

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανίχνευση του υπέρ-λοιμογόνου ριβοτύπου O27 του
βακτηρίου *Clostridium difficile* με τη χρήση μοριακών
τεχνικών**

**Detection of the hyper-virulent *Clostridium difficile*
ribotype O27 with molecular techniques**

Ιωάννου Ιωάννης

Αθήνα 2016

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης

Ι. ΠΑΠΑΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ (επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής,

Υπεύθυνος Μονάδας Μοριακής Διάγνωσης Βακτηριακών Λοιμώξεων

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (συνεπιβλέπων)

Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη

Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Για τη πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον κ. Παπαπαρασκευά Ιωσήφ, Επίκουρο Καθηγητή και υπεύθυνο της Μονάδας Μοριακής Διάγνωσης Βακτηριακών λοιμώξεων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, για την ανάθεση του θέματος, όπως επίσης και για την επίβλεψή του καθ' όλη τη διάρκεια αυτής. Η καθοδήγηση του, η τυπικότητα του καθώς και η άμεση ανταπόκριση του στις οποιεσδήποτε απορίες μου, όχι μόνο με διευκόλυναν στην πραγματοποίηση της εργασίας αλλά μου έδωσαν μια πλήρη εικόνα για το πώς πρέπει να πραγματοποιείται μια ορθή ερευνητική διαδικασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Τσακρή Αθανάσιο, Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και Διευθυντή του Εργαστηρίου, όπως επίσης και τα μέλη τεχνολογικού προσωπικού. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων όπως επίσης και τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Περίληψη

Το *Clostridium difficile* αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο μικρόβιο, σχετιζόμενο άμεσα με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Στις μέρες μας το *C. difficile* είναι αδιαμφισβήτη η κύρια αιτία πρόκλησης διάρροιας σχετιζόμενης με αντιβιοτικά στις ανεπτυγμένες χώρες και αποτελεί σημαντικό νοσογόνο παράγοντα των νοσηλευόμενων ασθενών. Το στέλεχος NAP1 (ριβότυπος O27) χαρακτηρίζεται ως υπερλοιμογόνο, λόγω μιας μονονουκλεοτιδικής μετάλλαξης (απαλοιφή) που φέρει στη θέση Δ117 του ρυθμιστικού γονιδίου *tcdC* και προκαλεί την υπερέκφραση των γονιδίων *tcdA* και *tcdB* που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες τοξίνες. Έτσι το υπερλοιμογόνο αυτό στέλεχος προκαλεί σοβαρότατες λοιμώξεις (ψευδομεμβρανώδης εντεροκολίτιδα) στους ασθενείς οι οποίοι συχνά καταλήγουν.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ριβότυπου O27 του βακτηρίου *C. difficile* με τη χρήση δυο μοριακών τεχνικών ενίσχυσης και ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, της Real-Time PCR και της PCR-ριβοτυπίας. Οι τεχνικές εφαρμόστηκαν σε ένα σύνολο 71 στελεχών του παθογόνου που απομονώθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς του νοσοκομείου ΓΝΑ “Λαϊκό” τα έτη 2012 και 2014.

Σε όλα τα στελέχη προσδιορίσθηκε η Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα των αντιβιοτικών μετρονιδαζόλη, μοξιφλοξασίνη, βανκομυκίνη και ριφαμπικίνη με την μέθοδο των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης. Ακολούθησε η εκχύλιση του βακτηριακού DNA η οποία πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα που συλλέχθηκαν από αναερόβια καλλιέργεια 72 ωρών, με την χρήση του συστήματος στηλών διήθησης QIAamp DNA mini kit. Όλα τα στελέχη υποβλήθηκαν σε Real-Time PCR και PCR ριβοτυπία.

Αντοχή ανιχνεύθηκε μόνο έναντι της μοξιφλοξασίνης. Όλα τα στελέχη ήταν αρνητικά ως προς την ανίχνευση της μετάλλαξης στη θέση Δ117 του γονιδίου *tcdC*. Ακολούθως η PCR-ριβοτυπία διαχώρισε επιτυχώς όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν, όμως δεν κατέταξε κάποιο στέλεχος στον ριβότυπο O27.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις λίγες μέχρι στιγμής μελέτες που αναφέρουν την μη ύπαρξη του συγκεκριμένου υπέρ-λοιμογόνου στελέχους στον ελληνικό χώρο.

Abstract

Clostridium difficile consists a major pathogen that is highly associated with hospital-acquired infections. Nowadays, *Clostridium difficile* is undoubtedly the leading definable cause of antibiotics associated diarrhea in developed countries, and therefore comprises an important pathogenic factor for hospitalized patients. NAP1-type isolates (ribotype O27), are characterized as hyper-virulent due to a mutation (deletion) at position $\Delta 117$ of the regulatory gene *tcdC* that causes the hyperexpression of genes *tcdA* and *tcdB* that encode for the corresponding toxins. Thus this virulent type causes severe infections (pseudomembranous colitis) to patients, who often decease.

The aim of this study was the detection of ribotype O27 of *C. difficile* with the use of two molecular amplification and screening techniques, that of Real-Time PCR and PCR-ribotyping. The techniques were applied on a total of 71 specimens of the pathogen, which were isolated from hospitalized patients of G.H.A. "Laiko" hospital the years 2012 and 2014.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics metronidazole, moxifloxacin, vancomycin and rifampicin was determined using the gradient strip method. DNA extraction was performed from bacterial cells harvested from a 72h anaerobic culture using the spin column system QIAamp DNA mini kit. All isolates were tested using Real-Time PCR and PCR ribotyping.

Resistance among the isolates was detected only against moxifloxacin. All isolates were negative for the mutation at position $\Delta 117$ of the *tcdC* gene. Similarly, PCR-ribotyping typed successfully and discriminated all isolates but didn't classify any one to ribotype O27.

These results are in agreement with the very limited number of national studies, reporting that the O27 ribotype is not yet present among the Greek patients.

Περιεχόμενα

1. Επισκόπηση των κλωστηριδίων (Clostridium)	8
1.1 Γενικά στοιχεία	8
1.2 Ταξινόμηση των κλωστηριδίων	9
1.3 Μορφολογία κλωστηριδίων	12
1.4 Βιοχημικές ιδιότητες κλωστηριδίων	13
1.5 Επιδημιολογία κλωστηριδίων	15
2. Το είδος <i>Clostridium difficile</i>	17
2.1 Εισαγωγή	17
2.2 Ανακάλυψη και ιστορικά στοιχεία	18
2.3 Γενωμική και φυλογένεια	19
2.4 Η εμφάνιση του ριβότυπου 027	22
2.5 Η παθογένεια του <i>C. difficile</i>	24
2.5.1 Πρόσληψη και αποικισμός του <i>C. difficile</i>	25
2.5.2 Ο ρόλος των τοξινών A και B και η εκδήλωση συμπτωμάτων	27
2.5.3 Οργάνωση και δομή των γονιδίων των τοξινών A και B	28
2.5.3.1 Γονιδιακή οργάνωση του τόπου PaLoc στο στέλεχος 027	30
2.5.4 Ο μηχανισμός δράσης των τοξινών A και B	31
2.6 Το εύρος των ασθενειών που προκαλούνται από λοίμωξη του <i>C. difficile</i>	32
2.6.1 Ψευδομεμβρανώδης και οξεία κολίτιδα	33
2.7 Διάγνωση του <i>C. difficile</i>	34
2.8 Θεραπείες των λοιμώξεων από <i>C. difficile</i>	35
2.9 Το δημόσιο οικονομικό κόστος αντιμετώπισης των λοιμώξεων από <i>C. difficile</i>	37
3. Υλικά και μέθοδοι της πειραματικής διαδικασίας	40
3.1 Συλλογή στελεχών	40
3.2 Έλεγχος ευαισθησίας	40
3.3 Εκχύλιση βακτηριακού DNA	40
3.4 Real-Time PCR	41

3.5 PCR- Ριβοτυπία	42
3.6 Επιδημιολογικά δεδομένα ασθενών.....	43
4. Αποτελέσματα	44
4.1 Συλλογή στελεχών	44
4.2 Έλεγχος ευαισθησίας.....	44
4.3 Εκχύλιση βακτηριακού DNA.....	44
4.4 Real-Time PCR.....	45
4.5 PCR- Ριβοτυπία	45
4.6 Επιδημιολογικά δεδομένα ασθενών.....	45
5. Συζήτηση.....	46

1. Επισκόπηση των Κλωστηριδίων (*Clostridium*)

1.1 Γενικά στοιχεία

Τα κλωστηρίδια αποτελούν ένα κατά Gram-θετικό γένος βακτηρίων. Είναι υποχρεωτικά αναερόβια και ικανά να παράγουν ενδοσπόρια. Τα φυσιολογικά αναπαραγωγικά βακτηριακά κύτταρα των κλωστηριδίων έχουν ραβδόμορφο σχήμα, από το οποίο προέρχεται και η ονομασία τους από την ελληνική λέξη “κλωστήρ”. Τα ενδοσπόρια τους έχουν χαρακτηριστικό κυλινδρικό σχήμα που τα διαχωρίζει από τα υπόλοιπα βακτηριακά ενδοσπόρια, τα οποία είναι συνήθως ωοειδή [1].

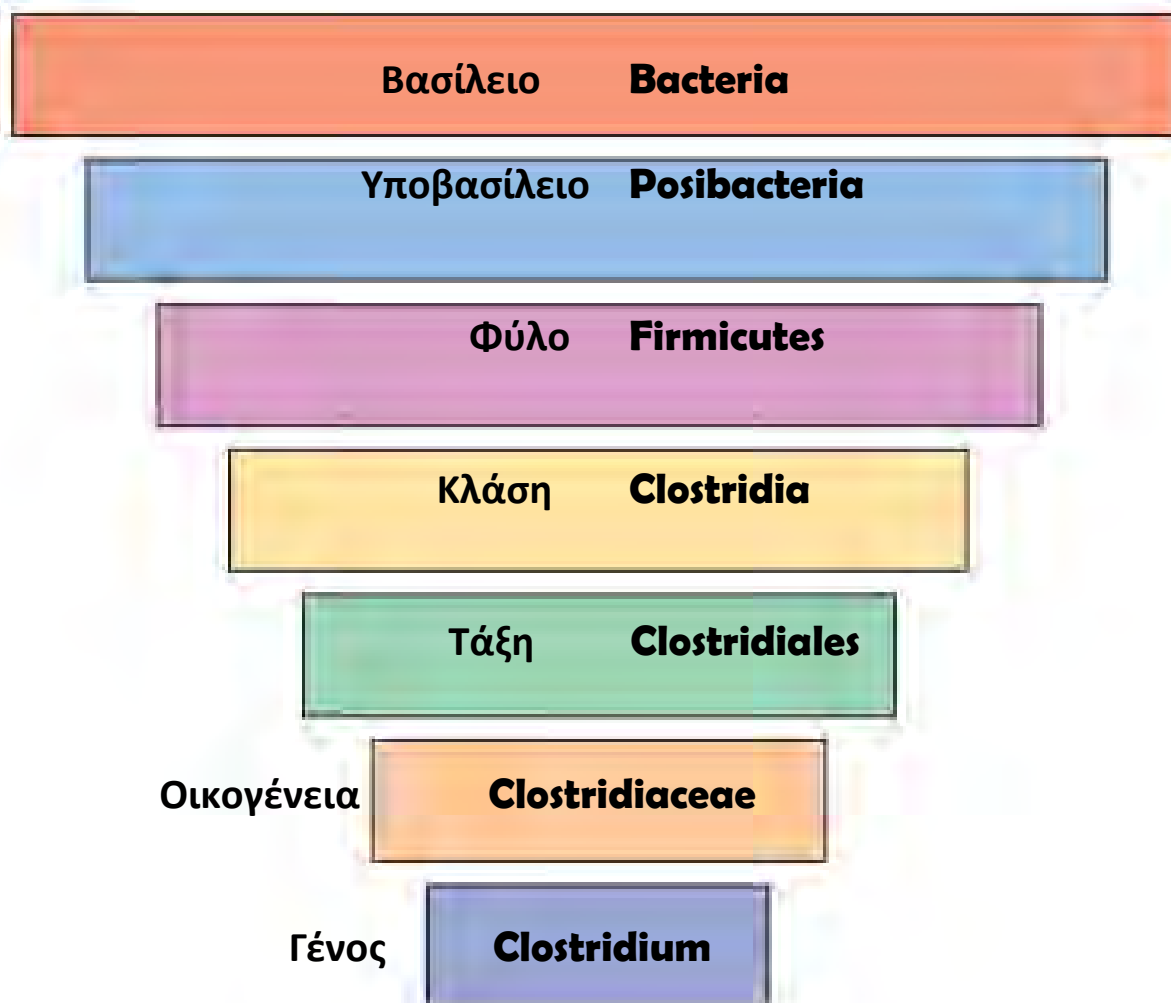
Τα είδη των κλωστηριδίων απαντώνται σε ποικίλα εδάφη καθώς επίσης και στον εντερικό σωλήνα των ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Μερικά είδη είναι κατεξοχήν παθογόνα για τον άνθρωπο, πολλά είναι δυνητικά παθογόνα και αρκετά ακόμη είδη είναι σαπροφυτικά. Το γένος των κλωστηριδίων είναι από τα μεγαλύτερα και πλέον ετερογενή γένη βακτηρίων και μπορεί να διαιρεθεί σε αρκετές φυλογενετικές ομάδες (clusters). Η αναλογία βάσεων G+C του γονιδιώματός τους έχει πολύ μεγάλο εύρος (22-55 mol%) [2].

Χαρακτηριστικό των κλωστηριδίων είναι η ικανότητα παραγωγής ισχυρών εξωτοξινών. Αυτές ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την εκδήλωση των συμπτωμάτων των λοιμώξεων, που προκαλούν στον άνθρωπο [3].

Οι κλωστηριδιακές λοιμώξεις διακρίνονται σε ενδογενείς (πηγή η χλωρίδα του ασθενούς) και σε εξωγενείς (πηγή το περιβάλλον). Ειδικά οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *Clostridium difficile* χαρακτηρίζονται ως μικτές (ενδο-εξωγενείς), επειδή το συγκεκριμένο είδος αφενός ανευρίσκεται στην εντερική χλωρίδα και αφετέρου μπορεί με τους σπόρους του να μεταδοθεί από ασθενή σε ασθενή, όπως έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια νοσοκομειακών επιδημιών διάρροιας ή ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας [4].

1.2 Ταξινόμηση των κλωστηριδίων

Τα κλωστηρίδια υπάγονται ταξινομικά στο γένος *Clostridium*. Η πλήρης ταξινομική τους ιεραρχία περιγράφεται στον πίνακα 1.



Πίνακας 1. Ιεραρχική ταξινόμηση κλωστηριδίων.

Στο γένος έχουν προς το παρόν ταξινομηθεί 208 είδη και υποείδη, τα οποία φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2.

<i>C. absonum</i>	<i>C. cylindrosporum</i>	<i>C. limosum</i>	<i>C. sardiniense</i>
<i>C. aceticum</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. litorale</i>	<i>C. sardiniensis</i>
<i>C. acetireducens</i>	<i>C. diolis</i>	<i>C. lituseburense</i>	<i>C. sartagoforme</i>
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. disporicum</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	<i>C. sartagoformum</i>
<i>C. acidisoli</i>	<i>C. drakei</i>	<i>C. lortetii</i>	<i>C. scatologenes</i>
<i>C. acidurici</i>	<i>C. durum</i>	<i>C. lundense</i>	<i>C. schirmacherense</i>
<i>C. acidurici</i>	<i>C. estertheticum</i>	<i>C. magnum</i>	<i>C. scindens</i>
<i>C. aerotolerans</i>	<i>C. estertheticum subsp. estertheticum</i>	<i>C. malenominatum</i>	<i>C. septicum</i>
<i>C. akagii</i>	<i>C. estertheticum subsp. Laramiense</i>	<i>C. mangenotii</i>	<i>C. sordellii</i>
<i>C. aldrichii</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. mayombeii</i>	<i>C. sphenoides</i>
<i>C. algidicamis</i>	<i>C. felsineum</i>	<i>C. methoxybenzovorans</i>	<i>C. spiroforme</i>
<i>C. algidixylanolyticum</i>	<i>C. fervidum</i>	<i>C. methylpentosum</i>	<i>C. sporogenes</i>
<i>C. alkalicellulosi</i>	<i>C. fervidus</i>	<i>C. neopropionicum</i>	<i>C. sporosphaeroides</i>
<i>C. aminophilum</i>	<i>C. fimetarium</i>	<i>C. nexile</i>	<i>C. stercorarium</i>
<i>C. aminovalericum</i>	<i>C. formicaceticum</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. stercorarium subsp. leptospartum</i>
<i>C. amygdalinum</i>	<i>C. formicoaceticum</i>	<i>C. oceanicum</i>	<i>C. stercorarium subsp. stercorarium</i>
<i>C. arcticum</i>	<i>C. frigidicamis</i>	<i>C. orbiscindens</i>	<i>C. stercorarium subsp. hermolacticum</i>
<i>C. argentinense</i>	<i>C. frigoris</i>	<i>C. oroticum</i>	<i>C. sticklandii</i>
<i>C. aurantibutyricum</i>	<i>C. ganghwense</i>	<i>C. oxalicum</i>	<i>C. straminisolvens</i>
<i>C. barati</i>	<i>C. gasigenes</i>	<i>C. papyrosolvans</i>	<i>C. subterminale</i>
<i>C. baratii</i>	<i>C. ghoni</i>	<i>C. paradoxum</i>	<i>C. symbiosum</i>
<i>C. barkeri</i>	<i>C. ghonii</i>	<i>C. paraperfringens</i>	<i>C. termitidis</i>
<i>C. bartlettii</i>	<i>C. glycolicum</i>	<i>C. paraputrificum</i>	<i>C. tertium</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. grantii</i>	<i>C. pascui</i>	<i>C. tetani</i>
<i>C. bifermentans</i>	<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. pasteurianum</i>	<i>C. tetanomorphum</i>
<i>C. boltaeae</i>	<i>C. halophilum</i>	<i>C. peptidivorans</i>	<i>C. thermaceticum</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>C. hastiforme</i>	<i>C. perenne</i>	<i>C. thermautotrophicum</i>
<i>C. bowmanii</i>	<i>C. hathewayi</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. thermoaceticum</i>
<i>C. bryantii</i>	<i>C. herbivorans</i>	<i>C. pfennigii</i>	<i>C. thermoalcaliphilum</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>C. hiranonis</i>	<i>C. phytofermentans</i>	<i>C. thermoautotrophicum</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. piliforme</i>	<i>C. thermobutyricum</i>
<i>C. caminitermale</i>	<i>C. homopropionicum</i>	<i>C. polysaccharolyticum</i>	<i>C. thermocellum</i>
<i>C. carboxidivorans</i>	<i>C. hungatei</i>	<i>C. populeti</i>	<i>C. thermocopriae</i>
<i>C. carnis</i>	<i>C. hydroxybenzoicum</i>	<i>C. propionicum</i>	<i>C. thermohydrosulfuricum</i>
<i>C. celatum</i>	<i>C. hylemonae</i>	<i>C. proteoclasticum</i>	<i>C. thermolacticum</i>
<i>C. celerecrescens</i>	<i>C. indolis</i>	<i>C. proteolyticum</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
<i>C. cellobioparum</i>	<i>C. innocuum</i>	<i>C. psychrophilum</i>	<i>C. thermopapyrolyticum</i>
<i>C. cellulofementans</i>	<i>C. intestinale</i>	<i>C. puniceum</i>	<i>C. thermosaccharolyticum</i>
<i>C. cellulolyticum</i>	<i>C. intestinalis</i>	<i>C. purinilyticum</i>	<i>C. thermosuccinogenes</i>
<i>C. cellulosi</i>	<i>C. irregulare</i>	<i>C. purinolyticum</i>	<i>C. thermosulfurigenes</i>
<i>C. cellulovorans</i>	<i>C. irregularis</i>	<i>C. putrefaciens</i>	<i>C. thermosulfurogenes</i>
<i>C. chartatabidum</i>	<i>C. isatidis</i>	<i>C. putrificum</i>	<i>C. thiosulfatireducens</i>
<i>C. chauvoei</i>	<i>C. jejuense</i>	<i>C. querciculum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. josui</i>	<i>C. quinii</i>	<i>C. uliginosum</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. kluyveri</i>	<i>C. ramosum</i>	<i>C. ultunense</i>
<i>C. coccoides</i>	<i>C. lactatifermentans</i>	<i>C. rectum</i>	<i>C. villosum</i>
<i>C. cochlearium</i>	<i>C. lacusfryxellense</i>	<i>C. roseum</i>	<i>C. vincentii</i>
<i>C. cocleatum</i>	<i>C. laramiense</i>	<i>C. saccharobutylicum</i>	<i>C. viride</i>
<i>C. colicanis</i>	<i>C. lentocellum</i>	<i>C. saccharolyticum</i>	<i>C. xylanolyticum</i>
<i>C. colinum</i>	<i>C. lentoputrescens</i>	<i>C. accharoperbutylaceticum</i>	<i>C. xylanovorans</i>
<i>C. collagenovorans</i>	<i>C. leptum</i>		

Πίνακας 2. Είδη και υποείδη του γένους *Clostridium*[www.itis.gov].

Ωστόσο, ο αριθμός των ειδών που ενοχοποιούνται για την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο είναι σχετικά μικρός (πίνακας 3). Τα περισσότερα από τα κλωστηρίδια με ιατρικό ενδιαφέρον έχουν τοποθετηθεί στην ομάδα I του γένους *Clostridium*.

Είδος	Ασθένεια	Συχνότητα
<i>C. difficile</i>	Ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα, διάρροια	Συνήθης
<i>C. perfringens</i>	Λοιμώξεις μαλακών ιστών, τροφική δηλητηρίαση, σηψαιμία, εντερική νέκρωση	Συνήθης
<i>C. septicum</i>	Αεριογόνος γάγγραινα, σηψαιμία	
<i>C. botulinum</i>	Αλλαντίαση	Μη συνήθης
<i>C. tetani</i>	Τέτανος	Μη συνήθης
<i>C. tertium</i>	Καιροσκοπικές λοιμώξεις	Μη συνήθης
<i>C. baratii</i>	Αλλαντίαση	Σπάνια
<i>C. butyricum</i>	Αλλαντίαση	Σπάνια
<i>C. clostridioforme</i>	Καιροσκοπικές λοιμώξεις	Σπάνια
<i>C. histolyticum</i>	Αεριογόνος γάγγραινα	Σπάνια
<i>C. innocuum</i>	Καιροσκοπικές λοιμώξεις	Σπάνια
<i>C. novyi</i>	Αεριογόνος γάγγραινα	Σπάνια
<i>C. ramosum</i>	Καιροσκοπικές λοιμώξεις	Σπάνια
<i>C. sordellii</i>	Αεριογόνος γάγγραινα, σύνδρομο σηψαιμικού σοκ	Σπάνια
<i>C. sporogenes</i>	Καιροσκοπικές λοιμώξεις	Σπάνια

Πίνακας 3. Είδη *Clostridium* και οι λοιμώξεις που προκαλούν στον άνθρωπο [Murray P. Medical Microbiology, 7th Edition, Elsevier].

1.3 Μορφολογία κλωστηριδίων

Τα κλωστηρίδια αποτελούν μια οικογένεια μεγάλων βακτηριδίων, μήκους 3-19 μm και πλάτους 0.4-2.6 μm, που έχουν την ικανότητα να παράγουν σπόρους. Από μορφολογικής άποψης μπορούν να διακριθούν οι βλαστικές (ή φυτικές) μορφές και οι σπόροι αυτών. Η βλαστική μορφή στα περισσότερα κλωστηρίδια έχει σχήμα ευθείας ή κεκαμμένου βακτηριδίου, που ποικίλει από κοκκοβακτηρίδιο μέχρι μακρύ νηματοειδές. Τα βακτήρια έχουν παράλληλες πλευρές και τα άκρα τους μπορεί να λεπτύνονται βαθμιαία, να είναι αποστρογγυλεμένα ή ορθογώνια. Μερικά είναι τόσο πολύμορφα που η ταυτοποίησή τους με βάση τα μορφολογικά κριτήρια είναι σχεδόν αδύνατη. Η μορφολογία ενός στελέχους μπορεί να παραλλάσσει όχι μόνο στην ίδια καλλιέργεια αλλά και από καλλιέργεια σε καλλιέργεια. Εμφανίζονται μονήρη, σε ζεύγη ή σε αλυσίδες με ποικίλο μήκος. Σε μερικά είδη, όπως τα *C. cocleatum* και *C. spiroforme*, αρκετά βακτηρίδια συνδέονται σε συμπαγείς ελικοειδείς και σπειροειδείς σχηματισμούς [5]. Τα περισσότερα είδη χρωματίζονται θετικά κατά Gram, κατά τη διάρκεια του πρώιμου σταδίου ανάπτυξης. Ωστόσο, κάποια είδη (όπως τα *C. ramosum* και *C. clostridiforme*) σχεδόν πάντοτε εμφανίζονται ως Gram-αρνητικά, μετά από 24ωρη επώαση. Μερικά είδη (συμπεριλαμβανομένου του *C. tetani*) εμφανίζονται ως Gram-αρνητικά όταν έχουν αναπτυχθεί οι σπόροι. Σχεδόν όλα τα είδη έχουν την ικανότητα κίνησης, με τη βοήθεια περιτρίχων βλεφαρίδων (flagella). Τα μη κινητά είδη που απομονώνονται από κλινικά δείγματα, είναι τα *C. perfringens*, *C. ramosum* και *C. innocuum*. Οι σπόροι των κλωστηριδίων έχουν σχήμα που ποικίλει από σφαιρικό έως ωοειδές και εμφανίζονται με τη μορφή διόγκωσης στο σώμα του βακτηριδίου. Οι σπόροι αναπτύσσονται σε διάφορες θέσεις του μικροβιακού κυττάρου, ανάλογα με το είδος. Μπορεί να είναι τελικοί (στο άκρο του βακτηριακού σώματος), υποτελικοί (σε μικρή απόσταση από το άκρο) ή κεντρικοί, δίνοντας διάφορα σχήματα στα κλωστηρίδια. Έτσι παρατηρούνται μορφές σχήματος τυμπάνου (*C. tetani*), λεμονιού (*C. novyi*, *C. septicum*) κλπ. Τα είδη *C. perfringens* και *C. butyricum* φέρουν έλυτρο [6].

1.4 Βιοχημικές ιδιότητες κλωστηριδίων

Συνήθως η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των κλωστηριδίων γίνεται βάσει των βιοχημικών τους ιδιοτήτων. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι οι ακόλουθες.

Η δοκιμασία καταλάσης είναι σπάνια θετική (και σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι ασθενώς θετική). Ακόμη, επειδή τα κλωστηρίδια στερούνται συστήματος κυττοχρωμάτων, η δοκιμασία οξειδάσης είναι αρνητική. Μερικά κλωστηρίδια συνθέτουν δισμουτάση του υπεροξειδικού ανιόντος. Τα είδη *Clostridium* συνήθως είναι είτε ζυμωτικά (σακχαρολυτικά), όπως τα *C. novyi*, *C. perfringens* και *C. septicum*, είτε πρωτεολυτικά, όπως τα *C. histolyticum* και *C. sporogenes*. Ο διαχωρισμός όμως αυτός δεν είναι απόλυτος. Κάποια είδη εμφανίζουν και τα δύο χαρακτηριστικά. Έτσι, το πρωτεολυτικό *C. sporogenes* εμφανίζει μικρή σακχαρολυτική δραστηριότητα, ενώ το σακχαρολυτικό *C. perfringens* είναι και ελαφρώς πρωτεολυτικό. Τέλος, υπάρχουν είδη που είναι αζυμωτικά και μη πρωτεολυτικά.

Αρκετά κλωστηρίδια παράγουν μια ποικιλία λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (π.χ. οξεικό και βουτυρικό), όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει πεπτόνες, εκχύλισμα ζύμης και γλυκόζη. Παράγουν επίσης αρκετά άλλα προϊόντα ζύμωσης, όπως ακετόνη, βουτανόλη και άλλες αλκοόλες.

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι κυριότερες βιοχημικές αντιδράσεις και ιδιότητες ειδών κλωστηριδίων που εμφανίζουν ιατρικό ενδιαφέρον.

<i>Clostridium</i> species	Aerotolerant Growth	Swarming	Double-Zone β -Hemolysis	Chartreuse Fluorescence	Gram-Stain Reaction	Spore Position	Motility	Indole	Lecithinase	Lipase	Proteolysis in Milk	Gelatin Hydrolysis	Acid from Lactose	Urease
<i>C. bifementans</i>	-	T	-	-	+	ST	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>C. clostridioforme</i>	-	T	-	-	-	ST	- ^L	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. difficile</i>	-	T	-	+	+	ST	+	-	-	-	-	- ^L	-	-
<i>C. novyi</i> type A	-	T	-	-	+	ST	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>C. perfringens</i>	-	T	+	-	+	- ST	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>C. ramosum</i>	-	T	-	-	-	(T)	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. septicum</i>	-	+	-	-	+	ST	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. sordellii</i>	-	T	-	-	+	ST	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. sporogenes</i>	-	T	-	-	+	ST	+	-	- ^L	+	+	+	-	-
<i>C. tertium</i>	+	-	-	-	+	T	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. tetani</i>	-	+	-	-	+	T	+	- ^L	-	-	-	+	-	-

Modified from Engelkirk PG et al: *Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology*, Belmont, CA, 1992, Star.

ST, Subterminal; T, terminal; -ST, usually not observed but subterminal when seen; (T), variable but usually terminal; +, most strains positive; -^L, most strains negative.

Πίνακας 4. Οι κυριότερες βιοχημικές αντιδράσεις και ιδιότητες των κλινικά σημαντικών κλωστηριδίων [Engelkirk PG et al: *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*, Belmont, CA, 1992, Star].

1.5 Επιδημιολογία κλωστηριδίων

Τα κλωστηρίδια μπορούν να εμφανιστούν παντού στη φύση, παρόλα αυτά οι κύριες δεξαμενές τους είναι το έδαφος και ο πεπτικός σωλήνας αρκετών ζώων και του ανθρώπου [7]. Τα είδη *C. subterminale*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. indolis*, *C. bifementans*, *C. mangenotii* και *C. perfringens* απομονώνονται συχνότερα από το έδαφος. Άλλα κλωστηρίδια, που έχουν επίσης βρεθεί σε δείγματα εδάφους αν και σπανιότερα, είναι τα *C. botulinum* και *C. tetani*. Ειδικά στην περίπτωση του *C. perfringens*, η εκτεταμένη του διασπορά στο έδαφος συνεπάγεται τη συχνή του παρουσία σε επιφάνειες και αντικείμενα που εκτίθενται στη σκόνη, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων. Η ημερήσια λήψη πάντως από τον άνθρωπο του *C. perfringens* με την τροφή είναι μικρή και δεν ξεπερνά τα 500 βακτήρια [7].

Κλωστηρίδια απομονώνονται συχνά από τα κόπρανα νεογνών, κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της ζωής τους, ιδιαίτερα σε όσα δεν θηλάζουν και τρέφονται με τεχνητό γάλα. Κόπρανα βρεφών ηλικίας 6-20 μηνών περιέχουν σχεδόν το ίδιο μικροβιακό φορτίο *C. perfringens* με τους ενήλικους (10^3 - 10^8 CFU/gr) [8]. Επίσης, το *C. difficile* ανευρίσκεται συχνότατα στα κόπρανα βρεφών, αν και απομονώνεται σπάνια από ασυμπτωματικούς ενήλικες σε συχνότητα που δεν ξεπερνά το 3-4% [9]. Αρκετά ακόμη είδη κλωστηριδίων, όπως τα *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. parapatrificum*, *C. sporogenes*, *C. tetrium*, *C. bifementans* και *C. butyricum*, εδράζονται στο κατώτερο τμήμα του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου, και αποτελούν μέλη της φυσιολογικής του χλωρίδας. Με λίγες εξαιρέσεις, τα περισσότερα είδη αποτελούν σαπρόφυτα.

Τα κλωστηρίδια μπορούν να κατανεμηθούν γεωγραφικά σε ποικίλα μέρη. Κάποια εμφανίζονται σε όλα τα μέρη του κόσμου (*C. tetani*) [2], ενώ άλλα σε ορισμένες μόνο γεωγραφικές περιοχές (*C. argentinense*) [10].

Η οικολογική κατανομή τους σχετίζεται με διάφορες παραμέτρους, όπως ο αντιγονικός τύπος του κλωστηριδίου, η ηλικία του ξενιστή και το περιβάλλον.

Το *C. perfringens* τύπου Α είναι διαδεδομένο στο περιβάλλον και τον εντερικό σωλήνα ανθρώπου και ζώων ενώ στελέχη *C. perfringens* τύπων Β, C, D και Ε είναι υποχρεωτικά παράσιτα οικιακών ζώων, και μόνο περιστασιακά του ανθρώπου. Σπόροι του *C. tetani* έχουν βρεθεί σε αίθουσες χειρουργείων, διαδρόμους χειρουργικών κλινικών και χειρουργικά ράμματα. Το *C. difficile* αποικίζει σε μεγάλο ποσοστό τον εντερικό σωλήνα των βρεφών [11] και των ενδονοσοκομειακών ασθενών (20-46%) [12]. Η ευρεία οικολογική διασπορά των κλωστηριδίων έχει ως συνέπεια να μολύνονται τραύματα και τρόφιμα και να προκαλούνται σοβαρές νόσοι είτε από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς είτε από τις τοξίνες που παράγουν. Νοσήματα προκαλούμενα από κλωστηρίδια εξωγενούς προέλευσης (αλλαντίαση, τέτανος, γάγγραινα κλπ.) είναι μεγάλης κλινικής σημασίας και είναι γνωστά από τους ιστορικούς χρόνους. Επίσης, έχουν καταγραφεί επιδημίες ενδονοσοκομειακής διάρροιας από στελέχη *C. difficile* [13]. Εντούτοις, είναι συχνότερες οι ενδογενείς λοιμώξεις, στις οποίες εμπλέκονται είδη κλωστηριδίων της φυσιολογικής χλωρίδας του ξενιστή. Όπως και στην περίπτωση άλλων ενδογενών αναερόβιων λοιμώξεων (ενδοκαρδίτιδα, εγκεφαλικό απόστημα, πνευμονία από εισρόφηση, ενδοκοιλιακό απόστημα), οι κλωστηριδιακές λοιμώξεις αναπτύσσονται κάτω από ειδικές συνθήκες. Στους συνήθεις προδιαθεσικούς παράγοντες περιλαμβάνονται τραυματισμοί, χειρουργικές επεμβάσεις, αγγειακή στάση, αποφράξεις, θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά ή χημειοθεραπευτικά, θεραπεία με αντιβιοτικά και παρουσία υποκείμενης νόσου (νεοπλασίας, σακχαρώδους διαβήτη κλπ.) [14]. Υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, τα κλωστηρίδια μπορούν να διεισδύσουν και να πολλαπλασιαστούν σχεδόν σε οποιονδήποτε ιστό.

2. Το είδος *Clostridium difficile*

2.1 Εισαγωγή

Το *Clostridium difficile* αποτελεί ένα Gram-θετικό, αναερόβιο βακτήριο που έχει την ικανότητα να παράγει ενδοσπόρια. Έχει ραβδοειδή μορφή και μήκος περίπου έως και 6μm (εικόνες 1-2). Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, αν και βρισκόταν σε μια σχετική αφάνεια, έφτασε να αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο μικρόβιο, σχετιζόμενο άμεσα με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις [15-17]. Στις μέρες μας το *C. difficile* είναι αδιαμφισβήτητα η κύρια αιτία πρόκλησης διάρροιας σχετιζόμενης με αντιβιοτικά στις ανεπτυγμένες χώρες και αποτελεί σημαντικό θνησιγενή παράγοντα των νοσηλευόμενων ασθενών [18-19]. Έτσι το *C. difficile* αποτελεί ένα μείζονος βαρύτητας ενδονοσοκομειακό λοιμογόνο παράγοντα με σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των ασθενών αλλά και την οικονομική επιβάρυνση των συστημάτων υγείας.



Εικόνα 1. Μικροφωτογραφία (φίλτρο 1μm) του *C. difficile* προερχόμενη από καλλιέργεια κοπράνων [Janice Haney Carr, Centers for Disease Control and Prevention]



Εικόνα 2. Τρισδιάστατη αναπαράσταση του *C.difficile* [Kateryna Kon illustration].

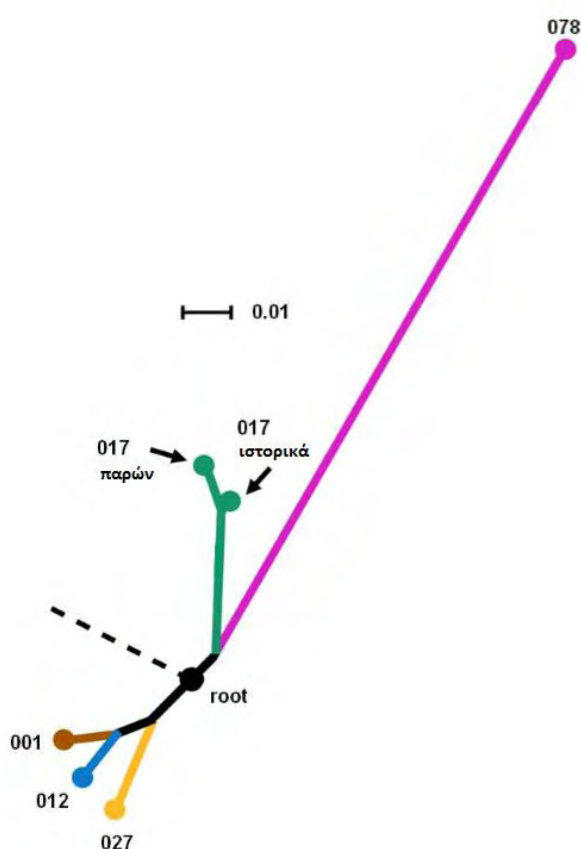
2.2 Ανακάλυψη και ιστορικά στοιχεία

Το *C. difficile* αρχικά ανακαλύφθηκε από τους Hall και Ο'Toole το 1935, οι οποίοι το απομόνωσαν από κόπρανα υγιών νεογνών[20] και του απέδωσαν την ονομασία βάκιλος ο δύσκολος (*Bacillus difficillis*), λόγω των δυσκολιών που αντιμετώπισαν στην απομόνωση και την καλλιέργεια του. Στη συνέχεια ταξινομήθηκε στο γένος των κλωστηριδίων και πήρε την τελική του ονομασία "*Clostridium difficile*". Παρόλα αυτά την εποχή εκείνη το βακτήριο θεωρήθηκε περισσότερο ως φυσικά συμβιωτικό της εντερικής χλωρίδας παρά ως μια απειλή προς την ανθρώπινη υγεία και έτσι τράβηξε μικρό ερευνητικό ενδιαφέρον .

2.3 Γενωμική και φυλογένεια

Το *C. difficile* αποτελεί ένα βακτηριακό είδος με ευρεία γενετική ποικιλότητα. Το υψηλής δυναμικής, μωσαϊκό γονιδίωμα του προσφέρεται για έντονη γονιδιακή ανταλλαγή [21-23]. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 280 ριβότυποι, γεγονός το οποίο υποδηλώνει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Η ριβοτυπία είναι μια διαδικασία τυποποίησης του παθογόνου, λεπτομέρειες της οποίας θα παρατεθούν αναλυτικά στην συνέχεια.

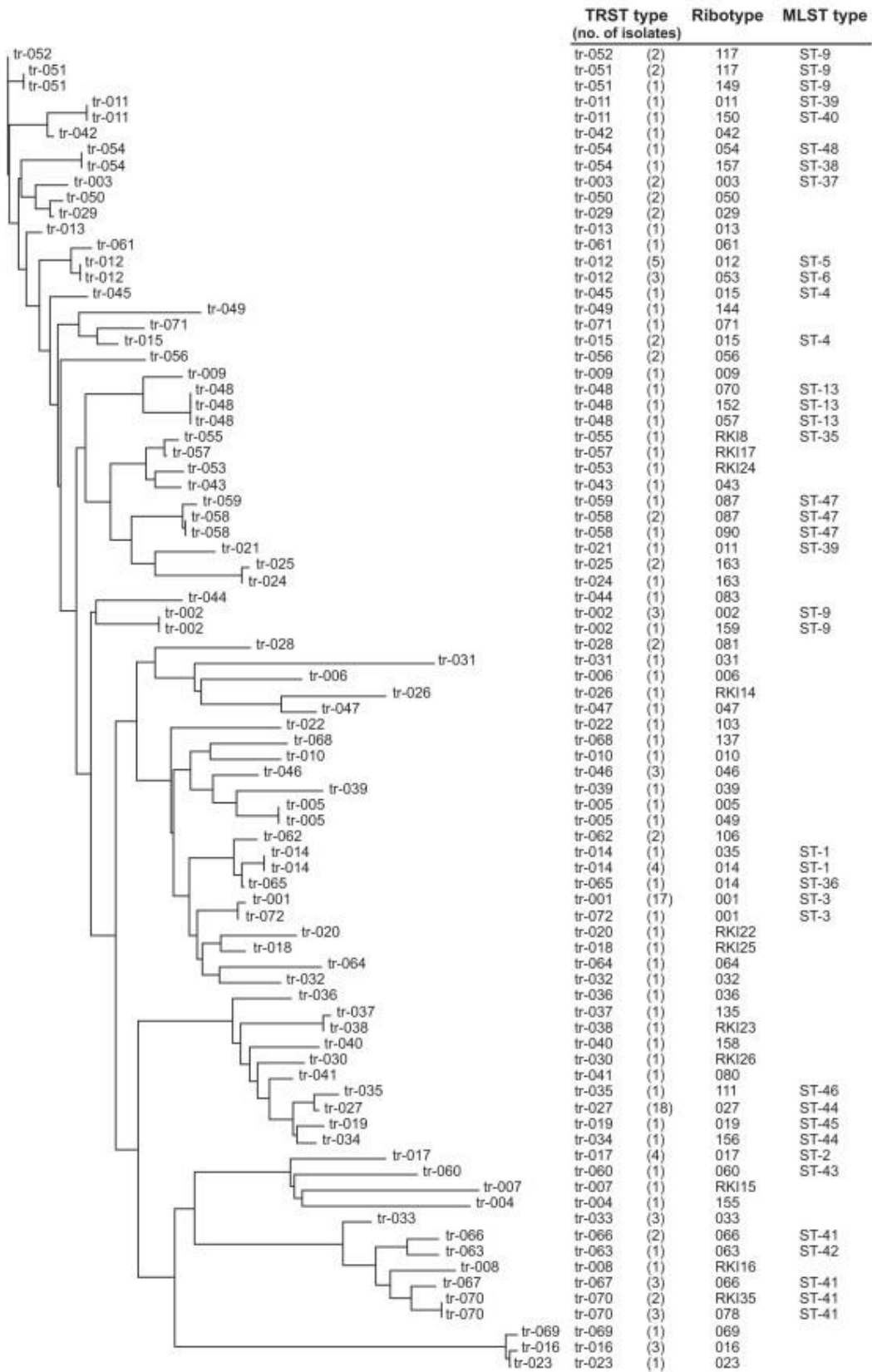
Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται ένα φυλογενετικό δένδρο το οποίο βασίζεται στις αλληλουχίες ολόκληρου του γονιδιώματος που έχουν πραγματοποιηθεί σε ορισμένους ριβότυπους του *C. difficile* έως τώρα. Ενώ ορισμένοι ριβότυποι μπορεί να κυριαρχούν σε δεδομένες χρονικές στιγμές και γεωγραφικούς τόπους, η επικράτηση τους τείνει να παρουσιάζει διακυμάνσεις τόσο χρονικά όσο και γεωγραφικά[22].



Εικόνα 3. Φυλογενετικό δένδρο του *C. difficile* που παρουσιάζει την συσχέτιση μεταξύ κοινών λοιμογόνων ριβοτύπων. Η ρίζα συνδέει το *Clostridium barlettii* και το *Clostridium hiranonis*. Τα απομονωμένα παθογόνα περιγράφονται από τους εμφανιζόμενους ριβοτύπους. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό των υποκαταστάσεων ανά τόπο [He M, Sebaihia M, Lawley TD, Stabler RA, Dawson LF, Martin MJ, Holt KE, Seth-Smith HM, Quail MA, Rance R, Brooks K, Churcher C, Harris D, Bentley SD, Burrows C, Clark L, Corton C, Murray V, Rose G, Thurston S, van Tonder A, Walker D, Wren BW, Dougan G, Parkhill J. 2010. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. Proc Natl Acad Sci USA 107: 7527-32].

Το βακτηριακό στέλεχος 630 του *C. difficile* (ριβότυπος 012) είναι το πρώτο, το γονιδίωμα του οποίου αλληλουχήθηκε στο σύνολό του και αποτελείται από 4.290.252 bp με ένα χαμηλό ποσοστό ζευγών G+C, της τάξης του 29.06%. Κωδικοποιεί ένα σύνολο 3.776 κωδικών αλληλουχιών(CDSs) [21]. Το γονιδίωμα του στελέχους R20291 (ριβότυπος 027), μοιράζεται ένα μεγάλο αριθμό, 3.247 CDS με το στέλεχος 630, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων σημαντικών για την παθογένεια του, τον σχηματισμό σπορίων και την ανθεκτικότητα του σε αντιβιοτικά [22]. Τέλος το *C. difficile* παρουσιάζει ισχυρή κωδική συγκρότηση με περισσότερο από το 80% των CDSs να κωδικοποιείται από την κωδική αλυσίδα του DNA του.

Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται μια φυλλογενετική ανάλυση βάσει αλγορίθμου Neighbor – Joining, βασισμένη σε επαναλαμβανόμενες διαδοχές των διατηρημένων γενετικών τόπων TR6 και TR10 από 154 απομονωμένα στελέχη *C. difficile*. Η επαναλαμβανόμενη απόσταση της μήτρας (repeat-distance matrix) βασίστηκε στο μοντέλο DSI το οποίο λαμβάνει υπ' όψιν του τις συνεχήs υποκαταστάσεις, εισαγωγές, απαλοιφές και διπλασιασμούς νουκλεοτιδίων. Επισημαίνονται οι σχετικοί ριβότυποι, οι τύποι TRST και οι αλληλουχίες MLST .



Εικόνα 4. Φυλογενετική ανάλυση (Neighbor-Joining) σε 154 απομονωμένα στελέχη του *C. difficile*.

[Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany].

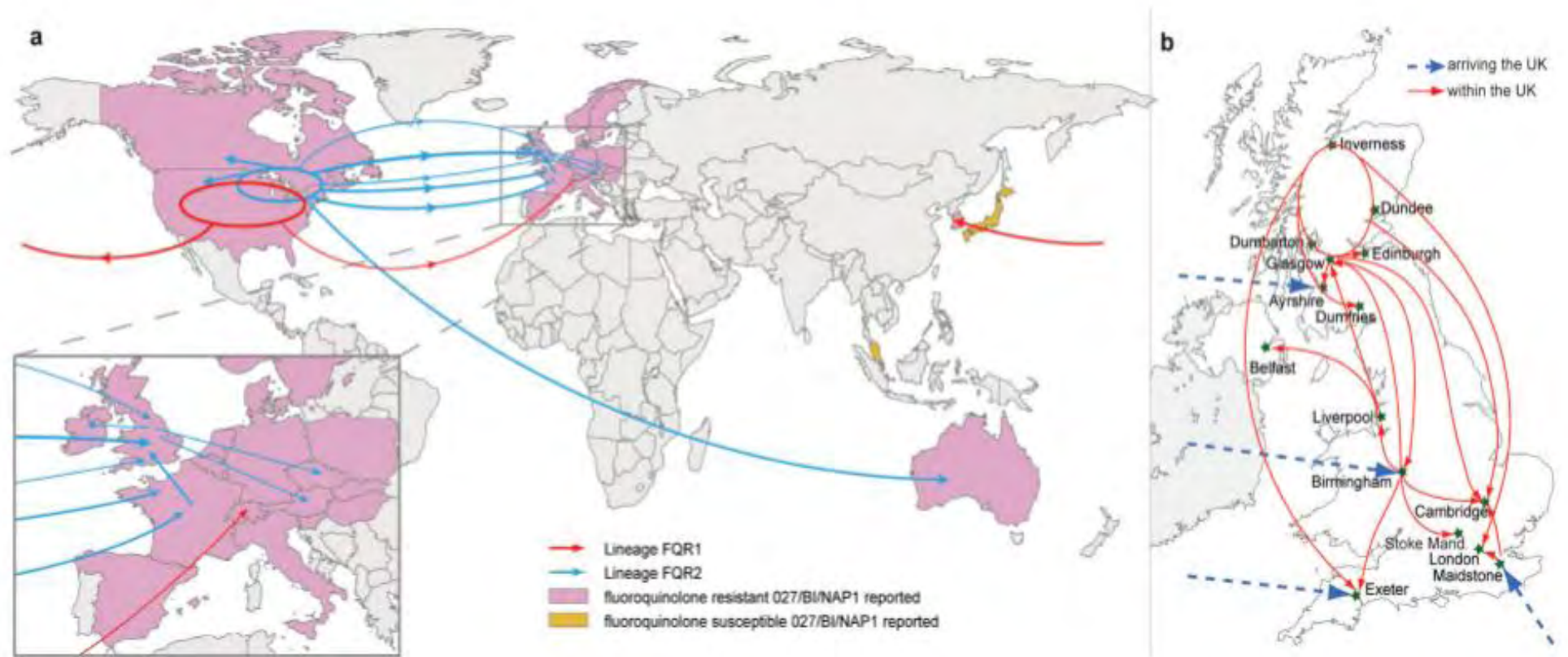
2.4 Η εμφάνιση του ριβότυπου 027

Στις αρχές του 2000 στη Βόρεια Αμερική, σημειώθηκε μια έξαρση των λοιμώξεων που σχετίζονται με το *C. difficile* (CDAs) καθώς παρατηρήθηκε αυξημένη αντοχή του σε φλουοροκινολόνες και μειωμένη ανταπόκριση στις μέχρι τότε συνήθως βακτηριακές θεραπείες [24-26]. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση ενός νέου ριβότυπου του *C. difficile*, ο οποίος αναφέρθηκε ως ριβότυπος PCR 027, North American Pulsotype 1 (NAP1), ή BI τύπος ανάλυσης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (REA). Αυτοί οι ονομαστικοί διαχωρισμοί μπορεί να πηγάζουν από διαφορετικές μεθόδους ταυτοποίησης, αλλά αναφέρονται όλοι στο ίδιο στέλεχος που πλέον είναι γνωστό ως ριβότυπος 027. Η εμφάνιση του συγκεκριμένου ριβότυπου, σχετίζεται άμεσα με την χρήση φλουοροκινολονών, οι οποίες εκείνη την στιγμή ήταν το πιο διαδεδομένο αντιβιοτικό [27].

Πλέον πιστεύεται ότι υπεύθυνες για αυτή την ανθεκτικότητα ήταν δυο διαφορετικές επιδημικές εμφανίσεις του 027 στη βόρεια Αμερική στις οποίες παρατηρήθηκαν πανομοιότυπες μεταλλάξεις στον γενετικό τόπο Thr82Ile του *gyrA* γονιδίου που προσδίδει στο βακτήριο αντοχή στις φλουοροκινολόνες [28].

Πρόσφατη έρευνα υποδεικνύει ότι αυτά τα δυο επιδημικά συμβάντα ήταν υπεύθυνα για την γρήγορη ηπειρωτική και δια-ατλαντική εξάπλωσή του ριβότυπου 027 από τα συστήματα περίθαλψης της Βόρειας Αμερικής σε αυτά του Ηνωμένου Βασιλείου (από το 2003), στην ηπειρωτική Ευρώπη (από το 2005) και την Αυστραλία (από το 2010). Η διασπορά του 027 συνεχίζεται με αυξανόμενο ρυθμό παγκοσμίως [29-30].

Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται η ακολουθία των γεγονότων της εξάπλωσης του στελέχους 027, στο μέρος α η παγκόσμια εξάπλωση του πρώτου επιδημιολογικού συμβάντος που παρατηρήθηκε με αντοχή στις φλουοροκινολόνες (FQR1), φαίνεται με κόκκινο βέλος. Η εξάπλωση του δεύτερου (FQR2) παρουσιάζεται με γαλάζιο βέλος. Στο μέρος β φαίνεται το ιστορικό εμφάνισης αυτών των στελεχών στο Ηνωμένο Βασίλειο [30].



Εικόνα 5. Τα γεγονότα επιδημιολογικής εξάπλωσης του στελέχους 027 παγκοσμίως και στο Ηνωμένο Βασίλειο [Genetics publication]

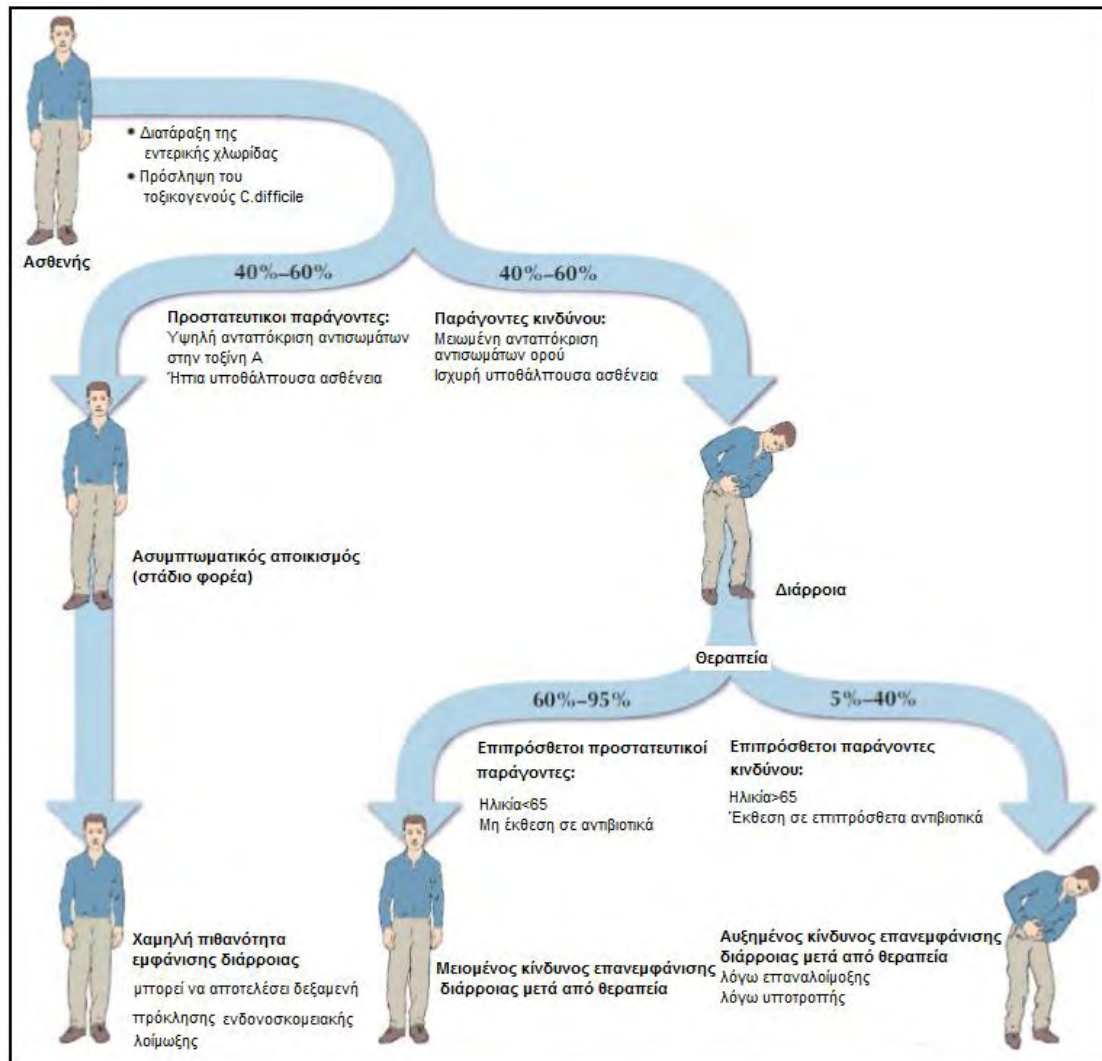
2.5 Η παθογένεια του *C. difficile*

Οι περισσότερες λοιμώξεις από *C.difficile* εντοπίζονται ενδονοσοκομειακά και πράγματι τα αναφερόμενα επίπεδα ανίχνευσης του βακτηρίου είναι μεγαλύτερα στα συστήματα υγείας [31,32]. Οι πιθανοί λόγοι για αυτό το φαινόμενο είναι, η μεγάλη παρουσία ασθενών με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και η συχνή χρήση αντιβιοτικών. Επιπλέον στο περιβάλλον των συστημάτων υγείας παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα μολυσματικών σπορίων βακτηρίων. Αν και το *C. difficile* μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις αυτογενώς, η πλειοψηφία των νοσηλευόμενων ασθενών δεν παρουσιάζει συμπτώματα στην φάση της έκθεσης τον μικροοργανισμό και του επακόλουθου αποικισμού [32], υποδεικνύοντας ότι η έκθεση από μόνη της δεν αρκεί για την εμφάνιση λοίμωξης. Έτσι είναι πιθανό ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης συμπτωματικής λοίμωξης. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν έναν συνδυασμό στοιχείων του οργανισμού ξενιστή και του περιβάλλοντος.

Η ακολουθία των γεγονότων που απαιτούνται για την εμφάνιση συμπτωματικής ασθένειας είναι η εξής:

- Ευαισθησία σε λοίμωξη (από διατάραξη της εντερικής χλωρίδας λόγω αυξημένης χορήγησης αντιβιοτικών ή εξασθένησης του ανοσοποιητικού λόγω ηλικίας)
- Έκθεση και πρόσληψη ενός παθογόνου στελέχους
- Επιτυχής αποικισμός και παραγωγή τοξινών

Ένα γενικό πλάνο των παραγόντων που επηρεάζουν την παθογένεια του βακτηρίου παρουσιάζεται στην εικόνα 6 [33].



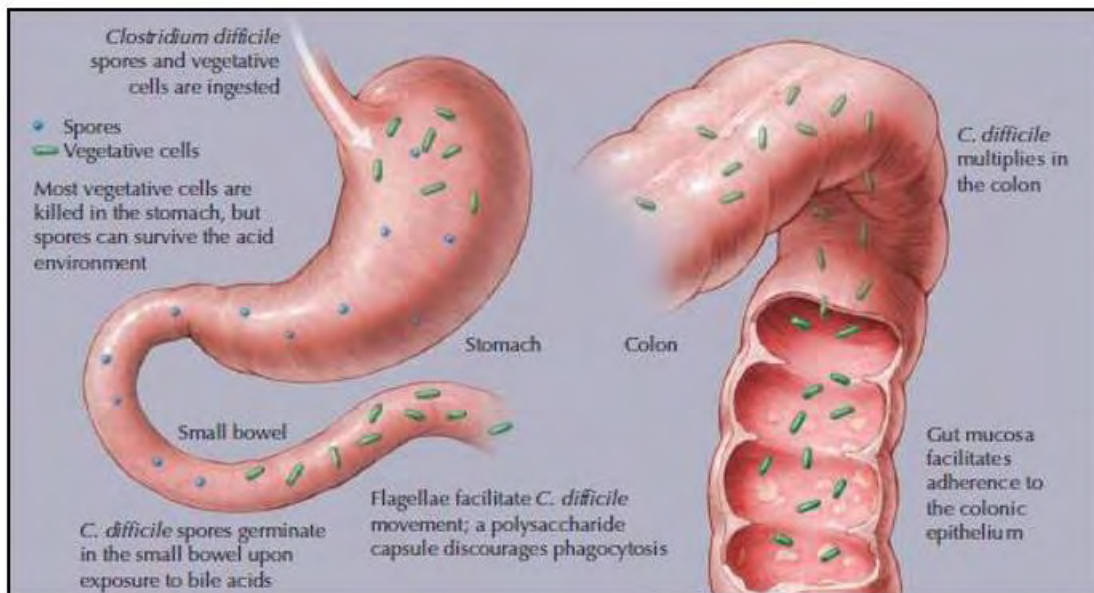
Εικόνα 6. Βασικοί παράγοντες πρόσληψης και έκφρασης σχετιζόμενης με το *C. difficile* λοίμωξης(CDAI)[Poutanen SM, Simor AE. 2004. Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. CMAJ 171: 51-8].

2.5.1 Πρόσληψη και αποικισμός του *C. difficile*

Συνήθως η έκθεση του *C. difficile* πραγματοποιείται σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Η εξωγενής πρόσληψη του γίνεται μέσω της επαφής από άτομο σε άτομο μέσω της στοματικής οδού (μορφή σπορίων) ή με άμεση επαφή με κόπρανα.

Σε αντίθεση με άλλα παθογόνα το *C. difficile*, παράγει ένα μολυσματικό και άκρως ανθεκτικό σπόριο το οποίο εκκρίνεται από τους μολυσμένους ασθενείς δημιουργώντας μια ενδοσκομοειακή πηγή μόλυνσης η οποία αντιστέκεται σημαντικά στις συνήθεις τακτικές απολύμανσης.

Η λοίμωξη ξεκινά όταν το *C. difficile* εισέρχεται στον ξενιστή από το περιβάλλον διαμέσου της γαστρεντερικής οδού. Αν και η πλειονότητα των βλαστικών μορφών του βακτηρίου εξουδετερώνεται λόγω των όξινων συνθηκών του στομάχου, αρκετά από αυτά καταφέρνουν να περάσουν και να εγκατασταθούν στο λεπτό έντερο. Σε αυτό και εφόσον το επιτρέπουν οι συνθήκες οι σπόροι του *C. difficile* βλαστάνουν ως ανταπόκριση της παραγωγής χολικών προϊόντων (ταυροχολικού οξέος) [34]. Εφόσον πραγματοποιηθεί η βλαστική ανάπτυξη το *C. difficile* μεταναστεύει στο παχύ έντερο, το οποίο αποτελεί και το συνηθέστερο σημείο εμφάνισης της λοίμωξης. Μια σχηματική απεικόνιση αυτών των γεγονότων παρουσιάζεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Αποικισμός και παθογένεια του *C. difficile* [Poutanen SM, Simor AE. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ 171: 51-8].

2.5.2 Ο ρόλος των τοξινών A και B και η εκδήλωση συμπτωμάτων

Ως επί το πλείστον, το *C. difficile*, αποτελεί ένα βακτήριο που προκαλεί λοιμώξεις τα συμπτώματα των οποίων σχετίζονται άμεσα με τις τοξίνες που παράγει. Έτσι τα μη τοξινογόνα στελέχη θεωρούνται συχνά ακίνδυνα ή ακόμα και μη-παθογόνα [35]. Κύρια αιτία της εμφάνισης συμπτωμάτων αποτελεί η παραγωγή των δυο εντεροτοξινών του βακτηρίου, της τοξίνης A και της τοξίνης B [36].

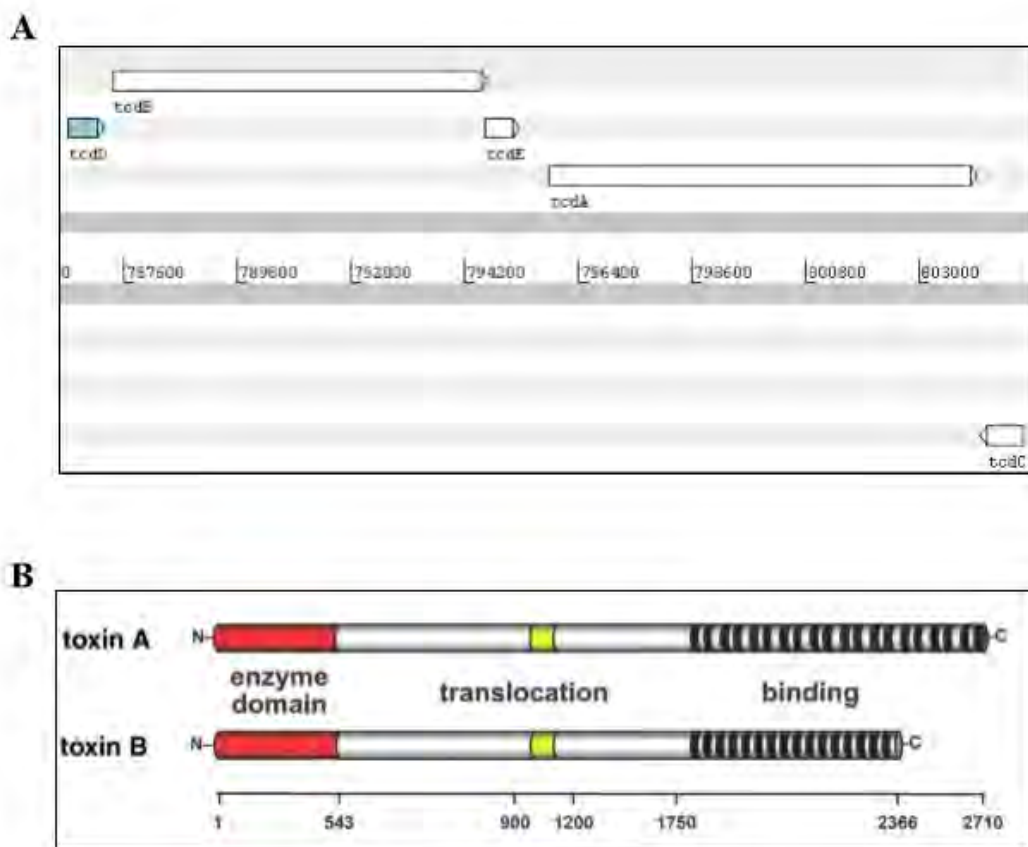
Αρχικά πιστευόταν ότι η τοξίνη A είναι ο κύριος τοξινογόνος παράγοντας καθότι τα πειράματα της εποχής υποδείκνυαν ότι από μόνη της αρκούσε για να προκαλέσει λοίμωξη σε πειραματόζωα, ενώ η τοξίνη B προκαλούσε λοίμωξη μόνο ύστερα από βλάβη του βλεννογόνου που είχε προκληθεί από την τοξίνη A [37]. Έτσι πιστευόταν ότι οι τοξίνες δρούσαν συνεργατικά για να προκαλέσουν οξεία μορφή ασθένειας [37,38].

Αυτή η άποψη όμως άλλαξε όταν αποδείχθηκε ότι η τοξίνη B είχε κυρίαρχο ρόλο για την εκδήλωση συμπτωμάτων και ότι η ενεργότητα της δεν βασιζόταν στο ρόλο της τοξίνης A [39]. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε και από την απομόνωση φυσικά μεταλλαγμένων στελεχών A(-)B(+) τα οποία ήταν ικανά να προκαλέσουν συμπτώματα.

Με τη χρήση τεχνικών πρόκλησης μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν για αυτές τις τοξίνες, η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε καθότι τα μεταλλαγμένα A(+)B(-) στελέχη δεν προκαλούσαν συμπτώματα της ασθένειας.

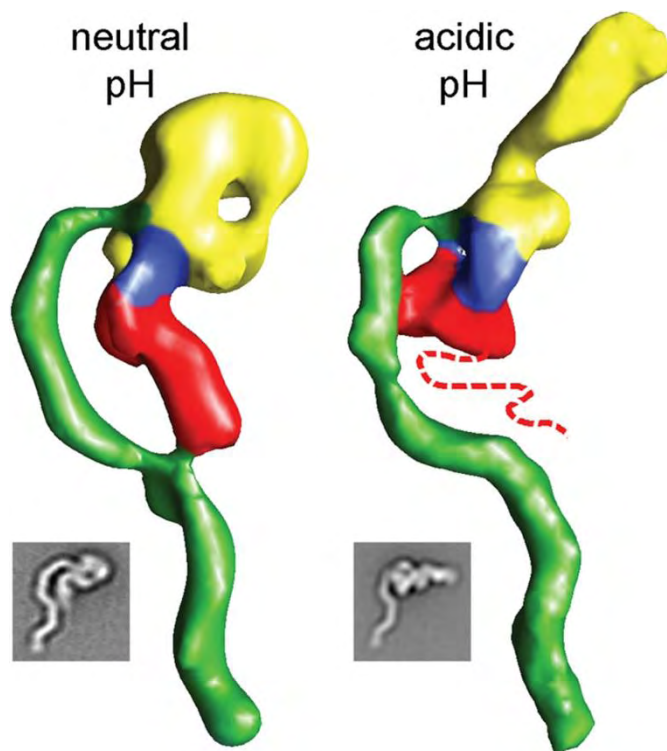
2.5.3 Οργάνωση και δομή των γονιδίων των τοξινών A και B

Οι τοξίνες A και B αποτελούν πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (308 και 269 kDa αντίστοιχα) και ανήκουν στην οικογένεια των μεγάλων τοξινών των κλωστηριδίων (LCTs) [40]. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8A, τα γονίδια των τοξινών *tcdA* (τοξίνη A) και *tcdB* (τοξίνη B) βρίσκονται μεταξύ του παθογόνου γονιδιακού τόπου (PaLoc) κατά μήκος του οποίου βρίσκονται 3 ρυθμιστικά γονίδια. Σε αυτά ανήκουν, ένας θετικός ρυθμιστής (*tcdD*), ένας αρνητικός (*tcdC*) και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με δράση χολίνης (*tcdE*) [40]. Το μήκος του γενετικού τόπου PaLoc εκτείνεται στις 19.6 kb έχοντας καθοριστικό μερίδιο στην γενωμική μορφολογία του βακτηρίου.



Εικόνα 8. Γονιδιακή οργάνωση του γενετικού τόπου PaLoc(A) και δομή των τοξινών A και B(B)[Jank T, Gieseemann T, Aktories K. 2007. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology* 17: 15R-22].

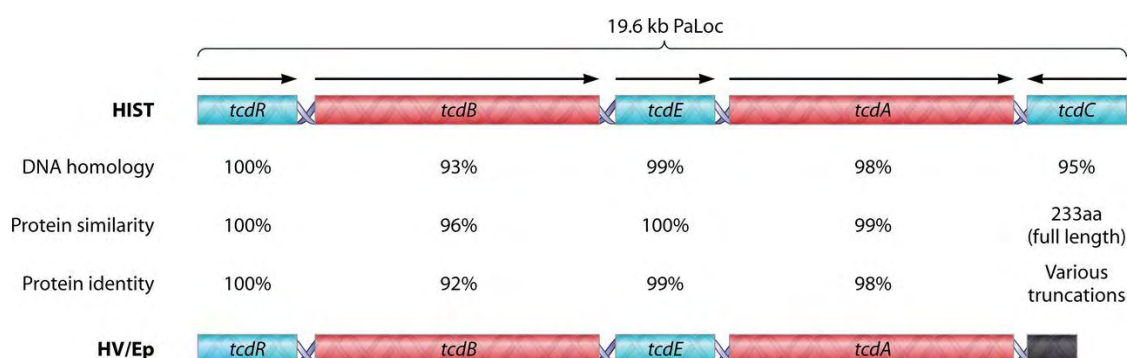
Οι τοξίνες A και B ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό και παρουσιάζουν μια δομή τριών περιοχών όπως φαίνεται και στην εικόνα 8B. Το καρβοξυτελικό άκρο παρουσιάζει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία ολιγοπεπτιδίων τα οποία φαίνεται να διευκολύνουν την τοξίνη ως προς τη πρόσδεση με τα κύτταρα του ξενιστή[41]. Αν και δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί ειδικοί υποδοχείς σύνδεσης για αυτές τις τοξίνες στον άνθρωπο, έρευνες σε πειραματόζωα αναδεικνύουν τους υδατάνθρακες και τις γλυκοπρωτεΐνες ως πιθανότερους υποψήφιους [41-43]. Η μεγάλη κεντρική περιοχή των τοξινών περιέχει μια υδροφοβική περιοχή (αμινοξέα 956-1128), η οποία πιστεύεται ότι λειτουργεί στην εισχώρηση τους στην κυτταρική μεμβράνη και την μετακίνηση τους στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή. Το αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 1-543) περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου το οποίο έχει δράση γλυκοτρανσφεράσης και αποτελεί τη μόνη καταλυτική περιοχή που εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή [44-45].



Εικόνα 9. Τρισδιάστατη απεικόνιση και μικροφωτογραφία της τοξίνης A σε ουδέτερο και όξινο pH [PNAS vol. 107 no. 30 Rory N. Pruitt, 13467–13472].

2.5.3.1 Γονιδιακή οργάνωση του τόπου PaLoc στο στέλεχος 027

Ο ριβότυπος 027 του *C. difficile* αναφέρεται ως υπερλοιμογόνος λόγω της ικανότητας του να παράγει αυξημένες ποσότητες τοξινών A και B. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε μια και μόνο μονονουκλεοτιδική μετάλλαξη (απαλοιφή) στο γονίδιο *tcdC* που κωδικοποιεί για έναν αρνητικό ρυθμιστή μεταγραφής των γονιδίων *tcdA* και *tcdB*, στη θέση 117. Η απαλοιφή αυτή αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου και έχει ως αποτέλεσμα μια πρωτεΐνη TcdC της οποίας το μέγεθος μειώνεται δραματικά από 232 σε 65 συνήθως αμινοξέα καταστέλλοντας τη δράση της [46]. Έτσι το υπερλοιμογόνο αυτό στέλεχος προκαλεί σοβαρότατες λοιμώξεις (ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα) στους ασθενείς οι οποίοι συχνά καταλήγουν. Επιπλέον η μελέτη του γενότυπου του γονιδίου *tcdC* έχει ανακαλύψει μια κοινή απαλοιφή 18bp σε αρκετά στελέχη 027 [46,47] η οποία όμως θεωρείται ως σιωπηλή μετάλλαξη και δεν συμβάλει στην υπερτοξικότητα αυτών των στελεχών[48].



Εικόνα 10. Σύγκριση του γενετικού τόπου PaLoc ενός συνήθους στελεχούς *C. difficile* (HIST) με το υπερλοιμογόνο (HV) όπου φαίνεται το κατά πολύ μικρότερο πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *tcdC* [Microbiol. Mol. Biol. Rev. December 2013 vol. 77 no. 4 567-581].

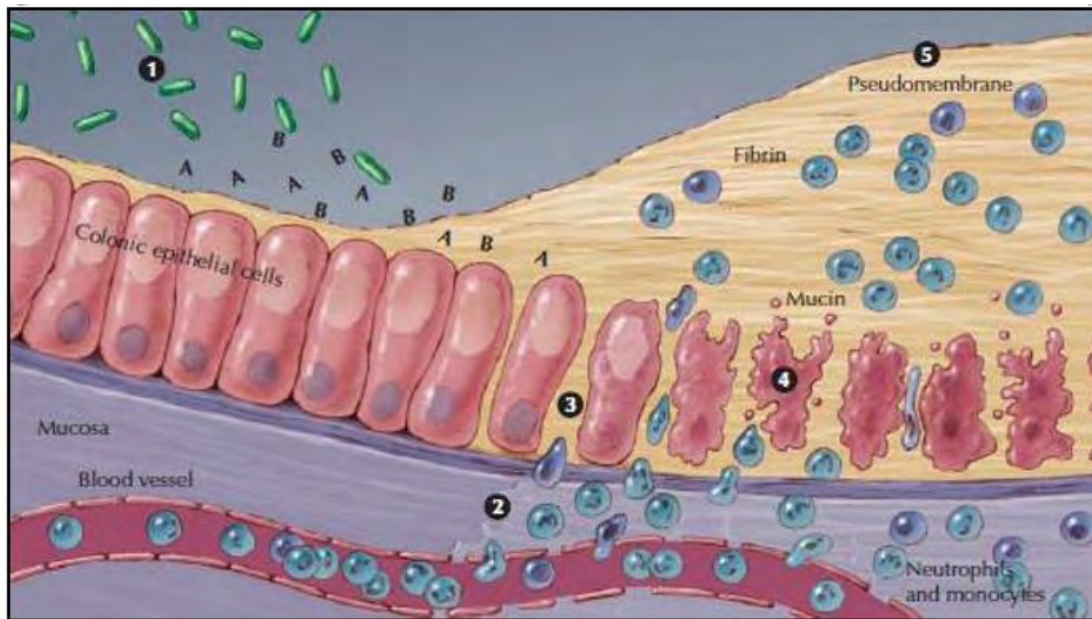
2.5.4 Ο μηχανισμός δράσης των τοξινών A και B

Από τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί ο αποικισμός του βακτηρίου, το *C. difficile* θα απελευθερώσει τις τοξίνες A και B στον αυλό του παχέος εντέρου. Στη συνέχεια αυτές θα συνδεθούν στους μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων του αυλού. Εφόσον εισέλθουν, η τοξίνη A δρα εντεροτοξικά και κυτταροτοξικά στον γαστρεντερικό σωλήνα αυξάνοντας δραματικά την διαπερατότητα του [49]. Αυτό πιθανότατα διευκολύνει την τοξίνη B (κυτοτοξίνη) να σπάσει τον επιθηλιακό φραγμό και να εισέλθει στο κύτταρο μαζί με την τοξίνη A μέσω ενός υποδοχεο-επαγόμενου μηχανισμού ενδοκυττάρωσης [50].

Από τη στιγμή που βρίσκονται στο κύτταρο και οι δυο τοξίνες δρουν ως μονογλυκοτρανσφεράσες, καταλύοντας την απενεργοποίηση των μικρών GTPασών (Rho, Rac και Ras), οι οποίες είναι ρυθμιστές της λειτουργίας των πρωτεϊνών ακτίνης και μυοσίνης του κυττάρου ξενιστή [51].

Πιο συγκεκριμένα, οι τοξίνες A και B χρησιμοποιούν την κυτταρική UDP-γλυκόζη ως υπόστρωμα και μεταφέρουν το επιπλέον μόριο γλυκόζης στη θρεονίνη ως αμινοξικό παραλήπτη. Έτσι σχηματίζεται ένας Ο-γλυκοζιτικός δεσμός ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα μια ανενεργή πρωτεΐνη [52,53].

Από τη στιγμή που οι GTPάσες δρουν ως ρυθμιστές της ακτίνης και της μυοσίνης, η απενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού και ως επακόλουθο την μειωμένη αμυντική δράση των επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης σημειώνεται τοπική αιμορραγία και έκκριση πυώδους υγρού η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της χαρακτηριστικής μορφής διάρροιας που σχετίζεται με την λοίμωξη από *C. difficile*. Μια σχηματική απεικόνιση της δράσης των τοξινών A και B παρουσιάζεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Ο μηχανισμός δράσης των τοξινών Α και Β [Poutanen SM, Simor AE. 2004. Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. CMAJ 171: 51-8].

2.6 Το εύρος των ασθενειών που προκαλούνται από λοίμωξη του *C. difficile*

Αν και τις προηγούμενες δεκαετίες θεωρούνταν ως ελάχισον κλινικό πρόβλημα, στις μέρες μας οι λοιμώξεις από *C. difficile* (CDI) προκαλούν σημαντικές επιπλοκές στην υγεία των ασθενών παρουσιάζοντας μεγάλο εύρος ασθενειών και καταλήγοντας σε ποικίλα αποτελέσματα. Παραδόξως το *C. difficile* μπορεί να αποικίζει ασυμπτωματικά στον εντερικό σωλήνα του πληθυσμού των ενηλίκων σε ποσοστό της τάξης του 3% και στα νεογνά σε ποσοστό 70% [31]. Αν και θεωρητικά αυτοί οι υποπληθυσμοί δεν παρουσιάζουν συμπτώματα, μπορούν να δράσουν ως πιθανές δεξαμενές μόλυνσης άλλων ατόμων.

2.6.1 Ψευδομεμβρανώδης και οξεία κολίτιδα

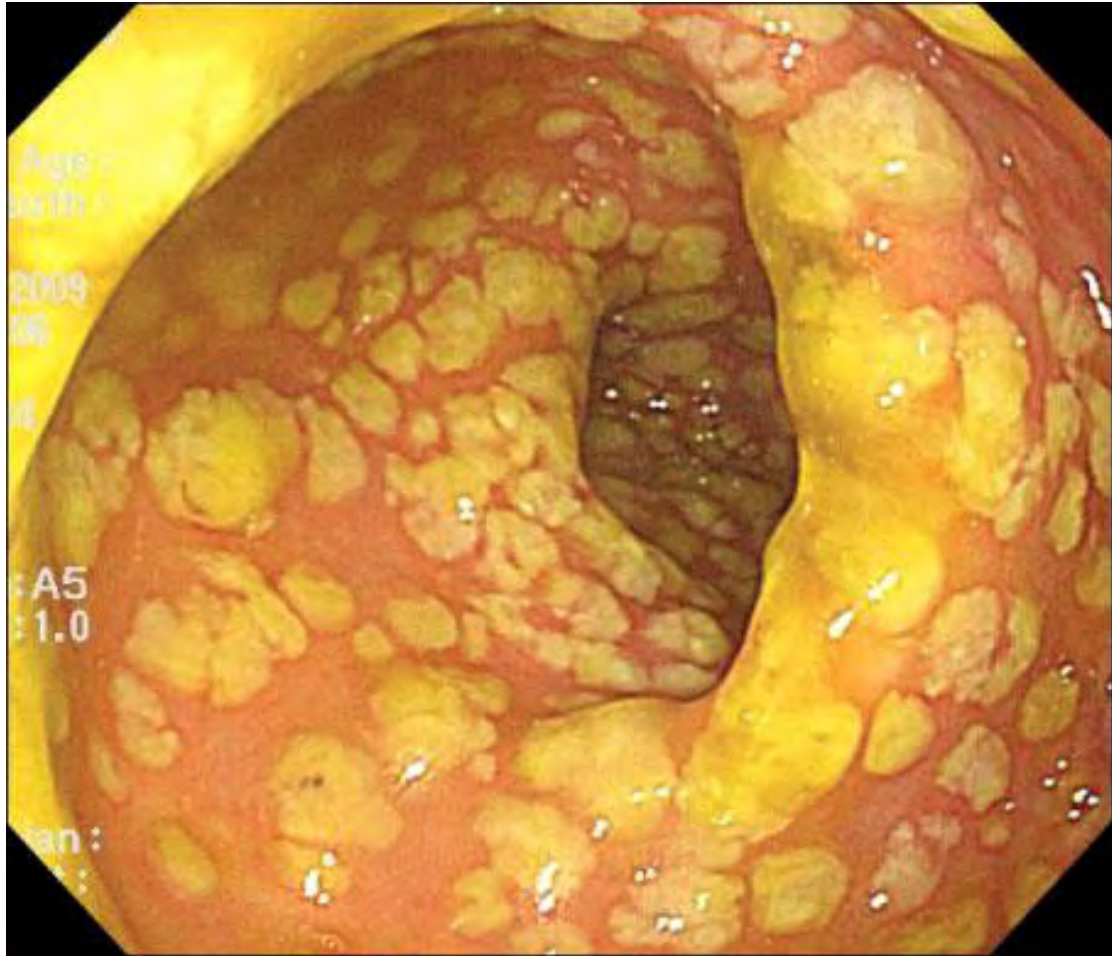
Στο σύνολό τους οι λοιμώξεις του *C. difficile* σχετίζονται με τον εντερικό σωλήνα. Τα έξω-εντερικά σύνδρομα είναι επίσης συνήθη. Το συνηθέστερο σύμπτωμα της λοίμωξης είναι η εμφάνιση διάρροιας (αραιής συγκέντρωσης). Αυτό συνήθως δεν είναι μεταδοτικό και θεραπεύεται σχετικά εύκολα με τη χορήγηση αντιβιοτικού[54].

Όμως οι λοιμώξεις του *C. difficile* μπορεί να είναι σημαντικές και να αποτελέσουν απειλή για την υγεία του ασθενούς. Η περιγραφή του συνδρόμου που οδήγησε στην "επανανακάλυψη" του *C. difficile* στα τέλη της δεκαετίας του 1970 είναι στις μέρες γνωστή ως ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα (PMC) [32]. Πλέον το *C. difficile* έχει αναγνωρισθεί ως ο αιτιολογικός παράγοντας αυτής της ασθένειας και απομονώνεται από το 95-100% των περιπτώσεων PMC. Η ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα αναγνωρίζεται μέσω ιστοπαθολογίας και χαρακτηρίζεται από την δημιουργία ψευδομεμβρανών που έχουν την μορφή κίτρινων-άσπρων πλακών (εικόνα 12) οι οποίες σε σοβαρές περιπτώσεις μπορούν να εκτείνονται σε όλο το μήκος του βλεννογόνου του παχέος εντέρου[55].

Αυτοί οι οιδηματώδεις σχηματισμοί περιέχουν πυώδες έκκριμα το οποίο αποτελείται από λευκοκύτταρα-ουδετερόφιλα και παραπροϊόντα του ενεργοποιημένου ανοσοποιητικού μηχανισμού[33].

Όμως η πιο σοβαρή μορφή λοίμωξης από *C. difficile* είναι η οξεία κολίτιδα η οποία συμβαίνει σε ποσοστό 1-3% των ασθενών [33]. Η εμφάνιση της είναι πιο συχνή σε ηλικιωμένα άτομα και σχετίζεται με διατοιχωματική φλεγμονή που οδηγεί σε πληθώρα συμπτωμάτων όπως ο συνεχής κοιλιακός πόνος, η μειωμένη κινητικότητα του παχέος εντέρου, ο παραλυτικός ειλεός καθώς και η διάτρηση του παχέος εντέρου[56,57].

Παραδόξως αυτές οι πιο συχνές μορφές λοίμωξης δεν συνοδεύονται από το σύμπτωμα της διάρροιας [57]. Χωρίς την κατάλληλη θεραπεία, θα προκληθεί περιτονίτιδα, σήψη και τελικά θάνατος [57].



Εικόνα 12. Ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα στο παχύ έντερο λόγω λοίμωξης από *C.difficile*

[Korean J Gastroenterol. 2010 Dec;56(6):387-390. Korean].

2.7 Διάγνωση του *C.difficile*

Το *C. difficile*, λόγω της συνεχώς μεταβαλλόμενης επιδημιολογικής του κατάστασης θα πρέπει να θεωρείται κύριος υποψήφιος λοιμογόνος παράγοντας για κάθε ασθενή με έντονα και συνεχή συμπτώματα διάρροιας. Υπάρχουν διάφορες εργαστηριακές τεχνικές για τη διάγνωση της λοίμωξης από *C. difficile*. Αρχικά μπορεί να πραγματοποιηθεί ανίχνευση της γλουταμινικής δευδρογονάσης του βακτηρίου με τεστ συγκόλλησης λατέξ και καλλιέργεια κοπράνων [58-59].

Αυτή όμως η μέθοδος, αν και ανιχνεύει το βακτήριο, δεν μπορεί να το τυποποιήσει σε κάποιο συγκεκριμένο στέλεχος.

Η καλλιέργεια ιστού και η κυτταροτοξική δοκιμή για ανίχνευση της τοξίνης Β θεωρείται ευρέως μια από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους, λόγω της υψηλής της ευαισθησίας (94-99%) και ειδικότητας (99%) μεταξύ των άλλων διαγνωστικών τεχνικών [60-61].

Αρκετά συχνά χρησιμοποιείται η τεχνική της ELISA για ανίχνευση των τοξινών Α και Β με χαμηλότερη ευαισθησία (70-90%), λόγω του χαμηλού οικονομικού κόστους και του σύντομου χρόνου ολοκλήρωσης [61]. Επίσης μια άλλη εναλλακτική αποτελεί η κολονοσκόπηση και η σιγμοειδοσκόπηση οι οποίες μπορούν να παρέχουν μια άμεση διάγνωση σε επείγουσες περιπτώσεις. Οι εξετάσεις αυτές όμως εμφανίζουν κίνδυνο διάτρησης του εντέρου και πραγματοποιούνται περισσότερο σε ασθενείς που παρουσιάζουν οξεία κολίτιδα ή τοξικό megacolon [60].

Τέλος η χρήση της real-time PCR καθώς και της PCR-ριβοτυπίας αποτελούν τις πιο ακριβείς τεχνικές καθώς δίνουν την δυνατότητα τυποποίησης των στελεχών ειδικά όπως του ριβοτύπου 027 που διαφοροποιείται από τα άλλα μόνο σε μια σημειακή μετάλλαξη [62]. Οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν και μεγαλύτερη ευαισθησία (100%) σε σχέση με τις κυτταροτοξικές δοκιμές [63].

2.8 Θεραπείες των λοιμώξεων από *C. difficile*

Όπως ήδη αναφέρθηκε η κύρια αιτία εμφάνισης συμπτωματικής λοίμωξης από *C. difficile* είναι η διαταραχή της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας, η υπερανάπτυξη του παθογόνου και η έκκριση των τοξινών. Συνεπώς μια πρώτη ήπια αντιμετώπιση έγκειται στην διακοπή χορήγησης αντιβιοτικών στον ασθενή, επιτρέποντας στην μικροβιακή χλωρίδα να επανακάμψει [64]. Στις ήπιες μορφές της ασθένειας η χορήγηση δια ορού ηλεκτρολυτών και διαλυμάτων ενυδάτωσης αρκεί για να καταστείλει τη λοίμωξη, όταν πρόκειται για ασθενείς χωρίς περαιτέρω επιβαρυνόμενη υγεία [65].

Εάν καταστεί αναγκαίο να συνεχιστεί η αγωγή αντιβιοτικών για τη πρωτογενή λοίμωξη, τότε προτιμάται η χρήση αντιβιοτικών μειωμένου φάσματος ή εκείνων που δεν έχουν στενή συσχέτιση με τη λοίμωξη από το *C. difficile* [66].

Στον πίνακα 5 αναφέρονται οι συνήθεις θεραπευτικές προσεγγίσεις μετά από λοίμωξη με *C. difficile* σύμφωνα με τον SHEA (αμερικανικός οργανισμός επιδημιολογίας του συστήματος υγειονομικής περίθαλψης) και τον IDSA (οργανισμός λοιμωδών νοσημάτων της Αμερικής) [67,68].

Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν διάφορα στελέχη σε αντιβιοτικά. Η έκθεση σε αυτά αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για τη λοίμωξη από *C. difficile*. Για το λόγο αυτό η αυξημένη χορήγηση τους μπορεί να διευκολύνει τη μετάδοση του βακτηρίου. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που έχουν προσβληθεί από *C. difficile* λαμβάνουν ποικίλα αντιβιοτικά για ένα διάστημα 6 περίπου εβδομάδων, κάτι που διευκολύνει την ικανότητα απόκτησης αντοχής σε ορισμένα στελέχη. Έτσι το στέλεχος B1/ριβότυπος 027, παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε φλουοροκινολόνες και μακρολίδες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την υποτροπή των ασθενών σε ένα ποσοστό έως 20%, που σχετίζεται άμεσα και με την σημαντική διαταραχή της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας που πραγματοποιείται από την χορήγηση των αντιβιοτικών [69].

Table 3 – Summary of treatment for <i>Clostridium difficile</i> infection*
Asymptomatic carrier <ul style="list-style-type: none"> No treatment needed
Symptomatic disease <ul style="list-style-type: none"> Discontinue offending antibiotic Replace fluids and electrolytes Avoid antiperistaltic agents
Initial episode or first recurrence <i>Mild infection</i> <ul style="list-style-type: none"> Metronidazole 500 mg orally 3 times daily for 10 to 14 days <i>Moderate to severe infection</i> <ul style="list-style-type: none"> Vancomycin 125 mg orally 4 times daily for 10 to 14 days. Colectomy may be needed in severe cases; early surgical consultation is recommended.
Second recurrence <ul style="list-style-type: none"> Vancomycin in tapered and pulsed doses: 125 mg orally 4 times daily for 14 days, then twice daily for 7 days then once daily for 7 days, then once every 2 days for 8 days, then once every 3 days for 15 days Or Fidaxomicin 200 mg orally twice daily for 10 days
Third recurrence <ul style="list-style-type: none"> Vancomycin taper followed by rifaximin 400 mg orally 2 times daily for 14 days Intravenous immunoglobulin 400 mg/kg of body weight once every 3 weeks for a total of 2 to 3 doses Fecal transplantation
*In addition to isolation of the patient and enforcement of contact precautions.

Πίνακας 5. Συνοπτική παρουσίαση των θεραπευτικών προσεγγίσεων μετά από CDI [Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31:431-455].

2.9 Το δημόσιο οικονομικό κόστος αντιμετώπισης των λοιμώξεων από *C. difficile*

Η μεγάλη αύξηση των λοιμώξεων που σχετίζονται με το *C. difficile* (CDAI) την τελευταία δεκαετία οδήγησε τις κυβερνήσεις κυρίως του Ηνωμένου Βασιλείου και των Η.Π.Α να ασκήσουν πίεση στους αρμόδιους οργανισμούς για την εξεύρεση μιας αποτελεσματικής στρατηγικής αντιμετώπισης των λοιμώξεων αυτών. Το οικονομικό κόστος επιβαρύνει κατά πολύ τον δημόσιο προϋπολογισμό αν και ακόμα δεν υπάρχουν λεπτομερή οικονομικά στοιχεία.

Το 1996, οικονομική μελέτη υπολόγισε ότι η θεραπεία των λοιμώξεων από *C. difficile* στο Ηνωμένο Βασίλειο κοστίζουν κατά μέσο όρο 4.107,00 £ ανά ασθενή [70]. Το περισσότερο από το 94% αυτού του αυξημένου κόστους αφορούσε την πολυήμερη διάρκεια νοσηλείας η οποία έφθασε έως και 21 ημέρες. Βάσει αυτών των υπολογισμών, το *C. difficile* το 2007 κόστισε 229.000.000,00 £ και το 2009 113.000.000,00 £ [71].

Στις Η.Π.Α. μόνο το 2008, το οικονομικό κόστος για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *C. difficile* ανήλθε στα 2.100.000.000,00 \$. Σύμφωνα με το HCUP (πρόγραμμα υγειονομικού κόστους των Η.Π.Α) ο αριθμός των νοσούντων ασθενών έφθασε τους 348.950 και το ημερήσιο κόστος περίθαλψης τα 375,00 \$ [72].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι υπολογισμοί αυτοί αφορούν το κόστος της θεραπείας που σχετίζεται μόνο με τα άμεσα συμπτώματα της λοίμωξης από το *C. difficile*. Είναι λογικό ότι υπάρχουν και έμμεσα συμπτώματα το κόστος της

θεραπείας των οποίων δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια, αλλά σίγουρα αυξάνει περαιτέρω τον κρατικό προϋπολογισμό.

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ριβοτύπου O27 του βακτηρίου *C. difficile* με τη χρήση δυο μοριακών τεχνικών ενίσχυσης και ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, της Real-Time PCR και της PCR-ριβοτυπίας. Οι τεχνικές εφαρμόστηκαν σε στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς του νοσοκομείου ΓΝΑ “Λαϊκό” τα έτη 2012 και 2014.

Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής επιδημιολογικά δεδομένα το συγκεκριμένο στέλεχος δεν είχε εμφανιστεί στον ελλαδικό χώρο, παρά μόνο σε χώρες της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης.

3. Υλικά και μέθοδοι της πειραματικής διαδικασίας

3.1 Συλλογή στελεχών

Στην μελέτη ενσωματώθηκαν όλα τα στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν από διαρροϊκά κόπρανα ασθενών, νοσηλευόμενων στο ΓΝΑ “Λαϊκό” κατά τη διάρκεια του πρώτου τετραμήνου του έτους 2012 και του πρώτου τετραμήνου του έτους 2014. Συνολικά απομονώθηκαν 44 στελέχη *C. difficile* το πρώτο τετράμηνο του έτους 2012 και 27 στελέχη αντίστοιχα απομονώθηκαν το πρώτο τετράμηνο του έτους 2014. Σε περίπτωση πολλαπλών απομονώσεων, στην μελέτη ενσωματώθηκε ένα στέλεχος ανά ασθενή, η πρώτη απομόνωση.

Όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με συνήθεις βιοχημικές δοκιμασίες και φυλάχθηκαν σε αποστειρωμένο skimmed milk σε συνθήκες -70°C .

3.2 Έλεγχος ευαισθησίας

Σε όλα τα στελέχη πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας και προσδιορισμού της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας των αντιβιοτικών μετρονιδαζόλη, μοξιφλοξασίνη, βανκομυκίνη και ριφαμπικίνη με την μέθοδο των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (Liofilchem, Italy) σε τρυβλία Brucella agar με 5% ερυθρά αλόγου, βιταμίνη Κ (1 mg/L) και αιμίνη (5 mg/L). Τα τρυβλία επώασθηκαν για 48h σε αναερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία 37°C .

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες CLSI [CLSI document M11-A7]. Για τον έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

3.3 Εκχύλιση βακτηριακού DNA

Η εκχύλιση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα των στελεχών που συλλέχθηκαν από αναερόβια καλλιέργεια 72 ωρών, με την χρήση του συστήματος στηλών διήθησης QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Το QIAamp DNA mini kit δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης νουκλειικών οξέων με τη χρήση μεμβρανών διοξειδίου του πυριτίου (silica).

Συγκεκριμένα, με κρικοφόρο στυλεό συλλέχθηκαν δυο-τρεις καθαρές αποικίες του βακτηρίου από το καλλιέργημα και επαναρραιώθηκαν σε διάλυμα 10% πρωτεΐνης K σε buffer επιφανειοδραστικών ουσιών του κιτ. Ακολούθησε επώαση στους 56° C μέχρι την πλήρη λύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση του διαλύματος και κατακράτηση του DNA στους ηθμούς των στηλών.

Το καθαρό DNA ελέγχθηκε με φωτομέτρηση στα 260 και στα 280 nanometer και φυλάχθηκε σε συνθήκες -20° C.

3.4 Real-Time PCR

Για την ανίχνευση της μονονουκλεοτιδικής μετάλλαξης (απαλοιφής) στη θέση Δ117 του γονιδίου *tcdC*, που καθιστά τα στελέχη που την έχουν ως υπερλοιμογόνα και έχει συσχετισθεί με τον ριβότυπο O27, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Real-Time PCR, σύμφωνα με πρωτόκολλο της βιβλιογραφίας [62].

Η Real-Time PCR αποτελεί μια εκδοχή της κλασσικής PCR, στην οποία όμως ο πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου καταγράφεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο (απ' όπου προέρχεται και το όνομά της) και όχι στο τέλος της όπως στη συμβατική PCR. Αυτό καθίσταται δυνατό με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδικών DNA ανιχνευτών (probes), συμπληρωματικών προς το DNA στόχο, τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές. Έτσι εφ' όσον παραχθεί DNA, μόνο τότε οι ιχνηθέτες αυτοί υβριδίζουν και παράγουν χρώμα προς ανίχνευση [73].

Συγκεκριμένα οι primers-probes που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (πίνακας 6): ένας ευθύς primer (CD-tcdC-F), δύο αντίστροφοι (CD-tcdC-R1 και CD-tcdC-R2) και δύο MGB-TaqMan probes, ένας για την αλληλουχία χωρίς την έλλειψη, σημασμένος με χρωστική FAM (CD-tcdCwt-MGB) και ένας για την αλληλουχία με την έλλειψη, σημασμένος με χρωστική VIC (CD-tcdCmut-MGB).

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl, που περιείχε 10 μl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), τους εκκινητές σε

συγκέντρωση 300 nM έκαστο, τους TaqMan probes σε συγκέντρωση 100 nM έκαστο και 5 µl DNA. Οι συνθήκες ήταν 40 κύκλοι στους 95 °C για 15 s και στους 60 °C για 1 min. Χρησιμοποιήθηκε ένα θερμικός κυκλοποιητής StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Για τον έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *C. difficile* NCTC-11209 (Ribotype 001) και NCTC 13366 (Ribotype 027) τα οποία προήλθαν από την Εθνική Συλλογή Πρότυπων Στελεχών (NCTC) του Εθνικού Συστήματος Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου.

Όνομα	Αλληλουχία
CD-tcdC-F	GCA CAA AGG RTA TTG CTC TAC TGG
CD-tcdC-R1	AGC TGG TGA GGA TAT ATT GCC AA
CD-tcdC-R2	CAA GAT GGT GAG GAT ATA TTG CCA
CD-tcdCwt-MGB	FAM-AAA CAC RCC HAA AAT AA-NFQ-MGB
CD-tcdCmut-MGB	VIC-AAA CAC RCC AAA ATA A-NFQ-MGB

Πίνακας 6: Αναλυτική περιγραφή αλληλουχιών των Primer και Probe που χρησιμοποιήθηκαν.

3.5 PCR- Ριβοτυπία

Η τεχνική της PCR-ριβοτυπίας χρησιμοποιείται για την τυποποίηση των στελεχών του παθογόνου και την απόδοση σε κάθε ένα από αυτά ενός ριβότυπου με σκοπό την επιδημιολογική σύγκριση των στελεχών και την διερεύνηση της κινητικότητας των στελεχών μεταξύ ασθενών ενός νοσοκομείου, γειτονικών ή μη νοσηλευτικών ιδρυμάτων μιας χώρας ή μεταξύ κρατών.

Η PCR-ριβοτυπία βασίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες των ριβοσωμικών γονιδίων των βακτηρίων είναι μοναδικές και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Αρχικά πραγματοποιείται ενίσχυση τμημάτων DNA με PCR μεταξύ των 16S και 23S rRNA γονιδίων, τα οποία περιέχουν πλήθος rRNA οπερονίων.

Τα προϊόντα αυτής της PCR ποικίλουν σε αριθμό και μέγεθος και είναι χαρακτηριστικά για κάθε βακτηριακό στελέχος. Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τυποποίηση ενός βακτηριακού στελέχους μετά από σύγκριση των προϊόντων PCR των ίδιων τμημάτων DNA με αυτά ενός πρότυπου στελέχους [74]. Η PCR-ριβοτυπία εφαρμόστηκε στο σύνολο των στελεχών των δύο περιόδων (2012 και 2014).

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Bidet και συν. [75] με τις εναρκτήριες αλληλουχίες (primers): BidR-F: 5'-GTG CGG CTG GAT CAC CTC CT-3' και BidR-R: 5'-CCC TGC ACC CTT AAT AAC TTG ACC-3'.

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μl, που περιείχε 25 μl HotStart PCR Master Mix (Promega, Madison USA), τους δύο εκκινητές σε συγκέντρωση 50 pmol και 1 μl βακτηριακό DNA.

Το πρόγραμμα της PCR αποτελείτο από 35 κύκλους (ένα λεπτό στους 94^o C, ένα λεπτό στους 57^o C και ένα λεπτό στους 72^o C). Χρησιμοποιήθηκε ένα θερμικός κυκλοποιητής MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories ΜΕΠΕ, 11527, Αθήνα).

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε gel αγαρόζης περιεκτικότητας 3% για 45 min στα 90 Watt και χρησιμοποιήθηκαν 10μl από κάθε αντίδραση. Η φωτογράφιση έγινε σε UV ακτινοβολία.

Για τον έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *C. difficile* NCTC-11209 (PCR-ribotype 001) και NCTC 13366 (PCR-ribotype 027) τα οποία προήλθαν από την Εθνική Συλλογή Πρότυπων Στελεχών (NCTC) του Εθνικού Συστήματος Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου.

3.6 Επιδημιολογικά δεδομένα ασθενών

Τα βασικά επιδημιολογικά δεδομένα των ασθενών που συλλέχθηκαν (με ανώνυμο τρόπο) αφορούσαν το φύλο (άντρας, γυναίκα), την ηλικία, την κλινική νοσηλείας (Α', Β' Γ' Παθολογική, ή άλλη κλινική του νοσοκομείου), την υποκείμενη νόσο, την βαρύτητα της λοίμωξης από *C. difficile* και την τελική έκβαση (ίαση, βελτίωση, θάνατος).

4. Αποτελέσματα

4.1 Συλλογή στελεχών

Συνολικά απομονώθηκαν 71 στελέχη του παθογόνου και ειδικότερα 44 στελέχη το πρώτο τετράμηνο του έτους 2012 και 27 στελέχη αντίστοιχα απομονώθηκαν το πρώτο τετράμηνο του έτους 2014.

4.2 Έλεγχος ευαισθησίας

Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε με προσδιορισμό της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (ΕΑΠ) στα αντιβιοτικά μετρονιδαζόλη, βανκομυκίνη, μοξιφλοξασίνη και ριφαμπικίνη.

Όλα τα στελέχη ήταν ομοιόμορφα ευαίσθητα στην βανκομυκίνη, με ΕΑΠ₅₀=0,25 mg/L και ΕΑΠ₉₀=0,5 mg/L. Δεν ανευρέθη στέλεχος ανθεκτικό στην βανκομυκίνη (ΕΑΠ>2mg/L).

Συνολικά τρία από τα 71 στελέχη (4,2%), όλα απομονωθέντα το πρώτο τετράμηνο του έτους 2012, ήταν ανθεκτικά στην μετρονιδαζόλη (ΕΑΠ>2 mg/L), ενώ το έτος 2014 δεν απομονώθηκε ανθεκτικό στέλεχος. Οι ΕΑΠ₅₀/ΕΑΠ₉₀ ήταν 0,25 /0,5 mg/L, αντίστοιχα.

Όσον αφορά την μοξιφλοξασίνη, συνολικά 8/44 των στελεχών του 2012 (18,2%) και 9/27 των στελεχών του 2014 (33,3%), ήταν ανθεκτικά (ΕΑΠ>4 mg/L). Οι ΕΑΠ₅₀/ΕΑΠ₉₀ ήταν 2 />32 mg/L, αντίστοιχα.

Τέλος, όσον αφορά την ριφαμπικίνη, συνολικά 1/44 των στελεχών του 2012 (2,3%) και 5/27 των στελεχών του 2014 (18,5%), ήταν ανθεκτικά (ΕΑΠ>2 mg/L). Οι ΕΑΠ₅₀/ΕΑΠ₉₀ ήταν 2 />32 mg/L, αντίστοιχα.

4.3 Εκχύλιση βακτηριακού DNA

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, όπως έδειξε (α) η φωτομέτρηση μέρους του δείγματος στα 260 nanometer, αλλά και (β) ο έλεγχος καθαρότητας, αφού ο λόγος απορρόφησης 260/280 nanometer ήταν >1,7.

4.4 Real-Time PCR

Με την τεχνική της Real-Time PCR ελέγχθηκαν το σύνολο των 71 κλινικών στελεχών των δύο περιόδων (έτη 2012 και 2014).

Η PCR ολοκληρώθηκε επιτυχώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Στο σύνολο τους σε όλα τα στελέχη επήλθε υψηλότερις υβριδισμός του primer CD-tcdCwt-MGB, όπως φάνηκε και στο κανάλι ανάγνωσης της χρωστικής FAM, ενώ ο υβριδισμός του primer CD-tcdCmut-MGB (κανάλι χρωστικής VIC) ήταν χαμηλότερος, γεγονός που σημαίνει ότι όλα τα στελέχη ήταν αρνητικά ως προς την ανίχνευση της μετάλλαξης στη θέση Δ117 του γονιδίου tcdC.

4.5 PCR- Ριβοτυπία

Με την τεχνική PCR-ριβοτυπίας ελέγχθηκε το σύνολο των 71 κλινικών στελεχών των δύο περιόδων (έτη 2012 και 2014).

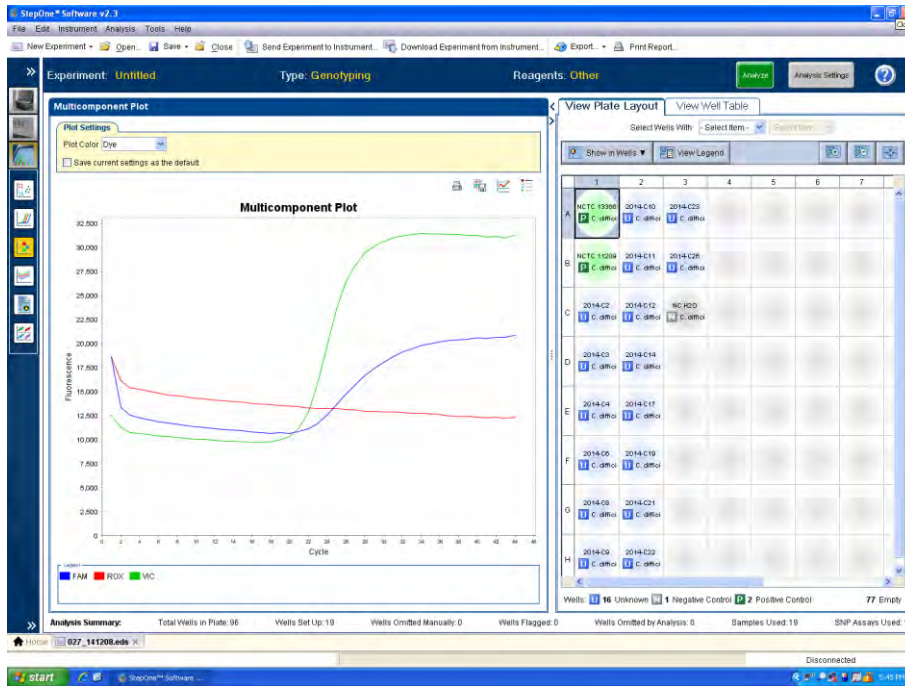
Η PCR-ριβοτυπία τυποποίησε όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν και τα διαχώρισε σε 16 διαφορετικούς τύπους (με ένα έως και 5 στελέχη ανά τύπο), όμως δεν κατέταξε κάποιο στέλεχος στον ριβότυπο O27. Τα αποτυπώματα όλων των στελεχών ήταν διαφορετικά από το αποτύπωμα του πρότυπου στελέχους *C. difficile* NCTC 13366 (στέλεχος O27).

4.6 Επιδημιολογικά δεδομένα ασθενών

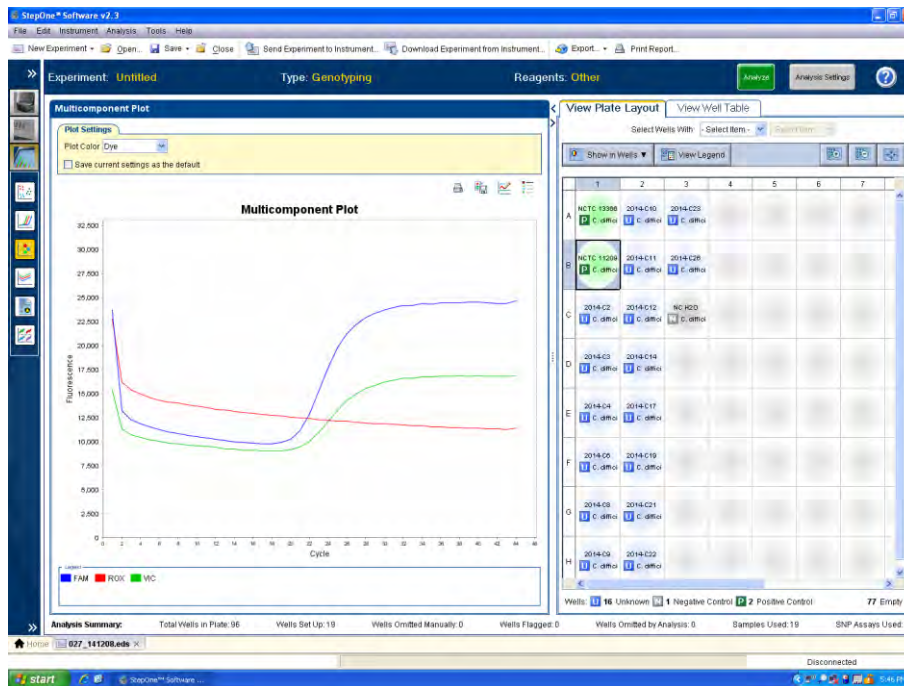
Η μελέτη των επιδημιολογικών δεδομένων έδειξε ότι ο μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 63 έτη (± 6) και επικρατούσε το άρρεν φύλο (28/44, 63,6%, για το έτος 2012 και 15/27, 55,6% για το έτος 2014).

Σε σχέση με το νοσηλευτικό τμήμα των ασθενών, παρατηρήθηκε ελαφρά υπεροχή των Παθολογικών Κλινικών (48/71, 56,3%) χωρίς επικράτηση κάποιας συγκεκριμένης κλινικής και χωρίς καταγραφή συρροής κρουσμάτων σε τόπο και χρόνο.

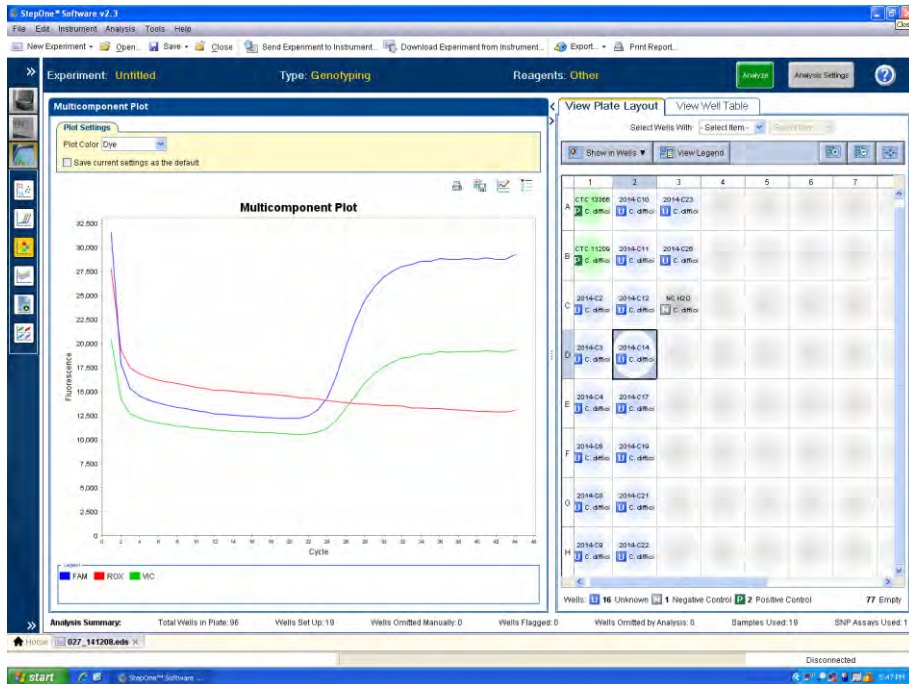
Η ηλικία >65 ετών (24/71, 33,8%), ο σακχαρώδης διαβήτης (20/71, 28,2%), η νεφρική ανεπάρκεια (16/71, 22,5%), η μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου (7/71, 9,9%) και η αιματολογική κακοήθεια (5/71, 7,0%) ήταν οι συχνότεροι παράγοντες κινδύνου των ασθενών.



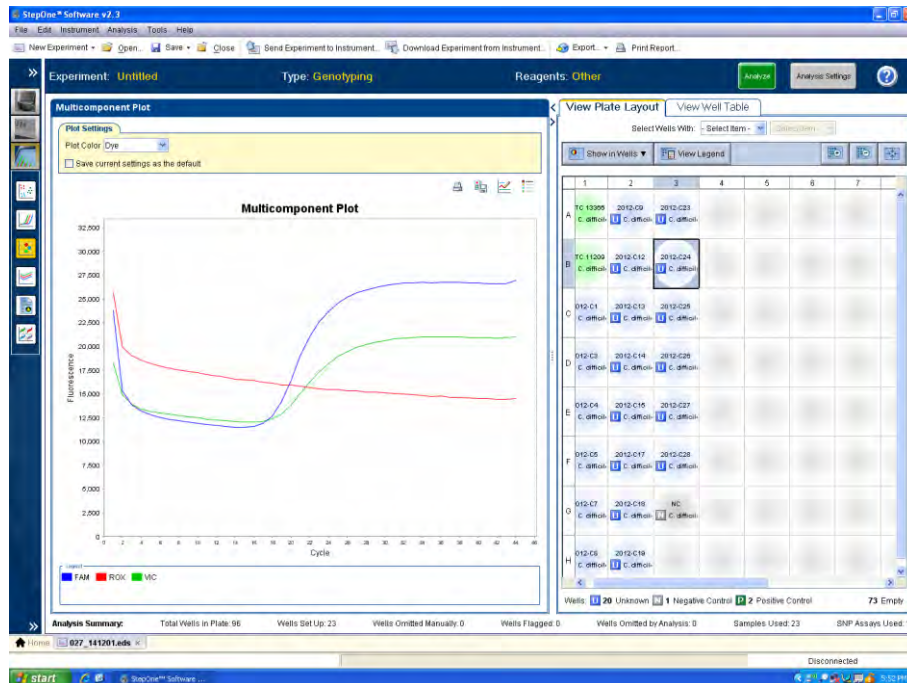
Εικόνα 13Α. Αντιπροσωπευτική εικόνα Real-Time PCR, μοτίβο (pattern) πρότυπου στελέχους NCTC 13366 (O27, D117-θετικό)



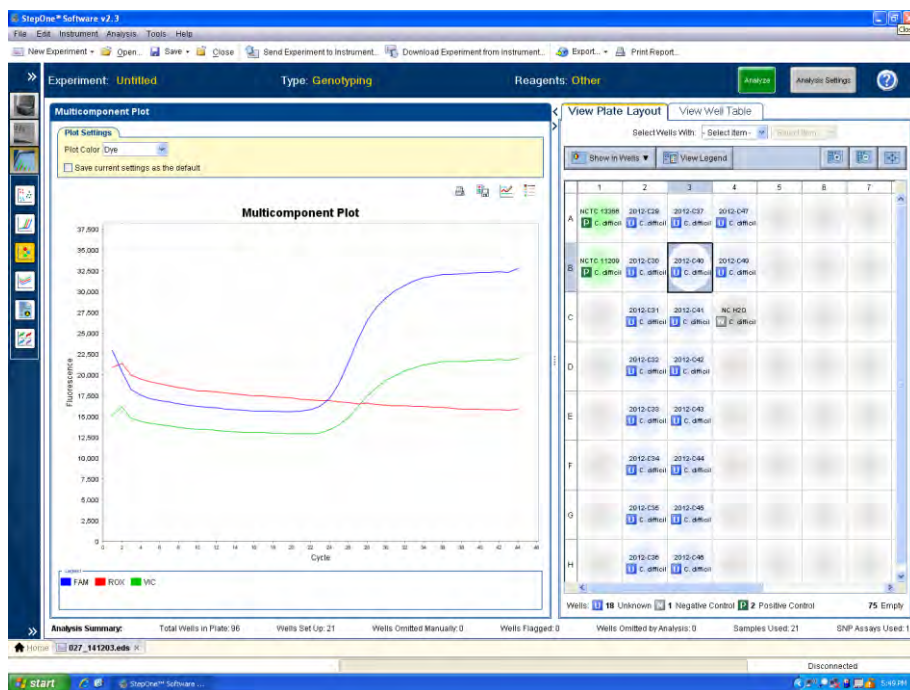
Εικόνα 13Β. Αντιπροσωπευτική εικόνα Real-Time PCR, μοτίβο (pattern) πρότυπου στελέχους NCTC 11209 (O1, Δ117-αρνητικό)



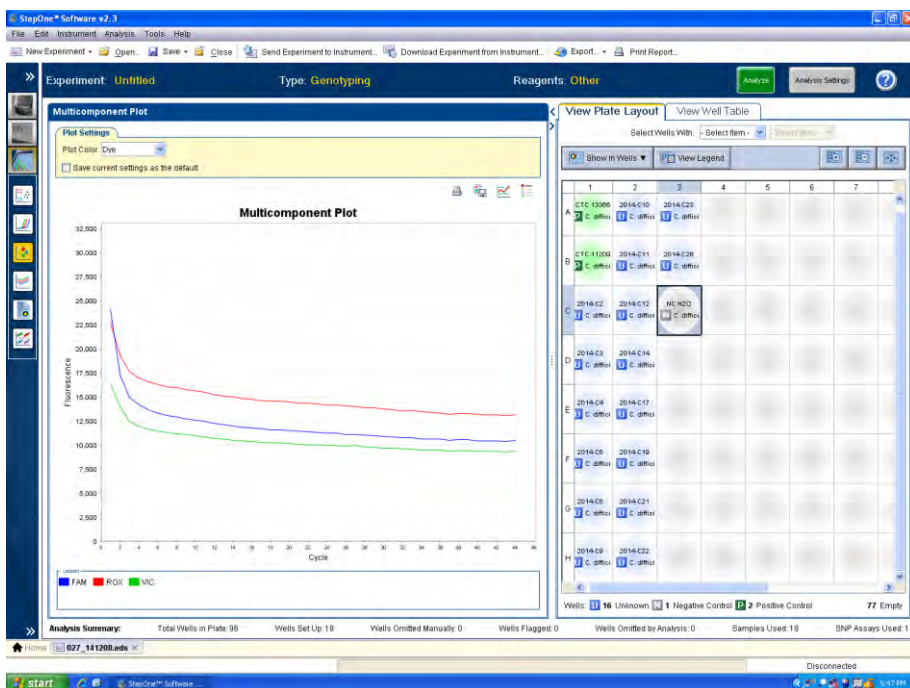
Εικόνα 13Γ. Αντιπροσωπευτική εικόνα Real-Time PCR, μοτίβο (pattern) κλινικού στελέχους C14 (Δ117-negative)



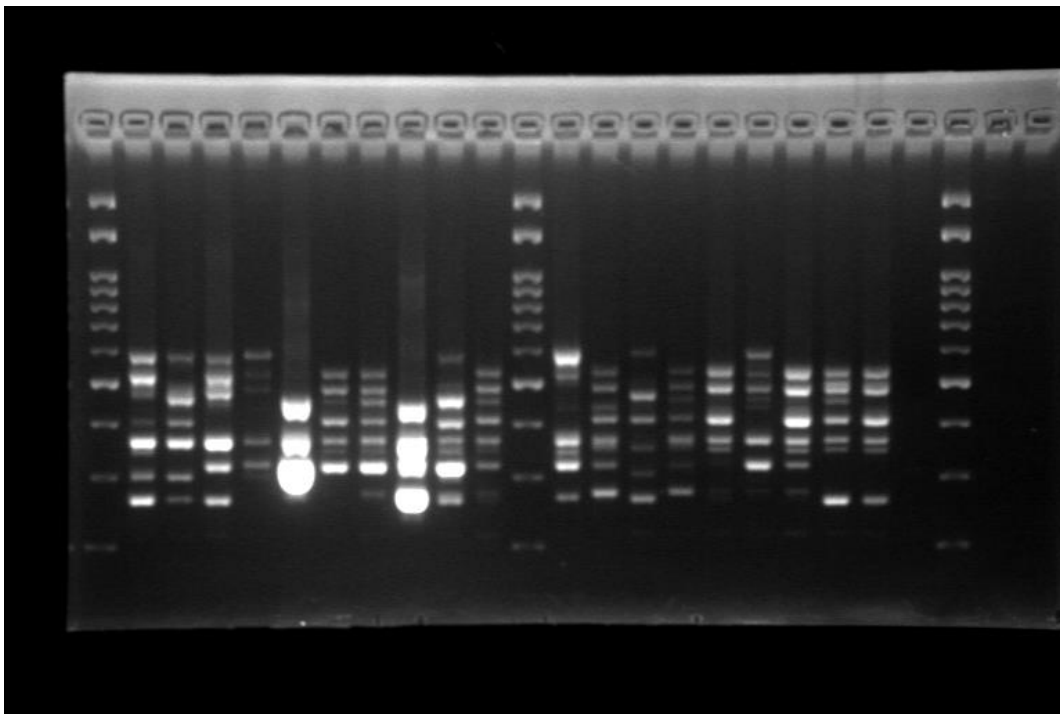
Εικόνα 13Δ. Αντιπροσωπευτική εικόνα Real-Time PCR, μοτίβο (pattern) κλινικού στελέχους C24 (Δ117-negative)



Εικόνα 13Ε. Αντιπροσωπευτική εικόνα Real-Time PCR, μοτίβο (pattern) κλινικού στελέχους C40 (Δ117-negative)



Εικόνα 13ΣΤ. Αντιπροσωπευτική εικόνα Real-Time PCR, μοτίβο (pattern) αρνητικού μάρτυρα



Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτική εικόνα PCR ριβοτυπίας

Διαδρομές L: 100 bp ladder (μάρτυρας βάρους)

Διαδρομή N: Αρνητικός μάρτυρας

Διαδρομή 1: Θετικός μάρτυρας, στέλεχος NCTC 11209

Διαδρομή 2: Θετικός μάρτυρας, στέλεχος NCTC13366 (στέλεχος O27)

Διαδρομές 3-19: Κλινικά στελέχη

5. Συζήτηση

Τα κλωστηρίδια (*Clostridium*) είναι υποχρεωτικά αναερόβια, Gram-θετικά βακτηρίδια. Τα είδη των κλωστηριδίων απαντώνται σε ποικίλα εδάφη καθώς επίσης και στον εντερικό σωλήνα των ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των κλωστηριδίων είναι η ικανότητα παραγωγής ισχυρών εξωτοξινών. Αυτές, ως επί τω πλείστων, ευθύνονται για την εκδήλωση των συμπτωμάτων των λοιμώξεων, που προκαλούν στον άνθρωπο. Αν και μέχρι στιγμής έχουν ταξινομηθεί 208 είδη και υποείδη του γένους, ο αριθμός των ειδών που ευθύνονται για την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο είναι σχετικά μικρός.

Το *C. difficile* αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο μικροοργανισμό, σχετιζόμενο άμεσα με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Στις μέρες μας το *C. difficile* είναι αδιαμφισβήτητα η κύρια αιτία πρόκλησης διάρροιας σχετιζόμενης με αντιβιοτικά στις ανεπτυγμένες χώρες και αποτελεί σημαντικό νοσογόνο παράγοντα των νοσηλευόμενων ασθενών. Το στέλεχος NAP1 (ριβότυπος O27) χαρακτηρίζεται ως υπερλοιμογόνο, λόγω μιας μονονουκλεοτιδικής μετάλλαξης (απαλοιφή) που φέρει στη θέση Δ117 του ρυθμιστικού γονιδίου *tcdC* και προκαλεί την υπερέκφραση των γονιδίων *tcdA* και *tcdB* που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες τοξίνες. Έτσι το υπερλοιμογόνο αυτό στέλεχος προκαλεί σοβαρότατες λοιμώξεις (ψευδομεμβρανώδης εντεροκολίτιδα) στους ασθενείς οι οποίοι συχνά καταλήγουν.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ριβότυπου O27 του βακτηρίου *C. difficile* με τη χρήση δυο μοριακών τεχνικών ενίσχυσης και ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, της Real-Time PCR και της PCR-ριβοτυπίας. Οι τεχνικές εφαρμόστηκαν σε ένα σύνολο 73 στελεχών του παθογόνου που απομονώθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς του νοσοκομείου ΓΝΑ “Λαϊκό” τα έτη 2012 και 2014.

Οι περίοδοι μελέτης επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι συγκρίσιμες επιδημιολογικά μεταξύ τους (το πρώτο τετράμηνο του 2012 και το πρώτο τετράμηνο του 2014). Ο χώρος της επιδημιολογικής επιτήρησης και μελέτης και στις δύο περιόδους ήταν το σύνολο του νοσοκομείου (δεν αποκλείστηκε ή δεν υπήρξε αδυναμία πρόσβασης στα δεδομένα και τα στελέχη κάποιας κλινική). Έτσι, από επιδημιολογική άποψη, τα δεδομένα ήταν πλήρως συγκρίσιμα.

Οι απομόνωση των στελεχών καταγράφηκε και τις δύο περιόδους σε όλες τις κλινικές του νοσοκομείου, χωρίς να σημειωθεί κάποια συγκεκριμένη επιδημική έξαρση σε κλινική ή θάλαμο νοσηλείας. Η ελαφρά υπεροχή των παθολογικών κλινικών στην καταγραφή των κρουσμάτων είναι συνήθης στην επιδημιολογία της λοίμωξης από *C. difficile* (CDI) και έχει σημειωθεί σε όλες τις διεθνείς μελέτες. Πιθανολογείται ότι οφείλεται στην αυξημένη χρήση στις παθολογικές κλινικές των αντιβιοτικών που σχετίζονται με την λοίμωξη αυτή, όπως οι κινολόνες και η κλινδαμυκίνη, ενώ σε αντίθεση, στις χειρουργικές κλινικές χρησιμοποιούνται περισσότερο τα β-λακταμικά (κεφαλοσπορίνες β-γενεάς και αναστολείς).

Η ελαφρά υπεροχή των ανδρών επίσης έχει καταγραφεί στις επιδημιολογικές μελέτες και θεωρείται ότι οφείλεται στις διαφορές που υπάρχουν στην εντερική χλωρίδα μεταξύ των δύο φύλων, αλλά και στις διαφορές στα θεραπευτικά δεδομένα, όπως η μεγαλύτερη χρήση κινολονών στους άνδρες μετά τα 50 έτη ηλικίας, λόγω υπερτροφίας του προστάτη και συνεπαγόμενης πιθανότητας χρόνιας προστατίτιδας, που αντιμετωπίζεται συχνά με την χρήση κινολονών.

Η αυξημένη ηλικία τέλος είναι και αυτή ένα βασικό στοιχείο της CDI, μαζί με τους υπόλοιπους παράγοντες κινδύνου που καταγράφηκαν και οι οποίοι συνήθως συνεπάγονται αυξημένη χρήση των αντιβιοτικών που οδηγούν σε ελάττωση της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, υπέρ-ανάπτυξη του *C. difficile* και έναρξη της συμπτωματολογίας της CDI.

Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν ήταν ομοιόμορφα ευαίσθητα στην βανκομυκίνη και η συντριπτική πλειοψηφία (96%) ήταν ευαίσθητα στην μετρονιδαζόλη, τα δύο κύρια αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της CDI. Διεθνώς, αλλά και στις λίγες Ελληνικές μελέτες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία, αναδεικνύεται η ευαισθησία των απομονωμένων στελεχών, με βασική εξαίρεση την συσχέτιση του ριβότυπου O27 με την αντοχή στις κινολόνες (δείκτης η αντοχή στην μοξιφλοξασίνη). Όμως και άλλοι ριβότυποι έχουν ποσοστό των στελεχών τους ανθεκτικά στις κινολόνες, χωρίς όμως την ισχυρή συσχέτιση του ριβότυπου O27.

Όλα τα στελέχη που υποβλήθηκαν σε Real-Time PCR ήταν αρνητικά ως προς την ανίχνευση της μετάλλαξης στη θέση Δ117 του γονιδίου *tcdC*. Ακολούθως η PCR-ριβοτυπία διαχώρισε επιτυχώς όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν, όμως δεν κατέταξε κάποιο στέλεχος στον ριβότυπο O27.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, για την ανίχνευση του στελέχους NAP1 (ριβότυπος O27), έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε διάφορες διεθνείς μελέτες [64, 72]. Ειδικά το πρωτόκολλο της PCR-ριβοτυπίας έχει επικρατήσει και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλες τις διεθνείς ομάδες εργασίας του παθογόνου, είτε στην μορφή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είτε με την μορφή της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Το πρωτόκολλο διαχώρισε επιτυχώς όλα τα στελέχη, όμως δεν απέδωσε τον ριβότυπο O27 σε κάποιον εξ' αυτών, επιβεβαιώνοντας τις λίγες μέχρι στιγμής Ελληνικές μελέτες που έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος ριβότυπος δεν έχει ακόμη εισαχθεί στα Ελληνικά νοσοκομεία [76-77]. Η διασπορά των στελεχών σε 16 διαφορετικούς ριβότυπους που ανευρέθηκε, συμφωνεί με τις παλαιότερες αυτές μελέτες, οι οποίες σημειώνουν ότι μέχρι στιγμής δεν επικρατεί κάποιος συγκεκριμένος ριβότυπος στα στελέχη από τα ελληνικά νοσοκομεία, αλλά υπάρχει διασπορά της κατανομής των στελεχών σε περισσότερους τύπους.

Η ύπαρξη ανθεκτικών στην μιξοφλοξασίνη στελεχών στην συλλογή που μελετήθηκε δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ύπαρξη του ριβοτύπου O27 αλλά με την ύπαρξη άλλων ριβοτύπων, των οποίων τα στελέχη, έχει διεθνώς καταγραφεί ότι εμφανίζουν αντοχή στην μοξιφλοξασίνη σε ποσοστά 5-15%. Στην παρούσα μελέτη, το σύνολο των 17 στελεχών που ήταν ανθεκτικά στην μοξιφλοξασίνη (οκτώ στελέχη του έτους 2012 και εννιά στελέχη του έτους 2014) κατατάχθηκαν σε πλειάδα ριβοτύπων και δεν υπήρξε ένα πρότυπο (pattern) ριβοτυπίας που να κυριαρχεί.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με την πανευρωπαϊκή μελέτη για τον έλεγχο διάγνωσης των λοιμώξεων από *C. difficile* (EUCLID) στην οποία συμμετείχε και η Ελλάδα, παρατηρήθηκε ελλιπής διάγνωση, κυρίως λόγω των διαφορετικών μεθοδολογιών που ακολουθούνται σε κάθε χώρα, η οποία μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο μετάδοσης των λοιμώξεων που προκαλούνται από

C.difficile κυρίως ενδονοσοκομειακά, καθώς και να οδηγήσει στη δημοσίευση μη συγκρίσιμων δεδομένων[78]. Το γεγονός αυτό πέραν του αντίκτυπου που μπορεί να έχει στην υγεία τον νοσηλευόμενων ασθενών, επιβαρύνει σημαντικά και τα εθνικά συστήματα υγείας της εκάστοτε χώρας καθώς η μεγάλη αύξηση των λοιμώξεων που σχετίζονται με το *C. difficile* (CDI) την τελευταία δεκαετία οδήγησε τις κυβερνήσεις κυρίως του Ηνωμένου Βασιλείου και άλλων χωρών της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης να ασκήσουν πίεση στους αρμόδιους οργανισμούς για την εξεύρεση μιας αποτελεσματικής στρατηγικής αντιμετώπισης των λοιμώξεων αυτών. Όπως είναι αναμενόμενο το οικονομικό κόστος επιβαρύνει κατά πολύ τον δημόσιο προϋπολογισμό της εκάστοτε χώρας [71].

Για τους παραπάνω λόγους, στις μέρες μας, η αναγκαιότητα ορισμού από ένα επίσημο Ευρωπαϊκό όργανο μιας συγκεκριμένης μεθοδολογίας ανίχνευσης λοιμώξεων που προκαλούνται από *C. difficile* και ειδικά των υπερλοιμογόνων στελεχών, όπως ο ριβότυπος O27, είναι πιο αναγκαία από ποτέ. Η ανάγκη αυτή ενισχύεται ακόμα περισσότερο και από την ύπαρξη συνεχών μεταναστευτικών ρευμάτων που παρατηρούνται την τελευταία τριετία και κατευθύνονται στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη όπου η συχνότητα εμφάνισης του ριβότυπου O27 και γενικότερα των λοιμώξεων από *C. difficile* είναι αυξημένη [77,79].

Αναφορές

1. Maczulak Anne (2011), "Clostridium", *Encyclopedia of Microbiology*, Facts on File, pp. 168–173, [ISBN 978-0-8160-7364-1](#)
2. Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 66-98.
3. Voth DE, Ballard JD. Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 247-63.
4. Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J Jr et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1981; 143: 42-50.
5. Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus Clostridium. pp. 11411200. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt GH (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Baltimore. Williams & Wilkins. 1986.
6. Tortora Gerard J., Funke R. Berdell, Case L Christine. *Microbiology: An Introduction* 11th ed. Pearson, 2013
7. Smith LDS, Williams BL. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. 3rd ed. Springfield. Thomas CC (ed). 1984.
8. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol*. 1982; 15: 189-203.
9. George WL, Finegold SM. Clostridia in the human gastrointestinal flora. pp. 1-37. In Boriello SP (ed). *Clostridia in Gastrointestinal Disease*. Boca Raton, CRC Press, Inc. 1985.
10. Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Clostridium argentinense, sp. nov: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some non-toxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminal* or *Clostridium hastiforme*. *Int J Syst Bacteriol* 1988; 38: 375.
11. Allen SD, Baron EJ. Clostridium. In Balows A, Hausler WJJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1991.
12. Varki NM, Aquino TI. Isolation of *Clostridium difficile* from hospitalized patients without antibiotic-associated diarrhea or colitis. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 659-62.

13. Kato H, Kato N, Watanabe K, Yamamoto T, Suzuki K, Ishigo S et al. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. J Clin Microbiol 2001; 39: 1391-5.
14. Lorber B. Gas gangrene and other clostridium-associated diseases. pp 2549-2561. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. vol. 2. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2000.
15. Riley TV, Bowman RA, Carroll SM. 1983. Diarrhoea associated with *Clostridium difficile* in a hospital population. Med J Aust 1: 166-9
16. Kelly CP, LaMont JT. 2008. *Clostridium difficile*-more difficult than ever. N Engl J Med 359: 1932-40
17. Stabler RA, Dawson LF, Valiente E, Cairns MD, Martin MJ, Donahue EH, Riley TV, Songer JG, Kuijper EJ, Dingle KE, Wren BW. 2012. Macro and micro diversity of *Clostridium difficile* isolates from diverse sources and geographical locations. PLoS One 7: e31559
18. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Krystofiak S, Patel-Brown S, Pasculle AW, Paterson DL, Saul M, Harrison LH. 2005. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol 26: 273-80
19. Thomas C, Stevenson M, Riley TV. 2003. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review. J Antimicrob Chemother 51: 1339-50
20. O'Toole H. 1935. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 49: 390-402
21. Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerdeno-Tarraga AM, Wang H, Holden MT, Wright A, Churcher C, Quail MA, Baker S, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Cronin A, Davis P, Dowd L, Fraser A, Feltwell T, Hance Z, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Mungall K, Price C, Rabbinowitsch E, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Unwin L, Whithead S, Dupuy B, Dougan G, Barrell B, Parkhill J. 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. Nat Genet 38: 779-86
22. He M, Sebahia M, Lawley TD, Stabler RA, Dawson LF, Martin MJ, Holt KE, Seth-Smith HM, Quail MA, Rance R, Brooks K, Churcher C, Harris D, Bentley SD, Burrows C, Clark

- L, Corton C, Murray V, Rose G, Thurston S, van Tonder A, Walker D, Wren BW, Dougan G, Parkhill J. 2010. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 7527-32
23. Zidaric V, Zemljic M, Janezic S, Kocuvan A, Rupnik M. 2008. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe* 14: 325-7
 24. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366: 1079-84
 25. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, Simmons RL. 2002. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann Surg* 235: 363-72
 26. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology* 136: 1913-24
 27. Linder JA, Huang ES, Steinman MA, Gonzales R, Stafford RS. 2005. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *Am J Med* 118: 25968
 28. Spigaglia P, Carattoli A, Barbanti F, Mastrantonio P. 2010. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in *Clostridium difficile* isolates by real-time PCR. *Mol Cell Probes* 24: 61-7
 29. Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, Pituch H, Reichert P, Schneider F, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Barbut F, Delmee M, Wilcox M, Pearson A, Patel BC, Brown DJ, Frei R, Akerlund T, Poxton IR, Tull P. 2007. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill* 12: E1-2
 30. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 12 Suppl 6: 2-18
 31. Barbut F, Petit JC. 2001. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect* 7: 405-10
 32. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J, Jr. 1995. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16: 459-77
 33. Poutanen SM, Simor AE. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ* 171: 51-8
 34. Sorg JA, Sonenshein AL. 2008. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol* 190: 2505-12

35. Williams OM, Spencer RC. 2009. The management of *Clostridium difficile* infection. Br Med Bull 91: 87-110
36. Borriello SP, Davies HA, Kamiya S, Reed PJ, Seddon S. 1990. Virulence factors of *Clostridium difficile*. Rev Infect Dis 12 Suppl 2: S185-91
37. Lysterly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect Immun 47: 349-52
38. Carter GP, Rood JI, Lyras D. 2010. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. Gut Microbes 1: 58-64
39. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature 458: 1176-9
40. Jank T, Gieseemann T, Aktories K. 2007. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. Glycobiology 17: 15R-22
41. von Eichel-Streiber C, Sauerborn M, Kuramitsu HK. 1992. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and Streptococcus mutans glucosyltransferases. J Bacteriol 174: 6707-10
42. Pothoulakis C, Gilbert RJ, Cladaras C, Castagliuolo I, Semenza G, Hitti Y, Montcrief JS, Linevsky J, Kelly CP, Nikulasson S, Desai HP, Wilkins TD, LaMont JT. 1996. Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. J Clin Invest 98: 641-9
43. Tucker KD, Wilkins TD. 1991. Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. Infect Immun 59: 73-8
44. Hofmann F, Busch C, Prepens U, Just I, Aktories K. 1997. Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. J Biol Chem 272: 11074-8
45. Pfeifer G, Schirmer J, Leemhuis J, Busch C, Meyer DK, Aktories K, Barth H. 2003. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. J Biol Chem 278: 44535-41
46. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. 2007. *tcdC* genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 45: 215-21

47. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353: 2433-41
48. Matamouros S, England P, Dupuy B. 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. Mol Microbiol 64: 1274-88
49. Voth DE, Ballard JD. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 18: 247-63
50. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. 2001. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 7: 421-7
51. Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. 1998. Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. Biochemistry 37: 5296-304
52. Jank T, Reinert DJ, Giesemann T, Schulz GE, Aktories K. 2005. Change of the donor substrate specificity of *Clostridium difficile* toxin B by site-directed mutagenesis. J Biol Chem 280: 37833-8
53. Jank T, Aktories K. 2008. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol 16: 222-9
54. Verma P, Makharia GK. 2011. *Clostridium difficile* associated diarrhea: new rules for an old game. Trop Gastroenterol 32: 15-24
55. Wolf PL, Kasyan A. 2005. Images in clinical medicine. Pseudomembranous colitis associated with *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353: 2491
56. Girotra M, Kumar V, Khan JM, Damisse P, Abraham RR, Aggarwal V, Dutta SK. 2012. Clinical predictors of fulminant colitis in patients with *Clostridium difficile* infection. Saudi J Gastroenterol 18: 133-9
57. Jaber MR, Olafsson S, Fung WL, Reeves ME. 2008. Clinical review of the management of fulminant *Clostridium difficile* infection. Am J Gastroenterol 103: 3195-203
58. Goldenberg SD, Cliff PR, French GL. 2010. Glutamate dehydrogenase for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 48: 3050-1
59. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R, Shetty NR. 2009. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. Br J Biomed Sci 66: 1-5
60. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. 1994. *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med 330: 257-62

61. Doern GV, Coughlin RT, Wu L. 1992. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays. *J Clin Microbiol* 30: 20426
62. de Boer RF1, Wijma JJ, Schuurman T, Moedt J, Dijk-Alberts BG, Ott A, Kooistra-Smid AM, van Duynhoven YT. *J Microbiol Methods*. Evaluation of a rapid molecular screening approach for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in general and subsequent identification of the tcdC Δ 117 mutation in human stools. 2010 Oct;83(1):59-65. doi: 10.1016/j.mimet.2010.07.017. Epub 2010 Jul 30
63. Jensen MB1, Olsen KE, Nielsen XC, Hoegh AM, Dessau RB, Atlung T, Engberg J. Diagnosis of *Clostridium difficile*: real-time PCR detection of toxin genes in faecal samples is more sensitive compared to toxigenic culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Apr;34(4):727-36. doi: 10.1007/s10096-014-2284-7. Epub 2014 Nov 25.
64. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N, Mastroeni P, Scott P, Raisen C, Mottram L, Fairweather NF, Wren BW, Parkhill J, Dougan G. 2009. Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect Immun* 77: 3661-9
65. Hedge DD, Strain JD, Heins JR, Farver DK. 2008. New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI). *Ther Clin Risk Manag* 4: 949-64
66. McFarland LV. 2005. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? *J Med Microbiol* 54: 101-11
67. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31:431-455.
68. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al, for the OPT-80-003 Clinical Study Group. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 2011;364:422-431
69. Jeffrey T. Wiczorkiewicz, Bert K. Lopansri, Adam Cheknis, James R. Osmolski, David W. Hecht, Dale N. Gerding, Stuart Johnson. Fluoroquinolone and Macrolide Exposure Predict *Clostridium difficile* Infection with the Highly Fluoroquinolone- and Macrolide-Resistant Epidemic C. difficile Strain BI/NAP1/027. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016; 60 (1): 418 DOI: 10.1128/AAC.01820-15

70. Wilcox MH, Cunniffe JG, Trundle C, Redpath C. 1996. Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 34: 23-30
71. Department of Health. 2009 [online]. *Clostridium difficile* infection: how to deal with the problem. Available: http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digitalassets/documents/digitalasset/dh_093218.pdf
72. Dubberke R. E, Olsen M. Burden of *Clostridium difficile* on the Healthcare System. *Clin Infect Dis.* (2012) 55 (suppl 2): S88-S92.doi: 10.1093/cid/cis335
73. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N, The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95-125.
74. van den Berg RJ, Claas EC, Oyib DH, Klaassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, Kuijper EJ, Characterization of Toxin A-negative, Toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by Amplified Fragment Length Polymorphism and PCR-ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1035-1041.
75. Bidet P1, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Jun 15;175(2):261-6.
76. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I; European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD), Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 2007;13:1048–1057.
77. Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, Wilcox MH, PELSP *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clinical Microbiology and Infection* 2015;21:e9-e16.
78. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Müller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Norén T, Nováková E, Nyč O, Rupnik M, Schmid D, Wilcox MH; Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis.* 2014 Dec;14(12):1208-19. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70991-0. Epub 2014 Nov 7.
79. Balsells E, Filipescu T, Kyaw MH, Wiuff C, Campbell H, Nair H; Infection prevention and control of *Clostridium difficile*: a global review of guidelines, strategies, and

recommendations. J Glob Health. 2016 Dec;6(2):020410. doi:
10.7189/jogh.06.020410.