, previous use of a new quinolone, and infection by PCR-ribotypes 027, 015, and 018 were significant risk factors for complicated infections in univariate analysis (table 4). Patients with this comorbidity were distributed evenly among all hospitals. No disease characteristic—such as duration of diarrhoea, presence of fever, or leucocyte count—was significantly associated with complicated infection nor was the presence of binary

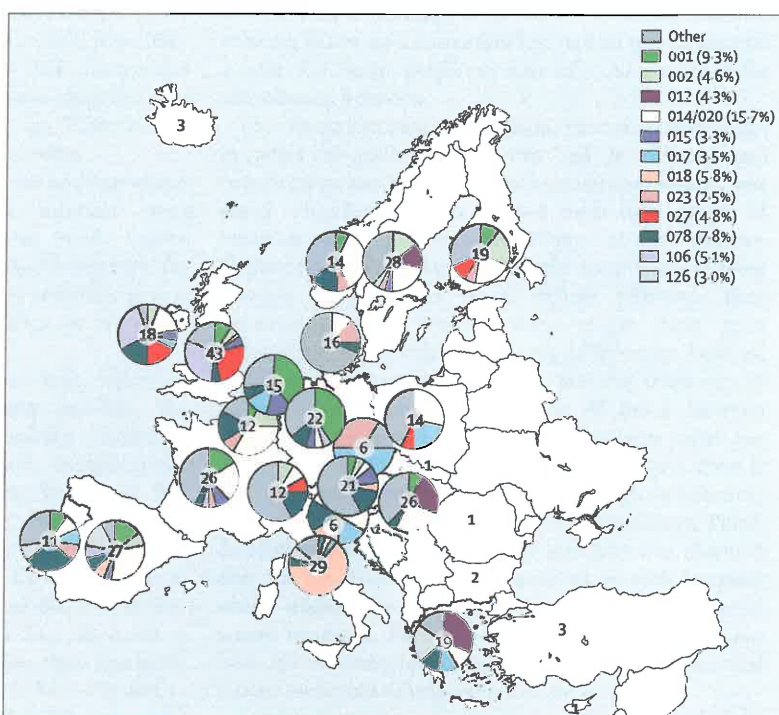


Figure: Geographical distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in European countries with more than five typable isolates, November, 2008
Pie charts show proportion of most common PCR-ribotypes per country. The number in the centre of pie charts is the number of typed isolates in the country.

	n/N (%)
Initial episode treated with	
Oral metronidazole	341/477 (71%)
Intravenous metronidazole	50/472 (11%)
Oral vancomycin	89/483 (18%)
Intracolonic vancomycin	1/473 (0.2%)
ICU admissions	31/459 (7%)
CDI contributive	6/459 (1%)
CDI primary cause	1/459 (0.2%)
Colectomy for CDI	3/460 (0.7%)
Death	101/455 (22%)
CDI contributive	33/455 (7%)
CDI primary cause	7/455 (2%)
Complicated CDI	44/442 (10%)
Recurrent CDI*	86/484 (18%)
Both complicated and recurrent CDI	10/440 (2%)

Of 491 (96%) of 509 patients, complete or partial follow-up information was available. n=characteristics of patients with *Clostridium difficile* for whom questionnaires were completed. N=total number studied. ICU=intensive care unit. CDI=*C difficile* infection. *Number of recurrences during follow-up in those patients who had recurrences. median 1, 1-3.

Table 3. Treatment and outcome (3-month follow up) characteristics of patients with *Clostridium difficile* infection

toxin. After correction for potential confounders, an age of 65 years or older and infection by PCR-ribotypes 018 and 056 were significantly associated with complicated infection. These PCR ribotypes were binary-toxin negative and belonged to toxinotype 0 (type 018) and XII (type 056). The seven complicated cases caused by PCR-ribotype 018 occurred in four different hospitals in two countries, and the two complicated cases caused by PCR-ribotype 056 occurred in two hospitals in two countries.

An age of 65 years or older, previous use of ceftazidime, and recent episodes of *C difficile* infection were significantly associated with recurrences during follow-up in univariate analysis (table 5). After correction for potential confounders, previous use of ceftazidime and recent episodes of infection were significantly associated with recurrence.

Since differences between patients with follow-up information and those without were possible, the characteristics of patients with available follow-up information about *C difficile* infection complications (n=442) were compared with patients for whom this information was not available (n=67). Patients without this information were more likely to be outpatients at the time of presentation (OR 1.97, 95% CI 0.98-3.97), to have community-associated infection (2.59, 1.39-4.84), and be infected by PCR-ribotype 018 (3.24, 1.20-8.73) or PCR-ribotype 106 (3.96, 1.44-10.95); they were less likely to be aged 65 years or older (0.61, CI 0.36-1.02) and to have severe comorbidity (0.56, 0.31-1.01), especially pulmonary disease (0.26, 0.06-1.10). A separate analysis in which non-complicated *C difficile* infection was assumed for patients with missing information resulted

in closely similar values for the association of PCR-ribotype 018 with complicated infection (5.65; 1.63-19.57).

Because death or colectomy could have precluded a patient from having a recurrence, a separate analysis was done for risk factors for recurrence in only those patients who did not die or undergo a colectomy. Results of the univariate analysis mirrored the analysis for the whole group, except that previous use of intravenous glycopeptides and chronic dialysis were significantly associated with recurrence (3.28, 1.12-13.78 and 2.87, 1.02-8.14, respectively).

Different cutoff values for the continuous variables age and leucocyte count, as assessed by receiver operator characteristics, did not lead to improved performance in the prediction of complicated *C difficile* infection.

Discussion

We have shown that the incidence of *C difficile* infection and the distribution of causative PCR ribotypes differed greatly between hospitals in Europe; overall and attributable mortality were strikingly high. The strengths of this pan-European study are the large number of participating countries and hospitals, and a study design with a fixed 3-month follow-up. The high follow-up rate and the fact that patients with missing follow-up were younger, were more likely to be outpatients, and had less comorbidity than patients with follow-up, minimised the risk that cases of complicated infection were missed. If all patients with missing follow-up information had had an uncomplicated course, this factor would not have affected predictors for complicated infection.

This study has some limitations. First, selection of the hospitals in each country was left to the national coordinators, and the number of hospitals per country was small. Therefore, results derived from this sample of hospitals might not be representative of each country. Furthermore, some hospitals might have been selected because of outbreaks of *C difficile* infection, thus introducing bias. Second, there might have been differences in physician awareness of infection between hospitals and countries. We note that the frequency of testing for infection varied up to 47 times between countries (as expressed by number of patients tested per 10 000 patient-days; table 1). Additionally, because there is no consensus on optimum testing for *C difficile* infection, diagnostic (and culture) methods were not uniform. Third, detailed information for cases of infection was obtained only for the first ten patients enrolled in each hospital, which might have introduced bias if risk factors varied across hospitals. Furthermore, this low number might have led to under-representation of PCR ribotypes that caused outbreaks of infection in some hospitals.

Results from endoscopy or CT might be biased since these examinations tend to be triggered by a more severe course of disease. The proportion of patients with severe comorbidity might be overestimated because one of

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Epidemiological characteristics						
Age ≥ 65 years	4.84	1.78-13.13	0.002	3.26*	1.08-9.78	0.035
Health-care-associated vs community-associated and indeterminate infection	3.23	0.92-11.40	0.068	4.86*	0.59-40.04	0.141
Severe comorbidity (APACHE II CHP >0)	1.17	0.57-2.40	0.666
Liver cirrhosis (APACHE II)	0.53	0.06-4.56	0.562
Heart disease (APACHE II)	1.71	0.62-4.76	0.302
Pulmonary disease (APACHE II)	2.66	1.11-6.37	0.028	1.38*	0.48-4.02	0.543
Chronic dialysis (APACHE II)	0.29	0.04-2.35	0.248
Immunocompromised status (APACHE II)	0.92	0.39-2.17	0.850
Treatment for inflammatory bowel disease†
Use of an antibiotic not directed at <i>C difficile</i> infection during previous month						
Aminopenicillin	2.69	0.69-10.51	0.156	2.39*	0.43-13.33	0.320
Aminopenicillin- β -lactamase inhibitor combination	1.81	0.80-4.06	0.153	1.18*	0.43-3.23	0.741
Antipseudomonal penicillin- β -lactamase inhibitor combination‡
Second-generation cephalosporin	0.53	0.14-1.97	0.343
Ceftazidime	1.34	0.52-3.46	0.546
Any cephalosporin	0.92	0.42-2.02	0.831
Carbapenem	1.29	0.42-4.00	0.657
Aminoglycoside	1.65	0.45-6.05	0.453
Old quinolone	1.41	0.57-3.53	0.459
New quinolone	3.45	1.07-11.06	0.038	2.57*	0.68-9.72	0.163
Any quinolone	2.29	1.03-5.09	0.043
Intravenous glycopeptide	1.95	0.61-6.20	0.257
Lincosamide	0.32	0.04-2.79	0.303
Macrolide	2.69	0.80-9.00	0.108	4.60*	0.72-29.37	0.107
Co-trimoxazole	0.33	0.04-2.83	0.321
Episodes of infection in 8 weeks before current episode	0.77	0.27-2.19	0.621
<i>C difficile</i> infection characteristics						
Duration of diarrhoea >1 week	0.55	0.23-1.32	0.182
Diarrhoea mixed with blood	1.06	0.33-3.42	0.928
Fever (temperature $>38.5^{\circ}\text{C}$)	1.28	0.59-2.76	0.533
Ileus	2.84	0.73-11.08	0.132
Leucocyte count $\geq 15 \times 10^9$ per L	1.50	0.67-3.35	0.324
Serum creatinine rise $>50\%$	2.33	0.63-8.63	0.205
Bowel distension	2.06	0.38-11.25	0.405
Microbiological characteristics						
PCR-ribotype 027§	4.72	1.34-16.56	0.016	2.56¶	0.64-10.25	0.184
PCR-ribotype 078§	1.08	0.29-4.10	0.909
PCR-ribotype 014-020§	0.43	0.12-1.50	0.184	0.60¶	0.17-2.16	0.433
PCR-ribotype 015§	3.77	1.01-14.08	0.048	4.56¶	0.98-21.20	0.053
PCR-ribotype 018§	9.22	2.24-38.09	0.002	6.19¶	1.28-29.81	0.023
PCR-ribotype 023§	1.00	0.11-9.11	0.999
PCR-ribotype 056§	10.96	0.96-126	0.054	13.01¶	1.14-148.26	0.039
Presence of either or both binary toxin genes	1.09	0.46-2.54	0.847
Toxin A negative, toxin B positive strains vs all other strains	0.69	0.08-6.08	0.739
Toxinotype III (including IIIb and IIIc) vs all other toxinotypes	3.18	0.96-10.56	0.059	1.81¶	0.48-6.75	0.378

OR=odds ratio. APACHE II=acute physiology, age, chronic health evaluation version II. CHP=chronic health points. ..=data not available. *Adjusted for other variables: age ≥ 65 years, health-care association, pulmonary disease, previous use of aminopenicillin, previous use of aminopenicillin with β -lactamase inhibitor, previous use of a new quinolone, previous use of macrolide, PCR-ribotype 027, PCR-ribotype 014/020, and PCR-ribotype 056. †No complicated *C difficile* infection occurred in 16 patients treated for inflammatory bowel disease versus 44 cases of complicated *C difficile* infection in 115 patients without inflammatory bowel disease. ‡No cases of complicated *C difficile* infection occurred in 34 patients who received an antipseudomonal penicillin- β -lactamase inhibitor combination versus 43 cases of complicated *C difficile* infection in 381 patients who did not receive drug combination. §Versus all other ribotypes. ¶Adjusted for other variables: age ≥ 65 years, health-care association, pulmonary disease, previous use of aminopenicillin, previous use of aminopenicillin with β -lactamase inhibitor, previous use of a new quinolone, previous use of macrolide.

Table 4: Determinants of complicated *Clostridium difficile* infection

five items was sufficient to declare severe comorbidity, whereas if one item was scored missing, absence of severe comorbidity could not be declared.

Barbut and colleagues²¹ reported a mean incidence of nosocomial *C difficile* infection in 23 European hospitals of 2.45 per 10 000 patient-days (minimum to maximum range; 0.1–7.1), which is lower than the overall figure of 4.1 per 10 000 patient-days in our study. However, that study differed from ours in methodology. Reports from Denmark, Finland, Germany, Spain, and the UK^{22–25} support the impression of an increase in incidence of *C difficile* infection in Europe. PCR ribotypes identified by Barbut and colleagues²¹ differed strikingly from those we identified. In their study, among isolates from 38 hospitals in 14 countries, PCR-ribotypes 001 and 014 were the most prevalent, followed by 027 and 020. Epidemic PCR-ribotype 027 was less prevalent in our study. By contrast, the prevalence of PCR-ribotypes 078 and 018 was increased. The high prevalence of PCR-ribotype 018 in our study is accounted for by its high prevalence in three Italian hospitals. Barbut and colleagues²¹ reported that PCR-ribotype 078 was dominant only in Greece, whereas in our study it was the third most prevalent PCR ribotype. This

increase of PCR-ribotype 078 in Europe accords with findings for the Netherlands²⁶ and reports of PCR-ribotype 078 in piglets with diarrhoea in the Netherlands and Spain.^{27,28} Interestingly, human and animal isolates of PCR-ribotype 078 are genetically highly related, supporting the hypothesis that no interspecies barrier exists for *C difficile* infection due to PCR-ribotype 078.²⁶ Research suggests that food products might play a part in interspecies transmission.^{29,30} In one study, patients infected with PCR-ribotype 078 were younger than those infected with PCR-ribotype 027, but had a similar attributable mortality.²⁷ We could not show an association between PCR-ribotype 078 and complicated infection; however, patients with infection as a result of this ribotype (n=31) were more likely to have a rise in serum creatinine than were patients with other ribotypes (n=362, OR 3.20, 95% CI 1.08–9.49), and had a slightly higher mean leucocyte count.

Although we emphasise that *C difficile* infection incidence rates of participating hospitals were not representative of national incidence rates, many hospitals with high rates of *C difficile* infection were from countries in northern and central Europe. Most of these countries are thought to have low antibiotic consumption per head,

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Epidemiological characteristics						
Age ≥65 years	1.91	1.08–3.37	0.026	1.86*	0.88–3.92	0.104
Health-care-associated versus community-associated and indeterminate infection	1.77	0.83–3.78	0.139	1.93*	0.59–6.35	0.278
Severe comorbidity (APACHE II CHP >0)	1.35	0.79–2.31	0.273
Liver cirrhosis (APACHE II)	0.50	0.11–2.33
Heart disease (APACHE II)	1.16	0.50–2.68
Pulmonary disease (APACHE II)	0.51	0.20–1.32	0.165	0.62*	0.20–1.95	0.417
Chronic dialysis (APACHE II)	2.04	0.79–5.26	0.139	2.23*	0.59–8.37	0.235
Immunocompromised status (APACHE II)	1.22	0.66–2.24	0.531
Treatment for inflammatory bowel disease†
Use of an antibiotic not directed at <i>C difficile</i> infection during previous month						
Aminopenicillin	1.04	0.35–3.13	0.941
Aminopenicillin-β-lactamase inhibitor combination	1.17	0.60–2.28	0.643
Antipseudomonal penicillin-β-lactamase inhibitor combination	1.78	0.76–4.20	0.186	2.32*	0.79–6.82	0.125
Second-generation cephalosporin	0.62	0.26–1.43	0.261
Ceftazidime	2.25	1.17–4.29	0.015	2.48*	1.06–5.81	0.036
Any cephalosporin	1.11	0.63–1.94	0.721
Carbapenem	0.81	0.31–2.11	0.661
Aminoglycoside	1.60	0.59–4.28	0.354
Older quinolone	1.22	0.63–2.39	0.555
Newer quinolone	1.60	0.57–4.26	0.368
Any quinolone	1.35	0.73–2.47	0.335
Intravenous glycopeptide	1.73	0.71–4.20	0.228
Lincosamide	1.78	0.64–4.96	0.271
Macrolide	1.03	0.35–3.02	0.952
Co-trimoxazole	0.15	0.02–1.18	0.071
Episodes of <i>C difficile</i> infection in 8 weeks before current episode	2.15	1.10–4.22	0.025	2.26*	1.03–4.96	0.041

(Continues on next page)

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
(Continued from previous page)						
<i>C. difficile</i> infection characteristics						
Duration of diarrhoea >1 week	1.01	0.56-1.83	0.965
Diarrhoea mixed with blood	0.49	0.18-1.36	0.171
Fever (temperature >38.5°C)	1.17	0.71-2.06	0.572
Ileus	0.24	0.03-1.92	0.177
Leukocyte count $\geq 15 \times 10^3$ per L	0.99	0.53-1.85	0.973
Serum creatinine rise >50%	0.90	0.30-2.69	0.850
Pseudomembranes†
Ulceration	1.12	0.06-21.17	0.941
Colonic wall thickening	2.24	0.50-10.01	0.290
Pericolonic fat stranding	3.12	0.47-20.55	0.237
Bowel distension	0.60	0.16-2.24	0.445
Microbiological characteristics						
PCR-ribotype 027§	2.06	0.66-6.43	0.211
PCR-ribotype 078§	1.62	0.67-3.90	0.286
PCR-ribotype 014/020§	0.86	0.39-1.89	0.700
PCR-ribotype 015§	1.72	0.47-6.30	0.411
PCR-ribotype 018§	2.39	0.70-8.16	0.165	0.50¶	0.07-3.71	0.495
PCR-ribotype 023§	2.89	0.72-11.61	0.135	1.76¶	0.33-9.29	0.508
PCR-ribotype 056§	1.75	0.27-11.47	0.557
Presence of either or both binary toxin genes	1.63	0.89-2.97	0.113
Toxin A negative, toxin B positive strains vs all other strains	0.69	0.14-3.46	0.654
Toxinotype III (including IIIb and IIIc) vs all other toxinotypes	1.38	0.48-3.94	0.551
OR=odds ratio. APACHE II=acute physiology, age, chronic health evaluation version II. CHP=chronic health points. ..=data not available. *Adjusted for other: age ≥ 65 years, health-care association, pulmonary disease, chronic dialysis, previous use of antipseudomonal penicillin with β -lactamase inhibitor, previous use of ceftazidime, episodes of <i>C. difficile</i> infection 8 weeks before current episode, PCR-ribotype 018, PCR-ribotype 023, and presence of either or both binary toxin genes. †No recurrences in 19 patients with inflammatory bowel disease versus 83 recurrences in 419 patients without inflammatory bowel disease. ‡No recurrences in seven patients with pseudomembranes versus two recurrences in 21 patients without pseudomembranes. §Versus all other ribotypes. ¶Adjusted for other variables: age ≥ 65 years, health-care association, pulmonary disease, chronic dialysis, previous use of antipseudomonal penicillin with β -lactamase inhibitor, previous use of ceftazidime and episodes of <i>C. difficile</i> infection 8 weeks before current episode.						

Table 5. Determinants of recurrence of *Clostridium difficile* infection during follow-up

ren during the winter-respiratory-infection season.³¹ Heightened awareness of *C. difficile* infection, as shown by the number of patients tested per 10000 patient-days, might partly account for these differences in infection-incidence rates. Differences in the severity of illness of patients in hospital or those prescribed antibiotics might be other explanations. Patients admitted to high-incidence hospitals were more likely to have received aminopenicillins and first-generation and second-generation cephalosporins than were patients admitted to low-incidence hospitals. Most risk factors for complicated or recurrent infection were consistent with those reported in previous studies. Old age,³²⁻³⁴ previous hospital or nursing-home admission,³³ leucocytosis,^{33,34} and infection by PCR-ribotype 027³⁵ have been associated with complicated *C. difficile* infection. The use of certain antibiotics, especially fluoroquinolones, has been associated with infection by PCR-ribotype 027, and through this association with complicated or recurrent disease.^{35,36} We did not find an association between the use of fluoroquinolones and complicated or recurrent disease,

possibly because of the small number of infections resulting from PCR-ribotype 027 in our study. Alternatively, some confounding effects in earlier studies—notably data for antimicrobial prescribing in outbreak settings that might overestimate *C. difficile* infection risk associated with specific antibiotics—were not as likely in our study. An association of PCR-ribotypes 018 and 056 with complicated infection has not been reported before. However, the number of complicated infections for which these associations were based was small. Old age^{32,37} and a long cumulative duration of previous episodes of *C. difficile* infection³⁸ have been identified as predictors of recurrent infection. We could not confirm leucocytosis^{33,34,37,39} as a strong predictor of complicated infection, possibly because we included leucocyte counts only from the week before the patients' inclusion, whereas in most studies the maximum leucocyte count during the course of the illness was examined. These findings underscore the importance of local surveillance to detect and control endemic and epidemic *C. difficile* infection.

Contributors

The study was designed by DWN, BHBB, MHW, and EJK, with support of DLM, on behalf of ECDC, and members of European Study group of *Clostridium difficile*, on behalf of European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. JSB and MR were responsible for PCR ribotyping and toxinotyping of strains, respectively. MPB did the study as principle coordinator, using support of DWN as principal investigator and EJK as microbiological coordinator. DLM helped in selecting national coordinators. BHBB and JTVd supervised clinical data collection and data analysis. MPB analysed the data and wrote the first draft of the article. All authors contributed substantially to the submitted version.

ECDC study group

*=national coordinator. †=local coordinator.

Austria—F Allerberger (AGES-Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Wien). G Hartman† (Hospital Feldkirch, Feldkirch). M Hell† (University Hospital Salzburg, Salzburg). A Wechsler-Fördös† (Hospital Rudolfstiftung, Wien). **Belgium**: M Delmee*† (University of Louvain, Brussels). B Gordts† (St Jan Hospital, Brugge). K Laffineur† (St Luc Hospital, Namur). **Bulgaria**: K Ivanova* (National Ref Lab for Anaerobes, Sofia). M Marina† (National Center of Infectious & Parasitic Diseases for the Queen Giovanna University Hospital, Sofia). E Dzhigoshveva† (Saint Anna-University Multi-specialization Hospital for Active Treatment, Sofia). G Filefski† (1st Multi-specialization Hospital for Active Treatment, Sofia). **Croatia**: B Matica* (Institute of Public Health Andrija Stampar, Zagreb). D Golubic† (County Hospital Cakovec, Cakovec). V Punda-Polic† (Split University Hospital, Split). A Tambic Andrasevic† (University Hospital for Infectious Diseases Zagreb, Zagreb). **Cyprus**: P Maikanti-Charalampous*† (Nicosia General Hospital, Nicosia). D Bagazoumi (Nicosia General Hospital, Nicosia). **Czech Republic**: O Nyč* (Hospital FN Motol Prague, Prague). L Mejzlíkova† (Hospital U svate Anny FN Brno, Brno). L Geigerova† (Hospital FN Plzen Prague, Plzen-Lichotin). **Denmark**: KEP Olsen* (Statens Serum Institut, Copenhagen). I Brock† (Hvidovre Hospital, Hvidovre). H Holt† (Odense Universitetshospital, Odense). M Kragh Thomsen† (Regionshospitalet Viborg, Viborg). **Estonia**: M Jyrna-Ellam*† (North-Estonian Regional Hospital and North Estonia Medical Centre, Tallinn). **Finland**: A Virolainen-Julkunen* (KTL [National Public Health Institute], Helsinki). J Mikkola† (Central Hospital of Kanta-Häme, Hämeenlinna). E Mattila† (Helsinki University Central Hospital [Meilahti], Helsinki). M Broas† (Lapland Central Hospital [Infection Control Unit], Rovaniemi). **Former Yugoslav Republic of Macedonia**: M Petrovska* (Institute of Microbiology and Parasitology, Skopje). **France**: F Barbut* (Hôpital Saint-Antoine, Paris). D Descamps† (Centre hospitalier de Béthune, Béthune). J P Canone† (Centre hospitalier de Lens, Lens). V Lalonde† (CHU Saint-Antoine, Paris). L Lemée† (CHU de Rouen-Charles Nicolle, Rouen). L Cavalier† (CHU de Toulouse, Toulouse). **Germany**: N Kleinkauf* (Robert Koch-Institut, Berlin). A Kola† (Paulinenhaus Krankenhaus e.V, Berlin). R Knüferrmann† (Paulinenhaus Krankenhaus e.V, Berlin). M Kist† (Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg). I Fenner† (Albertinenkrankenhaus, Hamburg). A Rodloff† (Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig). C von Eichel-Streiber† (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Mainz). S Borgmann† (Krankenhaus Tirschenreuth, Tirschenreuth). R Michael† (Krankenhaus Tirschenreuth, Tirschenreuth). **Greece**: E Malamou-Lada* (General Hospital of Athens). M Orfanidou† (G. Gennimatas General Hospital of Athens, Athens). A Avlami† (Laiko General Hospital, Athens). M Kanellopoulou† (Sismanoglion General Hospital, Athens). **Hungary**: E Nagy* (Faculty of Medicine, University of Szeged, Szeged). M Konkoly-Thege† (St István and St László Municipal Hospital, Budapest). G Terhes† (University Hospital of Szeged, Szeged). S Lenke† (St György Hospital, Székesfehérvár). **Iceland**: H Hardarson*† (Landspítali University Hospital, Reykjavik). H Hardardóttir (Landspítali University Hospital, Reykjavik). **Ireland**: F Fitzpatrick* (Health Protection Surveillance Centre, Dublin). M Skally* (Health Protection Surveillance Centre, Dublin). E Smyth† (Beaumont Hospital, Dublin). L Fenelon† (St Vincents University Hospital, Dublin). K Schaffer† (St Vincents University Hospital, Dublin). M Cormican† (University College Hospital, Galway). **Italy**: P Mastrantonio* (Istituto Superiore di Sanità [National Institute of Health], Rome). A Raglio† (Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo). P Nicoletti† (Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze). G Dettori† (Azienda Ospedaliera Universitaria, Parma). P Mazzella†, (Policlinico Universitario, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma). T Zaccaria† (Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, Torino). **Latvia**: A O Balode* (Central laboratory, Paul Stradins Clinical University Hospital, Riga). K Aksenoka† (Paul Stradins Clinical University Hospital, Riga). G Zvingelis† (Riga 1st City Hospital, Riga). M Liepins† (Riga City Hospital Gailezers, Riga). **Liechtenstein**: C Lee* (Labormed. Zentrum Dr. Risch, Schaan). **Luxembourg**: J Mossong* (Laboratoire National de Santé, Luxembourg). J Even (Laboratoire National de Santé, Luxembourg). A Hakim† (Clinique Sainte Thérèse, Luxembourg). **Malta**: P Caruana* (Mater Dei Hospital, Msida). **Netherlands**: E J Kuijper*† (Leiden University Medical Centre, Leiden). S B Debast† (Meander Medical Centre, Amersfoort). P Bloembergen† (Isala klinieken, Zwolle). C Harmanus (Leiden University Medical Centre, Leiden). I Sanders (Leiden University Medical Centre, Leiden). **Norway**: A Ingrebretsen*† (Rikshospitalet University Hospital, Oslo). BG Iversen* (Norwegian Institute of Public Health, Oslo). P A Jenum† (Asker and Baerum Hospital, Rud). J E Afset† (St Olav Hospital/Trondheim University Hospital, Trondheim). **Poland**: H Pituch* (Medical University of Warsaw, Warsaw). J Pawlowska† (Province Hospital Plock, Plock). H Pituch† (The Infant Jesus Teaching Hospital, Warsaw). H Pituch† (Public Central Clinic Hospital, Warsaw). **Portugal**: C Furtado* (Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge, Lisboa). R Guiomar Moreira* (Instituto Nacional de Saude Dr Ricardo Jorge, Lisboa); J Machado* (Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge, Lisboa). I Sancho† (Hospital Fernando Fonseca, Amadora). G Ribeiro† (Hospital da Universidade de Coimbra, Coimbra). H Ramos† (Hospital Geral de Santo António, Porto). **Romania**: D Lemeni* (Cantacuzino Institute, Bucharest). R Serban* (The Institute for Public Health Bucharest, Bucharest). M Ciocirlan† (Fundeni Clinic Institute, Bucharest). A Rafila† (Matei Bals Institute for Infectious Diseases, Bucharest). G Lesanu† (Grigore Alexandrescu Emergency Clinical Hospital for Children, Bucharest). E Danaila† (Military Central Emergency Hospital, Bucharest). E Szekely† (Targu-Mures Emergency Hospital, Targu-Mures). **Slovakia**: R Melková* (Slovak Medical University, Bratislava). E Novakova† (Martinska Fakultna Nemocnica, Martin). L Glosova† (Fakultna Nemocnica Trencin, Trencin). E Novakova† (Nemocnica s Poliklinikou Zilina, Zilina). **Slovenia**: M Rupnik* (Institute of Public Health, Maribor). T Lejko Zupanc† (University Clinical Centre, Ljubljana). B Kotnik Kevorkjan† (University Clinical Centre, Maribor). G Lesnicar† (Hospital, Celje). **Spain**: E Bouza* (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid). L Alcalá Hernández† (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid). J Abarca† (Hospital Clínico San Carlos-Complejo Hospitalario, Madrid). A Mena Ribas† (Hospital Son Dureta-Complejo Hospitalario, Palma de Mallorca). I Sanfeliú Sala† (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell [Barcelona]). MI García García† (Hospital Universitario de Salamanca-Hospital Clínico y Hospital Virgen de la Vega, Salamanca). **Sweden**: T Åkerlund* (Swedish Institute of Infectious Disease Control, Solna). M Wullt† (Malmö Allmänna Sjukhus, Malmö). T Norén† (Universitetssjukhuset Örebro, Örebro). A Weintraub† (Södersjukhuset, Stockholm). C Nord† (Södersjukhuset, Stockholm). **Switzerland**: A F Widmer*† (University Hospital, Basel). A Widmer† (Claraspital, Basel). A Widmer† (Felix Platter Spital, Basel). **Turkey**: B Levent* (Refik Saydam National Hygiene Center, Ankara). S Kacar† (Yüksek İhtisas Hospital, Ankara). G Hascelik† (Hacettepe University Medical Faculty, Ankara). B Sener† (Hacettepe University Medical Faculty, Ankara). O Azap (Baskent University Hospital, Ankara). H Arslan† (Baskent University Hospital, Ankara). M. Sinirtas† (Uludag University, Bursa). H Akalin† (Uludag University, Bursa). N Ulger† (Marmara University, Kadikoy, Istanbul). G Soyletir† (Marmara University, Kadikoy, Istanbul). M Petrovska† (Institute of Microbiology and Parasitology, Skopje). **United Kingdom—England**: M Wilcox*† (Leeds General Infirmary, Leeds). B Patel*† (Health Protection Agency, London; Northwick Park Hospital, Harrow; Central Middlesex Hospital, London). **United Kingdom—Northern Ireland**: P Rooney† (Belfast City Hospital, Belfast). **United Kingdom—Scotland**: C Wiuff* (Health Protection Scotland, Glasgow). A Gibb† (Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh). J Coia† (Stobhill Hospital, Glasgow). **European Centre for Disease Prevention and Control**: A Navarro Torné (European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden). P Till (European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden).

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Céline Harmanus and Ingrid Sanders for PCR-ribotyping isolates at Leiden University Medical Centre, Jeroen Alblas for support in the development of the web-based questionnaire, and Vandenbroucke for advice on multivariate analysis, and the laboratory technicians of all participating laboratories. The study was financed by the European Centre for Disease Prevention and Control through a specific service contract (ECD.894).

References

- Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P; the ESCMID Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD); EU member states and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (suppl 6): 2–18.
- Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*—more difficult than ever. *N Engl J Med* 2008; 359: 1932–40.
- Warny M, Pepin J, Fang A, 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: 1079–84.
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005; 353: 2433–41.
- Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005; 353: 2442–49.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 526–36.
- Smith A. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill* 2005; 10: 2735.
- Kuijper EJ, van den Berg RJ, Debast S, et al. *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 827–30.
- Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* 2008; 13: 18942.
- Barbut F, Delmée M, Brazier JS, et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 989–96.
- Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 1067–79.
- Paltansing S, van den Berg RJ, Guseinova RA, Visser CE, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease, The Netherlands, 2005. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1058–64.
- Bidet P, Lalande V, Salauze B, et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2484–87.
- Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2178–82.
- Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 186: 307–12.
- Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 461–63.
- Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C, Delmée M. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2240–47.
- McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kuty PK, the Ad Hoc *Clostridium difficile* Surveillance Working Group. Recommendations for surveillance of *Clostridium difficile*-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 140–45.
- 19 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818–29.
- 20 Maldonado G, Greenland S. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 923–36.
- 21 Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I, on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1048–57.
- 22 Lyytikäinen O, Turunen H, Sund R, et al. Hospitalizations and deaths associated with *Clostridium difficile* infection, Finland, 1996–2004. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 761–65.
- 23 Søres L, Mølbak K, Strøbaek S, et al. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Denmark—a possible link with the increased consumption of fluoroquinolones and cephalosporins? *Euro Surveill* 2009; 14: 19176.
- 24 Soler P, Nogareda F, Cano R. Rates of *Clostridium difficile* infection in patients discharged from Spanish hospitals, 1997–2005. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 887–89.
- 25 Vonberg RP, Schwab F, Gastmeier P. *Clostridium difficile* in discharged inpatients, Germany. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 179–80.
- 26 Debast SB, van Leengoed LA, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environ Microbiol* 2009; 11: 505–11.
- 27 Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1162–70.
- 28 Alvarez-Perez S, Blanco JL, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet Microbiol* 2009; 137: 302–05.
- 29 Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 819–12.
- 30 Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1039–45.
- 31 Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M, ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365: 579–87.
- 32 Pépin J, Routhier S, Gagnon S, Brazeau I. Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 758–64.
- 33 Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. Clinical risk-factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 415–22.
- 34 Sailhammer EA, Carson K, Chang Y, et al. Fulminant *Clostridium difficile* colitis. Patterns of care and predictors of mortality. *Arch Surg* 2009; 144: 433–39.
- 35 Goorhuis A, Van der Kooij T, Vaessen N, et al. Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 695–703.
- 36 Sundram F, Guyot A, Carboo I, Green S, Lilaonitkul M, Scourfield A. *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 106: clinical outcomes and risk factors. *J Hosp Infect* 2009; 72: 111–18.
- 37 Pépin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1591–97.
- 38 McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1769–75.
- 39 Moshkowitz M, Ben-Baruch E, Kline Z, Shimoni Z, Niven M, Konikoff F. Risk factors for severity and relapse of pseudomembranous colitis in an elderly population. *Colorectal Dis* 2007; 9: 173–77.

Clostridium difficile Associated Disease Clinical and Molecular Data

Karina Aksenoka*,**, Arta Balode**,***, Ilze Grope****, Tatjana Obidenova***, Dace Gardovska**,****, Edvins Miklasevics*,**

*Department of Molecular Biology and Genetics, Pauls Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia

**Riga Stradins University, Latvia

***Department of Microbiology, Pauls Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia

****Children's University Hospital, Riga, Latvia

Summary

Introduction. A balanced microflora of the gastrointestinal tract plays a significant role in the protection of an organism. Dramatic changes may take place in the composition of normal microflora during antibacterial therapy, because part of sensitive microorganisms die and microflora detrimental to an organism proliferates there causing gastrointestinal tract disorders (7).

C. difficile is an important agent causing gastrointestinal tract disorders. It may induce manifestations ranging from asymptomatic colonization of the gastrointestinal tract to severe diarrhea, pseudomembranous colitis, toxic megacolon, intestinal perforation, and death. All these severity levels are included in the term *Clostridium difficile associated disease (CDAD)*. A patient at risk for *C. difficile* is an elderly person with a severe principal disease, who receives long-term inpatient treatment, has been receiving antibiotics, antacid and antiulcer agents for a long time, has had a gastrointestinal surgical intervention or any organ transplantation, which is always related to immune suppression (11).

Aim of the study. Molecular typing of Latvian strains of *C. difficile* and clinical data analysis.

Materials and methods. The research includes data collected during the time period from August 2006 to the end of 2008 from three Latvian hospitals. A pure culture of *C. difficile* bacteria was isolated and cultured from fecal material. Ribotyping was done by amplification of specific regions of the 16S and 23S RNA genes and amplification products were separated in 1.5% agarose gel.

Results. Fecal samples of 500 patients having manifestations of clinical symptoms of CDAD were microbiologically and molecularly studied from August 2006 to the end of 2008. 130 samples were *tcdA*⁺*tcdB*⁺ toxin-positive.

Conclusions. All samples were cultured on agar in anaerobic conditions. As a result, 55 pure cultures were obtained. The average age of patients is 65 years. Women get infected more frequently than men. In 95% patients CDAD was induced by antibacterial therapy. In 86% cases, having received a positive response for *C. difficile* antibacterial therapy is changed. Disease development risk factors are previous antibacterial therapy, previous hospitalization, GIT manipulations and *C. difficile* infection in anamnesis. The biggest number of CDAD patients was found in Nephrology Department of P.Stradins Clinical University Hospital. A hypervirulent *Cl.difficile* ribotype 027 was not found in Latvia yet, but 16 different ribotypes were determined using Bionumerics software. 4 of them are domineering ribotypes with 17, 14, 5 and 4 isolates in every group.

Key words: *C.difficile*; CDAD; *tcdA* and *tcdB*.

INTRODUCTION

A balanced microflora of the gastrointestinal tract plays a significant role in the protection of an organism. Dramatic changes may take place in the composition of normal microflora during antibacterial therapy, because part of sensitive microorganisms die and microflora detrimental to an organism proliferates there causing gastrointestinal tract disorders. The most widespread endogenous infection related to use of antibiotics is candida, induced by fungi of the genus *Candida* and *Clostridium difficile* (7).

C. difficile is an important agent causing gastrointestinal tract disorders. It may induce manifestations ranging from asymptomatic colonization of the gastrointestinal tract to severe diarrhea, pseudomembranous colitis, toxic megacolon, intestinal perforation, and death. All these severity levels are included in the term *Clostridium difficile associated disease (CDAD)*. A patient at risk for *C. difficile* is an elderly person with a severe principal

disease, who receives long-term inpatient treatment, has been receiving antibiotics, antacid and antiulcer agents for a long time, has had a gastrointestinal surgical intervention or any organ transplantation, which is always related to immune suppression (11).

The increase in *C.difficile* infection rates for the last three decades may be explained by:

1. Improvement of diagnostic techniques;
 2. Widespread use of antibiotics and chemotherapy;
 3. Contamination of hospitals with *C.difficile* spores (9).
- C. difficile* is a gram-positive, spore-forming, anaerobic, rod-shaped bacterium of the genus *Bacillus*. It may be found in many objects, therefore it is called a ubiquitous (being everywhere) microorganism. It is present in soil (up to 21%), water, intestinal tract of many animals. It is also present, though not very often, in the intestinal tract of healthy people – *C. difficile* may be isolated from feces of not more than 5% of healthy people; *C.difficile* is

present in feces of up to 50% of healthy newborns, but it does not cause disease, because babies are protected by antibodies received from their mothers. Sometimes the microorganism may be also found in the vagina and in the urethra (14). The colonization percentage among elderly people, especially those who received inpatient treatment, may reach 10-20%, because the hospital environment is often contaminated with *C. difficile* spores. Vegetative bacteria die, but spores may live for months and even years (20).

Colonizing the large intestine *C. difficile* generates toxins. *C. difficile* generates two toxins – A(*tcdA*) and B(*tcdB*). Toxin production is determined by a chromosomal gene. Toxin production and microorganism's virulence depends on the degree of gene expression (6).

Less than 1% are symptom-free carriers of *C. difficile*. Factors of host and microorganism determining symptom-free carriage are not clear. Symptoms appear either during use of antibiotics or shortly after it. In rare cases the interval may be several weeks. Patients most frequently have mild or moderately severe diarrhea, they may also have loose stool with occult blood. Rarely, it may be accompanied by pains in the lower belly. Severe colitis, without formation of pseudomembranes, characterized by profuse, severe diarrhea, stomach aches, and abdominal swelling, may develop. The most frequent systematic symptoms are sickness, fever, loss of appetite, tiredness. Rarely, hemorrhagic colitis develops. Diffuse or fragmentary nonspecific colitis is visible on the sigmoidoscopy. Severe colitis with formation of pseudomembranes is characterized by pronounced severe diarrhea, stomach aches. Characteristic yellow pseudomembranes, 2 to 10 mm in diameter, are visible on the sigmoidoscopy, the mucous membrane between them looks healthy or slightly erythematous. An acute stomach pattern with pronounced stomach aches, fever, and tachycardia may develop in patients. As a result of loss of muscular tone toxic megacolon may develop, which is a state usually characteristic of ulcerative colitis (16).

When paralytic ileus and large intestine dilatation develop, a pathologic decrease in the volume of diarrhea is observed. If stomach aches increase, intestinal perforation and peritonitis should be excluded. Anyway, disease symptoms may be different and may change every several hours, therefore it is important to follow up the patient and to evaluate the situation in an adequate way (5).

Since 2002 special attention has been attracted to a hypervirulent strain of *C. difficile* which belongs to toxinotype III (ribotype 027) and initially spread in the USA and Canada (18,19), but now has already caused hospital outbreaks in Ireland (17), Belgium (8), France (23), Denmark (22), Austria (10) and other countries (4,13).

Taking into consideration that a very pathogenic *C. difficile* ribotype 027 causing very serious disease is currently spreading in the USA and Europe, the research of this microbe becomes very topical in Latvia as well in order to perform not only diagnostics, but also ribotyping of

this microorganism to start adequate therapy in case of necessity and perform infection control measures.

All CDAD patients need patient-centered approach, developing the most optimal and effective treatment regimes. Since CDAD is a severe infectious disease requesting the use of many different drugs (PDS, antibacterial, cardiological agents, anaesthetics, and resolvents, etc.), the presence of a hospital pharmacist could significantly optimize patient's treatment as well as reduce treatment costs. It is important to carry out a separate research on the situation in Latvia, because in case of minor microbiological changes in the circulating inducer, the process and the course of treatment may differ from the experience of other countries.

AIM OF THE STUDY

Molecular typing of Latvian strains of *Cl. difficile* and clinical data analysis.

MATERIALS AND METHODS

The research includes data collected during the time period from August 2006 to the end of 2008 from three Latvian hospitals – P. Stradins Clinical University Hospital, Gailezers hospital and Traumatology and Orthopedic Hospital. A questionnaire applied only to patients of P. Stradins Clinical University Hospital and a retrospective study was performed within the framework of this research.

Bacterial isolates. DNA was isolated from feces which were sent to the laboratory being suspect to CDAD, using a kit QIAamp DNA Stool mini Kit (Qiagen, Germany) and it was determined whether they contained toxin genes *tcdA* and *tcdB* by PCR (16). A pure culture of *Cl. difficile* bacteria was isolated and cultured from fecal material. Each material was cultured on *Cl. difficile* selective agar (*Clostridium difficile* Selective Agar, Becton Dickinson, USA), blood agar and CNA blood agar, according to anaerobic culture growth methods (20). On blood agar and CNA blood agar *Cl. difficile* is of medium-size, forming colonies with a concentrated whitish center and a transparent, wavy area around it. Colonies are characterized by 'smell of a horse'. On *Cl. difficile* selective agar colonies grow in a similar way, but the colour of colonies change as a result of fission of fructose (mannose).

Ribotyping. Ribotyping was done by amplification of specific regions of the 16S and 23S RNA genes and amplification products were separated in 1.5% agarose gel (12, 15). The filogenetic analysis of ribotypes was performed using BioNumerics (Applied Maths BVBA) software (1).

RESULTS

Fecal samples of 500 patients having manifestations of clinical symptoms of CDAD were microbiologically and molecularly studied from August 2006 to the end of 2008. 130 samples were *tcdA*⁺*tcdB*⁺ toxin-positive. All samples were cultured on agar in anaerobic conditions.

As a result, 55 pure cultures were obtained. All cultures comprised toxinogenous *Cl. difficile* bacteria, which were ribotyped, i.e. the arrangement of ribosomal genes in a specific strain was determined (Figure 1).

As a result of filogenetic analysis 16 different ribotypes were determined using Bionumerics software. 4 of them are domineering ribotypes with 17, 14, 5 and 4 isolates in every group. (Figure 2).

Having analyzed data from appointment card forms, it can be concluded that the average age of patients is 65 (+/-17.12) years. Having distributed patients by age groups with a 5 year interval it is seen that mainly people older than 60 get infected. (Figure 3).

Distribution by gender: 35 women (64%) and 20 men (36%). Almost all patients, i.e.

52 patients (95%), received antibacterial therapy, 3 patients (5%) did not receive it. All patients had serious clinical diagnoses and were treated for a long time both at home and in hospital.

21 patient of all 55 patients were from P.Stradins Clinical University Hospital. The analysis by departments clearly demonstrates that the biggest number of confirmed *Clostridium difficile* patients is in the Nephrology Department (Figure 4). The development of clinical presentation of CDAD was similar in all patient, diarrhea and fever were prevailing (Figure 5). Retrospectively analyzing possible risk factors for CDAD development, it was traced that the majority of patients were prescribed antibacterial therapy in hospital (18 patients), 10 patients had already been hospitalized during previous two months, 8 patients were performed different GIT manipulations and 3 patients had *C.difficile* infection in their anamnesis (Figure 6). Having received a positive response for *C.difficile* antibacterial therapy is changed in 86% cases, it is changed to metronidazole or vancomycin (Figure 7).

DISCUSSION

Analysis of the clinical data was performed during the research for patients having laboratory-proved *C. difficile* infection. The average age of patients of the study is 65 years. CDAD patients are elderly people also according to literary data from all over the world (2). In 95% of patients the infection was induced by antibacterial therapy used for treatment of the principal disease. Having received a positive response for *C.difficile* positive toxin, the therapy was changed to metronidazole or vancomycin – agents selected for treatment of *C.difficile* infection – in 86% cases. The infection may develop in 5 to 30% of patients receiving antibacterial therapy (3). Due to the fact that the range of antibiotics becomes wider, the incidence of the disease has increased over the past years. Currently, *C.difficile* is resistant to all antibiotics, except vancomycin and metronidazole, scientists, however, consider that new bacterial strains may become resistant to these antibiotics as well. Thus antibacterial agents are the main cause of outbreaks of iatrogenic diarrhea, and it significantly increases mortality and inpatient treatment costs (2). 20% of hospitalized patients get infected by *C.difficile*

infection in hospital and diarrhea develops in 30% of them (5). The development of *C. difficile* bacterium is also stimulated by patient's complicated severe principal diagnosis making the patient to receive long-term inpatient treatment and have diverse examinations related to it in hospital, in particular gastrointestinal tract examinations. It is proved by my research data.

A toxicogenic ribotype 027 is not spread in Latvia yet, but 16 other different ribotype strains inducing severe health impairments are spread. British scientists have already proved that according to their studies *C. difficile* is able to collect mutations and exchange genes incredibly quickly, in this way ensuring its viability. 10% of the genome consist of mobile phases, i.e. the nucleotide sequence may migrate from one organism to the other, as a result a bacterium with genes making it so pathogenic appears (21). Therefore, the relation of other ribotypes to clinical presentations should be evaluated and infection control measures should be implemented. The control possibilities of this infection are not complex, but are labour-consuming. The use of high-risk antibacterial agents should be reduced and the spread of *C. difficile* spores in hospitals should be restricted. Experimental data demonstrate that in the ward, in which an infected patient was accommodated, one third of environment samples contain spores of the bacterium, but in control wards only 1.3% of samples are positive (13). Therefore, hygiene plays a very important role in the restriction of spread of the infection.

CONCLUSIONS

1. The average age of patients is 65 years.
2. Women get infected more frequently than men, distribution by gender: 35 women (64%) and 20 men (36%).
3. In 95% patients CDAD was induced by antibacterial therapy.
4. In 86% cases, having received a positive response for *C.difficile* antibacterial therapy is changed.
5. Disease development risk factors are previous antibacterial therapy, previous hospitalization, GIT manipulations and *C.difficile* infection in anamnesis.
6. The biggest number of CDAD patients was found in Department of Nephrology in Pauls Stradins Clinical University Hospital.
7. A hypervirulent *Cl.difficile* ribotype 027 was not found in Latvia yet, but 16 different ribotypes were determined using Bionumerics software. 4 of them are domineering ribotypes with 17, 14, 5 and 4 isolates in every group.

Conflict of interest: None

REFERENCES

1. Bidet P, Lalande V, Salauze B, et al. Comparison of PCR – Ribotyping, Arbitrarily PCR and Pulse – Field Gel Electrophoresis for Typing *Clostridium difficile* // J Clin Microbiol, 2000; 38:2484 – 2487

2. Biller P, Shank B, Lind L, et al. Moxifloxacin Therapy as a Risk Factor for Clostridium difficile – Associated Disease During an Outbreak: Attempts to Control a New Epidemic Strain // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28:199 – 201
3. Bouza E, Burillo A, Munoz P. Antimicrobial Therapy of Clostridium difficile-Associated Diarrhea // *Med Clin North America*, 2006; 90:1141 – 1163
4. Chandler R.E, Hedberg K, Cieslak R. Clostridium difficile-Associated Disease in Oregon: Increasing Incidence and Hospital-level Risk factor // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28:116 – 122
5. Clifford L, Coignard B. Recommendations for Surveillance of Clostridium difficile – Associated Disease // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28:140–145
6. Coignard B, Barbut F, Blanckaert K, et al. Emergence of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027 – associated disease // *Euro Surveill*, 2006; 11: pii=060914
7. Daniel E., Ballard D. Clostridium difficile Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease // *CMR*, 2005; 18:247–263
8. Delme M, Ramboer I, Van Broeck I, et al. Epidemiology of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in Belgium // *Euro Surveill*, 2006; 11:3045
9. Gerding N, Johnson S., Peterson R, et al. Clostridium difficile – associated diarrhea and colitis // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995; 16:459 – 477
10. Indra A, Huhulescu S, Hasenberger P, et al. First isolation of Cl. difficile PCR ribotype 027 in Austria // *Euro Surveill*, 2006; 11:pii=3046
11. Kelly P, Pothoulakis C, LaMont T. Clostridium difficile colitis // *NEJM*, 1991; 330:257 - 262
12. Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of Clostridium difficile: REA, PFGE, PCR-ribotyping, MLST, MLVA, AFLP, and slpAST // *J Clin Microbiol*, 2008; 46: 432 – 437
13. Kuijper J, Coignard B, Tüll P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe // *CMI*, 2006; 12:2-18
14. Kuijper J, Surawicz M. Clostridium difficile infection // *Lancet*, 2008; 371:1486 – 1488
15. Lemee L, Bourgeois I, Ruffin E, et al. Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of Clostridium difficile // *J Clin Microbiol*, 2005; 46:3171 – 3180
16. Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, et al. Multilocus sequence typing analysis of human and animal Clostridium difficile isolates of various toxigenic types // *J Clin Microbiol*, 2004; 28: 2609 – 1617
17. Long S, Fenebon L, Fitzgerald S, et al. First isolation and report of clusters of C.difficile PCR 027 cases in Ireland // *Euro Surveill*, 2007; 12:pii=3183
18. Pepin J, Valquette L, Alary E, et al. Clostridium difficile-Associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity // *CMAJ*, 2004; 171:466–472
19. Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec // *CMAJ*, 2005; 170:1037–1042
20. Poxton R, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of Clostridium difficile // *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7:421–427
21. Rupnik M, Aveseni V, Janc M., et al. Toxinotyping Schema and Correlation of Toxinotypes with Serogroups of Clostridium difficile Isolates // *J Clin Microbiol*, 1998; 23:2240 – 2247
22. Soes L, Mollak K, Trobek S, et al. The emergence of Cl. difficile PCR Ribotype 027 in Denmark // *Euro Surveill*, 2009; 14:19183
23. Tachon M, Cattone C, K.Balanckaert, et al. First cluster of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 27 associated disease in France: preliminary report // *Euro Surveill*, 2006; 11:2951

Address:

Karina Aksenoka
 Department of Molecular Biology and Genetics
 Pauls Stradins Clinical University Hospital
 Pilsonu Street 13,
 Riga, Latvia, LV-1003
 e-mail: karina.a@inbox.lv

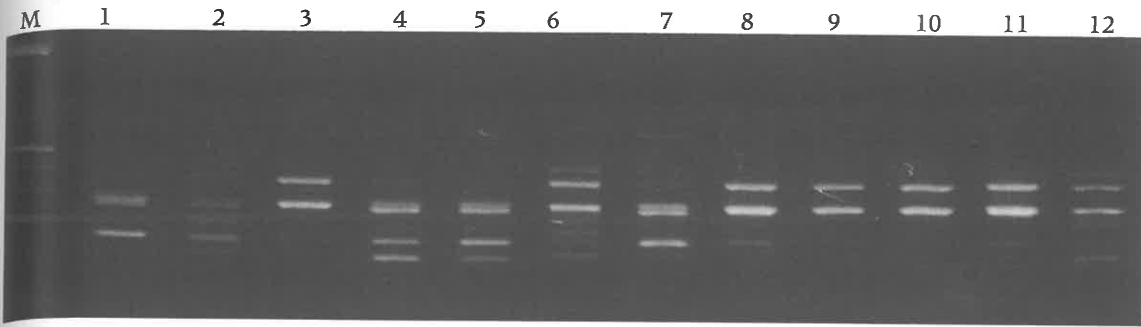


Fig. 1. Separation of ribotyping amplification products in 3% agarose gel. 1 – 12 different isolates. M – DNA marker (100bp DNA Ladder, Invitrogen)

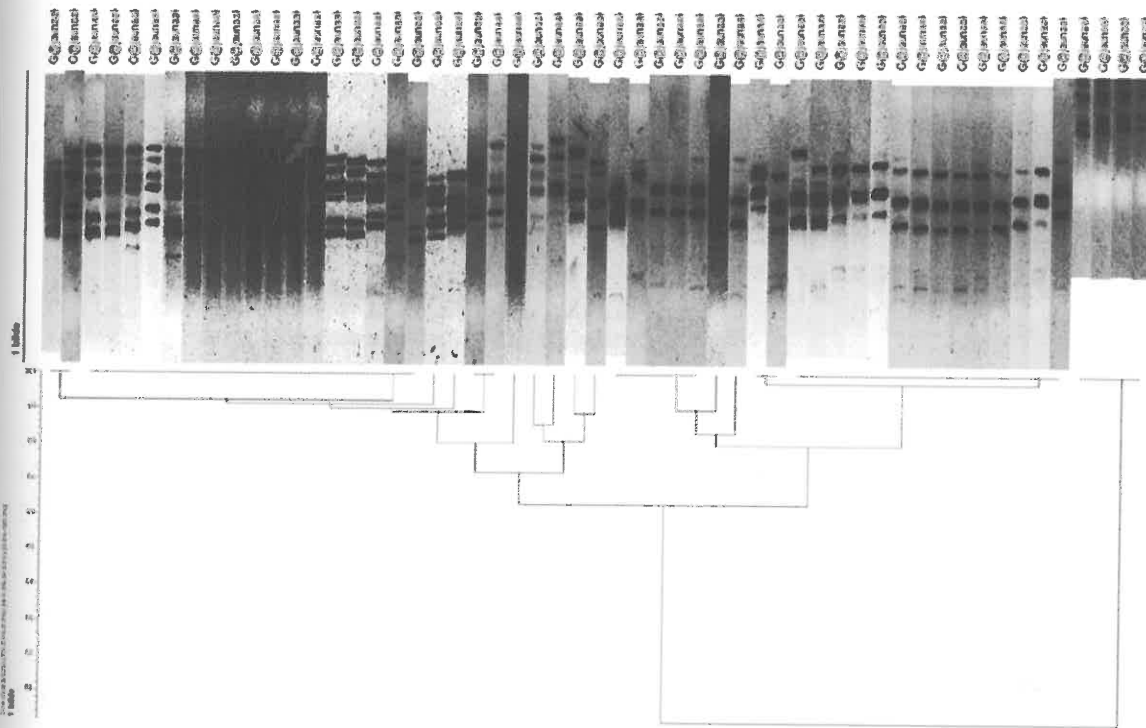


Fig. 2. Filogenetic tree of *Cl.difficile* isolates

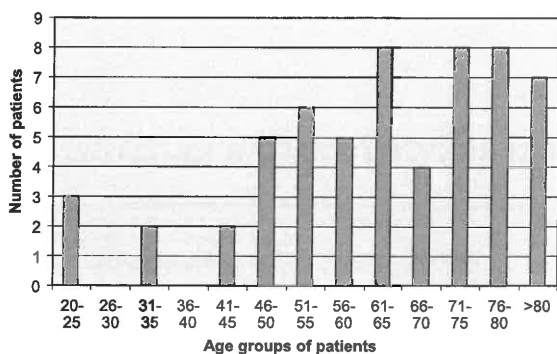


Fig. 3. Age distribution of patients with *Clostridium difficile*

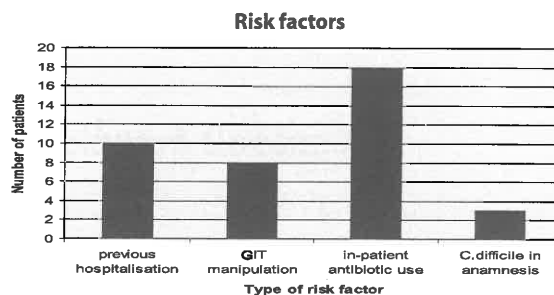


Fig. 6. Risk factors for the development of *Clostridium difficile* infection

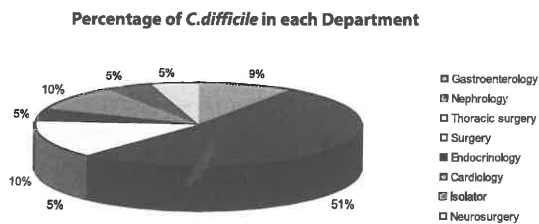


Fig. 4. The percentage of *Clostridium difficile* patients in each department in Pauls Stradins Clinical University Hospital

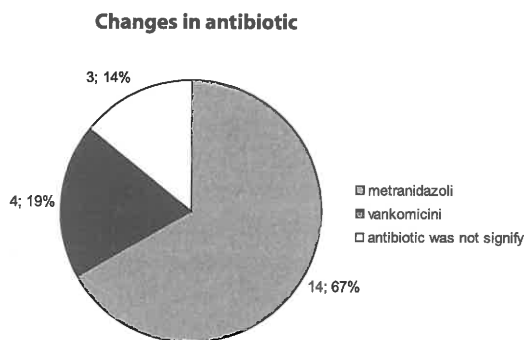


Fig. 7. Changes made to the administration of high risk antibiotics that have been implicated as risk factors for development of *Clostridium difficile*

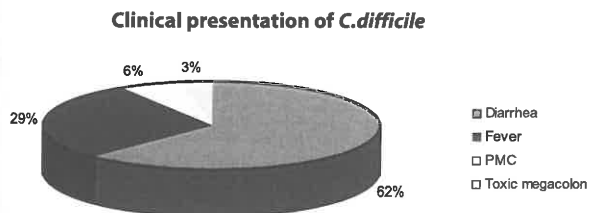


Fig. 5. Clinical presentation of *C. difficile* infection

Clostridium difficile Latvijas izolātu molekulārā tipēšana

Karīna Aksenoka^{1,2}, Arta Balode^{1,2}, Ilze Grope^{1,3}, Dace Gardovska^{1,3},
Edvīns Miklaševičs^{1,2}

¹ Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

² Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

³ Bērnu klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

Ievads

Clostridium difficile ir anaeroba, grampozitīva, sporas veidojoša baktērija. To uzskata par vienu no biežākajām gastrointestinālo infekciju izsaucējām. *Cl. difficile* 1978. gadā tika atzīta par pseidomembranozā kolīta izraisītāju [1]. Tā var radīt izspausmes, kas variē, sākot no asimptomātiskas kolonizācijas kuņģa-zarnu traktā, smagas caurejas, pseidomembranozā kolīta, toksiskas megakolonas, zarnu perforācijas, un nāvi. Visas šīs smaguma pakāpes apkopo ar angļu terminu *Clostridium difficile associated disease (CDAD)* [2-4]. *Cl. difficile* riska pacients ir cilvēks gados ar smagu pamatslimību, kas ilgi atrodas stacionārā, ilgstoši saņem antibiotikas, antacidus līdzekļus un pretčūlas līdzekļus, kuram ir bijusi ķirurģiska iejaukšanās gastrointestinālajā traktā vai kāda orgāna transplantācija, kas vienmēr ir saistāma ar imūnsupresiju [5-7].

CDAD ir reti sastopama, ja nav vai nav bijis nesenas anamnētiskas antibakteriālas terapijas. CDAD attīstību izraisa gandrīz visas antibiotikas. Biežāk CDAD attīstās slimniekiem, kuriem terapijā tīcis nozīmēts ampicilīns, amoksicilīns, cefalosporīni, klindamicīns, retāk - eritromicīns, tetraciklīns, sulfanilamīdi, trimetoprims, fluorhinoloni. Reti CDAD attīstās uz vankomicīna, metronidazola un parenterāli ievadāmo aminoglikozīdu fona [8].

Cl. difficile celmi, kuri izraisa cilvēku saslimšanu, producē divus toksīnus - A (*tcdA*) un B (*tcdB*), kas bojā zarnu gļotādu, līdz ar to attīstās kolīts [4]. *TcdB* ir potents citotoksīns, bet atšķirībā no *TcdA*, kas ir enterotoksīns, tas neizraisa šūnu membrānu bojājumus [9]. Tiek uzskatīts, ka galvenais virulences faktors ir toksīns A; B sinerģētiski ar to sadarbojas un pats par sevi nav īpaši bīstams. *Cl. difficile* patogenitātes lokusā ietilpst vēl regulētājkēni - *tcdD*, *tcdE* un *tcdC* [10].

Pēdējo divu gadu desmitu laikā šīm infekcijām ir tendence pieaugt. Šis pacēlums tiek skaidrots ar labākām diagnosticēšanas iespējām, pieaugošu antibiotiku patēriņu un ārstniecības iestāžu arvien lielāku kontamināciju ar *Cl. difficile* sporām. Ir attīstījušās īpaši toksiski baktērijas celmi, kas toksīnus A un B spēj ražot desmitiem reižu vairāk, nekā agrāk novērots [5]. Kopš 2002. gada īpašu uzmanību saista *Cl. difficile* hipervirulents celms, kas pieder III toksinotipam un 027 ribotipam, kas sākotnēji izplatījās ASV un Kanādā [11; 12], bet tagad jau ir izraisījis hospitālos uzliesmojumus Īrijā [13], Beļģijā [14], Francijā [15; 16], Dānijā [17], Austrijā [18] un citās valstīs [19]. Pacienti, kuri bija inficēti ar 027 ribotipa *Cl. difficile*, slimnīcā bija spiesti uzturēties vidēji par 10,7 dienām ilgāk un mortalitāte to vidū bija ievērojami augstāka [15].

Ņemot vērā to, ka pašreiz ASV un Eiropā izplatās īpaši patogēns *Cl. difficile* ribotips 027, kurš izraisa ļoti nopietnu slimību ar incidenci 80 līdz 200 gadījumi uz 10000 stacionāriem pacientiem, ļoti aktuāla kļūst šī mikroba izpēte arī Latvijā, lai veiktu ne tikai šī mikroorganisma diagnostiku, bet arī ribotipēšanu, lai nepieciešamības gadījumā uzsāktu adekvātu terapiju un veiktu infekcijas kontroles pasākumus [20].

Materiāls un metodes

Pētījumā ir iekļauti dati, kuri vākti no 2006. gada augusta līdz 2008. gada beigām trīs Latvijas slimnīcās – P. Stradiņa KUS, slimnīcā “Gaiļezers” un Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcā. Pētījumā tika novērtēti šādi parametri: pacientu vecums, dzimums, stacionārs, antibakteriālā terapija (+/-), materiāla nosūtīšanas laiks uz laboratoriju.

Baktēriju izdalīšana. DNS izdalīja no fēcēm, kuras sūtīja uz laboratoriju ar aizdomām par CDAD, ar kitu *QIAamp DNA Stool mini Kit* (Qiagen, Vācija) un noteica, vai tā satur toksīnu gēnus *tcdA* un *tcdB*, izmantojot PĶR [21]. *Cl. difficile* baktēriju tīrkultūras tika izdalītas un audzētas no fēcū materiāla. Katrs materiāls tika audzēts uz *Cl. difficile* selektīvas barotnes (*Clostridium difficile Selective Agar*, Becton Dickinson, ASV), asins agara un CNA asins agara, saskaņā ar anaerobo kultūru audzēšanas metodoloģiju [4]. Uz asins un CNA asins agara *Cl. difficile* aug, veidojot vidēji lielas kolonijas ar sabiezīnātu bālganu centru un caurspīdīgu, viļņainu zonu ap to.. Kolonijām raksturīga “zirga smaka”. Uz *Cl. difficile* selektīvās barotnes kolonijas aug līdzīgi, bet fruktozes (mannozes) šķelšanās rezultātā mainās to krāsa.

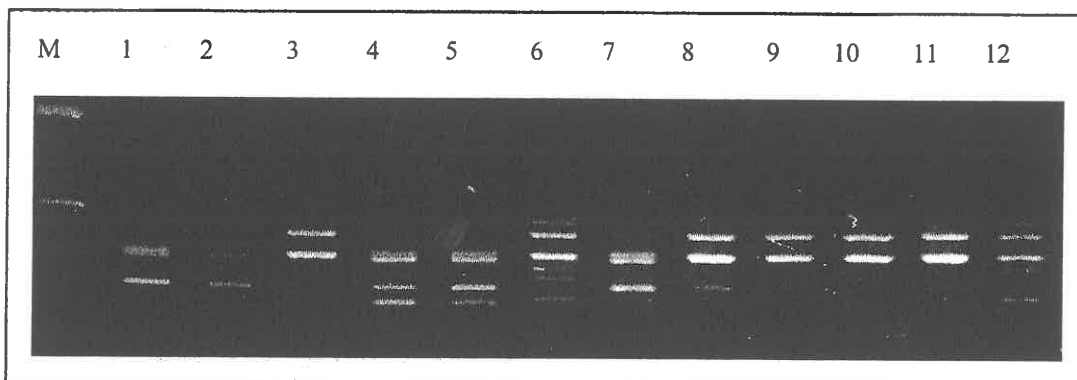
Ribotipēšana. Ribotipēšanai amplifikēja 16S un 23S RNS gēnu specifiskus rajonus, un amplifikācijas produktus sadalīja 1,5% agarozes gēlā [21]. Ribotipu filoģenētisko analīzi veica ar datorprogrammu *BioNumerics* (*Applied Maths BVBA*).

MLST veica, kā aprakstīts [22]. PCR produktus sekvenēja ar ģenētisko analizatoru ABI PRISM 3110 (*Applied Biosystems*). Iegūtās sekvences tika salīdzinātas ar atbilstošām alēlēm *Cl. difficile* MLST datu bāzē (www.pasteur.fr) un noteikts baktērijas sekvences tips [23; 24].

Rezultāti

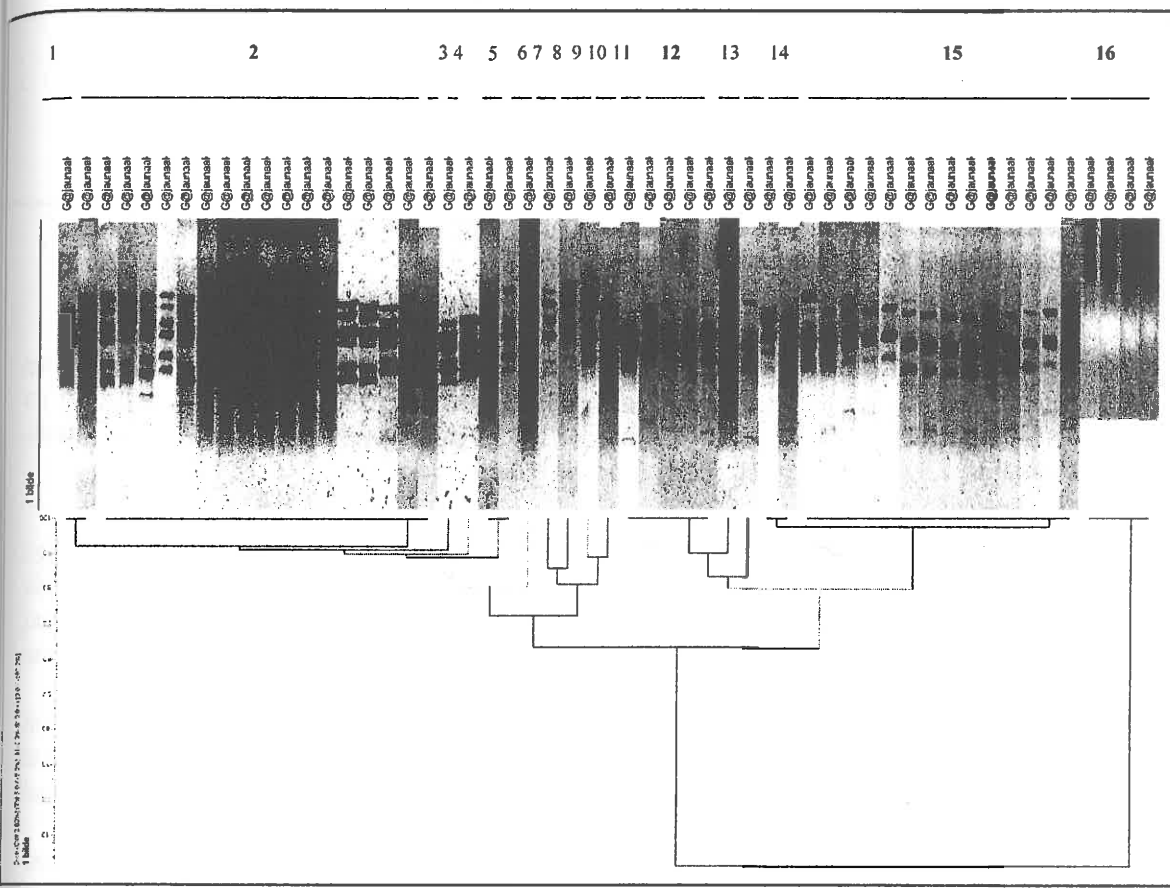
No 2006. gada augusta līdz 2008. gada beigām tika mikrobioloģiski un molekulāri izmeklēti 500 slimnieku fēcū paraugi, kuriem bija CDAD kliniskā simptomātika. 130 paraugi bija *tcdA***tcdB** toksīnpozitīvi. Visi paraugi tika audzēti uz barotnēm anaerobos apstākļos. Rezultātā tika iegūtas 55 tīrkultūras. Visas kultūras bija ar toksinogēnām *Cl. difficile* baktērijām, kuras tika ribotipētas, t. i., noteikts ribosomālo gēnu izvietojums noteiktā celmā (sk. 1. att.).

1. attēls. Ribotipēšanas PĶR amplifikācijas produktu sadalījums 3% agarozes gēlā. 1–12 dažādu izolātu. M – marķieris (*100bp DNA Ladder, Invitrogen*). Separation of ribotyping amplification products in 3% agarose gel. 1–12 – different isolates. M – DNA marker (*100bp DNA Ladder, Invitrogen*).

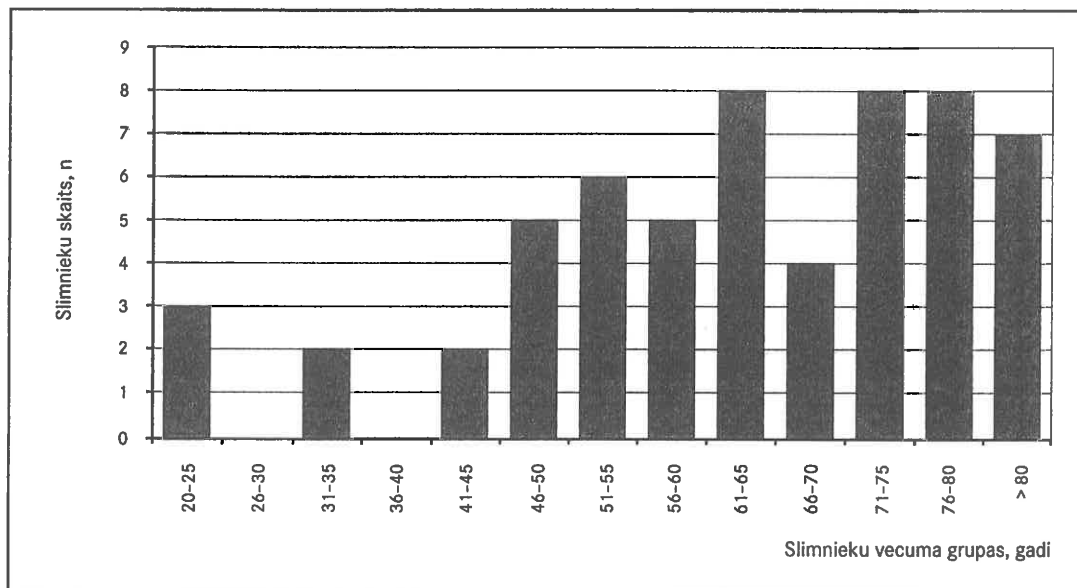


Filoģenētiskās analīzes rezultātā ar *Bionumerics* programmatūru tika noteikti 16 dažādi ribotipi, no kuriem – 4 dominējošie ribotipi ar 17, 14, 5 un 4 izolātiem katrā grupā (sk. 2. att.). No ribotipēšanas rezultātā iegūtā filoģenētiskā koka pretējo zaru lielākām grupām selektīvi izvēlētām sešām kultūrām tika veikta MLST tipēšana. MLST shēmā no 7 gēniem visiem sešiem paraugiem ir identiska alēļu kombinācija, un tie pieder vienam sekvences tipam – ST-3 (sk. 1.tab.).

2. attēls. *Cl. difficile* ribotipu filogenētiskais koks.
Phylogenetic tree of *Cl. difficile* isolates.



3. attēls. *Clostridium difficile* infekcijas slimnieku sadalījums pa vecumu grupām.
Age distribution of patients with *Clostridium difficile*.



1. tabula. *Cl. difficile* MLST rezultāti.
MLST results for *Cl. difficile* Latvian isolates.

Gēns / paraugs	<i>aroE</i>	<i>ddl</i>	<i>dutA</i>	<i>gmk</i>	<i>recA</i>	<i>solA</i>	<i>spi</i>	ST
140	2	2	2	1	1	5	1	3
107	2	2	2	1	1	5	1	3
177	2	2	2	1	1	5	1	3
189	2	2	2	1	1	5	1	3
190	2	2	2	1	1	5	1	3
192	2	2	2	1	1	5	1	3

Izanalizējot nosūtījumu veidlapu datus, var secināt, ka vidējais slimnieku vecums ir 65 (± 17,12) gadi. Sadalījums pa vecuma grupām parādīts 3. attēlā. Sadalījums pa dzimumiem – 35 sievietes (64%) un 20 vīrieši (36%). Antibakteriālo terapiju saņēma 52 slimnieki (95%), nesaņēma 3 slimnieki (5%). Visi slimnieki bija ar smagām klīniskām diagnozēm, kuri ilgstoši ārstējas gan mājās, gan stacionārā.

Diskusija

Pret *Cl. difficile* infekciju ir predisponēti veci cilvēki ar smagu pamatsaslimšanu, un bieži fonā ir ilgstoša antibakteriālā terapija. Mūsdienās antimikrobiskie līdzekļi tiek lietoti pārāk plaši, pat ārstējot slimības, kur tie nemaz nebūtu vajadzīgi, līdz ar to veicinot rezistentu mikroorganismu izplatību. No otras puses, patogēni kļūst aizvien rezistentāki pret aizvien lielāku skaitu antibiotiku. Jo plašāk lieto kādu antibiotiku, jo izplatītāka kļūst

rezistence pret to, turklāt rezistence attīstās pārsteidzoši ātri. Rezultātā sarūk jaunu antimikrobisko līdzekļu skaits un ļoti maz farmaceitisko firmu pasaulē nodarbojas ar jaunu antibakteriālo līdzekļu izstrādi. Tāpēc nākotnē nav izslēgts, ka *Cl. difficile* kļūs rezidenta arī pret vankomicīnu un metronidazolu, kas novedīs pie ļoti nopietnām sekām [25].

Tradicionālā mikrobioloģiskā metode – uzsējums – ir precīza, tomēr šīs baktērijas identifikācijai nepieciešamas vairākas dienas, bez tam baktērija ir grūti audzējama. Baktērijas nosaukums “*difficile*” radies tāpēc, ka tā slikti aug uz barotnēm, jo uz plātes grūti nodrošināt kuņģa un zarnu trakta videi līdzīgus apstākļus [21].

Cl. difficile slimnīcās izplatās epidēmiju veidā. Tās ierobežošanai jāveic stingri infekciju kontroles profilakses pasākumi. Inficētais pacients ir jāizolē atsevišķā telpā, personālam jālieto cimdi, priekšauti. Rokas jāmazgā ar antibakteriālām ziepēm. Rūpīgi jāuzskaita visi jaunie infekcijas gadījumi.

Secinājumi

1. Latvijā ir izplatīti *Cl. difficile* ST-3 toksinogēnie celmi, kuri pieder dažādiem ribotipiem.
2. Latvijā vēl nav konstatēts hipervirulents *C. difficile* ribotips 027.
3. Vidējais inficēto slimnieku vecums ir 65 gadi.
4. Sievietes ar *CDAD* slimo biežāk nekā vīrieši, 64% sievietes un 36% vīrieši.
5. 95% slimnieku *CDAD* attīstās uz antibakteriālās terapijas fona.



Molecular Epitomization of Latvian Strains of *Clostridium difficile*

Abstract

Diarrhea and colitis due to *Clostridium difficile* are well recognized and extensively studied iatrogenic complications of antibiotic use. It is also the leading cause of nosocomial diarrhea, and many hospital outbreaks have been described throughout the world. Molecular analysis of outbreaks provides detailed information on phylogenetic relationships within *C. difficile* strains. This study reports on ribotyping and MLST of *C. difficile* strains isolated from leading Latvian hospitals. All strains studied were of 17 ribotypes. Six arbitrarily selected strains belong to ST-3.

The average age of patients is 65 years. Women get infected more frequently than men, distribution by gender: 35 women (64%) and 20 men (36%). In 95% patients CDAD was induced by antibacterial therapy. In 86% cases, having received a positive response for *C. difficile*, the antibacterial therapy is changed. Disease development risk factors are previous antibacterial therapy, previous hospitalization, GIT manipulations and *C. difficile* infection in anamnesis. The biggest number of CDAD patients was found in Nephrology Department of P. Stradins Clinical University Hospital. In Latvia, *C. difficile* ST-3 toxinogenic strains belonging to different ribotypes are widespread. A hypervirulent *C. difficile* ribotype 027 has not been found in Latvia yet.

Literatūra

1. Kuijper E. J., Surawicz C. M. Clostridium difficile infection // The Lancet, 2008; 371: 1486-1488.
2. Vaishnavi C. Established and potential risk factors for Clostridium difficile infection // Indian J Med Microbiol, 2009; 27(4): 289-300.
3. Gerding D. N., Johnson S., Peterson L. R., et al. Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis // Infect Control Hosp Epidemiol, 1995; 16: 459-477.
4. Poxton R. Clostridium difficile: are we getting it right? // The Biomedical Scientist, 2005; 1034-1038.
5. Voth D. E., Ballard J. D. Clostridium difficile Toxins: mechanism of Action and Role in Disease // Clin Microbiol reviews, 2005; 247-263.
6. Chandler R. E., Hedberg K., Cieslak P. R. Clostridium difficile-associated Disease in Oregon: Increasing Incidence and Hospital-level Risk factor // Infect Control Hosp Epidemiol, 2007; 28: 116-122.
7. Biller P., Shank B., Lind L., et al. Moxifloxacin Therapy as a Risk Factor for Clostridium difficile-associated Disease during an Outbreak: Attempts to Control a New Epidemic Strain // Infect Control Hosp Epidemiol, 2007; 28: 199-201.
8. Kelly C. P., Pothoulakis C., LaMont J. T. Clostridium difficile colitis // NEJM, 1991; 330: 257-262.
9. Poxton R., McCouberey J., Blair G. The pathogenicity of Clostridium difficile // Clin Microbiol Infect, 2001; 7: 421-427.
10. Rupnik M., Aveseni V., Janc M., et al. Toxinotyping Schema and Correlation of Toxinotypes with Serogroups of Clostridium difficile Isolates // J Clin Microbiol, 1998; 23: 2240-2247.
11. Pepin J., Valiquette L., Cossette B. Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec // CMAJ, 2005; 170: 1037-1042.
12. Pepin J., Valiquette L., Alary M. E., et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity // CMAJ, 2004; 171(5): 466-472.
13. Long S., Fenebon L. S., Fitzgerald S., et al. First isolation and report of clusters of C. difficile PCR 027 cases in Ireland // Euro Surveill, 2007; 12: pii=3183.
14. Delme M., Ramboer I., Van Broeck I. et al. Epidemiology of C. difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in Belgium // Euro Surveill, 2006; 11: pii=3045.
15. Tachon M., Cattone C., Balanckaert K., et al. First cluster of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 27 associated disease in France: preliminary report // Euro Surveill, 2006; 11: pii=2951.
16. Coignard B., Barbut F., Blanckaert K., et al. Emergence of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease // Euro Surveill, 2006; 11: pii=060914.
17. Soes L., Mollak K., Trobek S., et al. The emergence of Cl. difficile PCR Ribotype 027 in Denmark // Euro Surveill, 2009; 14: pii=19183.
18. Indra A., Huhulescu S., Hasenberger P., et al. First isolation of Cl. difficile PCR ribotype 027 in Austria // Euro Surveill, 2006; 11: pii=3046.
19. Kuijper E. J., Coignard B., Tüll P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe // CMI, 2006; 12: 2-18.
20. Clifford L.C., Coignard B., Dubberke E. et al. Recommendations for Surveillance of Clostridium difficile-associated Disease // Infect Control Hosp Epidemiol, 2007; 28(2): 140-145.
21. Bidet P., Lalande V., Salauze B., et al. Comparison of PCR - Ribotyping, Arbitrarily PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Clostridium difficile // J Clin Microbiol, 2000; 38: 2484-2487.
22. Lemee L., Dhalluin A., Pestel-Caron M., et al. Multilocus sequence typing analysis of human and animal Clostridium difficile isolates of various toxigenic types // J Clin Microbiol, 2004; 28: 2609-2617.
23. Lemee L., Bourgeois I., Ruffin E. et al. Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of Clostridium difficile // J Clin Microbiol, 2005; 46: 3171-3180.
24. Killgore G., Thompson A., Johnson S., et al. Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of Clostridium difficile: REA, PFGE, PCR-ribotyping, MLST, MLVA, AFLP, and slpAST // J Clin Microbiol, 2008; 46: 432-437.
25. Bouza E., Burillo A., Munoz P. Antimicrobial Therapy of Clostridium difficile-associated Diarrhea // Med Clin North America, 2006; 90: 1141-1163.

Clostridium difficile prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diareju

Dace Gardovska¹, Linda Eihvalde¹, Ilze Grope¹,
Karīna Aksenoka^{1,2}, Edvīns Miklaševičs^{1,2}

¹ Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

² Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

Ievads

Clostridium difficile ir nozīmīgs diarejas izraisītājs attīstītajās valstīs un galvenais infekciozās diarejas izraisītājs hospitalizētiem pacientiem [1, 2]. Katru gadu *C. difficile* infekcija rada apmēram 3 miljonus diarejas un kolīta gadījumu ASV. Pseudomembranozā kolīta gadījumā mirstība svārstās no 6% līdz 30%, un arī citām klīniskajām formām tā ir liela [3]. Lielbritānijā laikā periodā no 2000. līdz 2006. gadam ar *C. difficile* saistīto saslimšanu skaits ir pieaudzis no 15 081 līdz 42 901 [4]. *C. difficile* izraisītā diareja tiek konstatēta 1 līdz 10 gadījumos uz katriem 1000 uzņemtajiem pacientiem, palielinot mirstības rādītājus un ievērojami palielinot ārstēšanas izmaksas. Šo pacientu hospitalizācija no 18 dienām vidēji tiek pagarināta līdz 30 dienām, un katra šīs slimības epizode papildus izmaksā 4101 mārciņu, kā aprēķinājuši Lielbritānijas pētnieki, un 3340 dolāru, kā aprēķinājuši ASV pētnieku grupa [5].

Literatūrā kā galvenie riska faktori *C. difficile* infekcijai minēti hospitalizācija un antibakteriālā terapija [1, 3, 5].

C. difficile ir sporas veidojošs grampozitīvs nūjiņveida mikroorganisms, kas aug tikai anaerobos apstākļos, veidojot cirkulāras vai neregulāras formas kolonijas. Klīniskajā darbā nozīmīgākie ir celmi, kas ražo toksīnus. Lielākajai daļai *C. difficile* izolātu par virulenci ir atbildīgi divi galvenie toksīni – A toksīns un B toksīns. Lai gan parasti A toksīnu pazīst kā enterotoksīnu un B toksīnu – kā citotoksīnu, tiem abiem ir citotoksiska darbība pret dažādiem šūnu tipiem – tie ierosina un pastiprina asinsvadu caurlaidību un izsauc asiņošanu, turklāt abi toksīni var darboties sinerģiski [5].

Pēdējo divdesmit gadu laikā šo infekciju izraisīto saslimšanu skaitam ir tendence pieaugt. Kopš 2002. gada īpašu uzmanību saista *C. difficile* hipervirulentais celms III toksinotips, 027 ribotips [6]. Vispirms tas izplatījās ASV un Kanādā [7], bet šobrīd ir pierādīts, ka tas ir hospitālo infekciju ierosinātājs Īrijā [8], Beļģijā [9], Francijā [10] un vairākās citās valstīs. Pacienti, kuri bija inficēti ar 027 ribotipa *C. difficile*, slimnīca bija spiesti uzturēties vidēji par 10,7 dienām ilgāk, un mirstība to vidū bija ievērojami lielāka [7]. Ņemot vērā to, ka patreiz ASV un Eiropā izplatās īpaši patogēns *C. difficile* ribotips 027, kurš izraisa klīniski smagas saslimšanas, kas tiek konstatētas 80 līdz 200 cilvēkiem no 10 000 hospitalizētiem pacientiem, aktuāla kļūst ne tikai šī mikroorganisma diagnostikā, bet arī ribotipēšana, lai pēc iespējas ātrāk diagnosticētu šo patogēno celmu, uzsāktu adekvātu terapiju un veiktu preventīvos infekcijas kontroles pasākumus.

Ar *Clostridium difficile* saistītā diareja (CDAD, *Clostridium difficile-associated diarrhea*) ir diareja (neformētas feces, kas pieņem paraugu savākšanas trauka formu) vai toksiskais megacolon (radioloģiski pierādīta resno zarnu dilatācija) bez cita zināma etioloģiska aģenta, kas atbilst vienam vai vairākiem šādiem kritērijiem: fēču parauga laboratoriskā izmeklēšanā ir konstatēts pozitīvs *C. difficile* toksīns A un/vai B vai fēču paraugā tiek atrasts toksīnu ražojošs *C. difficile* celms, pseudomembranozs kolīts, kas redzams endoskopiskās izmeklēšanas vai operācijas laikā, kā arī pseudomembranozs kolīts, kas noteikts patohistoloģiskās izmeklēšanas laikā [11].

C. difficile infekcija var izpausties kā viegla diareja, kas ir pašlimitējoša, atceļot antibakteriālo terapiju, bet visbiežāk *C. difficile* infekcija izpaužas kā vidēji smaga diareja, kas norit ar šādiem simptomiem: nogurumu, vēdera, nelabu dūšu, vemšanu, ūdeņainām vai brūnas krāsas fēcēm, drudzi un leukocitozi. Šādos gadījumos jāzina, ka zarnā endoskopiski vērojama nespecifiska kolīta aina. Smagākos gadījumos endoskopiski redzama bāli plankumu, t.i., pseidomembrānu veidošanās resnās zarnas gļotādā [5]. Vissmagākā šīs saslimšanas forma ir fulminants kolīts ar asiņainu diareju, toksiskais megacolon ar perforāciju sepsi, šoku un multiorgānu funkciju [12].

C. difficile toksīni veicina IL-8 un ICAM-1 ekspresiju epitēlija šūnās, kas savukārt regulē neitrofilo pieķirtno hemoatrakciju un adhēziju, radot zarnu iekaisumu, šūnu nekrozi un olbaltumvielu zudumu. Toksīni var arī gļotādas olbaltumvielu sintēzi un palielina kapilāru caurlaidību un zarnu peristaltiku [12].

Par *C. difficile* infekcijas riska faktoriem tiek uzskatīts pacienta vecums (ja tas ir virs 65 gadiem), smagas zarnu saslimšanas, neķirurģiskas procedūras kuņģa un zarnu traktā, nazogastrālās zondes klātbūtne, medikamentu lietošana čūlas ārstēšanai, uzturēšanās intensīvās terapijas nodaļā, ilgstoša hospitalizācija, ilgstoša antibiotiku lietošana, vairāku antibakteriālo līdzekļu saņemšana [3,13]. Kā biežākais *C. difficile* riska faktors tiek minēts antibakteriālās terapijas pielietojums. Tiek uzskatīts, ka tā iznīcina zarnu mikrofloras līdzsvaru, radot nišu *C. difficile* augšanai un toksīnu ražošanai. Pētījumi rāda, ka galvenā loma ir fluorhinolonu grupas antibakteriālajiem līdzekļiem [14], jāpiemin arī klindamicīns, ampicilīns, amoksicilīns, cefalosporīni un trimetoprimis [5]. Ir zināmi arī ziņojumi par sabiedrībā iegūtu *C. difficile* infekciju, kā arī par *C. difficile* diareju, kas nav saistīta ar antibakteriālu terapiju [15].

Latvijā līdz šim *C. difficile* infekcijas sastopamība bērniem nav pētīta.

Darba mērķis, materiāls un metodes

Darba mērķis ir noskaidrot *Clostridium difficile* prevalenci bērniem, kas ārstēti Bērnu Klīniskajā universitātes slimnīcā (BKUS).

Prospektīvais aprakstošais pētījums veikts BKUS laika periodā no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada oktobrim. Pētījuma subjekti (n = 187) ir pacienti vecumā no 3 dienām līdz 16 gadiem 7 mēnešiem, kuri stacionēti BKUS ar diareju vai hemokolītu un kam fēcēs tika noteikti *Clostridium difficile* A un B toksīni, rota vīruss, norovīruss, adenovīruss, astrovīruss, kā arī veikts fēcū uzsējums patogēnās zarnu floras noteikšanai.

DNS tika izdalīti no fēcū paraugiem (ar kitu *QIAamp DNA Stool mini Kit, Qiagen, Vācija*), neizolējot baktērijas. Toksīnu A un B gēnus *tdcA* un *tdcB* noteica, izmantojot PĶR ar tai sekojošu reakcijas produktu noteikšanu 3% agarozes gēlā [16].

Pētījumi tika apstrādāti ar bioloģisko pētījumu apstrādē pieņemtām standartmetodēm, izmantojot programmas *Microsoft Office Excel 2003* un *SPSS 2000*. Pacientu datu analīzei tika izmantotas aprakstošās statistikas metodes. Tika novērtēti centrālās tendences rādītāji – vidējais aritmētiskais, mediāna un moda.

Rezultāti

Pētījumā iekļauti 187 (100%) bērni, kas bija stacionēti BKUS no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada oktobrim. Jaunākais pacients bija 3 dienas vecs, bet vecākais – 16 gadus un 7 mēnešus; pacientu vidējais vecums bija 11 mēneši. 28,9% (54) pacientu bija 12 līdz 24 mēnešus veci, savukārt 25,1% (47) – 0 līdz 12 mēnešus, 25,6% (48) pacientu bija vecumā no 2 līdz 4 gadiem, bet pārējie 20,3% (38) ir pacienti vecumā no 4 līdz 16 gadiem. Pacienti ārstējušies BKUS vidēji 4,1 gultas dienu (minimālais rādītājs – 1 diena, maksimālais – 21 dienas).

11,2% (21) bērnu anamnēzē bija iepriekšēja stacionēšana, savukārt 12,8% (24) bija saņēmuši antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas BKUS. Vienam pacientam iepriekš bija stacionēti arī citi ģimenes locekļi. 35,8% (68) bērnu apmeklēja pirmsskolas bērnu iestādi vai skolu.

59,9% (112) pacientu bija stacionēti ar akūta gastroenterīta diagnozi, 9,1% (17) – ar diagnozi akūts enterokolīts, 11,2% (21) – akūts enterīts, 10,2% (19) – akūts enterokolīts, 8,0% (15) – funkcionāli gremošanas traucējumi, bet 1,6% (3) bija cita stacionēšanas diagnoze ar akūtu zarnu infekcijas slimību klīniku. 100% (170) pacientu tika stacionēti ar infekciju diagnozi.

Pēc klīniskajām diagnozēm pētījuma subjektus var iedalīt šādās grupās – 55,6% (104) bērnu bija akūts gastroenterīts, 13,4% (25) – akūts gastroenterokolīts, 5,3% (10) – akūts enterīts, 9,1% (17) akūts enterokolīts, 11,8% (22) – funkcionāli gremošanas traucējumi, bet 4,8% (9) bija cita, ar akūtām zarnu infekcijām nesaistīta, pamata diagnoze. Tikai 9,6% (18) pacientu bija konstatēts hemokolīts.

1,1% (2) pacientu tika stacionēti bez eksikozes pazīmēm, 79,1% (148) bija I pakāpes eksikoze, 18,2% (34) – II pakāpes eksikoze, un 1,6% (3) pacientu tika stacionēti ar III pakāpes eksikozi.

Analizējot pacientu vispārējo stāvokli stacionēšanas brīdī, redzams, ka 1,1% (2) pacientu vispārējais stāvoklis bija viegls, 91,4% (171) vispārējais stāvoklis bija vidēji smags, bet 7,5% (13) pacientu vispārējais veselības stāvoklis bija smags.

97,3% (182) pacientu tika noteikts C reaktīvā proteīna (CRP) līmenis. CRP vidējā vērtība šiem pacientiem bija 22,2 mg/L (minimālā – 0,1 mg/L, maksimālā – 187,8 mg/L). Analizējot CRP vērtību sadalījumu pa intervāliem, redzams, ka 74,3% (139) pacientu CRP vērtība bijusi intervālā no 0 līdz 25,0 mg/L.

97,3% (182) pacientu bija noteikts kopējais leikocītu skaits, kura vidējā vērtība bija $12\ 553 \times 10^3/L$ ar minimālo vērtību $1700 \times 10^3/L$ un maksimālo – $40\ 030 \times 10^3/L$. Vairumam pacientu – 21,9% (41) leikocītu skaits bija intervālā no 10 000 līdz $12\ 500 \times 10^3/L$.

96,2% (180) fēcēs tika noteikts rota vīruss, un 29,4% (53) pacientu tas bija pozitīvs.

11,8% (22) pacientu fēcēs tika noteikti citu vīrusu antigēni, un 8 pacientiem pierādīts noro vīruss, 1 pacientam – adenovīruss.

94,1% (176) pacientu tika veikts fēču bakterioloģiskais uzsējums. 86,6% (162) gadījumu fēču uzsējums bija negatīvs, 6,4% (12) gadījumu tika izolēta *Salmonella enteritidis* un pa vienam gadījumam – *Salmonella typhimurium* un *Shigella sonnei*. Trijos gadījumos tika novērota jaukta infekcija – no fēcēm izolēta *Salmonella enteritidis* un pierādīts rota vīrusa antigēns. Kopumā 41,1% (77) pacientu tika pierādīts kāds no diareju izraisošajiem patogēniem.

3,7% (7) pacientu tika veikta asins kulturēšana. 1 gadījumā asins kultūra bija pozitīva – tika izolēts *Lactococcus lactis*.

Stacionāra etapā 82,9% (155) pacientu nesaņēma antibakteriālo terapiju, 10,7% (20) saņēma antibakteriālo terapiju ar vienu antibakteriālo līdzekli, 3,2% (6) – divus antibakteriālos līdzekļus, 2,1% (4) saņēma trīs antibakteriālos līdzekļus, savukārt piecus un sešus antibakteriālos līdzekļus saņēma attiecīgi pa vienam pacientam.

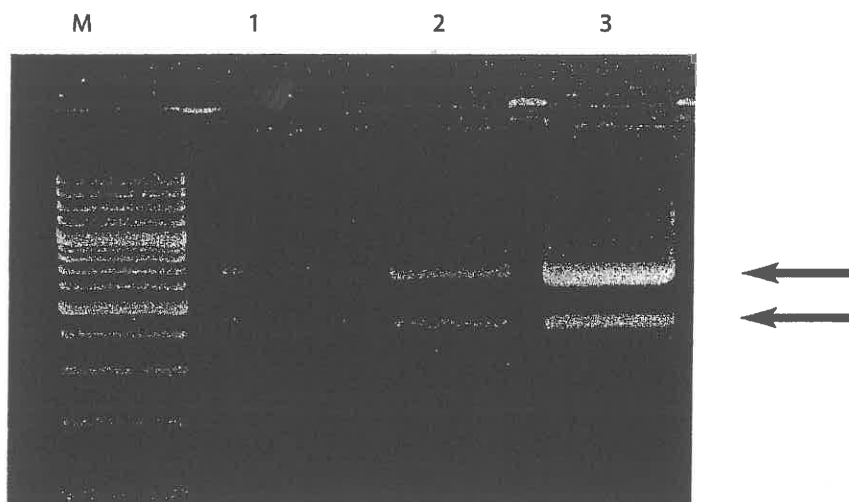
No visiem pacientu fēču paraugiem tika izdalīta DNS un noteikta *C. difficile* toksinogēnu klātbūtne, izmantojot PCR. Tipisks analīzes piemērs ir redzams 1. attēlā.

1. attēls. *C. difficile* DNS amplifikācijas produktu sadalījums agarozes gēlā.

C. difficile DNA amplification products' distribution in agarose gel

M – marķieris, 1-3 *tcdA* (apakšējais fragments) un *tcdB* (augšējais fragments) pozitīvie paraugi.

M – marker, 1-3 *tcdA* (lower fragment) and *tcdB* (upper fragment) are positive samples.



Clostridium difficile A un B toksīna vienlaicīga klātbūtne tika konstatēta 4,3% (8) pacientu, savukārt *Clostridium difficile* B toksīns konstatēts 1 pacientam.

1 gadījumā tika novērota vienlaicīga rota vīrusa antigēna pierādīšana un *C. difficile* A un B toksīna izdalīšana no fēcēm, savukārt 1 gadījumā vienlaicīgi tika pierādīts rota vīruss un *C. difficile* B toksīns. Pārējiem 7 *Clostridium difficile* pozitīvajiem pacientiem netika pierādīti citi zarnu infekciju ierosinātāji. Pacientu, kuru fēcēs *C. difficile* A un B toksīns bija pozitīvs, vidējais vecums bija 31 mēnesis jeb 2 gadi un 7 mēneši. Stacionārā tie pavadīja vidēji 2,6 guļu dienas. Tikai viens pacients pirms stacionēšanas saņēma 5 dienas ilgu antibakteriālu terapiju ar amoksicilīnu un 5 dienas – ar cefadroksilu. Stacionāra etapā antibiotiku terapiju saņēma tikai viens pacients – 1 dienas terapiju ar ampilīnu.

6 pacientu klīniskā diagnoze bija akūts gastroenterīts, 1 – akūts gastroenterokolīts, bet 1 – infekciozās mononukleozes sindroms ar funkcionāliem gremošanas traucējumiem. Visi šie pacienti tika stacionēti vidēji smagā vispārējā stāvoklī.

Pacientie ar pozitīvu *C. difficile* A un B toksīnu fēcēs vidējais leikocītu skaits bija $14\,524 \times 10^6/L$ un vidējās CRP vērtības – 17,42 mg/L.

Tika veikta Spīrmena rangu korelācijas analīze, lai noteiktu, vai ir statistiski ticama saistība ar pacientu vecumu, kā arī tika noteikts, vai pastāv atšķirības *C. difficile* A un B toksīna izolēšanā starp bērniem, kas apmeklē pirmsskolas iestādi vai skolu, un tiem, kas ir neorganizēti. Šajos gadījumos starp pētāmajiem lielumiem netika atklātas statistiski ticamas atšķirības ($p > 0,05$). Analizējot biežāko riska faktoru – stacionēšanas un citu ģimenes locekļu stacionēšanas, kā arī antibakteriālās terapijas saņemšanu pirms stacionēšanas un stacionāra etapā – saistību ar *C. difficile* A un B toksīna pozitivitāti, netika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp bērniem, kam šie riska faktori tika atzīmēti, un tiem, kam minēto riska faktoru nebija ($p > 0,05$). Tāpat netika novērota statistiski ticama saistība starp pozitīvu *C. difficile* A un B toksīna izdali, iestāšanās un klīnisko diagnozi, stāvokļa smagumu stacionējot un stacionēšanas ilgumu ($p > 0,05$). Pētot pacientu kopējo leikocītu skaitu un CRP vērtības, nebija statistiski ticamu atšķirību starp pacientu grupām ar pozitīvu *C. difficile* A un B toksīnu un pacientu grupu, kam tie bija negatīvi ($p > 0,05$).

Starp *C. difficile* A toksīnu un *C. difficile* B toksīnu šajā pētījumā pastāv cieša saistība (korelācijas koeficients $r_s = 0,81$, $p < 0,01$).

Diskusija

Pētījumā tika apkopoti dati par *C. difficile* A un B toksīna pozitivitāti bērniem, kas stacionēti BKUS no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam. 4,3% (8) pacientu bija pozitīvs gan *Clostridium difficile* A toksīns, gan *C. difficile* B toksīns, savukārt tikai *Clostridium difficile* B toksīns bija pozitīvs 1 pacientam. Šie dati atšķiras no literatūrā norādītajiem datiem par *C. difficile* diarejas biežumu stacionāros, kas, iespējams, saistīts ar atšķirīgo pētījuma populāciju; tiek uzskatīts, ka 80% no visiem *C. difficile* diareju gadījumiem sastopami vecuma grupā virs 65 gadiem [3].

Pētot bērnu populāciju, literatūrā ir ziņojumi par pacientiem, kuriem atrasts toksinogēnais *C. difficile*, bet, konsultējoties ar viņu ārstējošajiem ārstiem, noskaidrots, ka klīniskajā ainā dominē viegla diareja, kas tiek ārstēta simptomātiski un kam nav nepieciešama radikālāka terapija. Svarīgi ir arī tas, ka bērniem atrasts arī tikai B toksinogēns un nav A toksinogēna. No iepriekšējiem zinātniskajiem pētījumiem ir zināms, ka B toksīns rada sarežģījumus tikai, sinerģiski sadarbojoties ar A toksīnu, bet, ja nav A toksīna, tad tas izskaidro to, kāpēc bērniem nav raksturīgās *C. difficile* infekcijas ainas. Pēc literatūras datiem ir zināms, ka bērni līdz divu gadu vecumam var būt *C. difficile* nēsātāji [17].

Pētot diareju izraisītājus bērniem, E. Kleina (*Klein*) un līdzautori *C. difficile* B toksīna klātbūtni pierādīja 6,7% pacientu fēcū paraugos. A toksīns šajā pētījumā netika noteikts [18].

Pacientu ar pozitīvu *Clostridium difficile* A un B toksīnu vidējais vecums bija 31 mēnesis, kas nedaudz atšķiras no citu autoru minētā – E. Kleina (*Klein*) un līdzautoru pētījumā pacientu, kam tika pierādīts pozitīvs *C. difficile* B toksīns, vidējais vecums bija 18 mēneši [18].

Literatūrā CDAD izpausmes tiek aprakstītas kā ļoti variablas, sākot no vidēji smagas līdz smagai diarejai ar nogurumu, sāpēm vēderā, nelabu dūšu un vemšanu [5]. Pēc mūsu pētījuma rezultātiem grūti raksturot CDAD klīniku. *Clostridium difficile* pacientu grupa ir neliela, un jādomā, ka šie pacienti ir stacionēti ar citu akūtu zarnu infekciju klīniku, savukārt pierādītā *Clostridium difficile*, iespējams, uzskatāma par normālās mikrofloras pārstāvi.

Paraklīniskajos rādītājos par *C. difficile* infekciju varētu liecināt leukocitoze. Bouza un līdzautori min, ka leukocitoze, augstāka par 15 000, ir papildu pazīme *C. difficile* infekcijai. Pētījuma pacientiem, kam tika pierādīts pozitīvs *C. difficile* A un B toksīns, vidējais leukocītu skaits bija $14\,524 \times 10^3/L$, un, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas analīzi, netika pierādīta statistiski ticama saistība starp kopējo leukocītu skaitu un *C. difficile* toksīnu pozitivitāti ($p > 0,05$).

Par vienu no svarīgākajiem riska faktoriem *Clostridium difficile* infekcijai tiek uzskatīta antibakteriālā terapija [5, 14]. Pētījuma pacientu grupā, kam bija pozitīvi *Clostridium difficile* toksīni, tikai viens pacients no deviņiem pirms stacionēšanas bija saņēmis antibakteriālu terapiju, savukārt antibakteriālā terapija stacionārā tika nozīmēta tikai vienam pacientam. Analizējot saistību starp *C. difficile* toksīnu pozitivitāti un antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas ar Spīrmena rangu korelāciju analīzes metodi, netika iegūta statistiski ticama saistība ($p > 0,05$). Poļu autoru grupas pētījumā, analizējot *C. difficile* toksīna A pozitivitāti bērniem ar akūtu diareju, arī netika atklāta saistība starp iepriekšēju antibakteriālu terapiju un pierādītiem *Clostridium difficile* toksīniem [19].

Analizējot šajā pētījumā iegūtos rezultātus, nevar izdarīt viennozīmīgus secinājumus par *C. difficile* diarejas sastopamību bērniem. Iespējams, ka *C. difficile* ir diarejas etioloģiskais faktors pacientiem, kuru fecēs pierādīts A un B toksīns, ņemot vērā, ka bērniem iespējamās vieglas slimības formas [15], tomēr ir nepieciešama šīs problēmas tālāka izpēte. Turklāt, izvērtējot *C. difficile* A un B toksīna sastopamību bērniem, jāņem vērā arī asimptomātiskas nēsāšanas iespēja, kas visbiežāk sastopama zīdaiņiem – 40–60% gadījumu [20], samazinās pēc pirmā dzīves gada, bet ir iespējama arī pieaugušā vecumā – tās biežums atšķiras dažādu autoru pētījumos, sākot no 2% Zviedrijā līdz 15% Japānā [2].

Secinājumi

BKUS ārstētiem bērniem ar akūtu zarnu infekciju klīniku *Clostridium difficile* pierādīta 4,8% gadījumu. *Clostridium difficile* A un B toksīns vienlaicīgi pierādīti 4,3% (8) gadījumu, savukārt tikai *Clostridium difficile* B toksīns pierādīts 1 gadījumā.

Izmantojot Spīrmena rangu korelācijas analīzi, netika novērotas statistiski ticama saistība starp *C. difficile* A un B toksīna pozitivitāti un riska faktoriem ($p > 0,05$).

C. difficile prevalence bērniem, kam BKUS tika ārstēta diareja, ir 4,8%, un, saistībā ar diarejas klīniku, nevar izslēgt *C. difficile* kā etioloģisko faktoru, lai gan laboratoriskie rādītāji neliecina par bakteriālu infekciju. Tas jāņem vērā, veidojot tālākus izmeklēšanas algoritmus bērniem ar akūtu zarnu infekciju klīniku.

Pētījums tapis ar valsts pētījumu programmas "Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošo galveno patoloģiju zinātniska izpēte ar multidisciplināra pētnieciskā konsorcijs palīdzību" 7. projekta atbalstu.



Prevalence of *Clostridium difficile* among children treated in hospital with diarrhea

Abstract

Background. *Clostridium difficile* is an important cause of diarrhea in industrialized countries. It is responsible for approximately 3 million cases of diarrhea and colitis in the USA. The main risk factors of *C. difficile* infection are prolonged hospital stay and antibiotic use. There has been no research about prevalence of *C. difficile* infection in children in Latvia.

Objectives, materials and methods. The objective was to determine *C. difficile* prevalence in children treated in University Children's Hospital. A prospective research took place in the University Children's Hospital from October 2007 to March 2008. Subjects ($n = 187$) were hospitalized patients aged from 3 days to 16 years and 7 months with diarrhea or hemocolitis. Their feces was tested for *C. difficile* A and B toxins, rotavirus, norovirus, adenovirus and astrovirus, and stool culturing was performed.

Results. 55.6% (104) patients were diagnosed with gastroenteritis, 13.4% (25) – gastroenterocolitis, 5.3% (10) – enteritis, 9.1% (17) enterocolitis, 11.8% (22) – functional digestive system disorders, but 4.8% (9) had another diagnosis. Only 9.6% (18) of them had hemocolitis. 11.2% (21) have had previous hospitalization and 12.8% (24) had received antibacterial therapy before hospitalization in University Children's Hospital. The mean hospital stay was 4.1 days (min – 1 day, max – 90 days). Mean CRP value was 22.2 mg/L (min – 0,1 mg/L, max – 187.8 mg/L). Mean white blood count was $12\,553 \times 10^3/L$ (min – $1700 \times 10^3/L$, max – $40\,030 \times 10^3/L$).

29.4% (53) had positive rotavirus latex agglutination test in stool samples, 8 patients had norovirus, and 1 had adenovirus. In 94.1% (176) cases stool culturing was performed. 86.6% (162) of them were negative, in 6.4% (12) cases *Salmonella enteritidis* was isolated, and one case *Salmonella typhimurium* and *Shigella sonnei* was detected. In 3 cases a mixed infection was observed – *Salmonella enteritidis* together with rotavirus. An etiological agent was detected in total of 41.1% (77) cases. In 3.7% (7) patients blood culturing was performed, and in one case it was positive – *Lactococcus lactis* was isolated.

10.7% (20) received treatment with one antibiotic, 3.2% (6) got two antibiotics, 2.1% (4) – 3 antibiotics, and two patients received five and six antibiotics each.

DNA was isolated from stool specimens and *C. difficile* toxinogens were detected by PCR. *C. difficile* A toxin together with B toxin was detected in 4.3% (8) cases, but isolated *C. difficile* B toxin was detected in one patient. In one patient *C. difficile* A and B toxin was detected together with rotavirus, and in one *C. difficile* B toxin and rotavirus were detected simultaneously. One of these 9 patients received antibacterial therapy before hospitalization, and one did so in the hospital. Mean white blood count in patients with positive *C. difficile* A and B toxins was $14\,524 \times 10^3/L$ and mean CRP value was 17.42 mg/L.

Using Spearman correlation charts no statistically significant difference in positivity of *C. difficile* A and B toxins was found among children who received antibiotics before hospitalization and those who did not, and also in patients who were hospitalized before and those who were not ($p > 0.05$). Also there were no statistically confident connection between patients' age, hospital stay, mean white blood count and CRP values ($p > 0.05$). There is strong correlation between *C. difficile* toxin A and *C. difficile* toxin B ($r_s = 0.81$, $p < 0,01$).

Conclusion. *Clostridium difficile* was confirmed in 4.8% of patients treated in University Children's Hospital. There were no statistically significant differences between *C. difficile* toxins A and B and any of the risk factors ($p > 0.05$). As all these patients had diarrhea *C. difficile* can not be excluded as an etiological agent, although laboratory values do not show bacterial infection, and children can be asymptomatic carriers. This needs to be taken into account when developing diagnostic algorithms for children with diarrhea.

The work was supported by Latvian National Research Program in Medicine 2006–2009.

Literatūra

1. Pepin J., Valquette L., Alary M. E., et al. *Clostridium difficile* – Associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity // Canadian Medical Association Journal, 2004; 171 (5): 466–72.
2. Gerding D. N., Johnson S., Peterson L. R., et al. *Clostridium difficile* – associated diarrhea and colitis // Infectious Control and Hospital Epidemiology, 1995; 16: 459–477.
3. Kuijper E. J., Coignard B., Tüll P. Emergence of *Clostridium difficile* – associated disease in North America and Europe // Clinical Microbiology and Infection, 2006; 12 (6): 2–18.
4. Health Protection Agency – Surveillance of Healthcare Associated Infections Report 2007.
5. Bouza E., Burillo A., Munoz P. Antimicrobial Therapy of *Clostridium difficile* – Associated diarrhea // The Medical clinics of North America, 2006; 90: 1141–1163.
6. Poxton R. *Clostridium difficile*: are we getting it right? // The Biomedical Scientist, October 2005, 1034.
7. Pepin J., Valiquette L., Cossette B. Mortality attributal to nosocomial *Clostridium difficile* – associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec // CMAJ, October 2005; 1037–1042.
8. Long S., Fenebon L., Fitzgerald S., et al. First isolation and report of clusters of *C. difficile* PCR 027 cases in Ireland // Eurosurveillance, 26 April 2007, Volume 12, Issue 17.

9. Delme M., Ramboer I., Van Broeck I., Suetens C. Epidemiology of *C. difficile* toxinotype III, PCR – ribotype 027 associated disease in Belgium // Eurosurveillance, 14 September, 2006, Volume 11, Issue 37.
10. Tachon M., Cattone C., Balanckaert K., et al. First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 27 associated disease in France: preliminary report // Eurosurveillance, 4 May 2006, Volume 11, Issue 18.
11. McDonald L. C., Coignard B., Dubberke E., et al. Recommendations for Surveillance of *Clostridium difficile* – Associated Disease // Infection Control and Hospital Epidemiology, Feb. 2007; 28 (2): 140–145.
12. Durai R. Epidemiology, Pathogenesis, and Management of *Clostridium difficile* Infection // Dig Dis Sci, 2007; 52: 2958–2962.
13. Starr J. *Clostridium difficile* associated diarrhoea: diagnosis and treatment // British Medical Journal, 2005; 331: 498–501.
14. Blossom D. B., McDonald L. C. The Challenges Posed by Reemerging *Clostridium difficile* Infection // Clinical Infectious Diseases, 2007; 45: 222–227.
15. Wilson M. E. *Clostridium difficile* and Childhood Diarrhea: Cause, Consequence, or Confounder // Clinical Infectious Diseases, 2006; 43: 814–816.
16. Bidet P., Lalande V., Salauze B., et al. Comparison of PCR – Ribotyping, Arbitrarily PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Clostridium difficile* // Journal of Clinical Microbiology, July 2000; 2484–2487.
17. The Merck Manual of diagnosis and therapy / Editor Mark H. Beers, MD. – 18th ed.- Whitehouse Station, NJ; Merck Research Laboratories, 2006. – P. 1500.
18. Klein E. J., Boster D. R., Stapp J. R., et al. Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency Department: a prospective cohort study // Clin Infect Dis, 2006; 43: 807.
19. Rozkiewicz D., Zaremba M. L., Fiedoruk K., et al. *Clostridium difficile* toxin A and other enteropathogens in stool specimens of children hospitalized due to acute diarrhoea: Abstract // Przegl Epidemiol, 2005; 59 (3): 711–721.
20. Kuipers E. J., Surawicz C. M. *Clostridium difficile* infection // The Lancet, May 3, 2008; 371: 1486–1488.