



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Clostridium difficile* »**

ΙΩΑΝΝΑ Δ. ΒΟΥΛΓΑΡΙΔΗ

Ιατρός



Λάρισα, Οκτώβριος 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
« ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Clostridium difficile* »

ΙΩΑΝΝΑ Δ. ΒΟΥΛΓΑΡΙΔΗ
Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- **Πετεινάκη Ευθυμία**, Αναπλ.Καθηγήτρια Μικροβιολογίας-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
- **Σίμος Γεώργιος**, Καθηγητής Βιοχημείας
- **Γερμενής Αναστάσιος**, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη
Μοριακή Ιατρική

Λάρισα, Οκτώβριος 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
TITLE

“ Epidemiological study of *Clostridium difficile* strains”

By
Ioanna Voulgaridi

Three-member examining committee:

- **Efthymia Petinaki**, Associate Professor of Microbiology, Supervisor Professor
- **George Simos**, Professor of Biochemistry
- **Anastasios Germanis**, Professor of Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine.

Larisa, October 2016

| | |
|---|----|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..... | 8 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 10 |
| Abstract..... | 12 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 14 |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 16 |
| ΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ..... | 17 |
| 1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΩΝ..... | 18 |
| 2. <i>Clostridium difficile</i> | 20 |
| 2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ..... | 20 |
| 2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ..... | 22 |
| 2.3. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ..... | 24 |
| 2.3.1. MOBILE GENETIC ELEMENTS..... | 27 |
| 2.3.1.1. Tn916..... | 28 |
| 2.3.1.2. Tn1549..... | 29 |
| 2.3.1.3. Tn5397..... | 29 |
| 2.3.1.4. Tn4453..... | 30 |
| 2.3.1.5. Tn5398..... | 30 |
| 2.4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ..... | 31 |
| 2.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ..... | 32 |
| 2.5.1. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ..... | 38 |
| 2.5.2. ΥΠΕΡΛΟΙΜΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ – HYPERVIRULENCE..... | 39 |
| 2.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ..... | 40 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.7. | ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ..... | 48 |
| 2.8. | ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ..... | 49 |
| 2.9. | ΠΡΟΛΗΨΗ..... | 53 |
| 2.10. | ΘΕΡΑΠΕΙΑ..... | 54 |
| 2.11. | ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ..... | 56 |
| 2.11.1. | ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ..... | 58 |
| 2.11.2. | ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ..... | 59 |
| 2.11.3. | ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ..... | 60 |
| 2.11.3.1. | ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ..... | 60 |
| 2.11.3.2. | ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΖΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΕΣ..... | 61 |
| 2.11.3.3. | ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ..... | 62 |
| 2.11.3.4. | ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ..... | 63 |
| 2.11.3.5. | ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗ..... | 63 |
| 2.11.3.6. | ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ..... | 64 |
| 2.11.3.7. | ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ..... | 65 |
| 2.11.3.8. | ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ..... | 66 |
| 2.11.3.9. | RIFAMYCINS ΚΑΙ FIDAXOMYCIN..... | 67 |
| 2.11.3.10. | ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (MDR)..... | 68 |
| | ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 69 |
| | ΣΚΟΠΟΣ..... | 70 |
| 3. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 71 |
| 3.1. | ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ - ΣΚΟΠΟΣ..... | 71 |
| 3.2. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 71 |
| 3.2.1. | ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.1.1. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΗΣ ΔΕΪΔΡΟΓΕΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΕΣΤ ΑΝΟΣΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ..... | 73 |
| 3.2.1.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ..... | 76 |
| 3.2.1.2.1. Α. ΣΕ ΧΡΩΜΟΓΟΝΟ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ..... | 76 |
| 3.2.1.2.2. Β. ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΥΧΟ ΑΓΑΡ..... | 76 |
| 3.2.1.3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΧΡΩΣΗΣ ΚΑΤΑ GRAM..... | 77 |
| 3.2.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ..... | 78 |
| 3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (EXTRACTION)..... | 80 |
| 3.2.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 83 |
| 3.2.4.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ..... | 83 |
| 3.2.4.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΞΙΝΩΝ..... | 86 |
| 3.2.4.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΥΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ..... | 87 |
| 3.2.4.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ MLST | 89 |
| 3.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR..... | 94 |
| 3.2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ..... | 96 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 99 |
| 4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ – ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 99 |
| 4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ..... | 99 |
| 4.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ –ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ..... | 102 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 105 |
| 6. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ..... | 109 |
| 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 110 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη με θέμα «Επιδημιολογική Διερεύνηση Αντοχής Στελεχών *Clostridium difficile*» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μικροβιολογίας κ.Πετεινάκη Ευθυμίας.

Για την περάτωση της μεταπτυχιακής εργασίας ευχαριστώ ολόψυχα την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ.Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Την ευχαριστώ για την επιστημονική καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και ιδιαίτερα για την κατανόηση καθόλη τη διάρκεια της μελέτης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο και τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Αναστάσιο Γερμενή οι οποίοι με τίμησαν με την συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και για την επίβλεψη της.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις Διευθύντριες του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, κ. Μαρία Τσιακάλου και κ. Κούλα Ταμβάκη, καθώς και όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο που με την ανοχή και την υπομονή τους μου έδωσαν χρόνο για την εκπλήρωση της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στις κ. Στυλιανή Σάρρου και κ. Χριστίνα Χατεδάκη για τις πολύτιμες συμβουλές, τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσαν, την υπομονή και τον χρόνο τους. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τις κ. Βασιλική Χαχούδη και κ. Αλεξάνδρα Κούμπου καθώς και όλο το ιατρικό και λοιπό προσωπικό του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους μεγαλύτερους υποστηρικτές της ζωής μου, την οικογένεια μου και την μητέρα μου, που όλα αυτά τα χρόνια μου συμπαραστέκονται με κάθε τρόπο και διαμορφώνουν γύρω μου ένα άνετο περιβάλλον ώστε να μπορώ να εργαστώ και να επεκτείνω τις γνώσεις μου.

Λάρισα, Οκτώβριος 2016.

Στα παιδιά μου που με στερούνται,

στον άνδρα μου που με στηρίζει

Και στη μητέρα μου που υπομένει...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Clostridium difficile* είναι Gram θετικό βακτηρίδιο, αυστηρά αναερόβιο με δυνατότητα παραγωγής σπόρων. Λοιμογόνα θεωρούνται τα στελέχη που παράγουν τοξίνες, Α ή και Β. Αποτελεί το κύριο αίτιο διάρροιας σε νοσηλευόμενους ασθενείς κυρίως μετά την χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων. Η λοίμωξη ποικίλει από ήπια έως μέτρια κολίτιδα με μικρής έκτασης συμπτωματολογία έως σοβαρή ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο. Η δυνατότητα παραγωγής σπόρων του επιτρέπει την μακρά επιβίωση έως και πάνω από 6 μήνες. Τα τελευταία χρόνια, από το 2000 και έπειτα, παρατηρείται αλλαγή στην επιδημιολογία του μικροοργανισμού παγκοσμίως με ανάδυση νέων υπερλοιμογόνων στελεχών με πολυαντοχή και παραγωγή μιας επιπλέον τοξίνης, της Δυαδικής.

Σκοπός της εργασίας μας ήταν ο έλεγχος της ευαισθησίας στελεχών *C. difficile* σε ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά, η μελέτη του μηχανισμού αντοχής των ανθεκτικών στελεχών μέσω της αναζήτησης γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στους εξεταζόμενους παράγοντες, ο έλεγχος λοιμογονικότητας μέσω της παραγωγής τοξινών με ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων και τέλος η μοριακή τυποποίηση των στελεχών αυτών.

Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τυχαία για περαιτέρω έλεγχο 36 στελέχη που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς κατά το 2015. Όλα τα υπο μελέτη στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν και έγινε έλεγχος της αντιμικροβιακής αντοχής σε εννέα αντιμικροβιακά (Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Μετρονιδαζόλη, Βανκομυκίνη, Τετρακυκλίνη, Ριφαμικίνη, Σιπροφλοξασίνη, Μοξιφλοξασίνη και Λεβοφλοξασίνη) με ταινίες αντιβιοτικών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σε θρεπτικό υλικό ενώ ακολούθησε μοριακός έλεγχος για υπεύθυνα γονίδια αντοχής.

Όλα τα στελέχη βρέθηκαν ευαίσθητα σε μετρονιδαζόλη και βανκομυκίνη. Στα υπόλοιπα αντιμικροβιακά το 16,7% των στελεχών βρέθηκαν ανθεκτικά σε ένα και το 22,2% σε δύο ενώ από τα 36 στελέχη τα 26 (72,2%) εμφάνισαν αντοχή σε τρεις ή και περισσότερες τάξεις αντιμικροβιακών. Τα στελέχη με πολυαντοχή, δηλαδή σε τρία και πάνω αντιβιοτικά, συσχετίστηκαν κυρίως με τον ST 37 (13 από τα 26) και με σειρά εμφάνισης ακολουθεί ο ST 11 σε 7 από τα 26 στελέχη.

Σε όλα τα στελέχη με πολυαντοχή και αντοχή στην τετρακυκλίνη ανιχνεύθηκε το *tetM* γονίδιο και επίσης στα 18 από τα 22 στελέχη με αντοχή ταυτόχρονα στην ερυθρομυκίνη και στην τετρακυκλίνη το *ermB* γονίδιο, η παρουσία του οποίου συσχετίστηκε με πολύ υψηλές τιμές MIC και για τα δυο αντιμικροβιακά, >256 gr/ml. Τα 34 από τα 36 στελέχη παρουσίασαν αντοχή

στις κινολόνες και από αυτά τα 25 εμφάνισαν γνωστές μεταλλάξεις είτε στην *GyrA* είτε στην *GyrB* υπομονάδα της DNA γυράσης.

Συνολικά από την μοριακή τυποποίηση των στελεχών προκύπτει ότι ο επικρατών κλώνος είναι ο ST 37 ο οποίος είναι θετικός για τις τοξίνες A και B τοξίνες αλλά αρνητικός για την δυαδική. Ακολουθεί ο ST 11 με παραγωγή και της δυαδικής τοξίνης ενώ οι υπόλοιποι STs κατανέμονται ομοιόμορφα. Αξίζει να σημειωθεί και η παρουσία του ST 193 που παράγει και αυτός δυαδική τοξίνη.

Συνοψίζοντας καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα σε μετρονιδαζόλη και βανκομυκίνη
- Η αντοχή στην τετρακυκλίνη (44,5% %) συσχετίστηκε με την παρουσία *tetM* γονιδίου.
- 23 από τα 36 στελέχη (64%) εμφάνισαν αντοχή σε ερυθρομυκίνη με MLS_B φαινότυπο που συσχετίστηκε με την παρουσία του γονιδίου *ermB* και με υψηλές τιμές MIC, >256 g/ml.
- Όλα τα στελέχη είχαν αντοχή σε σιπροφλοξασίνη και μεγάλο ποσοστό στις νεότερες κινολόνες, μοξιφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη, που συσχετίστηκε σε μεγάλο ποσοστό με γνωστές μεταλλάξεις στην *gyr A* (82 *Thr* to *Ile*) ή/ και *gyr B* περιοχή (416 *Ser* to *Ala*)
- Ο κλώνος που κυριαρχεί στα στελέχη της μελέτης είναι ο ST37 και ακολουθεί ο ST11.
- Τα περισσότερα στελέχη ST37 και ST11 εμφάνισαν αντοχή σε πάνω από τρεις τάξεις αντιβιοτικών.
- Τα στελέχη που ανήκουν στον ST11 και ST193 έφεραν γονίδια και για την *binary toxin*.
- Η μελέτη στελεχών *Clostridium difficile* στην περιοχή της Θεσσαλίας βασιζόμενη στην μέθοδο MLST έδειξε μεγάλη γενετική ποικιλομορφία, με επικράτηση των κλώνων ST37, ST11 και πολυαντοχή.

ABSTRACT

Clostridium difficile is a Gram positive spore-forming bacilli that exerts its virulence by the production of toxins A or B or both of them. *C. difficile* is the main cause of diarrhea in hospitalized patients while the clinical manifestations caused by the microorganism vary from mild to moderate colitis with minor symptoms to severe pseudomembranous colitis, a life threatening condition. The ability of the bacterium to form spores allows it to survive in the environment for a long time, over 6 months. The last fifteen years there is a change in the epidemiological map of the microorganism worldwide because of the emergence of super-virulent strains that produce an additional toxin, called binary.

Aim of the present study was to determine the sensitivity of *C. difficile* strains to various antimicrobials, to study their resistance mechanism genes, to define their toxin profile and to characterize the strains through molecular methods.

The strain collection included 36 isolates recovered from hospitalized patients during 2015. All the strains were subcultured and checked for their antimicrobial resistance in nine antimicrobials (vancomycin, metronidazole, erythromycin, clindamycin, tetracycline, rifampicin, ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin) by a E-tests (bioMérieux), followed by molecular testing for resistance genes (*ermB*, *tetM*, *gyrA* and *gyrB*).

According to the susceptibility results all strains were sensitive to metronidazole and vancomycin. In addition, 16.7% of the strains were resistant to one antimicrobial, 22.2% in two antimicrobials, while the 26 out of the 36 (72.2%) were resistant to three or more antimicrobial classes (multi-resistant strains). The majority of the multi-resistant strains belonged to ST 37, followed by ST 11, 13 and 7 out of 26 strains respectively.

Resistance to tetracycline and erythromycin were found to be correlated with the presence of *tetM* and *ermB* genes, while mutation in either *GyrA* or *GyrB* subunits of gyrase DNA were responsible for quinolones resistance.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τις πρώτες αναφορές του *C. difficile* ως αιτιολογικού παράγοντα της διάρροιας σχετιζόμενης με τα αντιβιοτικά και της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας έως σήμερα έχει γίνει αλματώδης πρόοδος στη μελέτη του μικροοργανισμού ως προς το ρόλο του στην παθογένεια της νόσου, την επιδημιολογία και τη θεραπεία του.

Οι λοιμώξεις από *C. difficile* (CDI) αναδεικνύονται ως μείζον πρόβλημα που σχετίζεται με την νοσηλεία και αποτελούν τη συχνότερη αιτία λοιμώδους νοσοκομειακής διάρροιας στις βιομηχανοποιημένες χώρες. Βασικός προδιαθεσικός παράγοντας κινδύνου αποτελεί η αυξημένη κατανάλωση αντιμικροβιακών ευρέως φάσματος που οδηγούν σε εξάντληση της μικροβιακής χλωρίδας και σε αύξηση της αντοχής του μικροοργανισμού. Επιπλέον η αύξηση τόσο του μέσου όρου ηλικίας του πληθυσμού με τα συνοδά χρόνια προβλήματα υγείας αλλά και των ασθενών με ανοσοανεπάρκεια (χημειοθεραπεία, HIV, ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες, κα) καθιστούν τις ομάδες αυτές πιο ευπαθείς σε CDI.

Το *C. difficile* είναι ένα υποχρεωτικά αναερόβιο gram (+) βακτήριο σπορογόνο που βρίσκεται παντού, στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων, στο έδαφος, το νερό και το περιβάλλον και πολύ συχνά σε χώρους υγειονομικού ενδιαφέροντος όπως σε νοσοκομεία, γηροκομεία, κλινικές αποκατάστασης και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στον καθαρισμό με κοινά απολυμαντικά. Τα σπόρια δεν σκοτώνονται από την αλκοόλη και μπορούν να επιζήσουν για μήνες (>6) στο περιβάλλον. Ο συνωστισμός των ασθενών στα ελληνικά νοσοκομεία, η χρήση κοινής τουαλέτας από πολλούς νοσηλευόμενους και η αδυναμία ελέγχου των νοσοκομειακών λοιμώξεων ενισχύουν την διασπορά του μικροοργανισμού. Η μετάδοση γίνεται κυρίως από άτομο σε άτομο ή από το περιβάλλον και σπανιότερα η νόσος οφείλεται σε φορεία του γαστρεντερικού σωλήνα του ασθενή με *C. difficile*.

Η CDI προκαλείται όταν τα βακτήρια, μετά από κατάποση τους, αποικίσουν τον εντερικό βλεννογόνο, υπερνικήσουν την φυσιολογική χλωρίδα της περιοχής και επιπλέον παράγουν τοξίνες υπεύθυνες για την πρόκληση συμπτωμάτων. Το *C. difficile* παράγει τρία είδη τοξινών : την τοξίνη A (εντεροτοξίνη), την τοξίνη B (κυτταροτοξίνη) και μια τρίτη τη Δυναδική τοξίνη (Binary) ο ρόλος της οποίας είναι βοηθητικός των άλλων δύο αλλά όχι ακριβώς γνωστός. Παθογόνα θεωρούνται μόνο τα στελέχη που παράγουν τοξίνες, A και B, ενώ σε αντίθετη περίπτωση θεωρείται αποικισμός χωρίς εκδήλωση συμπτωματικής λοίμωξης. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ανάδυση ενός νέου υπερλοιμογόνου στελέχους με υπερπαραγωγή τοξίνης A, B αλλά και Binary και ταυτόχρονα αυξημένη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Η καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού απαιτεί ειδικά καλλιεργητικά υλικά και μεθόδους ταυτοποίησης και είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα (αναερόβια επώαση 48-72 h). Έτσι στα περισσότερα εργαστήρια ως μέθοδος ελέγχου χρησιμοποιείται η ανίχνευση σε διαρροϊκά κόπρανα του αντιγόνου της γλουταμινικής δεϋδρογονάσης (*C. difficile* glutamate dehydrogenase, GDH) με ανοσοενζυματική μέθοδο (rapids enzyme immunoassays, EIA) ή των τοξινών του μικροοργανισμού με ανοσοχρωματογραφία (immunochromatographic rapid test) ή EIA. Η μέθοδος αναφοράς είναι ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας σε κυτταροκαλλιέργεια. Πλέον μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για την ανίχνευση του κλωστηριδίου αλλά και το γενετικό χαρακτηρισμό του. Τέτοιες τεχνικές είναι πολύτιμες όσο το ποσοστό νοσοκομειακών λοιμώξεων που οφείλεται σε κλωστηρίδιο αυξάνεται και η επιδημιολογία των λοιμογόνων στελεχών αλλάζει. Οπότε είναι απαραίτητος ο έλεγχος της ευαισθησίας των νέων στελεχών καθώς και η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των γονιδίων που σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντοχής και η μοριακή τυποποίηση τους ώστε να υπάρχει μια παγκόσμια γλώσσα συνεννόησης. Η CDI είναι νόσος με σημαντική κλινική και οικονομική επιβάρυνση οπότε είναι απαραίτητο να καθοριστεί το μέγεθος του προβλήματος και να μελετηθεί εκτενέστερα ο μικροοργανισμός ώστε να γίνει πιο στοχευμένος και εντατικός ο έλεγχος και η αντιμετώπιση του.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ετυμολογία

Clostridium difficile

[klos-trid'e-əm di-fi-sil']

Clostridium, το όνομα του γένους των gram (+) αναερόβιων βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρους προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «κλωστήρ» (άξονας ή αδράχτι) διότι κάτω από το μικροσκόπιο οι αποικίες μοιάζουν με το αδράχτι που χρησιμοποιείται στην ύφανση και με μακριά ραβδιά με μια διόγκωση στο άκρο. Το όνομα του είδους, *difficile*, είναι μια μορφή του Λατινικού επιθέτου *difficilis*, διότι, όταν εντοπίστηκε για πρώτη φορά (από Hall και O'Toole το 1935), ο οργανισμός ήταν δύσκολο να απομονωθεί και πολύ αργή ανάπτυξη σε καλλιέργεια. Ωστόσο, πιθανότατα λόγω της εξοικείωσης του γαλλικού όρου με την ίδια ορθογραφία και σημασία, η γαλλική προφορά έχει γίνει ευρέως χρησιμοποιούμενη. Τα βακτήρια αυτά είναι μέρος των συμβιωτικών μικροοργανισμών της εντερικής χλωρίδας στον άνθρωπο και το ξινογόνο στελέχη μπορεί να προκαλέσουν ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα, μια σοβαρή λοίμωξη του παχέος εντέρου, μετά την εκρίζωση της φυσιολογικής χλωρίδας της περιοχής, σε ασθενείς οι οποίοι είχαν λάβει προηγουμένως αντιμικροβιακά φάρμακα (1)

1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΩΝ

| | | |
|----------------|--------------|------------------------------|
| <i>Domain</i> | (επικράτεια) | <i>Bacteria</i> |
| <i>Kingdom</i> | (βασίλειο) | <i>Eubacteria</i> |
| <i>Phylum</i> | (φύλο) | <i>Furmicutes</i> |
| <i>Class</i> | (κλάση) | <i>Clostridia</i> |
| <i>Order</i> | (τάξη) | <i>Clostridiales</i> |
| <i>Family</i> | (οικογένεια) | <i>Clostridiaceae</i> |
| <i>Genus</i> | (γένος) | <i>Clostridium</i> |
| <i>Species</i> | (είδος) | <i>Clostridium difficile</i> |

Η κλάση *Clostridia* του φύλου *Furmicutes* είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει ποικίλα gram (+) βακτήρια υποχρεωτικά αναερόβια ικανά να παράγουν ενδοσπόρια και ο κύριος λοιμογόνος παράγοντας τους είναι η παραγωγή τοξινών. Αυτές ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την εκδήλωση των συμπτωμάτων των λοιμώξεων που προκαλούν τα κλωστηρίδια στον άνθρωπο. Αρκετά από αυτά είναι σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο, πολλά είναι δυνητικά παθογόνα και αρκετά είναι σαπροφυτικά. Οι σπόροι των κλωστηριδίων έχουν σχήμα που ποικίλει από σφαιρικό έως ωοειδές και εμφανίζονται με την μορφή διόγκωσης στο σώμα του βακτηρίου. Οι σπόροι αναπτύσσονται σε διάφορες θέσεις του μικροβιακού κυττάρου και ανάλογα με το είδος μπορεί να είναι τελικοί, υποτελικοί ή κεντρικοί δίνοντας διάφορα σχήματα στα κλωστηρίδια.

Τα πιο γνωστά και καλά μελετημένα ήταν τα *C. botulinum* και *C. tetani*. Όμως λόγω της όλο και συχνότερης εμφάνισης τεκμηριωμένων λοιμώξεων από *C. difficile* το βακτήριο αυτό άρχισε να μελετάται εντατικά. Βρέθηκε λοιπόν ότι αποτελεί σημαντικό παθογόνο του ανθρώπου συσχετιζόμενο με διάρροια μετά από λήψη αντιβιοτικών (2) και συναντάται συχνότερα στο ενδονοσοκομειακό περιβάλλον. Επιπλέον αποτελεί χλωρίδα αλλά και παθογόνο σε ζώα όπως χοίροι, άλογα, κα (3,4). Οι κλωστηριδιακές λοιμώξεις διακρίνονται σε ενδογενείς (πηγή η χλωρίδα του ασθενούς) και σε εξωγενείς (πηγή το περιβάλλον). Ειδικά οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *C. difficile* χαρακτηρίζονται ως μικτές (ενδογενείς και εξωγενείς), επειδή το συγκεκριμένο είδος αφενός ανευρίσκεται σε μικρό ποσοστό στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου και αφετέρου έχοντας τη δυνατότητα μετατροπής σε ανθεκτικούς σπόρους διασπείρεται από ασθενή σε ασθενή, όπως έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια νοσοκομειακών επιδημιών διάρροιας και ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας

Το 1994 διαπιστώθηκε ότι πιθανόν το *C. difficile* και κάποια άλλα είδη όπως τα *C. sordelli*,

P. anaerobius, κα ανήκαν σε μια ξεχωριστή οικογένεια (5). Έτσι λοιπόν μετά την ολοκλήρωση της μελέτης του γονιδιώματος του *C. difficile* αλλά και της αλληλούχισης παρόμοιων μικροοργανισμών η πρόσφατη έκδοση του «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (Second Edition, Volume Three - The *Firmicutes*) αναταξινόμει τα παραπάνω είδη στην οικογένεια *Peptostreptococceae*. Σε πρόσφατη μελέτη έγινε σύγκριση ριβοσωμικών πρωτεϊνών, β-υπομονάδων RNA πολυμερασών και DNA γυρασών με την ήδη υπάρχουσα ταξινόμηση βάση 16sRNA η οποία ενίσχυσε την απόφαση για τοποθέτηση του *C. difficile* στην οικογένεια των *Peptostreptococceae* ενώ επιπλέον προτάθηκε η μετονομασία σε *Peptoclostridium difficile* ώστε να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα κλωστηρίδια με τα οποία έχει γενετικές διαφορές (6).

Έτσι πλέον το γένος *Peptoclostridium* [pep.to.clos.tri'di.um] περιλαμβάνει αρκετά είδη (πίνακας 1) κοινά χαρακτηριστικά των οποίων είναι ότι :

- χρωματίζονται θετικά κατά gram χρώση στο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης τους,
- είναι κινητά σπορογόνα βακτήρια μεγέθους 0,3 - 1,5 μm * 1,5 – 20 μm,
- υποχρεωτικά αναερόβια μεσόφιλα ή θερμόφιλα (θερμοκρασία μεταξύ 20 – 63 °C)
- αναπτύσσονται σε ουδέτερο έως αλκαλικό pH.

Η βλαστική μορφή στα περισσότερα κλωστηρίδια έχει σχήμα ευθέως ή κεκκαμένου 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. Η μορφολογία ενός στελέχους μπορεί να ποικίλει όχι μόνο από καλλιέργεια σε καλλιέργεια αλλά ακόμη και μεταξύ μικροοργανισμών της ίδιας. Είναι είδη που δίνουν αρνητικές τις δοκιμασίες οξειδάσης και καταλάσης. Μπορούν να χρησιμοποιήσουν την πεπτόνη ως πηγή αζώτου και αρκετά απαιτούν 1,5% NaCl για την ανάπτυξη τους. Η περιεκτικότητα σε G-C του DNA είναι 25 – 32 mol% (6).

Πίνακας 1 : Προτεινόμενες ονομασίες μικροοργανισμών τέως *Clostridium* spp (Ανατύπωση: Yutin N et al, “A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia”- Envir Microbiol.2013 Oct;15(10):2631-41).

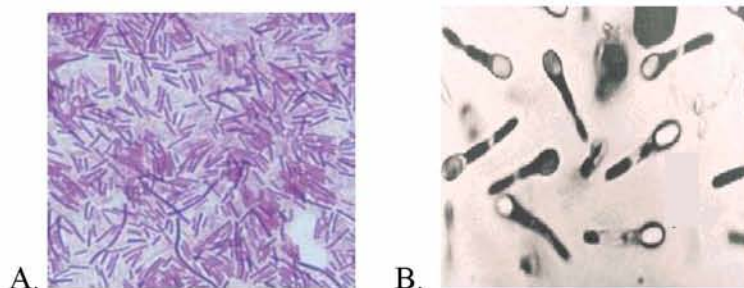
| Organism name ^a | Proposed family and genus name |
|--|--|
| <i>Clostridium ramosum</i> , <i>C. cocleatum</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. saccharogumia</i> , <i>C. spiroforme</i> | <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Erysipelatoclostridium</i> |
| <i>Clostridium acidurici</i> , <i>C. purinilyticum</i> ^b , <i>Eubacterium angustum</i> ^b | Unassigned, <i>Gottschalkia</i> |
| <i>Clostridium phytofermentans</i> , <i>C. aerotolerans</i> , <i>C. aldenense</i> , <i>C. algidixylanolyticum</i> , <i>C. aminophilum</i> , <i>C. aminovalericum</i> , <i>C. amygdalinum</i> , <i>C. asparagiforme</i> , <i>C. boltea</i> , <i>C. celerecrecens</i> , <i>C. citroniae</i> , <i>C. clostridioforme</i> , <i>C. fimetarium</i> , <i>C. glycyrrhizinilyticum</i> , <i>C. hathewayi</i> , <i>C. herbivorans</i> , <i>C. hylemonae</i> , <i>C. indolis</i> , <i>C. jejuense</i> , <i>C. lavalense</i> , <i>C. methoxybenzovorans</i> , <i>C. oroticum</i> , <i>C. polysaccharolyticum</i> , <i>C. populeti</i> , <i>C. saccharolyticum</i> , <i>C. scindens</i> , <i>C. sphenoides</i> , <i>C. symbiosum</i> , <i>C. xylanolyticum</i> , <i>C. xylanovorans</i> , <i>Desulfotomaculum guttoidum</i> , <i>Eubacterium contortum</i> , <i>Eubacterium fissicatena</i> | <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Lachnoclostridium</i> |
| <i>Clostridium difficile</i> , <i>C. bartlettii</i> , <i>C. bifermentans</i> , <i>C. ghonii</i> , <i>C. glycolicum</i> , <i>C. hiranonis</i> , <i>C. irregulare</i> , <i>C. litoreale</i> , <i>C. lituseburense</i> , <i>C. manganotii</i> , <i>C. mayombe</i> , <i>C. paradoxum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. sticklandii</i> , <i>C. thermoacetaliphilum</i> , <i>Eubacterium tenue</i> , <i>Eubacterium yurii</i> | <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Peptoclostridium</i> |
| <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. aldrichii</i> , <i>C. alkalicellulosi</i> , <i>C. caenicola</i> , <i>C. cellobioperum</i> , <i>C. cellulolyticum</i> , <i>C. cellulosi</i> , <i>C. clariflavum</i> , <i>C. hungatei</i> , <i>C. josui</i> , <i>C. leptum</i> , <i>C. methylpentosum</i> , <i>C. papyrosolvans</i> , <i>C. sporosphaeroides</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>C. straminisolvans</i> , <i>C. sufflavum</i> , <i>C. termitidis</i> , <i>C. thermosuccinogenes</i> , <i>C. viride</i> , <i>Bacteroides cellulosolvans</i> , <i>Eubacterium siraeum</i> | <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminiclostridium</i> |
| <i>Clostridium nexile</i> ^b , <i>C. colinum</i> ^b , <i>C. lactatifermentans</i> , <i>C. neopropionicum</i> ^b , <i>C. piliforme</i> ^b , <i>C. propionicum</i> ^b | <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Tyzzerella</i> |

2. Clostridium difficile

2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το *C. difficile* όπως φαίνεται με το οπτικό μικροσκόπιο σε φρέσκο χρωματισμένο παρασκεύασμα είναι ένας gram θετικός (+) κινητός, μη διεισδυτικός, σπορογόνος βάκιλλος με ωοειδή υποτελικά σπόρια που προκαλούν διόγκωση στο άκρο του κυττάρου (εικόνα 1) (7). Συνήθως η κυτταρική μορφολογία του μικροοργανισμού αφορά μακριά λεπτά και ευθεία βακτήρια, μεγέθους $0,5-1,9 \times 3,0-16,9 \mu\text{m}$, που μπορεί να σχηματίζουν αλυσίδα από 2 έως 6 κύτταρα ενωμένα άκρο με άκρο (8). Συναντάται παντού στο περιβάλλον, στο νερό (ποτάμια, λίμνες, θάλασσες), στο έδαφος, σε κόπρανα ανθρώπων και ζώων ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας και κυρίως στο ενδονοσοκομειακό περιβάλλον. Αποτελεί το μόνο αναερόβιο και σπορογόνο νοσοκομειακό παθογόνο.

Εικόνα 1 : *C. difficile* A. gram χρώση B. σχήμα ράβδου ή ρακέτα του τένις κάτω από το μικροσκόπιο, ο σαφής κύκλος στις κορυφές των ράβδων είναι τα σπόρια (Ανατύπωση από : <https://ibdpatient2patient.com/2015/02/05/treating-c-diff-now-in-the-future/>)



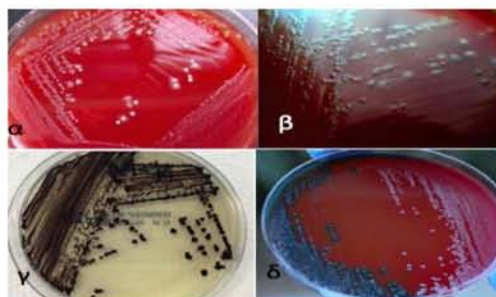
Είναι υποχρεωτικά αναερόβιο βακτήριο, δηλαδή δεν αναπτύσσεται σε περιβάλλον στο οποίο υπάρχει ελεύθερο O_2 και δεν πολλαπλασιάζεται όταν αυτό είναι πάνω από 0,5% στην επιφάνεια επαρκών για την θρέψη του καλλιεργητικών υλικών. Ως εκ τούτου, ένα ελεγχόμενο, αναερόβιο περιβάλλον είναι απαραίτητο για τον επιτυχή χειρισμό του. Η χρήση ενός αναερόβιου θαλάμου παρέχει το πλέον σταθερό περιβάλλον και τις ιδανικές συνθήκες για την αποτελεσματική καλλιέργεια του *C. difficile* και άλλων αναερόβιων βακτηρίων. Εντός του θαλάμου μπορεί να διατηρείται σταθερή μια ατμόσφαιρα που περιέχει ένα μείγμα αερίων (5% CO_2 , 10% H_2 , 85 % N_2) (9).

Το *C. difficile* είναι ετερότροφος μικροοργανισμός δηλαδή στηρίζεται σε οργανικές ουσίες για την διατροφή του. Δεδομένου ότι είναι αναερόβιος αποκτά την ενέργεια του, ATP, με ζύμωση υποστρωμάτων άνθρακα και αζώτου. Απαιτεί έξι αμινοξέα για ζύμωση, μεταβολισμό και ανάπτυξη : λευκίνη, ισολευκίνη, προλίνη, τρυπτοφάνη, βαλίνη και γλυκίνη (10).

Αμέσως μετά την ανακάλυψη του παθογενετικού ρόλου του *C. difficile* προτάθηκε ένα εκλεκτικό καλλιεργητικό υλικό, CCFA (cycloserine cefoxitin fructose agar), για απομόνωση του μικροοργανισμού από δείγματα κοπράνων (11). Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται ακόμα σε αρκετά εργαστήρια. Οι εκλεκτικοί παράγοντες είναι η κυκλοσερίνη σε συγκέντρωση 500 mg/L και η κεφοξιτίνη σε 16 mg/L οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας. Η αρχική εκδοχή του περιελάμβανε κρόκο αυγού, το οποίο μπορεί να αντικατασταθεί από αίμα. Είναι εμπορικά διαθέσιμο από διάφορες εταιρείες. Εμβολιάζονται περίπου 50-75μl πρόσφατου δείγματος και επωάζονται άμεσα σε αναερόβια ατμόσφαιρα για 48-72 ώρες. Αναερόβια προεπάση του θρεπτικού υλικού μπορεί να βελτιώσει το ρυθμό ανάκτησης του μικροοργανισμού. Αρκετές τροποποιήσεις έχουν προταθεί για την ενίσχυση της ευαισθησίας της καλλιέργειας. Οι περισσότερες έχουν ως στόχο την ανάκτηση περισσότερων σπορίων όπως η προσθήκη ταυροχολικού νατρίου ή άλατος Νατρίου χολικού οξέως. Η προ-επεξεργασία των κοπράνων με αιθανόλη (ανάμιξη 1:1-alcohol shock) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την ευαισθησία της καλλιέργειας καθώς ελαχιστοποιεί την ανάπτυξη μη σπορογόνων βακτηρίων (12).

Οι αποικίες του μικροοργανισμού αναγνωρίζονται εύκολα χάρη στην τυπική μορφολογία και οσμή τους (εικόνα 2). Είναι αποικίες με ποικίλο μέγεθος, συνήθως ανάγλυφες, επίπεδες ή ελαφρά επηρμένες, σκουρόχρωμες με ριζοειδείς προσεκβολές και λευκωπή ή γκριζωπή κεφαλή ενώ έχουν χαρακτηριστική οσμή κρεσόλης (στάβλου) (12). Όλα τα στελέχη παράγουν έναν απαλό πράσινο φθορισμό κάτω από μικρού μήκους κύματος υπεριώδες φως (365 nm) μετά από 48 ώρες επώαση σε Brucella blood agar εμπλουτισμένο με αιμίνη και Βιταμίνη K1 (13). Για να βελτιωθεί η χρονοβόρα ως τώρα καλλιέργεια του μικροοργανισμού δημιουργήθηκε ένα νέο μέσο καλλιέργειας με χρωμογόνο θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο φαίνεται να προσφέρει γρήγορη και αποτελεσματική ανίχνευση τοξινοπαραγωγού στελέχους *C. difficile* εντός 24 ωρών (14). Οι καλλιέργειες σε ζωμό PYG είναι θολές με ομαλό ίζημα και pH 5-5,5 μετά από επώαση 5 ημερών (7). Το βακτήριο υδρολύει την εσκουλίνη και την πηκτή και δίδει αρνητικές τις δοκιμασίες ινδόλης, αναγωγής των νιτρικών και ουρεάσης. Τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν τη γλυκόζη, τη μαννιτόλη και τη μαννόζη (15).

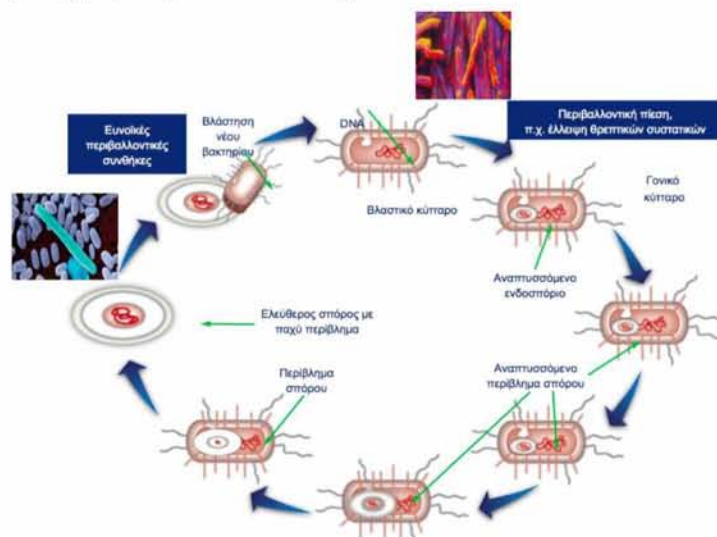
Εικόνα 2 : *C. difficile* σε αιματούχο άγαρ (α,β), σε χρωμογόνο τρυβλίο (γ) και Cdifftox plate (δ).



Το οξυγόνο είναι ιδιαίτερα τοξικό για το *C. difficile* και γι' αυτό ο μικροοργανισμός έχει αναπτύξει τη δυνατότητα μετάπτωσης σε μια μορφή ανθεκτική ώστε να καταφέρνει να επιβιώνει στο περιβάλλον και σε αντίξοες συνθήκες. Το συναντάμε λοιπόν σε δύο μορφές (εικόνα 3):

1. Βλαστική : Ευαίσθητη στο γαστρικό οξύ, τα κοινά αντισηπτικά και τα αλκοολούχα διαλύματα. Με τη μορφή αυτή επιβιώνει για κάποιες ώρες (έως 24h) στο περιβάλλον και σε υγρές επιφάνειες. Χρησιμοποιεί θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τη διαίρεση του.
2. Σπόρια : Σε δυσμενείς συνθήκες όπως στέρηση θρεπτικών συστατικών, έκθεση σε O_2 ή όξινο περιβάλλον, παρουσία χολικών αλάτων και αμινοξέων, αυξημένη θερμότητα, και το βακτήριο μεταπίπτει σε αυτή την ανθεκτική λανθάνουσα κατάσταση. Με τη μορφή αυτή μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον έως και δυο χρόνια και αντέχει στην έκθεση σε γαστρικό οξύ, ακτινοβολία, κοινά και αλκοολούχα αντισηπτικά διαλύματα (16).

Εικόνα 3 : Κύκλος μετατροπής *C. difficile* από βλαστική μορφή σε σπόρια (Αναπαραγωγή από: “Λοίμωξη από *C. difficile* : Τρέχουσα θεραπευτική προσέγγιση”-Συμεών Μεταλλίδης).



2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

Το κυτταρικό περίβλημα του κλωστηριδίου, όπως και σε όλους τους gram θετικούς (+) μικροοργανισμούς, έχει μια πολύπλοκη δομή που αποτελείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων μέσα στην οποία βρίσκονται τυχαία κατανομημένες οι πρωτεΐνες. Αποτελεί φραγμό διαπερατότητας, διαχωρίζοντας το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον ενώ ρυθμίζει και τη διέλευση μορίων από και προς το εσωτερικό του βακτηριδίου. Για τη λειτουργία της μεμβράνης μεγάλη σημασία έχει η διατήρηση της ρευστότητάς της, η οποία οφείλεται στα φωσφολιπίδια και μεταβάλλεται ανάλογα με τη χημική σύσταση της (17).

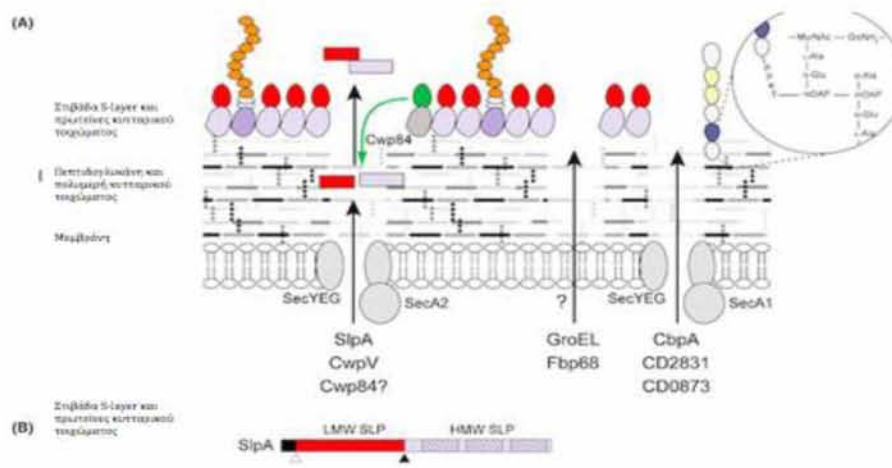
Το κυτταρικό τοίχωμα του μικροοργανισμού περιέχει ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης που αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος (>50%) μαζί με τα τειχοϊκά και λιποτεϊχοϊκά οξέα. Η πεπτιδογλυκάνη σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πλέγμα, δημιουργώντας ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα που προσδίδει σχήμα και προστασία στο βακτήριο. Αποτελείται από τα αμινοσάκχαρα N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ, που εναλλάσσονται μεταξύ τους και συνδέονται με 1,4 β-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα τειχοϊκά οξέα είναι πολυμερή της γλυκερόλης και της φωσφορικής ριβιτόλης τα οποία είναι συνδεδεμένα με την πεπτιδογλυκάνη ενώ τα λιποτεϊχοϊκά οξέα είναι συνδεδεμένα με γλυκολιπίδια στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα τειχοϊκά οξέα εκτείνονται πέρα από την επιφάνεια του κυττάρου μεταβάλλοντας την επιφανειακή υδροφοβικότητα. Επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης και ανάπτυξης. Η πεπτιδογλυκάνη και τα τειχοϊκά οξέα αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από επιφανειακές πρωτεΐνες με ποικίλους ρόλους (18). Μερικές από αυτές έχουν χαρακτηριστεί όπως οι πρωτεΐνες της επιφανειακής στιβάδας, η φλαγγελίνη FliC, το κύριο δομικό συστατικό των νηματίων των μαστιγίων, η πρωτεΐνη του μαστιγίου FliD και οι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος CWP 66 και CWP 84 (18, 19).

Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια, στο *C. difficile* οι βασικές πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος που απαρτίζουν την επιφανειακή στιβάδα (S-layer), τη δυσδιάστατη συστοιχία που περιβάλλει όλο το κύτταρο, είναι δυο (S-Layer Proteins - SLPs) και μάλιστα με διαφορετικό μέγεθος και ιδιότητες (εικόνα 4) (17). Συνδέονται ομοιοπολικά ή με ηλεκτροστατικές και υδροφοβικές δυνάμεις με την πεπτιδογλυκάνη και τα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος. Απομονώνονται από τη βλαστική μορφή του μικροοργανισμού και προέρχονται από ένα κοινό πρόδρομο μόριο πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *slpA*. Μετά τη διάσπαση του πρόδρομου μορίου σχηματίζονται δύο ώριμες πρωτεΐνες SLP, μια υψηλού μοριακού βάρους HMW (High Molecular Weight, ~ 40 kDa) και μια χαμηλού μοριακού βάρους LMW (Low Molecular Weight, ~35kDa). Μεταξύ των στελεχών του *C. difficile* οι αλληλουχίες των LMW SLP είναι εξαιρετικά μεταβλητές σε αντίθεση με τις HMW που είναι διατηρημένες σε μεγάλο ποσοστό (20). Οι LMW βρίσκονται εξωτερικά των HMW SLPs στην επιφάνεια του κυττάρου (εικόνα 4) και οι παραλλαγές στην αλληλουχία τους αντικατοπτρίζεται στην ιδιαίτερα περιορισμένη διασταυρούμενη ανοσολογική απάντηση που προκαλούν μεταξύ διαφορετικών στελεχών σε αντίθεση με τις HMW που συχνά αντιδρούν με αντισώματα από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες άλλου στελέχους. Επιπλέον οι LMW δεν παρουσιάζουν ομολογία με καμία άλλη πρωτεΐνη στις βάσεις δεδομένων υποδεικνύοντας κάποιο μοναδικό ρόλο στο *C. difficile*.

Οι επιφανειακές πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος του μικροοργανισμού, συμπεριλαμβανομένων και των SLPs, παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και κυρίως

στην προσκόλληση του στα κύτταρα του ξενιστή ενώ έχουν και ανοσογόνο δράση καθώς οι LMW SLPs φαίνεται να αποτελούν ανοσοκυρίαρχο αντιγόνο και αντισώματα έναντι αυτών έχουν βρεθεί σε ορό ασθενών με λοίμωξη από *C. difficile* (CDI) (20).

Εικόνα 4: Κυτταρικό τοίχωμα *C. difficile* (Ανατύπωση από : Kirk JA, Banerji O, Fagan RP. Characteristics of the clostridium difficile cell envelope and its importance in therapeutics. Microbial Biotechnology, 2016 Jun.).



Μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη της επιφάνειας είναι η φλαγγελίνη, Το *C. difficile* αναπαράγεται με σχάση ενώ κινείται χάρη στα περίτριχα μαστίγια (εικόνα 5) που βρίσκονται γύρω από το βακτήριο επιτρέποντας κίνηση ευθεία προς τα εμπρός και τρεμοειδή. Η φλαγγελίνη αποτελεί σημαντικό συστατικό των μαστιγίων. Η τροποποίηση της επηρεάζει την κινητικότητα, τις ιδιότητες της κυτταρικής επιφάνειας και τη μολυσματικότητα του μικροοργανισμού (10, 21).

Εικόνα 5: Περίτριχα μαστίγια (Ανατύπωση: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/kumm_jakl/growth&adapt.htm)



2.3. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Το πρώτο στέλεχος *C. difficile* που επιλέχθηκε για αλληλούχιση του γενετικού υλικού ήταν ένα πολυανθεκτικό *C. difficile*, στέλεχος 630, που απομονώθηκε από ασθενή στη Ζυρίχη με σοβαρή Ψευδομεμβρανώδη Κολίτιδα (ΨΜΚ) το 1982 και προκάλεσε επιδημία διάρροιας σε Ελβετικό νοσοκομείο (22, 23). Η μελέτη ολοκληρώθηκε το 2006 οπότε και βρέθηκε ότι το γονιδίωμα του μικροοργανισμού αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 4.290.252bp με 29,06%

περιεχόμενο σε γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και από ένα κυκλικό πλασμίδιο 7881bp με 27,9% G+C (πίνακας 2). Τα δεδομένα αυτά υπάρχουν στη βάση δεδομένων EMBL/GenBank. Έκτοτε έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση αρκετών στελεχών του *C. difficile* ακόμη και με τη χρήση τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς (next generation sequencing) (24).

Πίνακας 2: Μέγεθος και περιεχόμενα χρωμοσώματος και πλασμιδίου *C. difficile* (Ανατύπωση από : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=535>)

| Type | Name | RefSeq | INSDC | Size (Mb) | GC% | Protein | rRNA | tRNA | Other RNA | Gene | Pseudogene |
|-------|--------|-------------|------------|-----------|------|---------|------|------|-----------|-------|------------|
| Chr | - | NC_009089.1 | AM180355.1 | 4.29 | 29.1 | 3,756 | 32 | 87 | 64 | 3,971 | 96 |
| Plasm | pCD630 | NC_008226.1 | AM180356.1 | 0.007881 | 27.9 | 11 | - | - | - | 11 | - |

Το γονιδίωμα του στελέχους 630 συγκρινόμενο με άλλα *C. difficile* αλλά και με μέλη της οικογένειας *Clostridia* βρέθηκε ότι έχει πολύ μικρό ποσοστό διατηρημένου βασικού γονιδιώματος (core genome). Το βασικό γονιδίωμα περιλαμβάνει όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν απαραίτητες λειτουργίες και πρωτεΐνες για το βακτήριο και χαρακτηρίζεται από σχετική γονιδιακή σταθερότητα. Μια μελέτη σύγκρισης του στελέχους αυτού έδειξε σε μεγάλο ποσοστό του συνόλου των αλληλουχιών κωδικοποίησης (coding sequences – CDS), έως 61%, ότι απουσίαζαν τουλάχιστον σε ένα από τα εξεταζόμενα στελέχη (23, 25). Ενώ και μεταγενέστερες μελέτες συμφωνούν ότι μόνο ένα ποσοστό 16-20% των γονιδίων υπάρχει σε όλα τα στελέχη και είναι συντηρημένο, ενώ τα βασικά γονίδια είναι 946 έως 1033 bp (25, 26, 27). Είναι λοιπόν εκπληκτικό το γεγονός ότι τα βασικά γονίδια, τα οποία είναι συντηρημένα σε όλα τα στελέχη του μικροοργανισμού, είναι ασυνήθιστα λίγα και μάλιστα ίσως είναι το μικρότερο βασικό γονιδίωμα ανάμεσα στα βακτηριακά είδη (23, 25). Εντός του βασικού γονιδιώματος ανευρίσκεται ομάδα γονιδίων που χρησιμοποιείται σε μεθόδους που εφαρμόζουν την τεχνική του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA με σκοπό την τυποποίηση και διαφοροποίηση των στελεχών. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει γονίδια, συνήθως εφτά, που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία και τα οποία χρησιμοποιούνται στη μέθοδο Multilocus Sequence Typing (MLST)- Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των διαφορών που προκύπτουν στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των συγκεκριμένων γονιδίων. Με βάση την κατανομή των διαφορών ο κάθε κλώνος χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST), επιτρέποντας έτσι την τυποποίηση και το διαχωρισμό των στελεχών (28).

Το υπόλοιπο ποσοστό του γονιδιώματος ονομάζεται βοηθητικό γονιδίωμα (accessory

genome) και αφορά γονίδια που είναι παρόντα τουλάχιστον σε ένα αλλά όχι σε όλα τα στελέχη του είδους. Απαρτίζεται κυρίως από μεταθετά γενετικά στοιχεία (Mobile Genetic Elements, MGEs) τα οποία ανευρίσκονται σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος και κωδικοποιούν μεγάλο ποσοστό των λοιμογόνων παραγόντων. Διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ικανότητα προσαρμογής και εξέλιξης των βακτηρίων αφού μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες μεταξύ στελεχών. Η ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους 630 αποκάλυψε ότι το 11% αυτού αποτελείται από μεταθετά γενετικά στοιχεία (mobile genetic element-MGEs) με περιεχόμενο σε G-C έως 47% (29). Η ομάδα των MGEs είναι εξαιρετικά ετερογενής και αφορά από απλές αλληλουχίες που περιέχουν μόνο τη γενετική πληροφορία που απαιτείται για τη μετακίνηση τους έως βακτηριοφάγους, μεγάλα συζευκτικά τρανσποζόνια και μεγάλα πλασμίδια με περίπλοκο γονιδίωμα. Τα μεν πλασμίδια έχουν και αυτά ποικίλο μέγεθος και χρησιμοποιούνται για το γενετικό χειρισμό του γονιδιώματος ενώ βακτηριοφάγοι έχουν βρεθεί αρκετοί και διαφορετικοί για το *C. difficile*. Οι ποιοί γνωστοί για το συγκεκριμένο παθογόνο είναι οι βακτηριοφάγοι φCD119, φCD38-2, και φCD27 που σχετίζονται με θετική και αρνητική ρύθμιση παραγωγής των κλωστηριδιακών τοξινών και ο φC2 που συνδέεται με την αντοχή του μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά μακρολίδες, λινκοσαμίδη και στρεπτογραμμίνη (MLS_B) (30). Άλλα μεταθετά γενετικά στοιχεία είναι οι αλληλουχίες IS (IS sequencing) που είναι μικρές αλληλουχίες με μια μόνο γενετική πληροφορία, τα μεταθετά ιντρόνια (mobile introns), το στοιχείο skin^{CD} (skin^{CD} element) που σχετίζεται με το σχηματισμό σπόρων και τα κινητοποιήσιμα τρανσποζόνια (mobilisable transposons-MTs) (31). Η πλειοψηφία όμως αυτών των στοιχείων είναι συνδετικά τρανσποζόνια (τρανσποζόνια σύζευξης-conjugative transposons-CTNs) των οικογενειών Tn916 και Tn1549 που ονομάζονται CTNs και έχουν την ικανότητα να αποκόπτονται από τις γονιδιακές θέσεις στόχους και να μετακινούνται ενδοκυττάρια ή διακυτταρικά σε συγκεκριμένες θέσεις ανασυνδιασμού (site-specific recombination). Η ανταλλαγή των κινητών στοιχείων συμβαίνει συχνά και λόγω της φύσης τους έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς μεταφοράς προκειμένου να εισαχθεί γενετικό υλικό σε κύτταρα-λήπτες συμβάλλοντας έτσι στην ποικιλομορφία του γονιδιώματος (32). Η επιβεβαίωση της μεταβλητότητας (variability) του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση μικροσυστοιχιών ολόκληρου του γονιδιώματος (25). Οι λειτουργίες και τα χαρακτηριστικά που κωδικοποιούνται από τα CTNs μπορεί να αφορούν τη μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά, την παθογένεια και λοιμογόνο δύναμη του μικροοργανισμού, την προσαρμογή του στο περιβάλλον, την αλληλεπίδραση του με τον ξενιστή και την παραγωγή επιφανειακών δομών (29). Τα περισσότερα μελετημένα τρανσποζόνια είναι τα : Tn5397 με μέγεθος 21kb που σχετίζεται με αντοχή στην τετρακυκλίνη όπως και το Tn916, τα Tn4453a και Tn4453b που διαφέρουν σε λίγες βάσεις αλλά και τα δύο σχετίζονται με την αντοχή στην χλωραμφενικόλη και

τα Tn5398 και Tn6194 που σχετίζονται με την μετακινούμενη αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά μέσω της μετακίνησης του *ermB* γονιδίου (31). Πρόσφατη μελέτη φαίνεται να αποδίδει στα CTNs τη δυνατότητα μεταφοράς της παθογενετικής περιοχής PaLoc (Pathogenicity Locus) σε μεγάλα χρωμοσωμικά τμήματα μετατρέποντας ένα μη τοξινογόνο στέλεχος σε *C. difficile* που παράγει τις παθογενετικές τοξίνες του μικροοργανισμού (33).

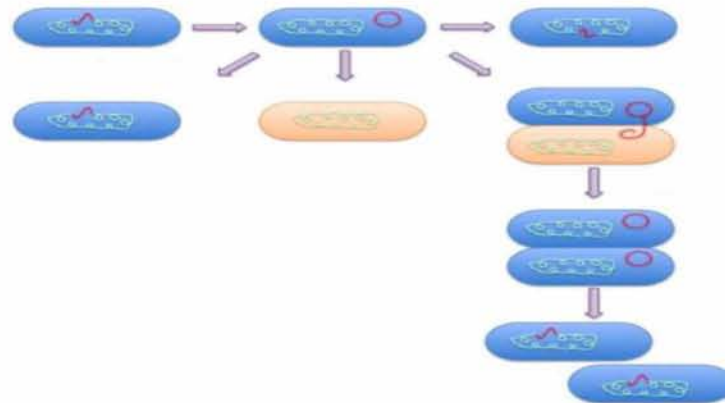
Το πλήρες περιεχόμενο γονιδίων σε ένα βακτηριακό είδος ονομάζεται «παν-γονιδίωμα» (pan genome) και υπολογίζεται ως το σύνολο των γονιδίων του βασικού και του ολικού γονιδιώματος περιλαμβάνοντας έτσι όλα τα γονίδια που έχουν ανακαλυφθεί στο σύνολο των στελεχών που έχουν μελετηθεί. Για το *C. difficile* το pan genome φαίνεται να είναι το μεγαλύτερο που έχει ανακοινωθεί έως σήμερα ανάμεσα σε όλα τα βακτηριακά είδη με 9640 αλληλουχίες κωδικοποίησης. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στον μεγάλο αριθμό μεταθετών γενετικών στοιχείων τα οποία όπως ήδη αναφέρθηκε συμβάλλουν στην γενετική ποικιλομορφία του μικροοργανισμού (34).

2.3.1 MOBILE GENETIC ELEMENTS (MGEs)

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι ανταλλαγή γενετικού υλικού και αποτελεί μηχανισμό που χρησιμοποιείται εκτενώς από αρκετους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Οι τρεις μοριακοί μηχανισμοί που είναι γνωστοί για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι ο μετασχηματισμός, η μεταβίβαση και η σύζευξη. Ο μετασχηματισμός αφορά πρόσληψη γυμνού γενετικού υλικού από το περιβάλλον, συνήθως από γυμνά κύτταρα, και ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα. Το *C. difficile* φαίνεται να μην χρησιμοποιεί το μηχανισμό αυτό. Η σύζευξη είναι μορφή μεταβίβασης γενετικού υλικού μεταξύ βακτηριακών κυττάρων που λαμβάνει χώρα μέσω επαφής τους. Η διαδικασία ανακαλύφθηκε αρχικά σε στελέχη *E.coli*.

Τα συζευκτικά τρανσποζόνια ή στοιχεία σύζευξης (conjugative transposons) είναι γενετικά στοιχεία που μπορούν να μεταφερθούν σε στέλεχος δέκτη μέσω σύζευξης και να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα του ξενιστή μέσω ανασυνδιασμού. Η μεταφορά και η σύζευξη τους ξεκινά με αποκοπή του στοιχείου και σχηματισμό ενός κυκλικού μορίου DNA. Το κυκλικό αυτό ενδιάμεσο μπορεί είτε να εισαχθεί στο προηγούμενο σημείο στόχο, είτε να μεταφερθεί σε μια διαφορετική θέση στόχο ή σε ένα κύτταρο δέκτη μέσω σύζευξης ή μπορεί να χαθεί από το κύτταρο ξενιστή (εικόνα 6). Τα κινητοποιήσιμα τρανσποζόνια (mobilisable elements) είναι στοιχεία που μπορούν να κινητοποιηθούν και να μεταφερθούν μέσω σύζευξης με τη χρήση μηχανισμών μεταφοράς ενός άλλου συζευκτικού γενετικού στοιχείου (31, 34).

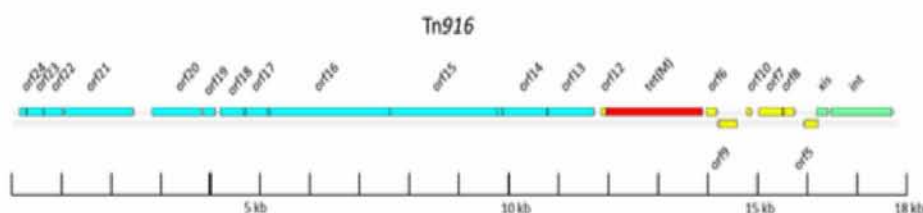
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς και σύζευξης των τρανσποζονίων. Το χρωμόσωμα αντιπροσωπεύεται από πράσινο κυκλικό μόριο ενώ το γραμμικό CTN που ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα από μια κόκκινη γραμμή και το κυκλικό του ενδιάμεσο από κόκκινο κύκλο. Τα μπλε κύτταρα είναι κύτταρα με ανθεκτικό φαινότυπο που παρέχουν ένα γονίδιο αντοχής στα αντιβιοτικά και τα πορτοκαλί κύτταρα αντιπροσωπεύουν έναν ευαίσθητο φαινότυπο (Ανατύπωση από : “Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*” by Michael Sebastian – Maria Brouwer).



2.3.1.1 Tn916

Είναι συνδετικό τρανσποζόνιο (ή ενοποιητικό συζευκτικό στοιχείο-integrative conjugative element, ICE) που απομονώθηκε αρχικά από τον *Enterococcus faecalis* DS16 το 1981 ως ένα μεταθετό στοιχείο που μεταφέρεται σε τετρακυκλίνη ευαίσθητα στελέχη από το πλασμίδιο ενός κυττάρου δότη. Έκτοτε, το στοιχείο αυτό έχει μεταφερθεί ή έχει απομονωθεί από μεγάλο αριθμό διαφορετικών βακτηρίων. Το Tn916 είναι το πρωτότυπο από μια μεγάλη οικογένεια συνδετικών τρανσποζονίων που ονομάζονται Tn916/Tn1545 family. Αυτά τα στοιχεία έχουν μια διαρθωτή οργάνωση σε περιοχές που κωδικοποιούν λειτουργίες σύζευξης, ανασυνδιασμού, ρύθμισης καθώς και γονίδια για βοηθητικές λειτουργίες όπως για ριβοσωμικές πρωτεΐνες που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά, τετρακυκλίνη στην περίπτωση του Tn916. Με μέγεθος 18kb, το Tn916 είναι το μικρότερο αυτής της οικογένειας γενετικών στοιχείων (31, 34).

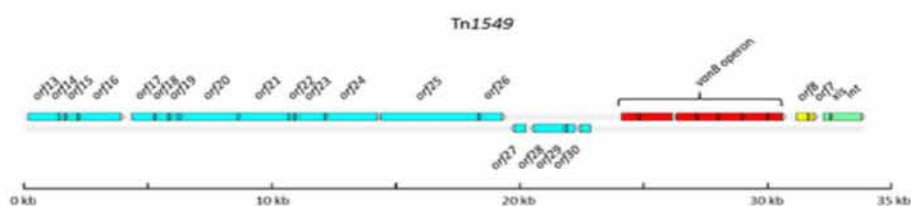
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση Tn926 όπου με μπλε χρώμα είναι οι περιοχές που σχετίζονται με τη σύζευξη, με κίτρινο με τη μεταγραφή, με πράσινο τη μεταφορά και με κόκκινο το γονίδιο *tetM* (Ανατύπωση από : “Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*” by Michael Sebastian – Maria Brouwer).



2.3.1.2 Tn1549

Μία άλλη οικογένεια συνδετικών τρανσποζονίων είναι τα Tn1549 στα οποία η μονάδα σύζευξης διαφέρει από αυτή των Tn916. Αρχικά απομονώθηκαν από τον *Enterococcus faecalis* 268-10 όπου είναι ενσωματωμένο στο πλασμίδιο pAD1. Το στοιχείο αυτό προσδίδει αντίσταση στην βανκομυκίνη που κωδικοποιείται από το οπερόνιο *vanB*. Σε μελέτη πραγματοποιήθηκε *in vivo* μεταφορά ενός Tn1549 στοιχείου που φέρει γονίδιο αντοχής στην βανκομυκίνη από κλωστηρίδιο (*C. symposium*) σε *E. faecium* και σε *E. faecalis*. Αυτό αποτελεί ιδιαίτερα ανησυχητικό εύρημα καθώς η βανκομυκίνη χρησιμοποιείται ως θεραπευτική επιλογή σε περιπτώσεις βαριάς και επιπλεγμένης λοίμωξης από *C. difficile* αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες για ανάπτυξη στελεχών εντεροκόκκου ανθεκτικού στη βανκομυκίνη (VRE) (31, 34).

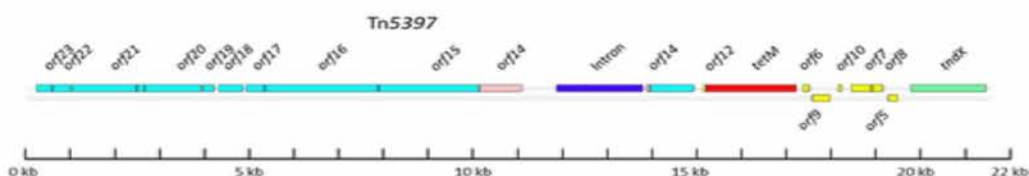
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση Tn1549 όπου με μπλε χρώμα είναι οι περιοχές που σχετίζονται με τη σύζευξη, με κόκκινο τις πρόσθετες ενότητες όπου βρίσκεται και το *vanB* οπερόνιο, με κίτρινα για τη μεταγραφή και με πράσινο για την μεταφορά (Ανατύπωση από : “Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*” by Michael Sebastian – Maria Brouwer).



2.3.1.3 Tn5397

Είναι τρανσποζόνιο που φέρει περιοχή που προσδίδει αντοχή στην τετρακυκλίνη. Φαίνεται να έχει τη δυνατότητα μεταφοράς μετά από κυτταρική σύζευξη σε *E. faecalis*, *S. aureus* και *B. subtilis*. Δομικά μοιάζει με το Tn916 έχει όμως μια βασική διαφορά. Σε αντίθεση με το Tn916 που φέρει μια ανασυνδιάση τυροσίνης (tyrosine recombinase) και μια πρωτεΐνη εκτομής (excisionase protein) που μαζί είναι υπεύθυνες για την εκτομή, το μετασχηματισμό σε κυκλικό μόριο και την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα, το Tn5397 διαθέτει μια μονή ανασυνδιάση σερίνης (serine recombinase) που είναι υπεύθυνη για όλες αυτές τις λειτουργίες (31, 34).

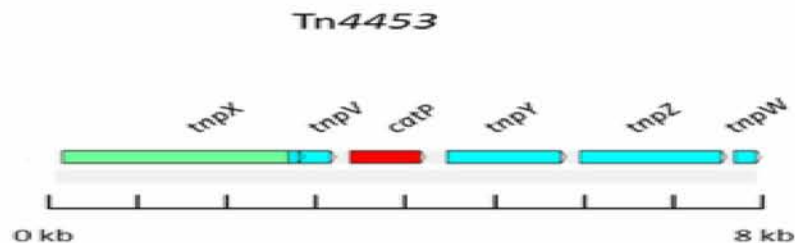
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση Tn5397 με την κόκκινη περιοχή να αναπαριστά το γονίδιο *tetM* (Ανατύπωση από : “Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*” by Michael Sebastian – Maria Brouwer).



2.3.1.4 Tn4453

Η αντοχή στην χλωραμφενικόλη στο *C. perfringens* μεταβιβάζεται μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράσης (CatP) που κωδικοποιείται στο μετακινήσιμο τρανσποζόνιο Tn4451. Η ανάλυση του *catP* στο *C. difficile* το τοποθέτησε σε ένα κινητοποιήσιμο στοιχείο με δομική κατασκευή όμοια με του Tn4451 που ονομάστηκε Tn4453 και έχει 89% ομοιότητα αλληλουχίας με το Tn4451 (31, 34).

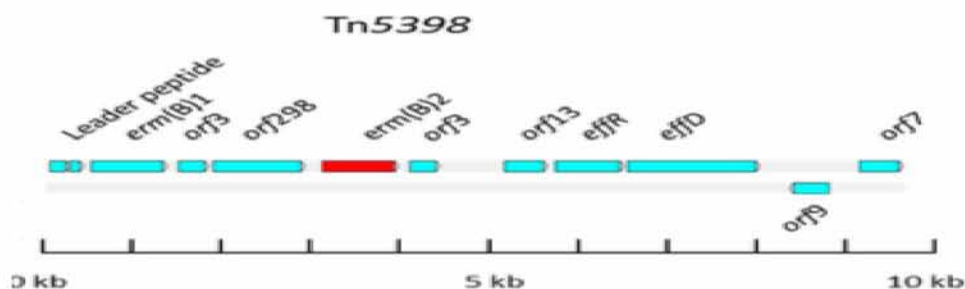
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του Tn4453 όπου με κόκκινο το *catP* για την αντοχή στην χλωραμφενικόλη (Ανατύπωση από : “Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*” by Michael Sebastian – Maria Brouwer).



2.3.1.5. Tn5398

Εκτός από την αντοχή στην τετρακυκλίνη, παρατηρήθηκε ότι και η αντοχή στην ερυθρομυκίνη μπορούσε να μεταφερθεί από το *C. difficile* 630 στο *C. difficile* CD37 αλλά και στα *S. aureus* και *B. subtilis* μέσω ενός στοιχείου που εισερχόταν σε συγκεκριμένες θέσεις. Έτσι προτάθηκε ότι το στοιχείο αυτό, Tn5398, θα μπορούσε να είναι συζευκτικό τρανσποζόνιο. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι περιέχει δύο rRNA αδενίνη N-6-μεθυλοτρανσφεράσες (adenine N-6-methyltransferase) *ermB* γονιδίων. Η ErmB παρέχει αντοχή στην ερυθρομυκίνη μέσω ριβοσωμικής προστασίας αλλά μόνο το *ermB2* στο Tn5398 είναι λειτουργικό (31, 34).

Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση Tn5398 με τα γονίδια *erm(B)1* και *erm(B)2* (Ανατύπωση από : “Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*” by Michael Sebastian – Maria Brouwer).



2.4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το *C. difficile* απομονώθηκε πρώτη φορά από δείγματα κοπράνων το 1935 ως μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου στο 40% των νεογνών που εξετάστηκαν, ηλικίας 1-10 ημερών, από τους Hall και O'Toole (35). Περιγράφηκε ως αναερόβιος βάκιλλος που δύσκολα καλλιεργείται και απομονώνεται γι' αυτό και αρχικά ονομάστηκε "*Bacillus difficilis*". Οι ίδιοι ερευνητές μάλιστα διαπίστωσαν την παραγωγή από τον μικροοργανισμό τοξίνης, 10-100 φορές λιγότερο τοξικής από του *C. botulinum*, θανατηφόρας μετά τη χορήγηση της σε ποντίκια. Ακολουθούν, τα επόμενα δυο χρόνια, δημοσιεύσεις μελετών σε νεογνά και βρέφη έως 12 μηνών με τα ίδια ευρήματα (36, 37). Έκτοτε δεν υπάρχει καμία αναφορά του μικροοργανισμού είτε σαν αίτιο λοίμωξης είτε σαν μέρος της εντερικής χλωρίδας παρά μόνο περιστασιακές αναφορές στελεχών σαν «δευτερογενής» μικροοργανισμός χωρίς να ενοχοποιείται ως αιτιολογικός παράγοντας λοίμωξης (38).

Ακολουθεί το 1960 η απομόνωση του από το γαστρεντερικό σωλήνα φώκιας στην Ανταρκτική (39), η ανεύρεση αντισωμάτων έναντι *C. difficile* σε μικτή λοίμωξη το 1972 (40) και τρία χρόνια μετά ακολουθεί σειρά άρθρων που αναφέρουν είτε την μορφολογία και τα χαρακτηριστικά του κλωστηριδίου (41), είτε την διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας του (42) αλλά και την παρουσία του στο ουροποιογεννητικό (43). Παράλληλα πραγματοποιείται μελέτη για την ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα και η πρώτη περίπτωση αναφέρεται το 1893 ως «diphtheritic colitis» (44). Λόγω της συνεχούς αύξησης κατανάλωσης αντιβιοτικών και της αυξανόμενης συχνότητας επικίνδυνης συνεπακόλουθης κολίτιδας το ενδιαφέρον στο κομμάτι αυτό εντείνεται και οδηγεί την έρευνα αρχικά στη συσχέτιση του *S. aureus* με την διάρροια ασθενών υπό αντιβίωση ("staphylococcal colitis") και τη χορήγηση από του στόματος Βακιτρακίνης (45). Την ίδια περίοδο παρατηρείται συσχέτιση του αντιβιοτικού Lincomycin και διάρροιας ενώ το 1974 σημαντικό αίτιο, όχι μόνο διάρροιας αλλά και ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας και σποραδικών θανάτων, θεωρήθηκε και η κλινδαμυκίνη, «clindamycin colitis» (46). Τελικά το 1978 ο Barlett και οι συνεργάτες του απέδειξαν τη σχέση ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας από αντιβιοτικά και τοξινοπαραγωγού στελέχους *C. difficile*. Κατέδειξαν κυτταροτοξικότητα σε κυτταροκαλλιέργεια και επαγόμενη εντεροκολίτιδα σε χάμστερ μετά την χορήγηση κοπράνων ασθενών με ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα (47).

Την ίδια χρονιά σειρά μελετών και δημοσιεύσεων επιβεβαιώνουν την συσχέτιση διάρροιας και ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών με την παρουσία κλωστηριδίου και στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται ο λοιμογόνος παράγοντας να είναι η παραγωγή τοξινών από τον μικροοργανισμό. Σε όλες τις περιπτώσεις το απομονωθέν κλωστηρίδιο ήταν το *C. difficile*.

Έκτοτε το ενδιαφέρον για τον μικροοργανισμό συνεχώς αυξάνεται και προκύπτουν μελέτες για την ανάπτυξη, απομόνωση, ταυτοποίηση και αντιμετώπιση του. Ήδη από την περίοδο των πρώτων μελετών, το 1978, παρουσιάζεται εκλεκτικό υλικό για την απομόνωση του με κυκλοσερίνη, κεφοξιτίνη, φρουκτόζη και κρόκο αυγού (CCFA) στο οποίο είναι δυνατή η ανίχνευση ακόμη και μικρού αριθμού βακτηρίων ανά δείγμα με ανάπτυξη μορφολογικά χαρακτηριστικών αποικιών (48). Ενώ προτείνεται ως θεραπεία η διακοπή του ενοχοποιητικού αντιβιοτικού και συνίσταται η χορήγηση Βανκομυκίνης και Μετρονιδαζόλης (49).

Η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών, ανοσοκατασταλτικών (HIV, χημειοθεραπείες) αντιπερισταλτικών, αντιόξινων και διεγερτικών του γαστρεντερικού, η αύξηση του μέσου όρου ηλικίας των ασθενών με τα συνοδά χρόνια νοσήματα και τις μακρές νοσηλείες οδήγησαν στην αύξηση της συχνότητας διάρροιας από αντιβιοτικά και ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας καθώς και στην εμφάνιση επιδημιών από νέα στελέχη με αυξημένη αντοχή σε αντιβιοτικούς παράγοντες και λοιμογόνο δύναμη και σε σπάνιες περιπτώσεις θανατηφόρας λοίμωξης από κλωστηρίδιο. Επιπλέον η αυξημένη επίπτωση λοίμωξης στην κοινότητα και η ανάδυση νέων δυνητικών ομάδων ασθενών όπως παιδιά, γυναίκες σε περιγεννητική περίοδο οδήγησαν σε αυξημένο ενδιαφέρον και καταγιστική δημοσίευση δεκάδων άρθρων για το *C. difficile* και το εύρος των νόσων που προκαλεί. Έτσι το 2004 γίνεται το πρώτο επίσημο συμπόσιο αποκλειστικά για το κλωστηρίδιο στη Σλοβενία με τη συμμετοχή περισσότερων από 90 ειδικούς από περισσότερες από 18 χώρες καλύπτοντας όλες τις πλευρές μελέτης του μικροοργανισμού από την επιδημιολογία έως την διάγνωση και τη θεραπεία του.

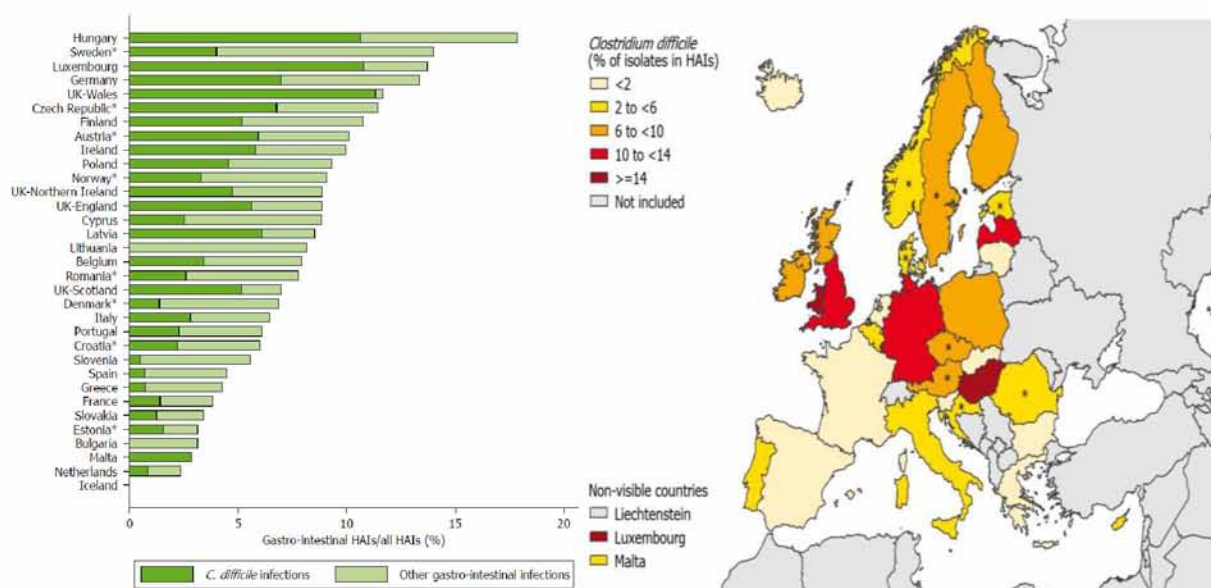
2.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το *C. difficile* συναντάται ως φυσιολογική χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα στο 60-70% των νεογνών (50) σε αντίθεση με τους υγιείς περιπατητικούς ενήλικες όπου το ποσοστό αυτό είναι <2%. Το ποσοστό αποικισμού αυξάνεται σημαντικά σε νοσηλεύόμενους (7-11%) και ασθενείς σε κέντρα μακράς νοσηλείας (5-7%) (51) καθώς και σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας ενώ ακολουθούν ηλικιωμένοι (>65 ετών) και ανοσοκατεσταλμένοι. Το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό αποικισμού στα νεογνά και βρέφη ελαττώνεται κατά πολύ στα παιδιά και στους εφήβους φτάνοντας σιγά σιγά το ποσοστό ενηλίκων. Για τον αποικισμό της ομάδας αυτής ενοχοποιείται το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό των μαιευτηρίων αλλά και η μητέρα. Η ανώριμη εντερική χλωρίδα των νεογνών τους επιτρέπει τον αποικισμό από *C. difficile* ο οποίος ελαττώνεται με την εγκατάσταση και αύξηση της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας. Και ενώ νεογνά και βρέφη είναι φορείς ακόμη και τοξινογόνων στελεχών παραμένουν ασυμπτωματικά λόγω έλλειψης υποδοχέων για την τοξίνη Α στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού τους

σολήνα όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια (51).

Ο μικροοργανισμός αποτελεί κύριο νοσοκομειακό παθογόνο χάρη στην ικανότητα του να μετατρέπεται σε σπόρο και να επιβιώνει σε επιφάνειες έως και πάνω από έξι μήνες. Η μετάδοση του γίνεται συνήθως από άτομο σε άτομο ή μέσω επαφής με μολυσμένα αντικείμενα μέσω της κοπρανοστοματικής οδού λόγω μη τήρησης κανόνων υγιεινής ακόμα και από το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό. Οι αποικισμένοι ασυμπτωματικοί φορείς παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του μικροοργανισμού και ο χειρισμός τους χωρίς κατάλληλα μέτρα προστασίας αποτελεί μόνιμη πηγή διασποράς. Έτσι ο κίνδυνος αποικισμού φαίνεται να συσχετίζεται με τη διάρκεια νοσηλείας. Σε νοσηλεία πάνω από μια εβδομάδα ο αποικισμός αυξάνεται στο 20% ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται με την παράταση της παραμονής στο νοσοκομείο και είναι ακόμη υψηλότερο στους ασθενείς των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) (52, 53).

Εικόνα 12: Επιδημιολογικός χάρτης CDI, 2008 (Ανατύπωση από : ECDC, 2013. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>



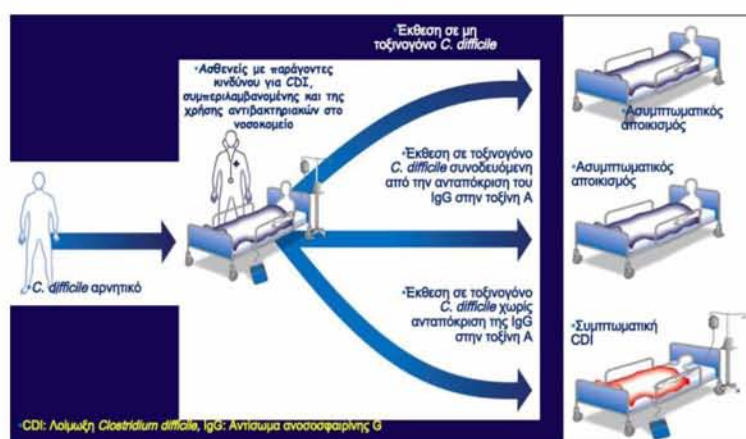
Το 2% των νοσηλευόμενων και το 4% των ασθενών της ΜΕΘ που είναι αποικισμένοι θα αναπτύξουν λοίμωξη από *C. difficile* (CDI). Τα ποσοστά αυτά αφορούν το 60% των λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος στα νοσοκομεία αντιπροσωπεύοντας το 9% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (εικόνα 12) τοποθετώντας τον μικροοργανισμό ως πρώτο αίτιο ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων στην Ευρώπη αφήνοντας δεύτερο τον *S. aureus* (54). Ένα μεγάλο ποσοστό των CDI δεν διαγιγνώσκεται διότι δεν υπάρχει κλινική υποψία ενώ ταυτόχρονα υπάρχει αδυναμία εργαστηριακής διάγνωσης. Από τους ασθενείς με CDI, και κυρίως σε αυτούς της ΜΕΘ, το 20% θα αναπτύξει κεραυνοβόλο κολίτιδα και ένα μικρό ποσοστό θα καταλήξει ή

θα χρειαστεί χειρουργείο ή νοσηλεία σε εξειδικευμένη μονάδα (53). Οι ασθενείς με CDI έχουν διπλάσιο κίνδυνο να καταλήξουν από ότι ασθενείς με οποιοδήποτε άλλου είδους διάρροια. Ενώ εξαιτίας της επιπλέον παράτασης νοσηλείας των ασθενών αυτών και των συχνών υποτροπών και επιπλοκών της νόσου το οικονομικό κόστος της λοίμωξης στο σύστημα υγείας είναι μεγάλο.

Η φυσιολογική μικρο-χλωρίδα του παχέως εντέρου αντιστέκεται στον αποικισμό. Αυτό, είναι γνωστό ως αντίσταση αποικισμού. Η αντιμικροβιακή θεραπεία καταστέλλει τη φυσιολογική μικροχλωρίδα και δημιουργεί ένα περιβάλλον στο εσωτερικό του παχέος εντέρου που επιτρέπει στο ευκαιριακό *C. difficile* να αναπτυχθεί. Σε τέτοιες περιπτώσεις, το *C. difficile* είναι σε θέση να πολλαπλασιαστεί και να αποικίσει το γαστρεντερικό σωλήνα του ασθενούς, οπότε και παράγει τοξίνες (τοξίνη Α και τοξίνη Β) που τραυματίζουν το εσωτερικό τοίχωμα του παχέος εντέρου, οδηγώντας σε διάρροια, φλεγμονή και, σε σοβαρές περιπτώσεις, σε ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα. Η ανάπτυξη της CDI δεν παρουσιάζεται σε όλους τους ασθενείς που αποικίζονται από *C. difficile*. Αυτό υποδηλώνει ότι επιπλέον παράγοντες, πέραν από την παρουσία του βακτηρίου, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Υπάρχουν τρία διαφορετικά κλινικά σενάρια που συνδέονται με τη μετάδοση του *C. difficile* (εικόνα 13) (55):

- 1) Έκθεση σε μη τοξινογόνο στέλεχος του *C. difficile* που καταλήγει σε ασυμπτωματικό αποικισμό
- 2) Έκθεση σε τοξινογόνο στέλεχος, επαρκής ανταπόκριση αντισώματος ανοσοσφαιρίνης G ορού (IgG) στην τοξίνη Α του *C. difficile*, η οποία οδηγεί επίσης σε ασυμπτωματικό αποικισμό
- 3) Έκθεση σε τοξινογόνο στέλεχος, μη συνοδός εκδήλωση επαρκούς ανταπόκριση IgG στην τοξίνη Α με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αρχικού επεισοδίου συμπτωματικής νόσου και πιθανής υποτροπής της CDI.

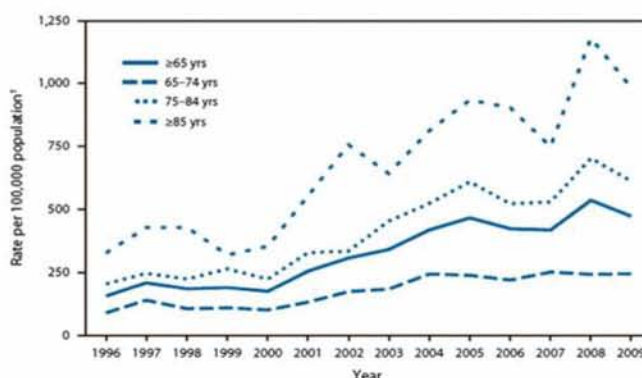
Εικόνα 13 : Έκθεση σε *C. difficile* και πιθανές εξελίξεις (Ανατύπωση από : *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis, Maja Rupnik, Mark H. Wilcox & Dale N. Gerding, Nature Reviews Microbiology 7, 526-536 - July 2009).



Φαίνεται λοιπόν πως ο μακροχρόνιος αποικισμός, χωρίς προδιαθεσικό παράγοντα που να επηρεάζει την σύσταση της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας, δρα προστατευτικά έναντι της λοίμωξης από κλωστηρίδιο. Μόνο το 1% των ήδη αποικισμένων θα αναπτύξει CDI σε αντίθεση με τους μη αποικισμένους που το ποσοστό είναι πολλαπλάσιο. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην δυνατότητα του ξενιστή να παράγει αντισώματα έναντι του παθογόνου και κυρίως έναντι της τοξίνης A. Επιπλέον, η παθογόνος δύναμη του μικροοργανισμού αλλά και η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή επηρεάζουν την ανάπτυξη λοίμωξης (50,51,54,55).

Προδιαθεσικοί παράγοντες και παράγοντες κινδύνου για CDI είναι η χρήση αντιβιοτικών, ανοσοκατασταλτικών, χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων και ηπακτικών, η αυξημένη ηλικία (>65 ετών) και τα συνοδά υποκείμενα νοσήματα, σημαντική λευκοκυττάρωση ($>15 \times 10^9/L$), μειωμένη αλβουμίνη ορού ($<30g/L$), αυξημένη κρεατινίνη ορού, χειρουργεία στο γαστρεντερικό σωλήνα, ρινογαστρικοί καθετήρες, φαρμακευτικά σκευάσματα υποκλυσμού, αντιπερισταλτικά, αντιόξινα και διεγερτικά του γαστρεντερικού (51, 56). Μάλιστα φαίνεται πως η ηλικία έχει ποσοτική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης CDI, δηλαδή για κάθε χρόνο μετά τα 18 έτη ο κίνδυνος για ενδονοσοκομειακή λοίμωξη από κλωστηρίδιο αυξάνεται κατά 2% (56) (εικόνα 14).

Εικόνα 14: Διάγραμμα σχέσης ηλικίας και ετήσιων περιστατικών CDI (Ανατύπωση από : from Centers for Disease Control and Prevention. Morb Mortal Wkly Rep (MMWR) 2011;60(34):1171).



Από τους προαναφερθέντες παράγοντες η λήψη αντιμικροβιακών παραγόντων φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος μιας και, από νωρίς στη μελέτη του παθογόνου, το *C. difficile* είχε συσχετιστεί με την διάρροια και κολίτιδα μετά από τη λήψη τους. Πλέον αποτελεί την βασική αιτία των νοσημάτων αυτών με δεύτερο τον *S. aureus* και τρίτο το *C. perfringens* (15). Όλα τα αντιμικροβιακά, με εξαίρεση τις ενδοφλεβίως χορηγούμενες αμινογλυκοσίδες, έχουν ενοχοποιηθεί για λοίμωξη από *C. difficile*. Κυρίως ενοχοποιούνται τα από του στόματος χορηγούμενα ευρέως φάσματος αντιμικροβιακά και κυρίως οι β-λακτάμες και η κλινδαμυκίνη καθώς και ο συνδιασμός αντιμικροβιακών σε μακρά χορήγηση. Φαίνεται λοιπόν, στην εμφάνιση της νόσου να συμβάλλει και δοσοεξαρτώμενος και χρονοεξαρτώμενος παράγοντας. Λοίμωξη από *C. difficile* μπορεί να αναπτυχθεί και μετά τη χορήγηση αντιμικροβιακών έναντι των οποίων

το μικρόβιο παρουσιάζει *in vitro* ευαισθησία. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ταχύτερη και μεγαλύτερη ανάπτυξη, σε σχέση με την υπόλοιπη εντερική χλωρίδα, του *C. difficile* μετά τη διακοπή της αντιμικροβιακής θεραπείας. Τα κύρια αντιμικροβιακά που ενοχοποιούνται και η συχνότητα τους φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Αντιμικροβιακοί παράγοντες που σχετίζονται με λοίμωξη από *C. difficile* (Ανατύπωση από : Bouza E, Muñoz P, Alonso R. Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. Clinical Microbiol infect 2005; 11 (Suppl. 4): 57-64.)

| Πολύ συχνά | Συχνά | Σπάνια |
|----------------|-------------------|-----------------|
| Κλινδαμυκίνη | Άλλες πενικιλίνες | Αμινογλυκοσίδες |
| Αμπικιλίνη | Σουλφοναμίδες | Βακτρακίνη |
| Αμοξικιλίνη | Ερυθρομυκίνη | Μετρονιδαζόλη |
| Κεφαλοσπορίνες | Χλωραμφενικόλη | Βανκομυκίνη |
| | Τετρακυκλίνες | Τεϊκοπλανίνη |
| | Τριμεθοπρίμη | ΡΙφαμυκίνη |
| | Κινολόνες | |
| | Κοτριμοξαζόλη | |

Συνήθως η λοίμωξη αφορά καλοήγη αυτοπεριοριζόμενη διάρροια που συχνά σταματά μετά την διακοπή του αντιβιοτικού ενώ κάποιες φορές τα εντερικά συμπτώματα είναι πιο βαριά και η διάρροια επίμονη ενώ σπανιότερα μπορεί να καταλήξει σε τοξικό megacolon και ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα (58). Συνολικά το ποσοστό διάρροιας σχετιζόμενης με αντιβιοτικά και παθογόνου μικροοργανισμού (*C. difficile*, *S. aureus*, *K. oxytoca*, *C. perfringens*) είναι παρόμοιο σε παιδιά και ενήλικες. Όταν όμως η διάρροια αφορά αποκλειστικά τη χρήση αντιβιοτικών και *C. difficile* τότε η ηλικία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου με αύξηση της συχνότητας και της νοσηρότητας παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας (59). Σπανιότερα το *C. difficile* εμπλέκεται με διάρροια μετά από λήψη μεθοτρεξάτης και άλλων χημειοθεραπευτικών, με υποτροπές ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, με απόφραξη ή στραγγαλισμό του εντέρου και σπάνια σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου (61).

Η CDI αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, πρωτίστως ενδονοσοκομειακή λοίμωξη και κυρίως σε ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους. Όμως, την τελευταία δεκαετία το κλωστηρίδιο αναδύθηκε και ως αίτιο λοίμωξης της κοινότητας σε άτομα που έως πρόσφατα θεωρούνταν χαμηλού κινδύνου, όπως παιδιά, γυναίκες σε εγκυμοσύνη και στην περιγεννητική περίοδο μετά από καισαρική τομή (62, 63). Το 20-27% των περιπτώσεων CDI κοινότητας αφορά προηγουμένως υγιή άτομα ενώ το 93% των θανάτων συναντάται σε υπερήλικες. Τα περιστατικά στην κοινότητα, βάση πρόσφατων δημοσιεύσεων, φαίνεται να αυξάνονται τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική. Η εξωνοσοκομειακή λοίμωξη από κλωστηρίδιο πιθανόν να υποδηλώνεται λόγω της μη αναζήτησης του μικροοργανισμού ως αίτιο σε περιπτώσεις διάρροιας κοινότητας. Στην Αυστραλία, σε μια προσπάθεια ευαισθητοποίησης στη νόσο, το

Στην Ευρώπη η λοίμωξη από *C. difficile* δεν ανήκει στα νοσήματα υποχρεωτικής επιτήρησης σε όλες τις χώρες. Έτσι ενώ σε κάποιες χώρες της Ευρώπης αλλά και στην Αμερική ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να είναι υψηλός σε κάποιες, άλλες λόγω της υποδήλωσης ή της αδυναμίας διάγνωσης, τα ποσοστά είναι εξαιρετικά χαμηλά (Εικόνα 15). Έτσι έγινε μια προσπάθεια συλλογικής καταγραφής των CDI και για το λόγο αυτό η ECDC (European Centre for Disease and Prevention and Control) ανακοίνωσε το 2008 την εφαρμογή του συστήματος επιτήρησης ECDIS (European surveillance of Clostridium difficile Infections). Έτσι σταδιακά, και στις χώρες όπου εφαρμόστηκε μαζί με μέτρα πρόληψης, το ποσοστό των νοσοκομειακών λοιμώξεων από *C. difficile* μειώθηκε έως και 70% σε κάποιες περιπτώσεις (63).

| Country | Number of patients tested (per 10,000 patient-days) | Weighted mean CDI incidence rate (per 10,000 patient-days) |
|----------------|---|--|
| Finland | 140 | 19 |
| United Kingdom | 115 | 10.5 |
| Sweden | 75 | 10 |
| Poland | 45 | 12.5 |
| Norway | 55 | 8 |
| Austria | 55 | 7.5 |
| Ireland | 95 | 7.5 |
| Germany | 75 | 7.5 |
| Denmark | 75 | 5.5 |
| Switzerland | 50 | 4.5 |
| Spain | 55 | 4.5 |
| Italy | 40 | 3.5 |
| Greece | 65 | 4 |
| Netherlands | 75 | 4 |
| Portugal | 50 | 3 |
| France | 45 | 2.5 |
| Slovenia | 20 | 2.5 |
| Hungary | 30 | 2.5 |
| Latvia | 15 | 2 |
| Bulgaria | 10 | 1.5 |
| Romania | 10 | 1 |
| Slovakia | 20 | 1.5 |
| Czech Republic | 30 | 1.5 |
| Cyprus | 40 | 1.5 |
| Croatia | 45 | 0.5 |
| Luxembourg | 50 | 0.5 |
| Turkey | 5 | 0.5 |

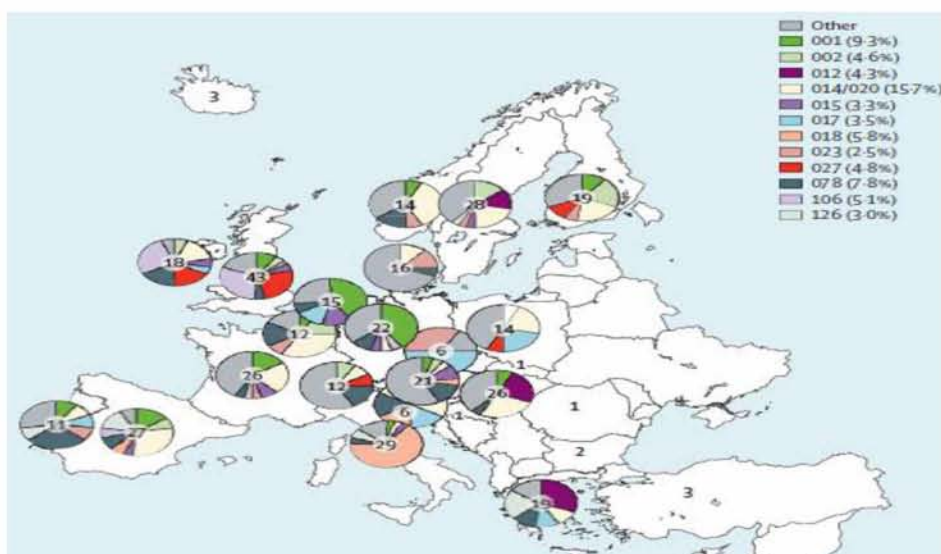
2.5.1. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Για την τυποποίηση των στελεχών χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως :

- Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse Field Gel Electrophoresis -PFGE)
- PCR-ribotyping
- Toxinotyping
- Multi Locus Sequencing Typing (MLST)
- Ανάλυση με Περιοριστική Ενδονουκλεάση (Restriction Endonuclease Analysis –REA)
κα.

Οι δυο πρώτες, REA και PFGE, βασίζονται στο αποτύπωμα του DNA μετά την πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Η PCR-ribotyping τυποποίηση βασίζεται στην ομοιότητα συναφών απομονωθέντων μικροοργανισμών στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ 16s και 23s rRNA. Η μέθοδος Toxinotyping ανιχνεύει θραύσματα της παθογενετικής γενετικής περιοχής PaLoc με PCR μετά από ενζυμικό περιορισμό. Ενώ η τυποποίηση με MLST βασίζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στη σύγκριση των διαφορών που προκύπτουν στη νουκλεοτιδική αλληλουχία συγκεκριμένων διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) οπότε και προσδιορίζεται η γενετική σχέση των στελεχών. Οι μέθοδοι τυποποίησης αναπτύχθηκαν ώστε να αντιστοιχίσουν χαρακτηριστικά και φαινοτυπικές διαφορές σε συγκεκριμένους τύπους και να υπάρχει έτσι παγκοσμίως κοινός κώδικας επικοινωνίας σχετικά με την επιδημιολογία του κλωστηριδίου (εικόνα 26).

Εικόνα 16: Κατανομή ριβότυπων στην Ευρώπη και ο επιπολασμός του στελέχους 027 (Ανατύπωση από : *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey Dr Martijn P Bauer, et al – The Lancet, Vol 377, No. 9759, p63-73, 1 January 2011).



2.5.2. ΥΠΕΡΛΟΙΜΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ – HYPERVIRULENCE

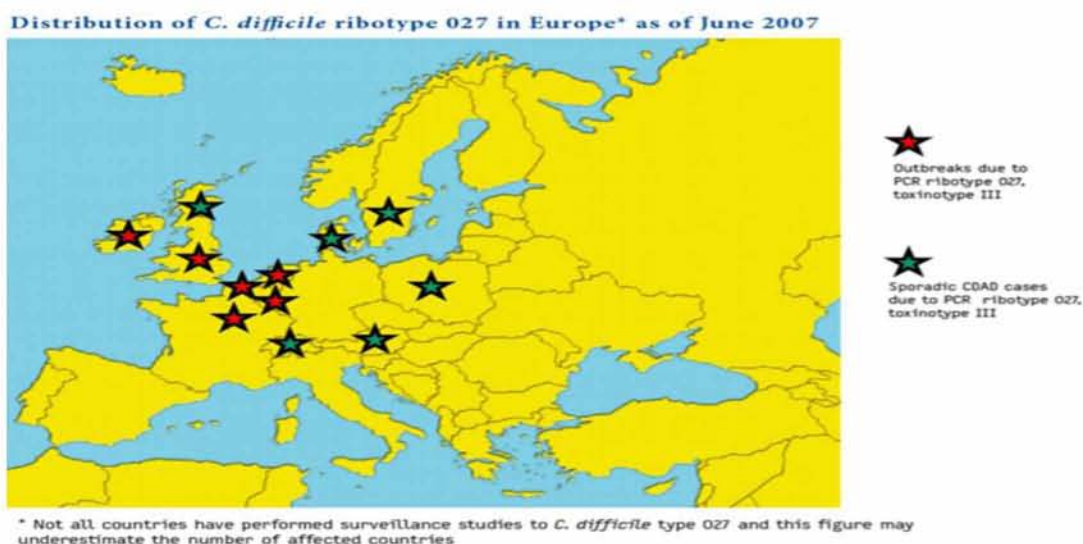
Υπάρχουν πολλά διαφορετικά στελέχη *Clostridium difficile* (>300). Σε ένα νοσοκομείο κυκλοφορούν αρκετά στελέχη και μάλιστα με μεγάλη ετερογένεια όμως «επιδημία» συνήθως προκαλείτε από ένα στέλεχος το οποίο επικρατεί την περίοδο εκείνη και είναι το πλέον λοιμογόνο. Στην Ευρώπη κυριαρχούν οι ριβότυποι 001 και 020 (εικόνα 16). Οι αλλαγές στη χρήση αντιμικροβιακών και η υπερκατανάλωση τους, ιδιαίτερα φλουοροκινολονών, καθώς και η ευρεία χρήση αλκοολούχων απολυμαντικών φαίνεται πως οδήγησαν στην ανάδυση νέων περισσότερο λοιμογόνων στελεχών, όπως τα στελέχη BI/NAP1/027 και BK/NAP7-0/078, που φαίνεται να αποτελούν παγκόσμια απειλή τα τελευταία χρόνια (Εικόνα 17) (64, 65). Τα νέα αυτά στελέχη, από το 2000, είναι υπεύθυνα για επιδημικές εξάρσεις νοσοκομειακών λοιμώξεων (outbreaks) και σχετίζονται με υπερπαραγωγή τοξινών A και B, με παραγωγή δυαδικής τοξίνης, με αυξημένη ικανότητα μετατροπής σε σπόρους και αντοχή στις κινολόνες συμπεριλαμβανομένης της μοξιφλοξασίνης, ενώ έχουν αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Επιπλέον φαίνεται ότι στα στελέχη αυτά υπάρχει μερική εξάλειψη του γονιδίου *tcdC* το οποίο, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, βρίσκεται στην παθογενετική περιοχή PaLoc του μικροοργανισμού και είναι υπεύθυνο για την αρνητική ρύθμιση παραγωγής των τοξινών A και B. Έτσι λοιπόν για το στέλεχος RT027 υπάρχει μια διαγραφή 18 bp και για το RT078 μια αντίστοιχη 39 bp (66). Έχει βρεθεί *in vitro* ότι στον ριβότυπο 027 η παραγωγή τοξινών δεν είναι μεγαλύτερη στη μονάδα του χρόνου αλλά η παραγωγή τους διαρκεί για μεγαλύτερο διάστημα οπότε και συνολικά η ποσότητα είναι μεγαλύτερη, 16 φορές περισσότερη A και 23 φορές περισσότερη B τοξίνη (67). Εκεί πιθανόν να οφείλονται τα παρατεταμένα και έντονα συμπτώματα της λοίμωξης από στελέχη 027 που δύσκολα υποχωρούν. Άλλοι ριβότυποι που έχουν εμφανιστεί και φαίνεται να έχουν αυξημένη λοιμογόνο δύναμη προκαλώντας επιδημίες είναι ο 002 στην Κίνα, ο 001 στην Γερμανία και ο 018 στην Ιταλία (34). Η επιδημιολογία του *C. difficile* αλλάζει συνεχώς όμως λόγω του αυξημένου επιπολασμού της νόσου από τους ανωτέρω ριβότυπους και των σημαντικών κλινικών και οικονομικών επιπτώσεων τους, κρίνεται απαραίτητη η καταγραφή τους ως «υπερλοιμογόνα» επιδημικά στελέχη καθώς και η άμεση λήψη μέτρων προφύλαξης και διασποράς τους.

Στην Ελλάδα οι μελέτες για το κλωστηρίδιο είναι περιορισμένες. Στο παρελθόν έχει απομονωθεί σε πολύ μικρό ποσοστό ως ένα από τα αίτια οξείας διάρροιας κοινότητας σε μελέτη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης (68) ενώ σε πρόσφατη μελέτη η συχνότητα της CDI σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς ήταν αρκετά χαμηλή και όλα τα απομονωθέντα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην μετρονιδαζόλη και τη βανκομυκίνη (69). Φαίνεται πως ακόμη δεν έχει κάνει την εμφάνισή του το υπερλοιμογόνο στέλεχος 027 στη χώρα μας ενώ το 14% των απομονωθέντων

στελεχών ανήκει στον ριβότυπο 078 (70) .

Η αλλαγή της επιδημιολογίας σε συνδιασμό με τα υπερλοιμογόνα στελέχη που έχουν αναδυθεί και προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις οδήγησαν το CDC (Centers for Disease Control and Prevention, US) να καθορίσει το *C. difficile* ως επείγουσα παγκόσμια απειλή. Συστήματα επιδημιολογικής επιτήρησης και στρατηγικές διαχείρισης των περιστατικών *C. difficile* έχουν εφαρμοστεί παγκοσμίως με μείωση του επιπολασμού της νόσου. Όμως η εμφάνιση στελεχών επιδημίας δεν έχει εξαλειφθεί και περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη ώστε να βελτιωθούν τα μέτρα πρόληψης και θεραπείας.

Εικόνα 17 : Επιπολασμός του στελέχους 027 (Ανατύπωση από : Eurosurveillance, Volume 12, Issue 6, 01 June 2007 – Euroroundup, Update of Clostridium difficile – associated disease due to PCR Ribotype 027 in Europe).

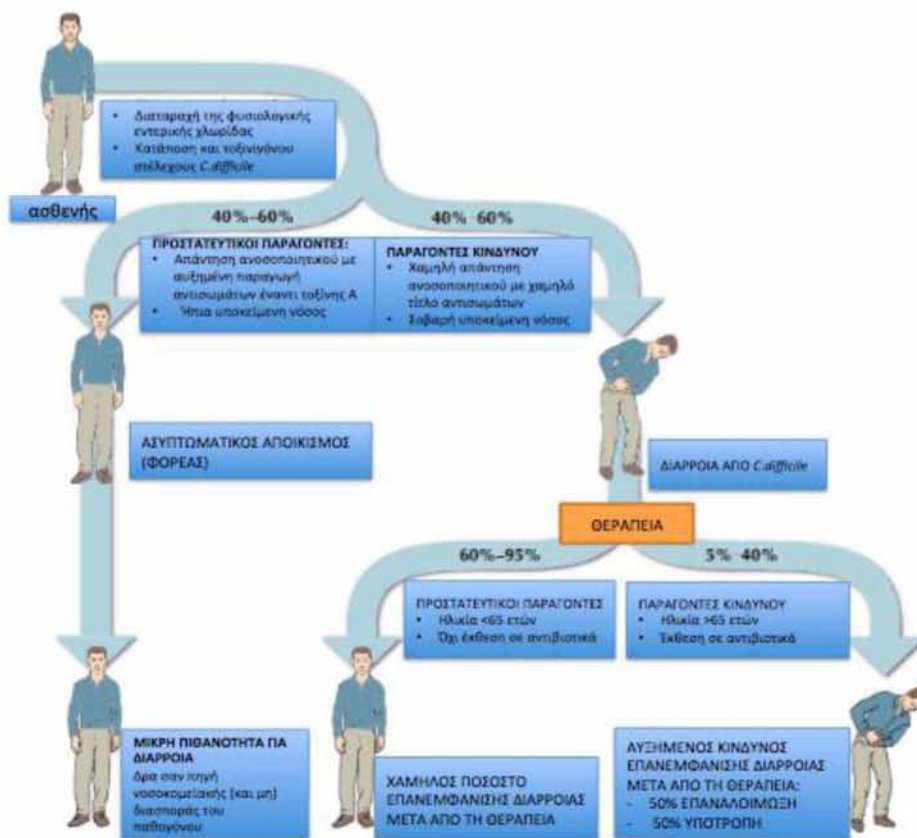


2.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Το *C. difficile* σχετίζεται με ευρύ φάσμα κλινικών καταστάσεων από ασυμπτωματική φορεία έως οξεία διάρροια αλλά και ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα συνοδευόμενη από κοιλιακές κράμπες, πυρετό και ιστολογικά ευρήματα. Η κλινική εικόνα εμφανίζεται συχνά 3-10 μέρες μετά την έναρξη θεραπευτικής αγωγής με αντιμικροβιακά. Ο παθογόνος μικροοργανισμός μεταδίδεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την πρόκληση νόσου είναι (εικόνα 18):

1. Η κατάποση του μικροοργανισμού είτε σε βλαστική είτε σε μορφή σπόρου.
2. Διαταραχή της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου.
3. Παραγωγή τοξινών από το στέλεχος *C. difficile*.

Εικόνα 18 : Παράγοντες που συνεισφέρουν στον αποικισμό και στη λοίμωξη από *C. difficile* (Ανατύπωση από : Johnson S, Gerding DN. Clostridium difficile-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998;26:1027-36, published by the University of Chicago Press, Infectious Diseases Society of America; 1998)



Στις περισσότερες περιπτώσεις ο μικροοργανισμός προέρχεται από κάποια εξωτερική πηγή (εξωγενής μόλυνση) που μπορεί να είναι ένα άλλο πάσχον άτομο, το μολυσμένο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό ή και απευθείας το μολυσμένο περιβάλλον. Τα περισσότερα βλαστικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στο γαστρικό οξύ και δεν επιβιώνουν. Μόνο το 1% του μικροβιακού φορτίου καταφέρνει να φτάσει στο λεπτό έντερο. Τα σπόρια ωστόσο είναι ανθεκτικά στα οξέα και εύκολα περνούν από το στομάχι και μπορούν να βλαστήσουν στο λεπτό έντερο. Μετά την έκθεση του εντερικού βλεννογόνου στα αντιμικροβιακά, που αποτελούν τον προεξάρχοντα παράγοντα κινδύνου, η εντερική χλωρίδα καταστρέφεται και η αντίσταση αποικισμού διαταράσσεται. Το έντερο συνεπώς γίνεται ευάλωτο στον αποικισμό του από το *C. difficile*. Οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι και πιο σημαντικοί παράγοντες λοιμογονικότητας είναι οι εξωτοξίνες του κλωστηριδίου A και B.

Το *C. difficile* ασκεί τη δράση του κυρίως μέσω των δυο βασικών λοιμογόνων παραγόντων του, τις τοξίνες A (TcdA) και B (TcdB), που ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των μεγάλων κλωστηριδιακών τοξινών (Large Clostridial Toxin, LCT) που είναι ισχυρές γλυκοτρανσφεράσες που διαταράσσουν το επιθήλιο του εντέρου (71). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις αιμοραγικές και θανατηφόρες τοξίνες, TcsL και TcsH, του *Clostridium sordelii*, την τοξίνη

TenA του *Clostridium novyi* και την TpeL του *Clostridium perfringens* που είναι δομικά όμοιες και έχουν 30-70% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων τους με τη τοξίνη B. Οι τοξίνες του *C. difficile*, A και B, αναφέρονται ως εντεροτοξίνη και κυτταροτοξίνη αντίστοιχα. Η ονομασία τους προέκυψε από την παθογόνο επίδραση που παρατηρήθηκε πως είχαν, δηλαδή συσσώρευση υγρών σε πειραματικά μοντέλα εντέρου η πρώτη και κυτταροπαθογόνο δράση σε κυτταροκαλλιέργειες η δεύτερη. Η σημασία αυτών των εξωτοξινών στην παθογένεια της CDI υποστηρίζεται και από *in vitro* μελέτες όπου απομονωθέντα στελέχη *C. difficile* από τα οποία απουσίαζαν τα γονίδια των τοξινών δεν ήταν παθογόνα σε πειραματικά μοντέλα (72, 73).

Σήμερα είναι γνωστό ότι και οι δύο τοξίνες συνεισφέρουν από κοινού στην παθογένεια της νόσου (71) και σε γενικές γραμμές ο τρόπος δράσης τους φαίνεται να είναι παραπλήσιος. Είναι αμφότερα κυτταροτοξικές για πλήθος διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Μόνο τοξινογόνα στελέχη συνδέονται με την ανάπτυξη CDI. Στους ενήλικες ασυμπτωματικούς φορείς οι τοξίνες ανευρίσκονται λιγότερο συχνά. Η τοξίνη A φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο στην παθογένεια της διάρροιας επειδή αυτή συνδέεται κυρίως με εκτεταμένη βλάβη ιστών και συσσώρευση υγρού σε πειραματικά μοντέλα ζώων (51). Η τοξίνη B δεν έχει άμεση εντεροτοξική δραστηριότητα και πιστεύεται ότι παίζει ρόλο αφότου το γαστρικό τοίχωμα έχει υποστεί βλάβη από την τοξίνη A. Η τοξίνη B φαίνεται πως είναι έντονα κυτταροτοξική σε σχέση με την A (51). Η πλειονότητα των στελεχών παράγουν τόσο τοξίνη A αλλά και B. Όμως έχουν περιγραφεί παθογόνα στελέχη A/B⁺ οπότε πιθανόν η τοξίνη A να μην είναι τόσο ουσιαστική για τη μολυσματικότητα του μικροοργανισμού. Στελέχη με λοιμογόνο δύναμη αρνητικά για τοξίνη B, A⁺/B⁻, είναι εξαιρετικά σπάνια (71).

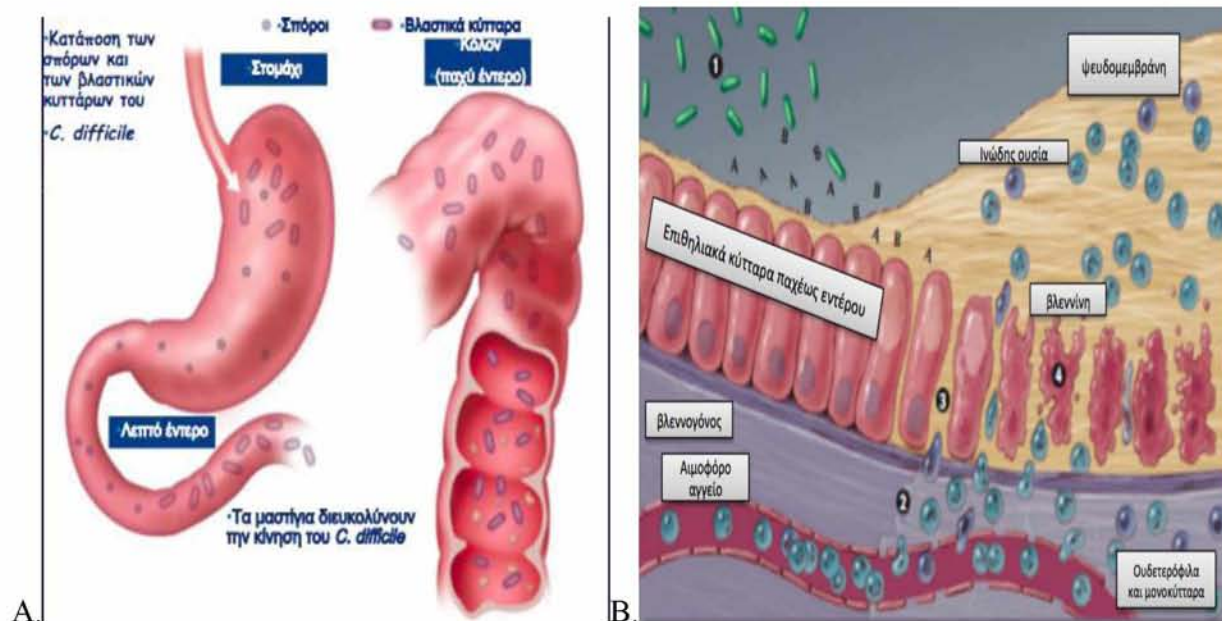
Οι τοξίνες ενδοκυτταρώνονται από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και παραβιάζουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Τα προσβεβλημένα κύτταρα εμφανίζουν ελάττωση των κυτταρικών λειτουργιών και αποστρογγυλοποιούνται λόγω αποσύνθεσης των ινιδίων της F-ακτίνης και ταυτόχρονης αύξησης των ινιδίων της G-ακτίνης (74). Για την αλλαγή του σχήματος των κυττάρων αρκεί η παρουσία πολύ λίγων μορίων τοξινών.

Μια δεύτερη επίδραση των τοξινών είναι η αποσταθεροποίηση των σφικτών συνδέσεων (tight junctions) η οποία οδηγεί στο θάνατο των κυττάρων και την κατάργηση του εντερικού φραγμού με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του βλεννογόνου και τις υδαρείς διάρροιες της CDI. Η κατάργηση των σφικτών συνδέσεων οδηγεί στην αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας ενώ επακόλουθο της δράσης των τοξινών μπορεί να είναι και η αιμορραγία (51). Επιπλέον, στην φλεγμονώδη απάντηση και στο σχηματισμό των ψευδομεμβρανών συνεισφέρουν η παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης α (TNFα) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών που επάγονται από τις τοξίνες (Εικόνα 19).

Εικόνα 19 :

- Α. Βλαστικά κύττατα του *C. difficile* προσκολλώνται σε επιθήλιο παχέως εντέρου και παράγουν τοξίνες Α και Β.
- Β. Η τοπική παραγωγή τοξινών και υδρολυτικών ενζύμων (1) οδηγεί σε παραγωγή του τοπικού παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNFα) και προφλεγμονωδών ιντερλευκινών, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και στρατολόγηση ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων (2), διάνοιξη των επιθηλιακών διακυτταρικών συνδέσεων (3) και απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων (4). Η τοπική παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων οδηγεί σε αποικοδόμηση του συνδετικού ιστού που οδηγεί σε κολίτιδα, σχηματισμό ψευδομεμβρανών (5) και διάρροια.

(Ανατύπωση από : *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults, Poutanen SM1, Simor AE-CMAJ. 2004 Jul 6;171(1):51-8)



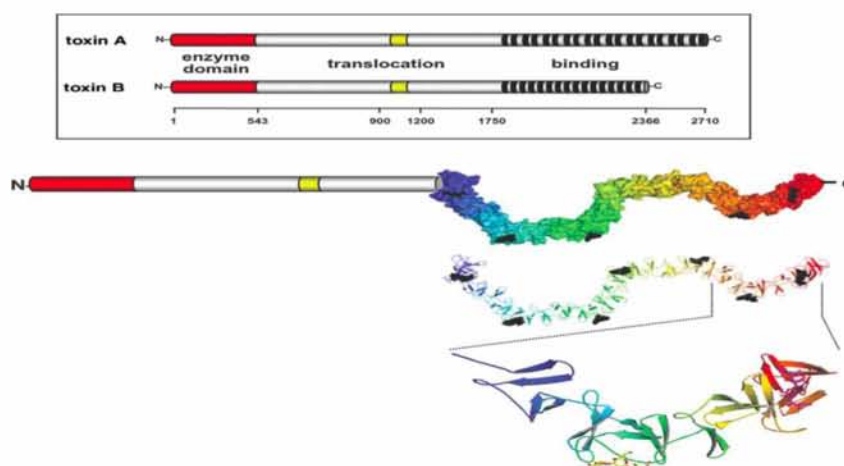
Συνοπτικά λοιπόν:

- Η τοξίνη Α είναι εντεροτοξίνη που προκαλεί χημειοταξία των ουδετεροφίλων και απελευθέρωση κυτταροκινών με υπερέκκριση υγρών δημιουργώντας έτσι αιμορραγική νέκρωση ενώ η κυτταροπαθητική του δράση οδηγεί σε διάσπαση των στεγανών διακυτταρικών συνδέσεων με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού τοιχώματος οπότε οδηγεί σε διάρροια.
- Η τοξίνη Β είναι κυτταροτοξίνη που προκαλεί αποπολυμερισμό της ακτίνης με επακόλουθη καταστροφή του κυτταροσκελετού (*in vivo* & *in vitro*).

Οι αρχικές έρευνες είχαν πραγματοποιηθεί πριν γίνει καλά κατανοητός ο μηχανισμός δράσης των τοξινών σε μοριακό επίπεδο. Οι τοξίνες Α και Β είναι μονές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, υψηλού μοριακού βάρους οργανωμένες σε μεγάλες πολυτμηματικές και λειτουργικά διακριτές δομές. Τα προϊόντα μεταγραφής και μετάφρασης της PaLoc είναι 308 kDa για την τοξίνη Α και 207 kDa για την τοξίνη Β με ομοιότητα περίπου 50% σε επίπεδο αμινοξέων και παρόμοια πρωτοταγή δομή. Οι δύο τοξίνες διαθέτουν τρεις δραστικές περιοχές. Η ενζυμική και

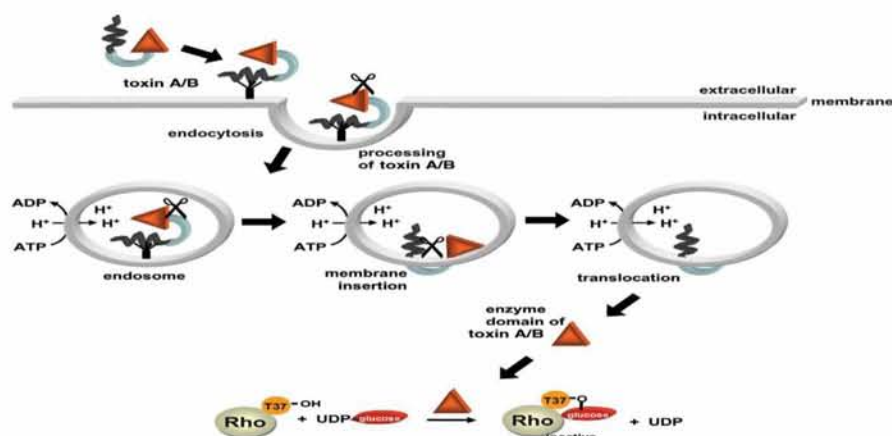
κυτταροτοξική δραστηριότητα των τοξινών οφείλεται στη διαμόρφωση του καταλυτικού αμινοτελικού άκρου (N-άκρου) που είναι υπεύθυνο για τη γλυκοζυλίωση του μορίου στόχου. (73,75). Στο ενδιάμεσο τμήμα βρίσκεται μια διαμεμβρανική περιοχή μετάθεσης (translocation domain) που σχετίζεται με διεργασίες ενδοκυττάρωσης των τοξινών ενώ το καρβοξυτελικό άκρο (C-άκρο) των τοξινών αποτελεί το σημείο σύνδεσης με τους υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων και συντίθεται από επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές αλληλουχίες (Εικόνα 20).

Εικόνα 20 : Δομή των τοξινών A και B (Ανατύπωση από : T Jank et al.Glycobiology, REV. 2007; 17, 4 , 15R–22R).



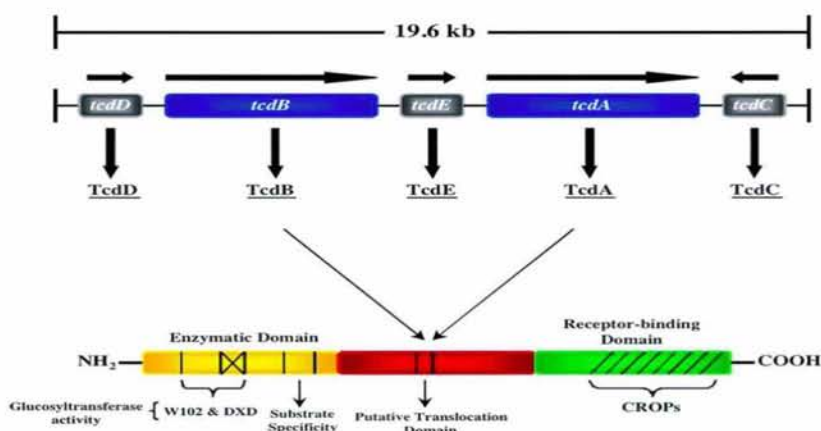
Ο μοριακός τρόπος δράσης των τοξινών δεν είναι ακριβώς κατανοητός. Από πρόσφατες μελέτες οι τοξίνες φαίνεται να προσδένονται σε έναν, άγνωστο προς το παρόν, υποδοχέα και να εισέρχονται στο κύτταρο μέσω διαμεσολαβούμενης ενδοκυττάρωσης. Στο ενδόσωμα, η πρωτεάση της κυστεΐνης εντός της περιοχής μετάθεσης είναι υπεύθυνη για την πρωτεολυτική διάσπαση της καταλυτικής περιοχής του N-άκρου η οποία εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Στόχος των τοξινών είναι αδρανοποίηση μικρών ρυθμιστικών πρωτεϊνών της Rho/Ras υπεροικογένειας των GTPασών με τροποποίηση μέσω γλυκοζυλίωσης σε Thr-35/Thr-37 (72) (εικόνα 21). Επειδή οι GTPάσες είναι βασικές κυτταρορυθμιστικές πρωτεΐνες, η μόνιμη απενεργοποίηση τους σε επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε δυσλειτουργία της ακτίνης του κυτταροσκελετού και της ακεραιότητας των σφικτών συνδέσεων της, σε καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού και σε απόπτωση μέσω ενεργοποίησης κασπασών (76). Η αναγνώριση των τοξινών από το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα μέσω του φλεγμονοσώματος οδηγεί σε παραγωγή της ιντερλευκίνης 1. Αυτό προκαλεί την εισροή φαγοκυτταρικών κυττάρων, όπως τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα την περαιτέρω φλεγμονή του ιστού. Η καταστροφή του επιθηλίου και η φλεγμονώδης απόκριση προκαλεί το σχηματισμό των ψευδομεμβρανών, την απώλεια του εντερικού φραγμού και τη συσσώρευση υγρού με τη δημιουργία οιδήματος της περιοχής.

Εικόνα 21 : Μοντέλο πρόσληψης τοξινών. Οι τοξίνες A και B συνδέονται με υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων και στη συνέχεια ενδοκυτταρώνονται. Η επίδραση του όξινου pH στις τοξίνες εντός των ενδοσωμάτων εκθέτει τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης επιτρέποντας την είσοδο τους στην μεμβράνη. Οι τοξίνες σχηματίζουν πόρους και το N-τελικό άκρο μετατοπίζεται από το όξινο ενδόσωμα στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα οι τοξίνες γλυκοζυλιώνουν τις πρωτεΐνες Rho χρησιμοποιώντας UDP-γλυκόζη σαν συνυπόστρωμα. (Ανατύπωση από : Glycobiology vol. 17 no. 4 pp. 15R–22R, 2007 - Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function, Thomas Jank, Torsten Gieseemann, and Klaus Aktories).



Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τοξίνες A και B καλούνται *tcdA* και *tcdB*, αντίστοιχα, και εδράζονται σε μια χρωμοσωμική περιοχή του γονιδιώματος που καλείται νησίδα παθογονικότητας (pathogenicity locus, PaLoc) του *C. difficile* και έχει μέγεθος 19,6kb. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει επίσης και τα γονίδια *tcdC*, *tcdD* και *tcdE* (72) (Εικόνα 22).

Εικόνα 22: Η νησίδα παθογονικότητας του *C. difficile* (Ανατύπωση από : Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):247-63 - “*Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease”, Voth DE1, Ballard JD.)



Η λειτουργία των γονιδίων αυτών είναι:

- *tcdR* : κωδικοποιεί μια RNA πολυμεράση που ασκεί θετική επίδραση (up regulation) στην

έκφραση των τοξινών

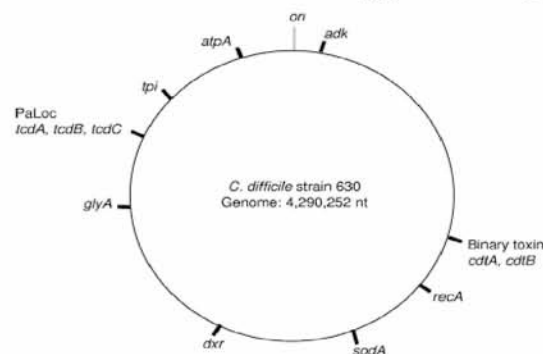
- *tcdC* : σχετίζεται με μειорύθμιση, αρνητική επίδραση (down regulation), της παραγωγής των τοξινών
- *tcdE* : σχετίζεται με τη δράση πρωτεϊνών (holins) που ρυθμίζουν τη δράση βακτηριοφάγων.

Γενετικές βλάβες της περιοχής PaLoc, όπως έλλειψη στην 3' CPOP του *tcdA*, 18-bp έλλειψη στο *tcdC* και πολυμορφισμοί σε γονίδια έχουν δημιουργήσει μια σειρά υπερλοιμογόνων στελεχών του *Clostridium difficile*.

Η περιοχή PaLoc έχει κάποιες από τις ιδιότητες των MGEs καθώς καταλαμβάνει την ίδια μοναδική θέση στο γονιδίωμα των τοξινογόνων στελεχών ενώ στα μη τοξινογόνα αντικαθίσταται από μια μη κωδικοποιούσα συνδετική αλληλουχία, καλά συντηρημένη (>90%), με μέγεθος 115bp. Έχει βρεθεί ότι είναι ικανή να μεταφερθεί μεταξύ στελεχών και συχνά η μετακίνηση αυτή διαμεσολαβείται από CTns (33). Η δυνατότητα αυτή έγινε αντιληπτή όταν σημασμένη γονιδιακή περιοχή τοξινογόνου στελέχους ανιχνεύθηκε και εκφράστηκε σε προηγούμενα μη τοξινογόνο στέλεχος καθιστώντας το ικανό για παραγωγή τοξίνης (33).

Κάποια στελέχη του *C. difficile* (κυρίως αυτά που ανήκουν στους ριβότυπους 027 και 078) παράγουν μια επιπλέον τοξίνη που καλείται διμερής ή δυαδική (binary - CDT) (77). Ανήκει στην οικογένεια των δυαδικών τοξινών που παράγονται και από άλλα είδη του γένους *Clostridium* όπως *C. perfringens* *C. spiroforme* *C. botulinum*. Αποτελείται από δύο ανεξάρτητες πεπτιδικές αλυσίδες με διαφορετική λειτουργία που κωδικοποιούνται από γονίδια εκτός της PaLoc περιοχής (εικόνα 23). Η πρώτη είναι η CDTb αλυσος που συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή και βοηθά στην ενδοκύττωση της δεύτερης αλυσίδας, της CDTa. Αυτή επιτελεί ενζυματική δράση, καταλύοντας την ADP-ριβοςυλίωση της ακτίνης και αποδιοργανώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον κυτταρικό σκελετό. Αν και η βιολογική σημασία της τοξίνης αυτής παραμένει ασαφής, μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι η CDT μπορεί να είναι τοξική και πιθανόν να αυξάνει την προσκόλληση του μικροοργανισμού στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω προεξοχών από δίκτυο μικροσωληνίσκων (78).

Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση γονιδιώματος *C. difficile* (Ανατύπωση από : "Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile*" -Griffiths D, et al-Journal of Clinical Microbiology, March 2010, p 770-778)



Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν την παθογένεια του *C. difficile* ως μια πολυπαραγοντική διαδικασία που καθορίζεται από την παραγωγή τοξινών, το μικροβίωμα του εντέρου και την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. Μετά την πρόσληψη του, το *C. difficile* διαφεύγει της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή, πολλαπλασιάζεται στο έντερο, παράγει τις τοξίνες του και εκδηλώνει την παθογόνο δράση του.

Εκτός λοιπόν από τις τοξίνες και άλλοι παράγοντες του μικροοργανισμού φαίνεται να παίζουν ρόλο στην παθογένεια της λοίμωξης από *C. difficile* όπως πρωτεΐνες της επιφανειακής στιβάδας για την πρόσδεση στο εντερικό επιθήλιο και την τοπική παραγωγή τοξινών, προσκολλητίνες, υαλουρονιδάση, κα έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη νόσου. Η επίδραση του μικροβιώματος του εντέρου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της περιοχής μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η σύνθεση βιταμινών και ενεργών μεταβολιτών, η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και η αντίσταση έναντι σε αποικισμό από παθογόνα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιμικροβιακά έχουν μεγάλες και συχνά μακροχρόνιες επιπτώσεις στο γαστρεντερικό μικροβίωμα και μειώνουν την αντίσταση αποικισμού έναντι του *C. difficile*. Σε κόπρανα ασθενών με CDI, μετά από χρήση αντιμικροβιακών ή σε υποτροπή της νόσου, βρέθηκε μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας σε σχέση με υγιείς ενήλικες (76).

Ο ρόλος της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή είναι ιδιαίτερα σημαντικός αφού η λοίμωξη από *C. difficile* ενεργοποιεί τόσο την έμφυτη αλλά και την επίκτητη ανοσία. Στην πρώιμη παθογένεση της λοίμωξης παρουσιάζεται κυρίως οξεία εντερική φλεγμονή από επαγωγίμη έμφυτη ανοσοαπόκριση με συμμετοχή ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που προκαλούν κυτταρική καταστροφή λόγω οξειδωτικών παραγόντων και πρωτεασών στα αζουρόφιλα κοκκία τους. Από την άλλη φαίνεται πως η χυμική απάντηση στις τοξίνες A και B επηρεάζει την έκβαση της CDI. Ο ρόλος της επίκτητης ανοσίας αντικατοπτρίζεται και από τις συνεχείς προσπάθειες για κατασκευή εμβολίου έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού (62).

Τέλος, σημαντικό ρόλο στην παθογένεια έχει η ικανότητα του μικροοργανισμού να μετατρέπεται σε σπόρους όταν βρεθεί σε δυσμενείς συνθήκες. Η ικανότητα αυτή καθορίζεται από την ύπαρξη του γονιδίου *spoA* και την παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης που προσδίδει στο μικροοργανισμό αντοχή και επιτυχή ικανότητα μετάδοσης μεταξύ ασθενών και περιβάλλοντος. Τα σπόρια είναι μεταβολικά αδρανή άρα εγγενώς ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, απολυμαντικά, θερμοκρασίες αλλά και στις αερόβιες συνθήκες. Έτσι τα σπόρια φτάνουν στις κρύπτες και στις λάχνες του εντέρου και λόγω των αναερόβιων συνθηκών εκβλαστάνουν σε φυτικές μεταβολικά ενεργές μορφές η παραγωγή τοξινών από τις οποίες επάγει τη νόσο. Η χορήγηση αντιβιοτικών οδηγεί σε εμπλουτισμό του εντερικού σωλήνα με χολικά οξέα και υδατάνθρακες που υποστηρίζουν την βλάστηση κα ανάπτυξη του *C. difficile*. Τα χολικά άλατα

προσδένονται σε cspC που είναι μια ειδική πρωτεάση που δρα σαν υποδοχέας εκβλάστησης.

2.7. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Το *C. difficile* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της νοσολογικής οντότητας που είναι γνωστή σαν λοίμωξη από *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* infection, CDI) και της κολίτιδας από *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* associated diarrhea, CDAD) που ποικίλουν από ελαφράς μορφής αυτοπεριοριζόμενο διαρροϊκό σύνδρομο μέχρι σοβαρή νόσο με δυνητικά απειλητικές για τη ζωή επιπλοκές. Ο κλινικός ορισμός της CDAD περιλαμβάνει : παρουσία διάρροιας (τουλάχιστον 5 υγρών ή ασχημάτιστων κενώσεων τις τελευταίες 36 ώρες), λήψη αντιμικροβιακών φαρμάκων τις τελευταίες 8 εβδομάδες, ανίχνευση των τοξινών του μικροοργανισμού, κλινική ύφεση μετά από την ενδεικνυόμενη θεραπεία και αποκλεισμό άλλων αιτιών διάρροιας. Οι κλινικές εκδηλώσεις ποικίλουν από ήπια διάρροια έως απειλητική για τη ζωή ψευδομεμβρανώση κολίτιδα με νεκρωτικές βλάβες του βλεννογόνου του εντέρου. Η περίοδος επώασης από την εγκατάσταση του μικροοργανισμού έως την έναρξη των συμπτωμάτων δεν έχει καθοριστεί ενώ ο χρόνος από την έκθεση σε αντιμικροβιακά ποικίλει από μια ημέρα έως 6 εβδομάδες ή και περισσότερο (51).

Η κλινική εικόνα της CDAD περιλαμβάνει υδαρή διάρροια, διάχυτο κοιλιακό άλγος και συμπτώματα όπως πυρετός, ανορεξία, ναυτία και έμετο ενώ σπάνια μπορεί να υπάρξει αιμορραγία από το πεπτικό. Η λοίμωξη από *C. difficile* συχνά προκαλεί λευκοκυττάρωση κατά τον εργαστηριακό έλεγχο και μάλιστα μπορεί να είναι σημαντική. Υπάρχει μελέτη που αναφέρει το *C. difficile* ως σημαντικό και συχνό αίτιο λευκοκυττάρωσης αγνώστου προέλευσης σε νοσοκομειακούς ασθενείς (79). Άλλα εργαστηριακά ευρήματα είναι η υπολευκωματιναιμία και η παρουσία λευκοκυττάρων στα κόπρανα ενώ ενδοσκοπικά συνήθως υπάρχει διάχυτη ή κατά τόπους φλεγμονή. Η ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα είναι σημαντική επιπλοκή της CDI και χαρακτηρίζεται από παρουσία λευκοκίτρινων πλακών μεγέθους 2-10mm σε οποιοδήποτε σημείο του παχέως εντέρου. Ιστολογικά οι ψευδομεμβράνες αποτελούνται από ουδετερόφιλα, ινώδες, βλεννίνη και κυτταρικά υπολείμματα (51, 80). Η ανεύρεση ψευδομεμβρανών είναι εύρημα σχεδόν παθογνωμονικό της κολίτιδας από *C. difficile* ενώ αρνητικά ενδοσκοπικά ευρήματα δεν αποκλείουν την διάγνωση μιας και σε υψηλό ποσοστό οι αλλοιώσεις βρίσκονται στο ανώτερο τμήμα του παχέως εντέρου και δεν αποκαλύπτονται από την ενδοσκόπηση. Σπάνια η λοίμωξη από κλωστηρίδιο μπορεί να οδηγήσει σε τοξικό megacolon με διαστολή του παχέως εντέρου και παράλυση της περισταλτικής κίνησης με μοναδική θεραπευτική επιλογή τη χειρουργική αντιμετώπιση και υψηλό ποσοστό θνητότητας, 24-38% (51). Σε περιπτώσεις τοξικού megacolon η διάρροια μπορεί να απουσιάζει λόγω παραλυτικού είλεου και απώλειας μυϊκού τόνου του

εντέρου. Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από παράγοντες του ξενιστή (ηλικία, ανοσοκαταστολή, κα) αλλά και του παθογόνου μικροοργανισμού (παθογονικότητα στελέχους, ποσότητα ενοφθαλμίσματος, κα). Ενώ στις επιπλοκές συγκαταλέγονται οι υποτροπές της νόσου, η αφυδάτωση, οι ηλεκτρολυτικές διαταραχές, η υποαλβουμιναιμία, η διάτρηση του εντέρου και η περιτονίτιδα.

Υποτροπή της νόσου με επανεμφάνιση της διάρροιας συμβαίνει σε ένα ποσοστό 5-40% ασθενών που έλαβαν θεραπεία για λοίμωξη από *C. difficile*. Ανεξάρτητοι παράγοντες θεωρήθηκαν η αυξημένη ηλικία (>65 ετών), σοβαρά υποκείμενα νοσήματα και επιπρόσθετη έκθεση σε αντιμικροβιακά μετά τη θεραπεία. Επίσης, η χαμηλή ανοσολογική απάντηση με μικρή συγκέντρωση αντισωμάτων έναντι της τοξίνης Α κατά το αρχικό επεισόδιο διάρροιας φαίνεται να σχετίζεται και αυτή με υψηλά ποσοστά επανεμφάνισης. Μεγάλο ποσοστό επανεμφάνισης (έως 50%) φαίνεται να οφείλεται σε επαναλοίμωξη και όχι σε υποτροπή, γεγονός που υποδεικνύει ότι η έκθεση σε *C. difficile* είναι πολύ συχνή ενώ ασθενείς και περιβάλλον αποτελούν μεγάλη πηγή του μικροοργανισμού. Στις περιπτώσεις πραγματικής υποτροπής, η επανεμφάνιση των συμπτωμάτων πιθανόν να οφείλεται σε αντοχή των σπόρων του μικροοργανισμού στην χορηγούμενη αντιμικροβιακή θεραπεία και βλάβη τους μετά τη διακοπή της (51).

2.8. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της λοίμωξης από *C. difficile* θα πρέπει να αναζητείται σε όλους τους ασθενείς με νοσοκομειακή διάρροια ιδιαίτερα αν συνοδεύεται από πυρετό και θα πρέπει να βασίζεται σε συνδυασμό κλινικών χαρακτηριστικών (κοιλιακό άλγος και διάρροια) και απεικονιστικών και εργαστηριακών εξετάσεων.

Ο απεικονιστικός έλεγχος περιλαμβάνει ακτινογραφία και αξονική τομογραφία (CT) κοιλίας. Στην CT μπορεί να ανευρεθούν πάχυνση του εντερικού τοιχώματος (accordion like pattern), πάχυνση κολικών κυψελών και εικόνα οιδήματος βλεννογόνου (thump-printing) καθώς και ασαφopoίηση του περικολικού λίπους. Στην ακτινογραφία κοιλίας η διάταση του παχέως εντέρου ανευρίσκεται σε βαριά επιπλεγμένη νόσο και τοξικό megacolon (81). Τα απεικονιστικά ευρήματα δεν είναι ειδικά.

Η ενδοσκόπηση συνήθως δεν χρησιμοποιείται στην αρχική διάγνωση εκτός αν υπάρχει υψηλή υποψία με φυσιολογικές εξετάσεις κοπράνων, υποψία για άτυπες εκδηλώσεις ειλεού λόγω λοίμωξης από *C. difficile* ή μη ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ανεύρεση ψευδομεμβρανών είναι ειδικό αλλά όχι ευαίσθητο εύρημα για τη διάγνωση ενώ η ύπαρξη τους υποδηλώνει βαριά λοίμωξη. Σε ένα 10-20% δεν ανευρίσκονται ψευδομεμβράνες και τότε χρήσιμη είναι η βιοψία.

Σε ήπια νόσο τα ευρήματα της βιοψίας θα είναι μη ειδικά και πιθανόν να είναι ακόμη και φυσιολογικά. Σε αρκετές περιπτώσεις συνήθως υπάρχουν αλλοιώσεις συμβατές με οξεία φλεγμονή και διήθηση πολυμορφοπύρηνων. Αντίθετα σε σοβαρές περιπτώσεις υπάρχει εστιακή εξέλκωση του βλεννογόνου που σχετίζεται με την έξοδο (έκρηξη) φλεγμονωδών κυττάρων και νεκρωτικού υλικού (εικόνα ηφαιστείου). Οι τεχνικές απεικόνισης έχουν σε μεγάλο βαθμό αντικατασταθεί από εργαστηριακές εξετάσεις με μεγαλύτερη ευαισθησία καθώς μέσω της απεικόνισης μπορεί να ανιχνευθεί η κολίτιδα αλλά όχι η αιτία της.

Μια σειρά στρατηγικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση μιας πιθανής κλινικής διάγνωσης CDI, όπως :

- Τοξινογόνος κυτταροκαλλιέργεια για ανίχνευση κυτταροτοξίνης B
- Τοξινογόνος καλλιέργεια
- Ανοσοενζυμικές μέθοδοι για ανίχνευση τοξινών A ή και B και της γλουταμινικής δεϋδρογενάσης (GHD)
- Αναερόβια καλλιέργεια κοπράνων
- Μοριακές μέθοδοι με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Χρυσός κανόνας για την διάγνωση είναι ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας της τοξίνης B σε κυτταροκαλλιέργεια (CCA) με άμεσο ενοφθαλμισμό του δείγματος χωρίς να έχει προηγηθεί απομόνωση του βάκιλου. Η προσθήκη ειδικού αντιορού αυξάνει την ειδικότητα της εξέτασης. Ανιχνεύει τουλάχιστον 10pg και έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Απαιτεί όμως ειδικό εξοπλισμό, ο χρόνος εκτέλεσης είναι περίπου τρεις ημέρες ενώ στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι και η αστάθεια της τοξίνης B καθώς και τα μη ειδικά κυτταροπαθητικά ευρήματα που είναι αδύνατο να ερμηνευθούν.

Η τοξινογόνος καλλιέργεια (toxigenic culture) γίνεται σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά συνήθως με επεξεργασία των κοπράνων με αιθυλική αλκοόλη. Μετά από επώαση 72 ωρών είναι δυνατή μια προκαταρκτική ταυτοποίηση που βασίζεται στην μορφή των αποικιών, στη χρώση Gram, στην οσμή κρεσόλης του καλλιεργήματος αλλά και στον χαρακτηριστικό φθορισμό των αποικιών σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Η τελική ταυτοποίηση απαιτεί έλεγχο βιοχημικών ιδιοτήτων και έλεγχο παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων ενώ μπορεί να γίνει με ταυτοποιητικά συστήματα του εμπορίου.

Στις βιοχημικές ιδιότητες χαρακτηριστικό των στελεχών *C. difficile* είναι η διάσπαση της γλυκόζης και σε >90% της μανιτόλης με παραγωγή άφθονου αερίου. Κανένα *C. difficile* δεν παράγει ινδόλη ενώ πολλά στελέχη παράγουν H₂S διασπώντας την εσκουλίνη. Δεν διασπά τα λίπη και την λεκιθίνη ενώ από το μεταβολισμό του παράγεται μίγμα διαφόρων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου, η σύσταση του οποίου είναι μοναδική σε επίπεδο είδους και επομένως διαγνωστική εφόσον αναλυθεί με αέρια-υγρή χρωματογραφία (15).

Η ανεύρεση των τοξινών γίνεται με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) και υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης της A ή A και B τοξινών. Απαιτούνται 100-1000pg τοξίνης για την θετικοποίηση του τεστ οπότε ανιχνεύονται αρκετά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Στα πλεονεκτήματα του τεστ είναι το χαμηλό κόστος και η εκτέλεση του εντός λίγων ωρών ενώ περιορισμοί της μεθόδου είναι η αστάθεια των τοξινών, η εξουδετέρωση τους εντός του γαστρεντερικού σωλήνα και η αστάθεια κυρίως της τοξίνης B.

Η ανίχνευση του μικροοργανισμού μπορεί να γίνει είτε με την ανεύρεση της κοινής πρωτεΐνης γλουταμινικής δεϋδρογενάσης (GDH) με δοκιμασία ανοσοσυγκόλλησης (EIA) είτε με αναερόβια καλλιέργεια των κοπράνων. Στην πρώτη περίπτωση η GDH είναι πρωτεΐνη που υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα σε όλα τα *C. difficile* οπότε δεν υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού τοξινογόνων από μη στελεχών. Παρόλα αυτά αποτελεί άριστο πρώτο βήμα σε διαγνωστικούς αλγορίθμους CDI και ακολουθείτε από έλεγχο των θετικών δειγμάτων με πιο ειδικές τεχνικές. Απαιτεί μη ειδική εκπαίδευση για την εκτέλεση της, έχει χαμηλό κόστος και ολοκληρώνεται εντός μίας ώρας. Έχει βέβαια μεγάλη διακύμανση ευαισθησίας (60-98%) η οποία εξαρτάται από την ποιότητα διαχείρισης του δείγματος και από τα στελέχη του μικροοργανισμού. Στην περίπτωση της αναερόβιας καλλιέργειας κοπράνων υπάρχει υψηλή ευαισθησία αλλά και εδώ δεν διακρίνονται τα τοξινογόνα στελέχη. Πρέπει παράλληλα να γίνει έλεγχος παρουσίας τοξινών για αύξηση της ειδικότητας της μεθόδου. Είναι απαραίτητη σε επιδημιολογικές μελέτες όπου μετά την καλλιέργεια θα γίνει τυποποίηση του μικροοργανισμού.

Το νωπό παρασκεύασμα και η χρώση Gram δεν βοηθούν ιδιαίτερα στην αναζήτηση του *C. difficile*. Ο μικροοργανισμός παρά το ότι προκαλεί φλεγμονώδη διάρροια, και θα έπρεπε να ανευρίσκεσκονται πυοσφαίρια στα κόπρανα, συχνά απουσιάζουν κατά την μικροσκοπική εξέταση. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή τοξίνης B που είναι κυτταροτοξική και καταστρέφει τα κύτταρα. Έτσι η μικροσκοπική εξέταση ενώ είναι απαραίτητη και χρήσιμη δεν είναι παθογνωμονική.

Η μέθοδος με την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα είναι η μοριακή ανίχνευση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπου βασίζεται στην ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων των τοξινών. Η μέθοδος όμως απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και εκπαίδευση, έχει μεγάλο κόστος και είναι χρονοβόρα. Σπάνια μπορεί να έχουμε ψευδώς θετικά αποτελέσματα όταν ανιχνεύονται γονίδια που δεν εκφράζονται σε περιπτώσεις αποικισμού από τοξινογόνο στέλεχος που όμως δεν είναι υπεύθυνο για το διαρροϊκό σύνδρομο. Με PCR ανιχνεύθηκε τοξινογόνο στέλεχος *C. difficile* στο 1-2% υγιούς πληθυσμού, στο 10-15% εισαχθέντων σε νοσοκομείο χωρίς κλινική εικόνα CDI και 15-30% ασθενών με παρατεταμένη νοσηλεία.

Καθεμία από τις παραπάνω μεθόδους χρησιμοποιείται για έλεγχο διαφορετικών χαρακτηριστικών, επομένως δεν υπόκεινται σε άμεση σύγκριση (Πίνακας 4). Ο συνδιασμός τους

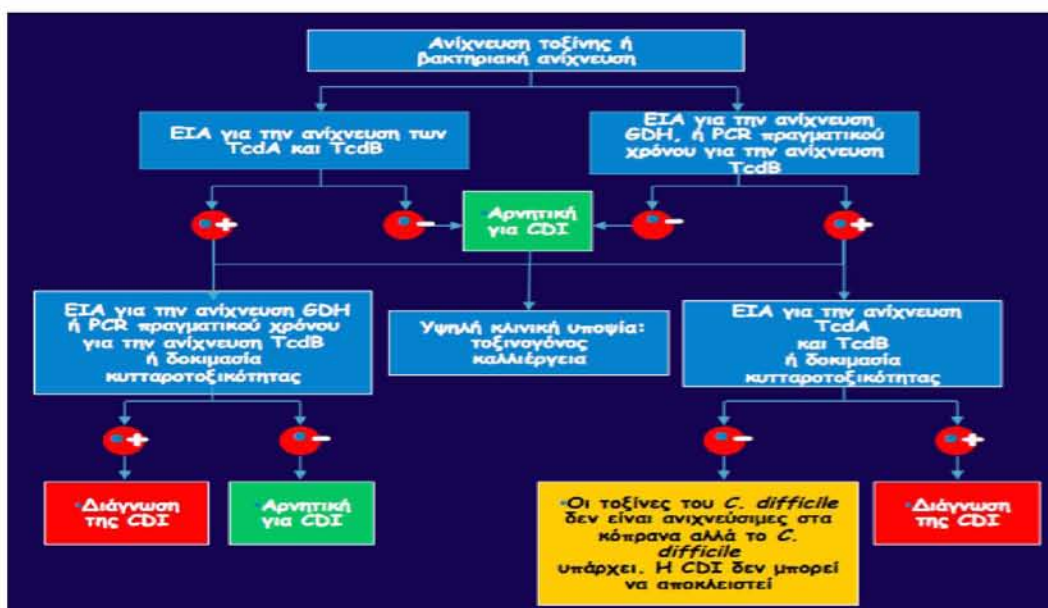
όμως αυξάνει την ταχύτητα και την ακρίβεια της διάγνωσης. Η στρατηγική ανίχνευσης της CDI διαφέρει ανάλογα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των εταιρειών (IDSA, ESCMID). Ένας γενικά αποδεκτός αλγόριθμος σε μικροβιολογικό εργαστήριο ρουτίνας στηρίζεται στην καλλιέργεια και την ανίχνευση τοξινών σε κάθε ύποπτο δείγμα. Όταν οι δυο δοκιμασίες είναι αρνητικές (όπως συμβαίνει στο 87% των περιπτώσεων) η διάγνωση της CDI σχεδόν αποκλείεται. Αν και οι δύο δοκιμασίες είναι θετικές η λοίμωξη τεκμηριώνεται και απαιτούνται θεραπεία και λήψη μέτρων ελέγχου της διασποράς του παθογόνου μικροοργανισμού. Όταν δεν ανιχνεύεται τοξίνη αλλά η καλλιέργεια είναι θετική γίνεται απευθείας αναζήτηση παραγωγής της τοξίνης σε αποικίες ώστε να διευκρινιστεί αν το στέλεχος είναι τοξινοπαραγωγό (82). Η ESCMID (European Society of Clinical Microbiology) ως λύση στην χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης των τοξινών, ιδιαίτερα σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό της νόσου, πρότεινε τον αλγόριθμο της εικόνας 24.

Πίνακας 4 : Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των εργαστηριακών εξετάσεων για τη CDI. (Οι πηγές αναφέρονται στο κάτω μέρος του πίνακα)

| Διαγνωστική εξέταση | Χρόνος ολοκλήρωσης | Ευαισθησία | Πλεονεκτήματα | Μειονεκτήματα |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------|---|---|
| Ενδοσκόπηση | 2 ώρες | 51% ¹ | • Διαγνωστική της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας ² | • Χαμηλή ευαισθησία: ¹ ενδέχεται να χρειαστεί εργαστηριακή διερεύνηση ² |
| Αναερόβια καλλιέργεια | 48 ώρες ^{3,4} | 93-100% ^{3,4} | • Άμεση ανίχνευση ⁵ • Υψηλή ευαισθησία ^{3,5} | • Αργή ⁵ • Δεν διακρίνει τοξινογόνα στελέχη ⁵ |
| CCA | ≥24 ώρες ^{6,7} | 97-100% ⁷ | • Χρυσό πρότυπο ⁸ • Ανιχνεύει τα στελέχη A και B ⁷ • Υψηλή ειδικότητα (99%) ⁷ | • Μεγάλος χρόνος ολοκλήρωσης ^{3,6} • Κοπιαστική διαδικασία ⁹ |
| Εξέταση EIA-GDH (κοινό αντιγόνο) | 7 ώρες ^{*10} | 80-97% ¹⁸ | • Εύκολη στη χρήση ⁹ • Ανιχνεύει ένα συγκεκριμένο ένζυμο του <i>C. difficile</i> ⁶ • Υψηλή ειδικότητα (89-100%) ^{16,8} | • Δεν διακρίνει τοξινογόνα στελέχη ⁵ |
| EIA-τοξίνη A | 2-6 ώρες ^{3,10} | 49-93% ¹⁸ | • Εύκολη στη χρήση ⁹ • Υψηλή ειδικότητα (83-100%) ¹⁸ | • Υποβέλτιστη ευαισθησία όταν χρησιμοποιείται μόνη της ⁸ |
| EIA-τοξίνες A και B | 2-6 ώρες ^{3,10} | 75-99% ¹⁸ | • Εύκολη στη χρήση ⁹ • Ανιχνεύει τα στελέχη A και B ⁸ • Υψηλή ειδικότητα (94-100%) ¹⁸ | • Υποβέλτιστη ευαισθησία όταν χρησιμοποιείται μόνη της ⁸ |
| PCR πραγματικού χρόνου | <1 ώρα ¹¹ | 87-100% ¹⁸ | • Γρήγορη ¹⁰ • Υψηλή ειδικότητα (94-100%) ¹⁸ | • Ανιχνεύει τα γονίδια τοξίνης, αλλά όχι και την παραγωγή τοξίνης ¹¹ • Υψηλότερο κόστος ¹¹ |

1. Bartlett & Gerding. Clin Infect Dis 2008, 46:812-8,
2. Bauer και Συν. Clin Microbiol Infect 2008,16:1067-70,
3. Shanthikumar και Συν. J Clin Microbiol 1992, 30:1837-40,
4. De Giori και Συν. J Clin Microbiol 1992, 30:1088-9,
5. Barbut και Συν. J Clin Microbiol 1993, 31:963-7,
6. Shetty και Συν. J Hosp Infect 2011, 77:1-6,
7. Doern και Συν. J Clin Microbiol 1992, 30:2042-6,
8. Crobach και Συν. Clin Microbiol Infect 2008, 16:1053-66,
9. Kelly & LeMont. Annu Rev Med 1998, 48:375-90,
10. Goldenberg και Συν. J Infect 2011, 62:363-70,
11. Goldenberg και Συν. J Hosp Infect 2010, 74:48-54.

CCA: κυτταροτοξική δοκιμασία κυτταρικής καλλιέργειας,
GDH: γλουταμική δευδρογονάση,
EIA: ανοσοενζυμική δοκιμασία,
PCR: αλυσωτική αντίδραση πολυμεράσης.



Όπως ήδη έχει αναφερθεί, υπάρχουν άτομα που είναι υγιείς φορείς του *C. difficile* στα κόπρανα τους χωρίς να εμφανίζουν συμπτώματα. Είναι λοιπόν σημαντικό να υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια συλλογής και ελέγχου των δειγμάτων ώστε να υπάρχει η μέγιστη ειδικότητα των αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται λοιπόν η ανίχνευση του μικροοργανισμού σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, εκτός αν πρόκειται για επιδημία, ούτε για την παρακολούθηση μετά από λοίμωξη με *C. difficile* για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας της θεραπείας (test of cure). Επιπλέον δεν γίνεται έλεγχος σε νεογνά και παιδιά <1 έτους, τα οποία έχουν υψηλό ποσοστό φορείας, εκτός αν υπάρχουν ενδείξεις λοίμωξης. Για νοσηλευόμενους ασθενείς, διάρροια που εμφανίζεται μετά την 3^η μέρα νοσηλείας σπάνια οφείλεται σε κοινά παθογόνα ή παράσιτα ενώ θα πρέπει να γίνεται απαραίτητα αναζήτηση του *C. difficile* (83). Ο έλεγχος γίνεται μόνο σε ασχημάτιστα υδαρή κόπρανα, 2-10 gr ή 5ml, ενώ η συλλογή του δείγματος πρέπει να γίνεται σε υδατοστεγές δοχείο και η μεταφορά στο εργαστήριο άμεση. Επειδή αφενώς η τοξίνες είναι θερμοευαίσθητες και αφετέρου έχει παρατηρηθεί πρωτεολυτική αδρανοποίηση των κλωστηριδιακών τοξινών από ένζυμα που παράγονται από βακτήρια της χλωρίδας του εντέρου όταν το δείγμα παραμένει για ώρες σε θερμοκρασία δωματίου θα πρέπει, αν δεν επεξεργαστεί εντός 2 ωρών από τη λήψη του, να διατηρηθεί σε ψύξη για 2 ημέρες ή σε κατάψυξη για μεγαλύτερο διάστημα (84). Η επεξεργασία ενός και μόνο κατάλληλου δείγματος αρκεί συνήθως για τη διάγνωση.

2.9. ΠΡΟΛΗΨΗ

Το *C. difficile* είναι παθογόνος μικροοργανισμός σημαντικής νοσηρότητας και πρέπει να βρίσκεται υπό συνεχή επιτήρηση. Πρώτο μέλημα είναι η έγκαιρη και σωστή διάγνωση της CDI/CDAD και στη συνέχεια άμεσα να λαμβάνονται ειδικά μέτρα και προφυλάξεις.

Σχολαστική τήρηση κανόνων υγιεινής με πρώτο και βασικό μέτρο το σωστό πλύσιμο των χεριών, ιδιαίτερα του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού, με ζεστό νερό και σαπούνι ώστε να απομακρύνονται μηχανικά τα σπόρια που δεν καταστρέφονται με αλκοόλη και κοινά αντισηπτικά. Η απομόνωση των ασθενών με διαγνωσμένη λοίμωξη από *C. difficile* και η χρήση ξεχωριστής τουαλέτας κρίνεται απαραίτητη. Στα μέτρα ελέγχου επαφής συγκαταλέγονται απαραίτητα η χρήση γαντιών και ρόμπας μίας χρήσης κατά τους συνήθεις ιατρονοσηλευτικούς χειρισμούς και η άμεση απόρριψη τους στα μολυσματικά απόβλητα, η ελάττωση χρήσης ορθικών θερμομέτρων, η σωστή απολύμανση όχι μόνο του χώρου αλλά και του εξοπλισμού με τον οποίο ήρθε σε επαφή ο ασθενής με υποχλωριώδες οξύ και αλδεϋδες. Συνίσταται όλες οι προφυλάξεις να γίνονται έως και 48 ώρες μετά την αποδρομή του διαρροϊκού συνδρόμου. Το βασικότερο μέτρο όμως είναι ο περιορισμός της χρήσης αντιμικροβιακών παραγόντων και ειδικότερα όσων θεωρούνται ότι ευνοούν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη CDI, όπως οι κεφαλοσπορίνες και η κλινδαμυκίνη (85).

Το *C. difficile* αποτελεί πλέον κοινό εντερικό νοσοκομειακό, αλλά και μη, παθογόνο και είναι βασικό αίτιο ενδοноσοκομειακής λοίμωξης και διάρροιας μετά τη λήψη αντιμικροβιακών. Τα νέα υπερλοιμογόνα στελέχη αποτελούν παγκόσμια απειλή οπότε η τήρηση των κατευθυντήριων οδηγιών από τις επιστημονικές εταιρείες για την πρόληψη και διασπορά του μικροοργανισμού καθώς και ένα αυστηρό και αποτελεσματικό σύστημα επιτήρησης κρίνονται απαραίτητα ώστε η άμεση ανίχνευση του να οδηγεί σε ταχεία λήψη προληπτικών και θεραπευτικών μέτρων.

2.10. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Σε ασθενείς με διαρροϊκό σύνδρομο και πρόσφατη λήψη αντιμικροβιακής αγωγής ή νοσηλεία, και ιδιαίτερα σε ασθενείς με νοσοκομειακή διάρροια, που επιπλέον εμφανίζουν πυρετό, λευκοκυττάρωση και ενδοσκοπικά ευρήματα δεν θα πρέπει να χορηγείται εμπειρική θεραπεία πριν τον έλεγχο για ύπαρξη τοξινών *C. difficile*. Επιπλέον, δεν συνίσταται θεραπευτική αγωγή για υγιείς αποικισμένους ενήλικες ακόμα και αν αφορά τοξινογόνα στελέχη.

Σημαντικό στη θεραπεία είναι η εξάλειψη των προδιαθεσικών παραγόντων της νόσου με βασικότερο τη διακοπή της ενοχοποιούμενης αντιμικροβιακής αγωγής ή την αντικατάσταση της

από άλλη λιγότερο επιβλαβή με αντιμικροβιακό φάσμα όχι ευρύτερο από το πραγματικά αναγκαίο. Στις περιπτώσεις ήπιας νόσου το μέτρο αυτό είναι συχνά επαρκές για την ύφεση και εξάλειψη των συμπτωμάτων. Ταυτόχρονα αποφεύγεται η χρήση φαρμάκων αντιχολινεργικών/αντιπερισταλτικών που μπορεί να επιδεινώσουν τη διάρροια ή να οδηγήσουν σε τοξικό megacolon (86).

Σε σοβαρότερη λοίμωξη συνίσταται η χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας. Αρχικά υπήρχαν δυο θεραπευτικές επιλογές η μετρονιδαζόλη με δυνατότητα χορήγησης είτε από το στόμα είτε ενδοφλέβια, και η βανκομυκίνη, με από του στόματος ή διορθική χορήγηση. Για τα θεραπευτικά σχήματα, δοσολογία και χρόνο θεραπείας, υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες από τις επιστημονικές εταιρείες (πίνακας 5). Συνήθως η έγκαιρη από του στόματος χορήγηση μετρονιδαζόλης ή βανκομυκίνης είναι αποτελεσματική στο μεγαλύτερο ποσοστό, 90-97%, των ασθενών με CDAD (87) και η διάρκεια της θεραπείας είναι 10-14 ημέρες. Πάντοτε γίνεται επιμελής αποκατάσταση του ισοζυγίου ύδατος και ηλεκτρολυτών ιδιαίτερα σε σοβαρή νόσο και σε μικρές ηλικίες όπου ο κίνδυνος αφυδάτωσης από τις διάρροιες είναι σημαντικός.

Η βανκομυκίνη δεν συνίσταται να χορηγείται ενδοφλέβια γιατί μέσω αυτής της οδού χορήγησης δεν επιτυγχάνεται υψηλή συγκέντρωση στον εντερικό αυλό. Επιπλέον, λόγω του υψηλού κόστους του φαρμάκου αλλά και του αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη εντεροκόκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη (VRE) προτιμάται αρχικά η χορήγηση μετρονιδαζόλης ενώ σε δυσανεξία, αντενδείξεις ή μη ανταπόκριση στη θεραπεία ως δεύτερη επιλογή χορηγείτε η βανκομυκίνη. Η επιτυχία της θεραπείας σηματοδοτείται από την πτώση του πυρετού από το πρώτο εικοσιτετράωρο και από ελάττωση των διαρροϊκών κενώσεων από την 4^η – 5^η μέρα (88).

Το μεγαλύτερο, και ίσως το λιγότερο αναγνωρισμένο, πρόβλημα είναι οι υποτροπές της νόσου. Εμφανίζονται στο 20-30% των ασθενών με CDAD και συνήθως 1-3 εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας (89). Υποτροπή θεωρείται η επανεμφάνιση της νόσου από το ίδιο στέλεχος λόγω αντοχής και παραμονής των σπόρων στο γαστρεντερικό σωλήνα. Μερικές υποτροπές, σπάνια, μπορεί να οφείλονται στην επαναπόκτηση του ίδιου στελέχους του *C. difficile* από το περιβάλλον ενώ επαναλοίμωξη είναι η επανεμφάνιση νόσου αλλά από νέο διαφορετικό στέλεχος. Σημαντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες υποτροπών είναι η συνεχιζόμενη χρήση ΑΒ, η χρήση αντιόξινων και η μεγάλη ηλικία (>65 ετών) (90). Η χορήγηση μετρονιδαζόλης για 10 επιπλέον μέρες αποτελεί την αρχική θεραπευτική αντιμετώπιση των υποτροπών. Τόσο όμως η μετρονιδαζόλη όσο και η βανκομυκίνη παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά υποτροπών, έως 28%. Έτσι προέκυψε η ανάγκη για ένα νέο φάρμακο και αυτό ήταν η fidaxomicin. Το αντιβιοτικό αυτό είναι βακτηριοκτόνο για το *C. difficile* αναστέλλοντας την RNA πολυμεράση και την πρωτεϊνική σύνθεση (91).

| ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ | ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ | ΣΥΝΙΣΤΟΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ |
|---|---|---|
| Αρχικό επεισόδιο, ήπιας ή μετριας σοβαρότητας | -WBC \leq 15000 κυτ/μL -CREAT < 1.5*above baseline | Metronidazole per os, 500mg *3 (10-14 ημέρες) |
| Σοβαρό αρχικό επεισόδιο | -WBC > 15000 κυτ/μL -CREAT > 1,5*above baseline | Vancomycin per os, 125mg*4 (10-14 ημέρες) |
| Σοβαρό και επιπλεγμένο αρχικό επεισόδιο | Υπόταση ή σοκ, ειλός, τοξικό megacolon | Vancomycin per os or nasogastric tube, 500mg*4 & Metronidazole iv, 500mg*3 |
| Πρώτο επεισόδιο υποτροπής | - | Όπως σε αρχικό επεισόδιο |
| Δεύτερο επεισόδιο υποτροπής | - | Vancomycin |

Εναλλακτικές θεραπείες είναι η χορήγηση τεϊκοπλανίνης, βακτριακίνης και φουσιδικού οξέως με μικρά ποσοστά επιτυχίας και αντίθετα συχνές υποτροπές. Η ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρινών καθώς και η μεταμόσχευση κοπράνων είναι νεότερες θεραπευτικές επιλογές πολλά υποσχόμενες. Ο ρόλος του μικροβιώματος στην άμυνα εναντίον της λοίμωξης από *C. difficile* θα πρέπει να μελετηθεί προσεκτικά γιατί φαίνεται να οδηγεί σε νέες θεραπευτικές επιλογές για την προστασία και τη θεραπεία της CDI. Χειρουργική αντιμετώπιση συνίσταται όταν υπάρχει επιπλεγμένη νόσος με υποψία διάτρησης, σοβαρή διαταραχή διαπερατότητας εντερικού αυλού με εικόνα ειλούς και τοξικό megacolon (92).

2.11. ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η ανακάλυψη των αντιμικροβιακών φαρμάκων οδήγησε σε μεγάλη πρόοδο στη θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων. Δυστυχώς όμως η αλόγιστη χορήγηση τους και η περιορισμένη γνώση των αναδυόμενων μηχανισμών αντοχής των μικροοργανισμών στα φάρμακα αυτά οδήγησαν γρήγορα σε εμφάνιση υψηλού ποσοστού μικροβιακής αντοχής στα κλινικώς σημαντικά είδη. Το ίδιο συνέβει και με το *C. difficile*. Η αντιμικροβιακή θεραπεία παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη λοίμωξης από CDI διαταράσσοντας την φυσιολογική εντερική χλωρίδα και τη δημιουργία συνθηκών που ευνοούν την απόκτηση και τον πολλαπλασιασμό στελεχών κλωστηριδίου στο γαστρεντερικό σωλήνα ασθενών. Απο νωρίς στη μελέτη του μικροοργανισμού το 1962, οι Smith & King ανέφεραν αντοχή σε κολιστίνη, στρεπτογραμμίνη, και άλλα αντιμικροβιακά (93) ενώ μια δεκατία αργότερα περιγράφηκε αντοχή σε κυκλοσερίνη, κεφοξιδίνη και p-cresol, αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται πλέον σαν βασικό συστατικό

των εκλεκτικών θρεπτικών υλικών απομόνωσης του *C. difficile* από κλινικά δείγματα (11,42). Τα αποδεικτικά στοιχεία που εμπλέκουν τα αντιμικροβιακά στην παθογένεση της λοίμωξης από *C. difficile* είναι συντριπτικά, αν και ορισμένα όπως οι πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και κλινδαμυκίνη συνδέονται πιο έντονα από άλλα με αυξημένο ποσοστό κινδύνου για CDI και ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα (94, 95). Ιστορικά, την δεκαετία του 1970 η κλινδαμυκίνη είχε το μεγαλύτερο κίνδυνο για CDI ενώ αρκετές επιδημίες περιγράφηκαν την περίοδο εκείνη. Η ορθή πολιτική διαχείρισης των αντιμικροβιακών οδήγησε σε μείωση της συχνότητας των περιστατικών διάρροιας μετά τη χορήγηση του φαρμάκου ενώ ταυτόχρονα η αύξηση της χορήγησης κεφαλοσπορινών τις ανέδειξε ως μείζων αίτιο CDI τις επόμενες δεκαετίες. Η ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση επιδημιών και εμφάνισης νέων επιδημικών στελεχών *C. difficile*. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η εμφάνιση και η εξάπλωση του στελέχους RT027 στην Ευρώπη το οποίο έχει συσχετιστεί με την μαζική χρήση φθοριοκινολονών και την απόκτηση αντοχής εναντίον τους.

Οι συχνότητες αντοχής ποικίλουν σημαντικά στις διάφορες μελέτες και αυτό πιθανόν να εξαρτάται από την περιοχή και την τοπική ή εθνική πολιτική χρήσης αντιμικροβιακών (antibiotic policy). Από 30 μελέτες μεταξύ 2012 – 2015 τα ποσοστά αντοχής σε κλινδαμυκίνη και κεφαλοσπορίνες φτάνουν το 55% και 51% αντίστοιχα. Ενώ για την ερυθρομυκίνη και τις φθοριοκινολόνες είναι περίπου 47%. Η αντοχή για τις κεφαλοσπορίνες 2^{ης} γενιάς είναι 79% σε αντίθεση με τις 3^{ης} γενιάς όπου το ποσοστό αντοχής των στελεχών είναι 38%. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η αντοχή στις φθοριοκινολόνες 2^{ης} γενιάς (σιπροφλοξασίνη) όπου το ποσοστό αγγίζει το 99% ενώ για τη μοξιφλοξασίνη (4^{ης} γενιάς κινολόνη) είναι 34% (96). Παρά το γεγονός ότι η αντοχή στα αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία των λοιμώξεων από *C. difficile* δεν είναι ακόμη πρόβλημα, τα βακτήρια εξαπλώνονται γρήγορα λόγω της ανθεκτικότητας τους έναντι πολλών άλλων αντιμικροβιακών που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία άλλων λοιμώξεων. Η μετρονιδαζόλη και η βανκομυκίνη, αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της CDI, καθώς και η ριφαμπικίνη βρέθηκαν δραστικά *in vitro* όμως η ευαισθησία αυτή δεν σημαίνει απαραίτητα και θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η μετρονιδαζόλη έχει συσχετιστεί με φτωχά θεραπευτικά αποτελέσματα και με αυξημένο ποσοστό υποτροπών (98).

Η αυξημένη συχνότητα χορήγησης ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών οδήγησε στην παρουσία στελεχών *C. difficile* με αντοχή σε πληθώρα παραγόντων (multidrug –resistant strains, MDR) η οποία μπορεί να περιπλέξει την πρόληψη και την πιθανή θεραπεία του μικροοργανισμού. Μελέτες παρουσιάζουν ποσοστά πολυανθεκτικών στελεχών *C. difficile* να κυμαίνονται από 13-100% ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και το νοσοκομείο. Επιπλέον, νέα χαρακτηριστικά αντοχής του μικροοργανισμού έχουν εμφανιστεί, όπως μείωση της

ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά που χορηγούνται ως θεραπεία εκλογής σε CDI και ταχεία διάδοση ανθεκτικών στελεχών. Το *C. difficile* έχει υψηλή ικανότητα προσαρμογής στο περιβάλλον μέσω μεταβολικών και γενομικών αλλαγών. Μοριακές έρευνες αποκάλυψαν ένα ευέλικτο γονιδίωμα με μεγάλο φάσμα και αριθμό MGEs που κωδικοποιούν προβλεπόμενες αντοχές στα αντιβιοτικά. Εκτός όμως από την οριζόντια μεταφορά γονιδίων υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που συμβάλουν στην αντοχή του *C. difficile* η οποία φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Τέτοιοι μηχανισμοί φαίνεται να είναι η αλλαγή του στόχου δράσης των αντιβιοτικών, η αλλαγή έκφρασης πρωτεϊνών οξειδοαναγωγής, μεταβολισμού του σιδήρου και επισκευής του DNA, κα (98, 99).

2.11.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Ο έλεγχος ευαισθησίας γίνεται είτε με φαινοτυπικές είτε με μοριακές μεθόδους. Η βάση για τις φαινοτυπικές μεθόδους είναι η ανεύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), η οποία είναι η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αναστέλει ορατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ευαισθησίας των μικροοργανισμών: ευαίσθητοι (susceptible) όταν σχετίζονται με θεραπευτική επιτυχία, μέτρια ευαίσθητοι (intermediate) με αβέβαιο θεραπευτικό αποτέλεσμα και ανθεκτικοί (resistant) όταν είναι σίγουρη η θεραπευτική αποτυχία. Επιπλέον υπάρχουν δύο κρίσιμες συγκεντρώσεις, μια χαμηλή κάτω από την οποία τα στελέχη θεωρούνται ευαίσθητα και μια υψηλή πάνω από την οποία τα στελέχη θεωρούνται ανθεκτικά (εικόνα 25). Οι τιμές αυτές (breakpoints) καθορίζονται από εθνικές επιτροπές και ρυθμιστικές αρχές όπως η CLSI (USA) και η EUCAST (Ευρώπη). Οι τιμές breakpoints μεταξύ των δυο εταιρειών δεν είναι πάντα ταυτόσημες.

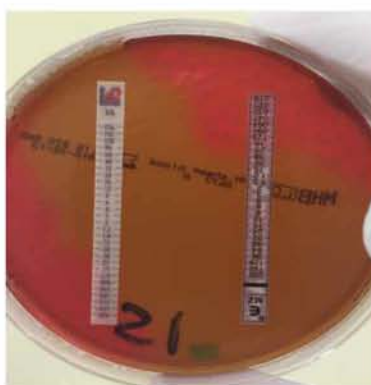
Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση ορίων ευαισθησίας, όπου c η μέγιστη MIC κάτω από την οποία ένα στέλεχος είναι ευαίσθητο για ένα αντιβιοτικό και C η ελάχιστη MIC πάνω από την οποία ένα στέλεχος θεωρείται ανθεκτικό στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

| c : χαμηλή | | C : υψηλή |
|--------------|------------------|-------------|
| S | I | R |
| $MIC \leq c$ | $c < MIC \leq C$ | $MIC > C$ |

Η εκτίμηση της MIC γίνεται με τη μέθοδο αραιώσεων των αντιβιοτικών ή με E-test. Στην πρώτη περίπτωση, όπου είναι προτυποποιημένη και είναι η συνιστώμενη μέθοδος αναφοράς από το CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) οι αραιώσεις γίνονται είτε σε ζωμό (broth dilution method) είτε σε άγαρ (agar dilution method). Μικροβιακό εναιώρημα εκτίθεται σε

διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιμικροβιακού και αναζητούμε την μικρότερη συγκέντρωση του που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *in vitro*. Περιορισμοί της μεθόδου αυτής είναι η δυσκολία αυτοματοποίησης και η χρονοβόρος διαδικασία. Στην περίπτωση των E-test υπάρχει προκαθορισμένη διαβάθμιση συγκεντρώσεων αντιβιοτικού (τουλάχιστον 15 αραιώσεις) σε μια πλαστική ταινία. Γίνεται συγκεκριμένο εναιώρημα το οποίο ενοφθαλμίζεται σε Muller Hinton (\pm blood) Agar και μετά από επώαση εμφανίζεται αναστολή ανάπτυξης σε σχήμα έλλειψης. Η τιμή της MIC είναι το σημείο που η έλλειψη συναντά την ταινία. Η μέθοδος είναι απλή, εύχρηστη και δίνει ακριβείς και διακριτές τιμές MIC.

Εικόνα 26 : Ανεύρεση ελάχιστης MIC για την βανκομυκίνη και μετρονιδαζόλη σε αιματούχο Muller Hinton μετά από επώαση 48-72 ωρών.



2.11.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ

Το γονιδίωμα του *C. difficile* χαρακτηρίζεται από γενετική ποικιλομορφία καθώς το 11% του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού αποτελείται από κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs) τα οποία είναι ετερογενή και μπορούν να μετακινηθούν είτε εντός του ίδιου γονιδιώματος είτε μεταξύ μικροοργανισμών. Είναι είτε απλές αλληλουχίες με μια μόνο γενετική πληροφορία που απαιτείται για την μετακίνησή τους, είτε μεγάλα συζευκτικά τρανσποζόνια, βακτηριοφάγοι και μεγάλα πλασμίδια με πολύπλοκο γονιδίωμα. Έτσι λοιπόν υπάρχουν τα :

- πλασμίδια (plasmids) που είναι επιπλέον γενετικό υλικό, από μικρό 1,5kb έως τεράστιο, που συναντάται σε αρκετά στελέχη του *C. difficile* και χρησιμοποιείται για γενετική τροποποίηση
- IS sequences που είναι απλά MGEs που περιλαμβάνουν μόνο την απαιτούμενη γενετική πληροφορία
- Mobile introns : introns ανιχνεύθηκαν το 1977, όταν ανακαλύφθηκε ότι η κωδικοποιούσα περιοχή διακόπτεται από μη μεταφραζόμενες περιοχές και τα βακτηριακά mobile introns ανάλογα με τη δευτροταγή δομή τους διακρίνονται σε group I και II.
- Τρανσποζόνια σύζευξης (Conjugative transposons - CTs) που μεταφέρονται από δότη σε

δέκτη και κινητοποιήσιμα τρανσποζόνια (mobilisable transposons – MTs) όμοια με CTs αλλά επειδή δεν διαθέτουν γονίδια σύζευξης χρησιμοποιούν CTs ή πλασμίδια για τη μεταφορά τους.

- Skin^{CD} element που σχετίζεται με το σχηματισμό σπόρων
- Βακτηριοφάγοι που φέρουν πλήθος πληροφοριών, όπως θετική και αρνητική ρύθμιση παραγωγής τοξινών, αντιμικροβιακή αντοχή, κα.

Στην ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στο *C. difficile* ιδιαίτερο ρόλο παίζουν τα Τρανσποζόνια σύζευξης (Conjugative transposons - CTs) και τα κινητοποιήσιμα τρανσποζόνια (mobilisable transposons – MTs) τα οποία περιέχουν πολλά γονίδια σημαντικά για την επιβίωση και την αντοχή του μικροοργανισμού. Τα ποιά γνωστά CTs είναι το Tn5397 με μέγεθος 21kb και το Tn916 που φέρουν το γονίδιο *tetM* που προσδίδει αντοχή σε τετρακυκλίνη, το Tn6194 που μεταφέρει το γονίδιο για αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά (μακρολίδες, λινκοσαμίνη και στρεπτογραμμίνη) είναι το συχνότερο και το CTn1/CTn1-like που φέρει το γονίδιο *catD* για αντοχή σε χλωραμφενικόλη. Τα Tn4453a και Tn4453b είναι MTs που διαφέρουν σε κάποιες βάσεις και σχετίζονται με αντοχή στη χλωραμφενικόλη μέσω του *catD*. Τα Tn5398 και Tn6215 διαθέτουν το γονίδιο *ermB* οπότε ελέγχουν μεταβιβάσιμη αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά. Από τους βακτηριοφάγους ο ΦC2 σχετίζεται με την αντοχή στα MLS_B. Τα περισσότερα από τα MGEs έχουν μεγάλη κλινική σημασία μιας και μεταφέρονται μεταξύ στελεχών μετατρέποντας ευαίσθητους δέκτες σε ανθεκτικά στελέχη. Η ανταλλαγή του γενετικού υλικού μεταξύ στελεχών οδηγεί στην εξέλιξη του γονιδιώματος του *C. difficile* (29, 31).

2.11.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

2.11.3.1 ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ

Μετά τη θεραπεία με ευρέως φάσματος β-λακταμικά αντιμικροβιακά, όπως οι αμινοπενικιλίνες και κυρίως οι κεφαλοσπορίνες (CFs) παρατηρείται υπερανάπτυξη του *C. difficile*. Ο ακριβής μηχανισμός αντοχής του μικροοργανισμού έναντι των κεφαλοσπορινών είναι άγνωστος παρόλο που το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών είναι ανθεκτικό στην κατηγορία αυτή των αντιμικροβιακών. Η αντοχή αυτή είχε χαρακτηριστεί σαν «ιδιοσυστατική» όμως τελικά, λόγω των ποικίλων MICs στις διάφορες κεφαλοσπορίνες και μεταξύ στελεχών, φαίνεται πως είναι στελεχο-εξαρτώμενη. Υπάρχουν δύο μηχανισμοί αντοχής στα β λακταμικά. Ο ένας είναι η παραγωγή ενζύμων, β-λακταμασών, που αποικοδομούν τα αντιμικροβιακά και ο δεύτερος είναι αλλαγή στο στόχο δράσης των φαρμάκων, όπως για παράδειγμα στις πενικιλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBP). Η ανάλυση του γονιδιώματος του *C. difficile* 630 ανέδειξε έναν αριθμό

αλληλουχιών κωδικοποίησης (coding sequences – CDSs) που φαίνεται να εμπλέκονται στον μηχανισμό αντοχής ενάντια στις CFs. Οι αλληλουχίες αυτές ήταν παρούσες και σε αναλύσεις γενομικού υλικού άλλων στελεχών *C. difficile* με ομοιότητα 73-100% όμως επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την συσχέτιση αυτών των γονιδίων με την αντοχή (96).

Αντίθετα με τις κεφαλοσπορίνες ορισμένες β-λακτάμες όταν χορηγούνται σε συνδιασμό με αναστολείς των β-λακταμασών, πχ πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, δεν εμφανίζουν την τάση να οδηγούν σε CDI ενώ αντίθετα έχουν χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία για τη μείωση του ποσοστού λοίμωξης από *C. difficile* (99).

2.11.3.2 ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΖΑΜΙΝΗ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ (MLS_B)

Οι μακρολίδες δεν έχουν ισχυρή συσχέτιση με την ανάπτυξη λοίμωξης από *C. difficile* όμως συχνά συγχρησιμοποιούνται με φάρμακα όπως οι πενικιλίνες για την θεραπεία λοιμώξεων κοινότητας (99). Η αντοχή στην ομάδα αυτή των αντιμικροβιακών έχει ανιχνευθεί σε απομονώσεις αρκετών βακτηριακών ειδών όπως σε *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* και *Streptomyces*. Ο συχνότερα συναντούμενος μηχανισμός αντοχής για την ομάδα αυτή είναι η μετα-μεταγραφική μεθυλίωση του 23S ριβοσωμικού DNA. Η ερυθρομυκίνη, σαν μακρολίδη, αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών στα βακτήρια συνδεόμενη με την 50S ριβοσωμική υπομονάδα αλλοιώνοντας τον κύκλο επιμήκυνσης εμποδίζοντας την κίνηση του ριβοσώματος κατά μήκος του mRNA (99).

Η αντοχή των κλωστηριδίων στα MLS_B αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Sebal et al. (100) όταν ταυτοποιήθηκε *C.perfringens* με αντοχή σε ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη και λινκομυκίνη. Αργότερα βρέθηκαν αρκετά στελέχη *Clostridium spp* με αντοχή στην ερυθρομυκίνη καθώς και στα υπόλοιπα αντιμικροβιακά. Η αντοχή του *C. difficile* στην ερυθρομυκίνη μέσω τροποποίησης του στόχου δράσης του φαρμάκου συμβαίνει στο επίπεδο των ριβοσωμάτων μέσω μιας Erm N-μεθυλοτρανσφεράσης και διαμεσολαβείτε από το υπεύθυνο γονίδιο *erm* (erythromycin ribosomal methylases gene) κλάσης B ενώ σπανιότατα συναντάμε άλλης κλάσης. Το γονίδιο *ermB* υπάρχει σε δύο αντίγραφα στο μετακινούμενο μη συζευκτικό στοιχείο Tn5398 μήκους 9.6kb το οποίο εύκολα μετακινείται *in vitro* από το *C. difficile* στα *S. aureus* και *B. subtilis*. Το στοιχείο αυτό δεν διαθέτει γονίδια για ανασυνδιασμό οπότε πιθανόν να χρησιμοποιεί άλλα συζευκτικά τραπεζοζόνια του γονιδιώματος του δότη για να διαμεσολαβούν σε λειτουργίες όπως η αποκοπή και η ενσωμάτωση ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά του.

Εκτός από το Tn5398 έχουν βρεθεί και άλλα στοιχεία που περιλαμβάνουν το *ermB* στην πλειοψηφία των στελεχών *C. difficile* προσδίδοντας αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά. Έχουν βρεθεί 17 γενετικές ομάδες τέτοιων στοιχείων (E1-E17) μέσω χαρτογράφησης με PCR. Η πιο

συχνή ομάδα στην Ευρώπη είναι η E4 η οποία έχει συσχετιστεί με το συνδετικό τρανσποζόνιο Tn6194 το οποίο έχει μια συζευκτική περιοχή που μοιάζει με εκείνη του Tn916. Η οικογένεια του Tn916 είναι μεγάλη και περιλαμβάνει συνδετικά τρανσποζόνια ιδιαίτερα διαδεδομένα σε gram θετικά (+) αλλά και αρνητικά (-) βακτήρια και μια βοηθητική περιοχή σχετική με Tn5398.

Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ένα ιδιόμορφο στοιχείο που προσδίδει αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά, το Tn6215. Το στοιχείο αυτό είναι ένα μετακινήσιμο τρανσποζόνιο 13kb που μεταφέρεται είτε μέσω μηχανισμού σύζευξης είτε μέσω μεταφοράς με τον φάγο ΦC2. Τόσο το Tn6215 αλλά και το Tn5398 μπορούν να μεταφερθούν μέσω μηχανισμού μετασχηματισμού.

Έχουν βρεθεί στελέχη ανθεκτικά σε ερυθρομυκίνη ή ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη χωρίς όμως την παρουσία του γονιδίου *erm*. Στα στελέχη αυτά βρέθηκαν αλλαγές των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, μεθυλίωση του 23S rRNA, ή μετάλλαξη στο 23S rDNA χωρίς όμως να αποδεικνύεται συσχέτιση των αλλαγών αυτών με την αντοχή καθώς έχουν βρεθεί και σε μη ανθεκτικά στελέχη. Επιπλέον, θεραπεία των στελεχών αυτών με αναστολείς αντλιών δεν οδήγησε σε ελάττωση των MICs οπότε η αντοχή σε αυτά τα στελέχη φαίνεται ότι δεν διαμεσολαβείται από μηχανισμούς εκροής. Τέλος, το πρόσφατα αναγνωρισμένο στοιχείο Tn6218 είναι ένα μη συζευκτικό Tn916-like στοιχείο που φέρει πολλά βοηθητικά γονίδια που φαίνεται να παρέχουν αντίσταση σε κλινικά σημαντικά αντιμικροβιακά, όπως τα *cfr* και *ermAB*. Το *cfr* ανευρίσκεται σε πολυανθεκτικά στελέχη Gram θετικών (+) αλλά και αρνητικών (-) βακτηρίων και πιθανόν να συμμετέχει στην αντοχή του *C. difficile* σε στελέχη όπου απουσιάζει το *ermB* γονίδιο (31, 34, 96, 102).

Η αντοχή στην ερυθρομυκίνη ποικίλει τόσο μεταξύ στελεχών του ίδιου ριβότυπου αλλά και μεταξύ ριβότυπων με την MIC να ορίζεται από 8 mg/l (CLSI) (99).

2.11.3.3 ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ

Η λινεζολίδη (linezolid) είναι συνθετικός αντιμικροβιακός παράγοντας που ανήκει σε νέα τάξη, τις οξαζολιδινόνες. Έχει *in vitro* δράση κατά των αερόβιων Gram-θετικών βακτηριδίων και αναερόβιων μικροοργανισμών. Η λινεζολίδη αναστέλλει επιλεκτικά την πρωτεϊνική σύνθεση των βακτηριδίων με μοναδικό μηχανισμό δράσης αναστέλλοντας την σύνθεση πρωτεϊνών μέσω στόχευσης των βακτηριακών 23S rRNA. Είναι παράγοντας που δεν χρησιμοποιείται για την θεραπεία CDI αλλά αναστέλλει την παραγωγή εξωτοξινών σε Gram θετικούς κόκκους, έχει κάλη δράση έναντι του *C. difficile* ακόμη και σε στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη μετρονιδαζόλη ενώ φαίνεται να αναστέλλει *in vitro* την παραγωγή κυτοξίνης σε περιπτώσεις CDI. Τα περισσότερα στελέχη κλωστηριδίου αναστέλλονται από τη λινεζολίδη σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο αντοχής βάση του CLSI (4 mg/l). Σπάνια αναφέρονται

στελέχη με MIC 8-16 mg/lit. Στα περισσότερα στελέχη από αυτά, μετά από PCR και αλληλούχιση (sequencing) ταυτοποιήθηκε η παρουσία γονιδίου *cfr*, το οποίο κωδικοποιεί μια rRNA μεθυλοτρανφεράση (methyltransferase) (99).

2.11.3.4 ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ (FQS)

Οι κινολόνες είναι μια ομάδα αντιμικροβιακών παραγόντων που δρουν αναστέλλοντας το ένζυμο γυράση (αναστολείς γυράσης). Συνδεόνται με το σύμπλεγμα της γυράσης στο βακτηριακό DNA και αποτρέπουν την περιέλιξη του. Η αναδίπλωση (υπερσπείρωση) της υπερέλικας είναι απαραίτητη για την διαδικασία αντιγραφής του γονιδιώματος κατά την διαίρεση του βακτηρίου, οπότε τα βακτήρια δεν είναι σε θέση να πολλαπλασιαστούν. Ένα άτομο φθορίου στο βενζολικό δακτύλιο χαρακτηρίζει τις φθοριοκινολόνες οι οποίες έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης.

Η αντοχή του *C. difficile* στη κατηγορία αυτή των αντιβιοτικών οφείλεται σε αλλαγές στην περιοχή καθορισμού της αντοχής των κινολονών QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) είτε στην GyrA είτε στην GyrB υπομονάδα της DNA γυράσης. Έχουν βρεθεί αρκετές υποκαταστάσεις αμινοξέων όμως η συχνότερη είναι η Thr82-Ile στην GyrA υπομονάδα, δηλαδή η αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνη (Thr) στη θέση 82 από ισολευκίνη (Ile). Άλλες συχνά συναντούμενες υποκαταστάσεις στην GyrA είναι οι Asp71-Glu, Pro116-Ala, Ala118-Ser και Thr82-Ala ενώ στην GyrB οι Asp426-Val, Asp426-Asn, Glu466-Val, Ser366-Ala, Leu444-Phe. Η αντοχή των στελεχών ποικίλει ανάλογα με τη χώρα και τον ριβότυπο με συχνότερα ανθεκτικούς τους 027, 078 και 356 (99, 102). Τα όρια αντοχής βάση EUCAST για την σιπροφλοξασίνη είναι τα 32mg/lit και για τη μοξιφλοξασίνη βάση CLSI τα 8mg/lit.

Η έκθεση *in vitro* στελεχών σε φθοριοκινολόνες έχει βρεθεί ότι επάγει αντοχή σε μοξιφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη προκαλώντας μεταλλάξεις αντοχής σε ευαίσθητα στελέχη άρα η χορήγηση FQS σε περιπτώσεις πρωτολοίμωξης από *C. difficile* μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία υποπληθυσμού με υποκαταστάσεις για αντοχή (96).

2.11.3.5 ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗ

Η μετρονιδαζόλη ανήκει στην ομάδα των νιτροϊμιδαζολών και είναι αντιμικροβιακή ουσία που ενεργοποιείται και αποκτά την δραστική της μορφή ενδοκυτταρίως συνδεόμενη με το DNA του μικροοργανισμού και διαταράσσοντας την ελικοειδή δομή του αναστέλλοντας την σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων και οδηγώντας το κύτταρο σε θάνατο. Πολλά συστήματα έχουν επισημανθεί ως σημαντικά για την ενεργοποίηση της μετρονιδαζόλης, φαίνεται όμως το πιο

σημαντικό να είναι αυτό του πυροσταφυλικού-ferredoxin/οξειδοαναγωγής της PFOR, κατά το οποίο το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται σε ακετυλοσυνένζυμο Α (acetyl-CoA) και ταυτόχρονα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην νιτρο-ομάδα της μετρονιδαζόλης μέσω της φερρεδοξίνης ή της flavodoxin (99). Αποτελεί το φάρμακο εκλογής για περιπτώσεις ήπιας έως μέτριας CDI για πάνω από τριάντα χρόνια. Η αντοχή στη μετρονιδαζόλη δεν αναφέρεται συχνά και μόνο λίγα στελέχη έχουν αναφερθεί παγκοσμίως (99). Όμως, με βάση τελευταία δεδομένα, παρά την *in vitro* ευαισθησία σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θεραπευτικής αποτυχίας και μάλιστα σε διπλάσιο ποσοστό σε σχέση με την βανκομυκίνη (22,4% vs 14,2%) καθώς και με υψηλό ποσοστό επανεμφάνισης της λοίμωξης (27,1% vs 24,0%). Σε μελέτη 207 ασθενών με CDI μόνο το 50% θεραπεύτηκε επιτυχώς ενώ το 22% παρά την παρατεταμένη θεραπεία (>10 ημέρες) συνέχισε να έχει συμπτώματα. Επιπλέον, το 22% επανεμφάνισε τη νόσο εντός 90 ημερών (101).

Σε μελέτες παρατηρείται αύξηση του μέσου όρου της MIC κυρίως σε λοιμογόνα στελέχη όπως στους RT027, RT072, RT106 με συχνότερο τον RT027 σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες όπως στο Ηνωμένο Βασίλειο, Πολωνία, Γερμανία, Ολλανδία και Ουγγαρία (99). Για παράδειγμα στον RT027 ο μέσος όρος MIC είναι 1.1-1.42 mg/lit φτάνοντας και τα 4 mg/lit ενώ στα κοινά στελέχη 0,13-0,41mg/lit. Επιπλέον, παρουσιάζεται το φαινόμενο της ετερο-αντοχής όπου μέρος του μικροβιακού πληθυσμού επιβιώνει παρουσία αντιμικροβιακού σε περίπτωση πρωτολοίμωξης και αφορά κυρίως λοιμογόνα στελέχη ριβότυπου 027, 001 και 010 (96).

Η αντοχή για το *C. difficile* στη μετρονιδαζόλη ορίζεται με διαφορετικές τιμές από τη EUCAST (>3mg/lit) και τη CLSI (>32mg/lit). Η ανίχνευση στελεχών μειωμένης ευαισθησίας μπορεί να είναι προβληματική καθώς επηρεάζεται από τον χειρισμό του δείγματος και τη μέθοδο που ακολουθείται ακόμη και από το θρεπτικό υλικό και το χρόνο επώασης. Με τα E-test συνήθως υποεκτιμάται η MIC στην μετρονιδαζόλη. Το γονίδιο που ενοχοποιείται για την αντοχή στις νιτροϊμιδαζόλες είναι το *nim* χωρίς όμως να έχουν βρεθεί στελέχη *C. difficile* που να φέρουν το γονίδιο αυτό. Ο μηχανισμός αντοχής παραμένει όχι απόλυτα κατανοητός. Από πρόσφατες μελέτες η αντοχή φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική και να εξαρτάται από αλλαγές σε μεταβολικά μονοπάτια όπως αυτά της πρόσληψης σιδήρου και την επιδιόρθωση του DNA (96, 102).

2.11.3.6 BANKOMYKINH

Η βανκομυκίνη (Vancomycin) είναι ένα αντιμικροβικό που αναστέλλει την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, συγκεκριμένα της πεπτιδογλυκάνης, των Gram θετικών μικροβίων και είναι βακτηριοκτόνο για τα περισσότερα παθογόνα. Ανήκει στα γλυκοπεπτίδια και η χημική της

δομή αποτελείται από αλυσίδα γλυκοζυλιωμένου εξαπεπτιδίου με διασταυρούμενους αρωματικούς δακτυλίους. Συνδέεται στο C-διπεπτιδικό άκρο, D-ala-D-ala, της πλαγίας πενταπεπτιδικής αλυσού που χρησιμεύει για τη χιαστή σύνδεση των παράλληλων αλυσών πεπτιδογλυκάνης. Έτσι δεν δρουν ένζυμα όπως η τρανσγλυκοσυλάση και η τρανσπεπτιδάση με αποτέλεσμα την αναστολή του πολυμερισμού πεπτιδογλυκάνης. Έχει χαμηλή απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα, μεταβολίζεται στο ήπαρ και απεκκρίνεται από τους νεφρούς. Πολύ συχνά χρησιμοποιείται στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) και στη θεραπεία της σοβαρής λοίμωξης από *C. difficile* ακόμη και σε στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στην μετρονιδαζόλη.

Σπάνια ανιχνεύονται στελέχη *C. difficile* ανθεκτικά στην βανκομυκίνη (99) αλλά πλέον παρατηρείται όλο και συχνότερα ελάττωση της ευαισθησίας του μικροοργανισμού με τιμές MIC 2-16 mg/lit σε διάφορους ριβότυπους όπως RT027, RT126, RT356 και RT001/072 αλλά τα κρούσματα είναι σποραδικά. Οι ριβότυποι που συχνότερα εμφανίζονται με αυξημένη MIC είναι οι RT018 και RT356 με 2mg/lit και 2,28mg/lit αντίστοιχα όταν τα περισσότερα στελέχη κοινών ριβότυπων κυμαίνονται μεταξύ 0,62-0,95mg/lit (99). Ο μηχανισμός αντοχής δεν είναι σαφής. Η αντοχή στο αντιμικροβιακό αυτό έχει μελετηθεί επαρκώς στον *S. aureus* και στους *Enterococcus* spp και αποδίδεται στα γονίδια *van*. Στο κλωστηρίδιο *C. difficile* όμως τα Tn1549-like τρανσποζόνια που βρέθηκαν δεν είχαν λειτουργικό *vanB* οπερόνιο. Πρόσφατα βρέθηκε σε στελέχη *C. difficile* *vanG*-like σύμπλεγμα γονιδίων, ομόλογο με του *E. faecalis*, το οποίο αν και εκφράζεται δεν είναι ικανό να προκαλέσει αντοχή στην βανκομυκίνη. Σε μελέτες *in vitro* βανκομυκίνη ανθεκτικών στελεχών βρέθηκε αλλαγή του αμινοξέος Pro108Leu στην πρωτεΐνη MurG η οποία συμμετέχει στη μετατροπή των λιπιδίων τύπου I σε τύπου II στη διαδικασία βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης οπότε η υποκατάσταση αυτή μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα. Τέλος, βακτήρια εντός βιομεμβράνης (biofilm) είναι περισσότερο ανθεκτικά έναντι της βανκομυκίνης και ο σχηματισμός της φαίνεται να επάγεται από υπο-ανασταλτικές και ανασταλτικές συγκεντρώσεις βανκομυκίνης (96, 102).

2.11.3.7 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ

Οι τετρακυκλίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνολύση, εμποδίζοντας την προσκόλληση του αμινο-ακυλο-tRNA στην ριβοσωμική υποδοχή (A) (99). Η αντοχή αναπτύσσεται για να προστατευθεί το ριβόσωμα του μικροβιακού κυττάρου από το αντιμικροβιακό. Αυτή η οικογένεια παραγόντων θεωρείται χαμηλού κινδύνου για την επαγωγή CDI παρά το ευρύ τους φάσμα δράσης έναντι gram θετικών και αρνητικών αλλά και αναερόβιων μικροοργανισμών. Η αντοχή στην τετρακυκλίνη τεκμηριώθηκε πριν 30 χρόνια σαν μεταβιβάσιμη τόσο μεταξύ

στελεχών του *C. difficile* αλλά και μεταξύ άλλων βακτηριακών ειδών (99) και τα ποσοστά της ποικίλουν μεταξύ στελεχών και χωρών κυμαινόμενα μεταξύ 2,4% - 41,6% χωρίς να είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη. Στις περισσότερες μελέτες είναι κάτω από 10% μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών (99). Το τρέχον όριο βάση του CLSI για την αντοχή στην τετρακυκλίνη ορίζονται τα 16 mg/l. Η τιμή της εξαρτάται από την δοκιμή που χρησιμοποιήθηκε, E-test, ισοδύναμες δοκιμασίες ή αραιώσεις σε ζυμό/άγαρ. Ενδιάμεσης ευαισθησίας στελέχη με MIC 8mg/lt βρέθηκαν στους RTs 014,017 και 078 ενώ MIC>16mg/lt κυρίως στους RTs 012 κι 048. Υψηλότερες τιμές MICs (32 έως >256mg/l) βρέθηκαν σε στελέχη του ριβότυπου 012 στη Σουηδία και σε στελέχη που μελετήθηκαν στην Σαγκάη (99).

Η αντοχή στις τετρακυκλίνες διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες εκροής, μηχανισμούς ριβοσωμικής προστασίας ή μέσω ενζυματικής απενεργοποίησης του αντιβιοτικού. Στο *C. difficile* η αντίσταση στην τετρακυκλίνη εκδηλώνεται συχνότερα ως συνέπεια παραγωγής της TetM πρωτεΐνης και σπανιότερα της TetW. Και οι δύο είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που προστατεύουν τα ριβοσώματα από την δράση των παραγόντων μειώνοντας την ευαισθησία τους προς το αντιμικροβιακό. Το πιο διαδεδομένο λοιπόν γονίδιο είναι το *tetM* και συναντάται συνήθως στο τρανσποζόνιο Tn5397 αν και σε κάποια στελέχη υπάρχει στα Tn916-like, που είναι υπεύθυνα για αντοχή κυρίως σε τετρακυκλίνη και MLS_B σε πολλά παθογόνα, αλλά και στα Tn6190 και Tn6235. Σπανιότερα ανιχνεύονται άλλα *tet* γονίδια όπως το *tetW*. Εκτός από την αντοχή μέσω *tet* πιθανόν και άλλα κινητά γενετικά στοιχεία να έχουν ρόλο στην αντοχή στην τετρακυκλίνη (96, 99, 102).

2.11.3.8 ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ

Μόνο το 3,7% των στελεχών *C. difficile* στην Ευρώπη έχει ανιχνευθεί με αντοχή στην χλωραμφενικόλη. Η αντοχή του μικροοργανισμού, καθώς και του *C. perfringens*, φαίνεται να διαμεσολαβείται μέσω των γονιδίων *catD* και *catP* που κωδικοποιούν την ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (CAT) η οποία αδρανοποιεί το αντιβιοτικό (96, 102). Το γονίδιο *catP* του *C. perfringens* φέρεται στα τρανσποζόνια Tn4451 και Tn4452 (103). Το γονίδιο αντοχής στην χλωραμφενικόλη του *C. difficile* *catD* παρουσιάζει ομοιότητα αλληλούχισης 97% με το *catP* ενώ δεν υπάρχει απόδειξη ότι μπορεί να μεταφερθεί με σύζευξη είτε εντός είτε μεταξύ δυο ειδών (90). Το *catD* εδρεύει στα τρανσποζόνια Tn4453a και Tn4453b που δομικά και λειτουργικά ομοιάζουν με το στοιχείο Tn4451 του *C. perfringens* (96).

2.11.3.9 RIFAMYCINS ΚΑΙ FIDAXOMICIN

Η θεραπευτική αποτυχία και η επανεμφάνιση λοίμωξης μετά τη θεραπεία με μετρονιδαζόλη και βανκομυκίνη οδήγησαν σε αναζήτηση νέων θεραπευτικών επιλογών όπως οι Ριφαμυκίνες-Rifamycins (RIFs), και ιδιαίτερα η Ριφαξιμίνη-Rifaximin (RFX), καθώς και η Φινταξομυκίνη-Fidaxomicin (FDX). Τα αντιμικροβιακά αυτά είναι αναστολείς μεταγραφής, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, έχοντας ως στόχο διαφορετική RNA πολυμεράση συνδεδεμένα με την RpoB υπομονάδα. Η ριφαξιμίνη έχει ευρεία δράση έναντι gram θετικών και αρνητικών μικροοργανισμών και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της διάρροιας των ταξιδιωτών και δοκιμάζεται και για την CDI (104). Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την αποτελεσματικότητα της ριφαξιμίνης έναντι του *C. difficile*, *in vivo* και *in vitro*, καταλήγοντας σε συμπέρασμα πως φαίνεται να έχει καλή δραστηριότητα όμως έχουν εντοπιστεί στελέχη με υψηλή MIC.

Η αντοχή του *C. difficile* στις RIFs ορίζεται με MIC >16mg/lit και αγγίζει το 11% με αυξητικές τάσεις ενώ η έκθεση σε αυτά τα αντιμικροβιακά αυξάνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη αντοχής ακόμη και κατά τη διάρκεια θεραπείας ευαίσθητων *in vitro* στελεχών. Διαφορετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs – Single Nucleotide polymorphism) εντός του γονιδίου για την β-υπομονάδα της RNA-πολυμεράσης (*rpoB*) έχουν βρεθεί σε στελέχη ανθεκτικά σε RIF. Μεταξύ των υποκαταστάσεων που βρέθηκαν, η πιο κοινή ήταν η Arg505-Lys και ακολουθούν οι His502-Asn, Arg505-Lys και His502-Asn (99, 102). Η αντοχή στη ριφαμυκίνη έχει αναφερθεί σε αρκετούς επιδημικούς και μη τύπους καθώς και σε πολυανθεκτικά στελέχη.

Η Fidaxomicin είναι ένα σύγχρονο αντιμικροβιακό με ποσοστό ίασης της λοίμωξης από *C. difficile* όχι μικρότερο από την Βανκομυκίνη αλλά πλεονεκτεί λόγω του χαμηλού ποσοστού επανεμφάνισης της CDI και της μικρότερης αρνητικής επίδρασης έναντι στο μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα και ιδιαίτερα στα *Bacteroides*. Ανήκει στις μακρολίδες, είναι στενού φάσματος βακτηριοκτόνο και απορροφάται λίγο μετά την από του στόματος χορήγηση. Απεκρίνεται κυρίως από τα κόπρανα. Στοχεύει στην βακτηριακή RNA πολυμεράση σε θέση διαφορετική από τις ριφαμυκίνες. Η προχωρημένη ηλικία, η ηπατική δυσλειτουργία και η νεφρική ανεπάρκεια δεν μεταβάλλουν την διάθεση του φαρμάκου. Είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι του κλωστηριδίου με MICs 0,02-0,25 mg/lit και σπάνια αναφέρονται στελέχη με μειωμένη ευαισθησία, MIC 2-4mg/lit. Έχει βρεθεί μόνο ένα στέλεχος *in vitro* με MIC 16mg/lit λόγω μετάλλαξης στο *rpoB*. Όμως παραμένει δραστική έναντι στα ανθεκτικά στις RIFs στελέχη καθώς οι μεταλλάξεις αντοχής βρίσκονται σε διακριτές θέσεις (96).

2.11.3.10 ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (MDR - MULTI DRUG RESISTANT)

Σε ευρωπαϊκή μελέτη του 2005 το 55% των απομονωθέντων στελεχών *C. difficile* ήταν MDR ενώ το 49% αυτών ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές τάξεις αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα ποσοστά ποικίλουν ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, το νοσοκομείο και την χρήση αντιμικροβιακών. Τα συχνότερα μοτίβο αντοχών που συναντάμε είναι :

- αντοχή σε κλινδαμυκίνη, φθοριοκινολόνες, ερυθρομυκίνη, κεφαλοσπορίνες ± RIFs
- αντοχή σε κλινδαμυκίνη, φθοριοκινολόνες και ερυθρομυκίνη στο 29,7%
- αντοχή σε κλινδαμυκίνη, φθοριοκινολόνες και κεφαλοσπορίνες στο 18,4%
- αντοχή στους υπόλοιπους συνδυασμούς αντιβιοτικών <14%
- αντοχή σε ερυθρομυκίνη, μοξιφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη και RIFs σε RT176 (σχετικός με RT027)
- αντοχή σε κλινδαμυκίνη, ερυθρομυκίνη, μοξιφλοξασίνη και RIFs στον RT356 (σχετικός με RT018)
- πολυανθεκτικοί θεωρούνται οι ριβότυποι 001/072, 012, 017, 018, 027, 078, 046 και 176
- η αντοχή στην μετρονιδαζόλη είναι αναδυόμενος φαινότυπος (96,98).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός της ευαισθησίας σε εννέα αντιμικροβιακά φάρμακα 36 στελεχών *C. difficile* από ασθενείς με διάρροια στην περιοχή της Θεσσαλίας το 2015 καθώς και η μοριακή τυποποίηση τους. Τα δείγματα επιλέχθηκαν τυχαία από το σύνολο των απομονωθέντων στελεχών κατά την ως άνω χρονική περίοδο.

- Μελετήθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε εννέα αντιμικροβιακά φάρμακα με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμικροβιακών, E-tests.
- Στη συνέχεια αναζητήθηκαν γονίδια που σχετίζονται με τις αντοχές στα αντιμικροβιακά φάρμακα που ελέγχθησαν.
- Τα στελέχη ελέγχθησαν για την ύπαρξη γονιδίων παραγωγής τοξινών A, B και Δυαδικής.
- Τέλος τα πολυανθεκτικά στελέχη τυποποιήθηκαν με την μέθοδο Multilocus Sequence Typing, MLST - Τυποποίηση Πολυτοπικού Προσδιορισμού Αλληλουχίας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ). Επιλέχθηκαν 36 στελέχη *C. difficile* από το σύνολο των στελεχών που απομονώθηκαν στο εργαστήριο κατά την διάρκεια χρονικής περιόδου ενός έτους, 2015. Το σύνολο των εξετασθέντων δειγμάτων αποτέλεσαν 622 κόπρανα ασθενών από την περιοχή της Θεσσαλίας με συμπτώματα διάρροιας κατά την νοσηλεία τους. Για όλους τους ασθενείς, από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη προς μελέτη, συλλέχθηκαν πληροφορίες από τον ιατρικό φάκελο τους που περιελάμβαναν απαραίτητα κλινικά και δημογραφικά στοιχεία.

Στην παρούσα εργασία όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο γένους και είδους με συνδιασμό φαινοτυπικών και ανοσοενζυμικών μεθόδων ενώ τυποποιήθηκαν με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων. Τα υπό μελέτη στελέχη ερευνήθηκαν για την παραγωγή τοξινών Α και Β αλλά και της Δυναδικής τοξίνης με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών. Ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών έγινε με τη χρήση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης, E-test, σε εννέα αντιμικροβιακούς παράγοντες (Βανκομυκίνη, Μετρονιδαζόλη, Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Τετρακυκλίνη, Ριφαμικίνη, Λεβοφλοξασίνη, Σιπροφλοξασίνη και Μοξιφλοξασίνη) και ερμηνεύθηκε βάση των MICs του αντιβιογράμματος που προέκυψε (105). Στη συνέχεια διερευνήθηκε η μοριακή βάση της αντοχής στα άνωθεν αντιμικροβιακά φάρμακα με την αναζήτηση αντίστοιχων γονιδίων.

Τα βασικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την μελέτη έχουν ως εξής :

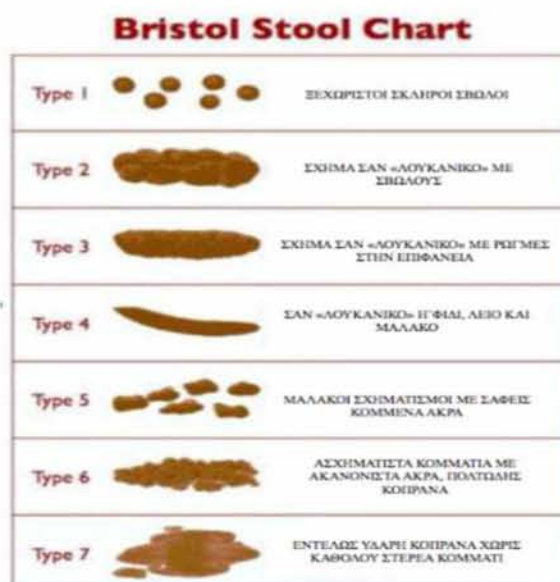
- Ανίχνευση, απομόνωση και έλεγχος αντοχής στελεχών *C. difficile* από ασθενείς στη περιοχή της Θεσσαλίας που νοσηλεύθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας κατά το έτος 2015
- Διερεύνηση των υπεύθυνων γονιδίων αντοχής
- Έλεγχος παραγωγής τοξινών με αναζήτηση υπεύθυνων γονιδίων
- Μοριακή τυποποίηση - χαρακτηρισμός των στελεχών *C. difficile* με MLST

3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του ΠΓΝΛ κατά το έτος 2015 εξετάστηκαν 622 διαρροϊκά δείγματα κοπράνων για την παρουσία *C. difficile* από νοσηλευόμενους ασθενείς οι οποίοι

εμφάνισαν ξαφνικά κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους διαρροϊκές κενώσεις, πάνω από τρεις ημερησίως σε αριθμό, με ασχημάτιστα και υδαρή κόπρανα τύπου 6 και 7 κατά την κλίμακα Bristolⁱ (εικόνα 27). Αρχικά τα δείγματα αξιολογούνται για την καταλληλότητα τους. Δεχτά για έλεγχο γίνονται μόνο διαρροϊκά κόπρανα από ασθενείς με ύποπτη συμπτωματολογία για CDI τα οποία προέρχονται από πρόσφατη κένωση και έχουν μεταφερθεί άμεσα στο εργαστήριο. Η ποσότητα του δείγματος θεωρείται κατάλληλη όταν είναι 2-10gr ή 5ml που αντιστοιχούν σε ποσότητα μεγέθους ενός καρυδιού. Στο εργαστήριο τα δείγματα είτε επεξεργάζονται άμεσα εντός 2 ωρών είτε διατηρούνται στους 4-6°C έως 48 ώρες.

Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση ταξινόμησης κοπράνων κατά την κλίμακα Bristol (Ανατύπωση από : https://en.wikipedia.org/wiki/Bristol_stool_scale#cite_note-4)



3.2.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα στελέχη που συλλέχθηκαν χαρακτηρίστηκαν προκαταρκτικά ως *C. difficile* σύμφωνα με το αποτέλεσμα του τεστ ανοσοχρωματογραφίας που ανιχνεύει Γλουταμινική Δεϋδρογενάση (GHD) η οποία είναι κοινό αντιγόνο όλων των *C. difficile* ανεξάρτητα από την παραγωγή τοξινών και αποτελεί δομική πρωτεΐνη που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τον μικροοργανισμό. Έτσι μετά την μακροσκοπική εξέτασηⁱⁱ για την κατάλληλότητα του δείγματος γίνεται άμεσα το τεστ ανοσοχρωματογραφίας το οποίο ταυτόχρονα ανιχνεύει και την ύπαρξη τοξινών του μικροοργανισμού στα κόπρανα.

Το πρωτόκολλο ταυτοποίησης περιλαμβάνει αναλυτικά:

3.2.1.1 ΤΕΣΤ ΑΝΟΣΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ : ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΗΣ ΔΕΥΔΡΟΓΕΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΩΝ

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (Enzyme ImmunoAssays - EIA), όπως η ανοσοχρωματογραφία, είναι κοινό διαγνωστικό εργαλείο των μικροβιολογικών εργαστηρίων για την ανίχνευση *C. difficile*. Ανιχνεύουν την παρουσία Γλουταμινικής Δεϋδρογενάσης και τοξινών, Α και/ή Β. Η ανίχνευση GHD είναι αρκετά ευαίσθητη δεν είναι όμως ειδική για τη διάκριση των τοξινοπαραγωγών στελεχών. Αποτελεί όμως μια αξιόπιστη προκαταρκτική ταυτοποίηση γρήγορη, οικονομική και χωρίς απαίτηση ιδιαίτερων γνώσεων για την εκτέλεση της. Στο Μικροβιολογικό εργαστήριο του ΠΓΝΛ χρησιμοποιήθηκε το τεστ C.Diff Quick Check Complete (D-EIA; TechLab, Blacksburg VA) το οποίο είναι μια ταχεία ανάλυση ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού σε μεμβράνη για την ταυτόχρονη και γρήγορη ανίχνευση του αντιγόνου GHD και των τοξινών Α και Β σε μια κυψελίδα αντίδρασης.

Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος, γνωστή και ως γρήγορο τεστ πλευρικής ροής, ανήκει στην κατηγορία των ανοσοενζυμικών μεθόδων. Οι ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες πραγματοποιούνται σε απλές συσκευές οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν την παρουσία ή την απουσία ενός στόχου στο υπό ανάλυση δείγμα, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου και ακριβού εξοπλισμού. Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος χρησιμοποιείται για την κλινική διάγνωση είτε παρά την κλίνη του ασθενούς, είτε για εργαστηριακή χρήση.

Η τεχνική αυτή βασίζεται σε μία σειρά από κομμάτια πορώδους χαρτιού, νιτροκυτταρίνης ή ειδικού πολυμερούς, τα οποία αποτελούν τη βάση της συσκευής. Η βάση αυτή (υπόστρωμα) έχει την ικανότητα να μεταφέρει το βιολογικό υγρό με φυσικό τρόπο χρησιμοποιώντας την αρχή της διάχυσης. Το υπόστρωμα αυτό λειτουργεί σαν «σφουγγάρι» και παρακρατεί την περίσσεια από το υγρό του υπό εξέταση δείγματος. Σε ένα σημείο του υποστρώματος βρίσκεται το αντιδραστήριο το οποίο περιέχει αντισώματα ειδικά για το υπό ανίχνευση αντιγόνο συζευγμένα με το χρωμοφόρο (conjugate) αντίσωμα (συνήθως μόρια χρυσού σε μέταλλο ή μικροσφαιρίδια latex). Εάν το δείγμα είναι θετικό τα αντισώματα που είναι συζευγμένα με το χρωμοφόρο ενώνονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Το σύμπλεγμα αντιγόνων και αντισωμάτων συζευγμένων με το χρωμοφόρο, ρέει στην υπόλοιπη επιφάνεια του υποστρώματος. Μετά από λίγο όταν ολοένα και περισσότερα μόρια του διαλύματος διαβρέχουν την μεμβράνη του υποστρώματος, τα μόρια συσσωρεύονται και καθώς το πορώδες χαρτί διαβρέχεται η περιοχή αλλάζει χρώμα. Τυπικά υπάρχουν δύο περιοχές: η μία αναφερόμενη ως περιοχή ελέγχου (control) η οποία εγκλωβίζει οποιοδήποτε μόριο και με αυτόν τον τρόπο διαβεβαιώνει ότι η αντίδραση αυτή λειτούργησε σωστά και η δεύτερη περιοχή, περιοχή δοκιμής (test) που περιέχει ένα

εξειδικευμένο εγκλωβισμένο μόριο το οποίο δεσμεύει μόνο τα μόρια πάνω στα οποία έχει ακινητοποιηθεί το μόριο του δείγματος το οποίο αναλύεται ή ανιχνεύεται από τη συγκεκριμένη ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία. Στο τέλος το υγρό διαπερνά όλο το πορώδες υλικό και αφού απορροφηθεί εξολοκλήρου, δίνεται το τελικό αποτέλεσμα. Η ανοσοχρωματογραφία μπορεί να βασίζεται στη μεθοδολογία της ανταγωνιστικής ή μη ανταγωνιστικής (sandwich) δοκιμασίας.

Η εξέταση *C.Diff* Quick Check Complete χρησιμοποιεί ειδικά αντισώματα για τη γλουταμινική δεϋδρογενάση και τις τοξίνες A και B του *C. difficile*. Η συσκευή περιέχει ένα παράθυρο αντίδρασης με τρεις κατακόρυφες γραμμές ακινητοποιημένων αντισωμάτων. Η γραμμή εξέτασης αντιγόνου (“Ag”) περιέχει αντισώματα έναντι της GHD , η γραμμή ελέγχου (“C”) είναι μια διάστικτη γραμμή που περιέχει αντισώματα υπεροξειδάσης από ραφανίδα και τέλος η γραμμή εξέτασης των τοξινών A και B (“Tox”) περιέχει αντισώματα έναντι των τοξινών του *C. difficile*.

ΥΛΙΚΑ

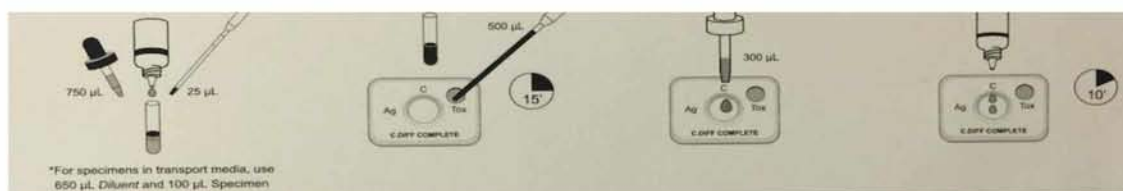
- Μεμβρανική συσκευή
- Αραιωτικό (ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης με διαβαθμισμένο σταγονόμετρο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (με διαβαθμισμένο σταγονόμετρο)
- Υπόστρωμα (διάλυμα που περιέχει τετραμεθυλοβενζιδίνη)
- Σύζευγμα (ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού για την γλουταμινική δεϋδρογενάση συζευγμένο με υπεροξειδάση από ραφανίδα και ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα αίγας για τις τοξίνες A και B συζευγμένα με υπεροξειδάση από ραφανίδα σε ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης)
- Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης διαβαθμισμένες στα 25μl, 400μl και 500μl
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πλαστικοί ή γυάλινη (τύπου Eppendorf)
- Ραβδία εφαρμογής
- Χρονόμετρο
- Αναμείκτης vortex
- Σύστημα πιπετών με ρύγχος
- Γάντια μιας χρήσης για τον χειρισμό των δειγμάτων κοπράνων

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους. Δοκιμαστικός σωλήνας επισημαίνεται με ετικέτα στην οποία αναγράφονται στοιχεία αναγνώρισης του δείγματος. Με το διαβαθμισμένο σταγονόμετρο προστίθεται 750μl αραιωτικού σε κάθε σωληνάριο για τα δείγματα κοπράνων και στη συνέχεια προστίθεται μια σταγόνα

συζεύγματος σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Με την διαβαθμισμένη πλαστική πιπέτα μεταφοράς μιας χρήσης τοποθετούμε την κατάλληλη ποσότητα κοπράνων, 25 μl και αναμειγνύουμε διεξοδικά τα δείγματα είτε με περιδίνηση είτε με αναστροφή του σωληναρίου. Χρησιμοποιείται μια μεμβρανική συσκευή (κασέτα) ανά δείγμα η οποία επισημένεται . Με πιπέτα μεταφοράς μεταφέρουμε 500μl αραιωμένου μείγματος δείγματος-συζεύγματος στην κυψελίδα δείγματος και παρακολουθούμε το υγρό δείγμα να αποστραγγίζεται στο τμήμα απορρόφησης στο εσωτερικό της μεμβρανικής συσκευής. Η συσκευή επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και μια υγρή περιοχή κατά πλάτος του παραθύρου αντίδρασης εμφανίζεται. Στην συνέχεια προστίθενται 300μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης στο παράθυρο αντίδρασης τα οποία πρέπει να απορροφηθούν πλήρως. Τέλος, προσθέτουμε 2 σταγόνες υποστρώματος στο παράθυρο αντίδρασης και αξιολογούμε το αποτέλεσμα μετά το πέρας επώασης 10 λεπτών (εικόνα 28).

Εικόνα 28 : Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας C.Diff Quick Check Complete (Ανατύπωση από : TechLab, USA).



Κατά την αξιολόγηση του αποτελέσματος ελέγχουμε πάντα για την παρουσία των μπλε κουκκίδων στο μέσο του παραθύρου αντίδρασης που αντιπροσωπεύουν τον εσωτερικό θετικό ορό ελέγχου. Στη συνέχεια ελέγχεται η παρουσία μπλε γραμμών στις πλευρές “Ag” και “Tox” του παραθύρου αντίδρασης (εικόνα 29). Η εξέταση *C.Diff* Quick Check Complete ανιχνεύει τα επίπεδα της τοξίνης A σε συγκέντρωση $\geq 0,63\text{ng/ml}$, της B $\geq 0,16\text{ng/ml}$ και της γλουταμινικής δεϋδρογενάσης $\geq 0,8\text{ng/ml}$.

Εικόνα 29 : Ερμηνεία αποτελεσμάτων C.Diff Quick Check Complete (Ανατύπωση από : TechLab, USA).



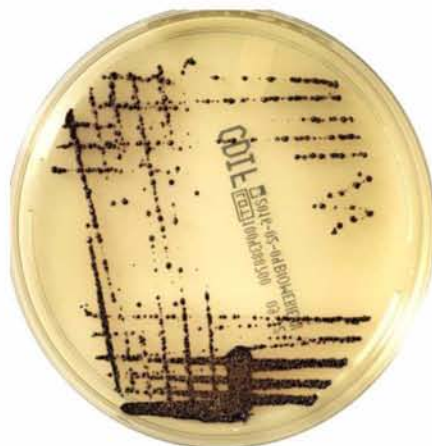
3.2.1.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Α. ΣΕ ΧΡΩΜΟΓΟΝΟ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Αμεσώς μετά το τεστ ανοσοχρωματογραφίας, τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για το αντιγόνο GHD του μικροοργανισμού, άσχετα με την παρουσία ή όχι τοξίνης, εμβολιάστηκαν σε στερεό εκλεκτικό χρωμογόνο θρεπτικό υλικό CDIF (chromID *C. difficile* Culture Media – bioMerieux) το οποίο αποτελείται από μια πλούσια θρεπτική βάση συνδυάζοντας διάφορες πεπτόνες και ταυροχολικό που ευνοεί την ανάπτυξη των σπόρων. Περιέχει ένα χρωμογόνο υπόστρωμα και ένα μείγμα αντιβιοτικών που επιτρέπουν την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των στελεχών *C. difficile* που παράγουν β-γλυκοσιδάση με ανάπτυξη έγχρωμων αποικιών του μικροοργανισμού αλλά και αναστέλλοντας τα περισσότερα gram θετικά και αρνητικά βακτήρια και μύκητες. Το δείγμα επωάζεται σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂) για τουλάχιστον 24 ώρες.

Μετά την επώαση αξιολογείται η ανάπτυξη τυπικών αποικιών : γκρι έως μαύρες με ακανόνιστα ή και λεία όρια (εικόνα 31). Από το καλλιέργημα γίνεται επαλήθευση με το *C.Diff* Quick Check Complete για την παραγωγή τοξινών και την παρουσία GHD.

Εικόνα 31 : Χρωμογόνο εκλεκτικό υλικό για *C. difficile* της bioMerieux (Ανατύπωση από <http://www.biomerieux-culturemedia.com>)



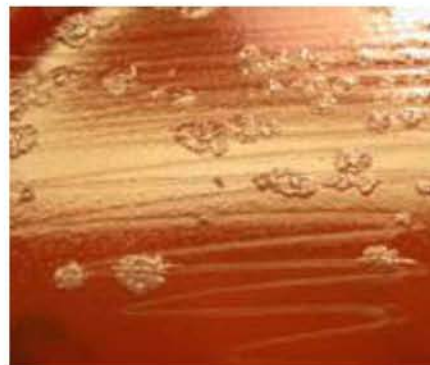
Β. ΣΕ ΜΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΑΙΜΑΤΟΥΧΟ ΑΓΑΡ

Στο στάδιο αυτό, ταυτόχρονα με τον εμβολιασμό του δείγματος σε εκλεκτικό χρωμογόνο υλικό, το δείγμα επωάζεται και σε αιματούχο θρεπτικό υλικό σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂) για 48-72 ώρες. Μετά το πέρας της

επώασης το τρυβλίο αξιολογείται για ανάπτυξη αποικιών με ποικίλο μέγεθος και χαρακτηριστική μορφολογία. Οι αποικίες είναι ανάγλυφες, επίπεδες ή ελαφρά επηρμένες, σκουρόχρωμες με ριζοειδείς προσεκβολές και λευκωπή ή γκριζωπή κεφαλή και χαρακτηριστική οσμή κρεσόλης (στάβλου) (εικόνα 32). Από το καλλιέργημα γίνεται δοκιμασία χρώσης κατά Gram. Εφόσον επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για Gram θετικά βακτήρια το καλλιέργημα χρησιμοποιείται για :

- Φύλαξη του στελέχους στους -80°C σε ζωμό TSB (Tryptic Soy Broth) 10% γλυκερόλη
- Εκχύλιση/εξαγωγή (extraction) χρωμοσωμικού DNA για χρήση σε μοριακές τεχνικές
- Ανακαλλιέργεια σε Mueller Hinton Agar + 5% Sheep Blood για έλεγχο αντοχής στα αντιβιοτικά με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test)

Εικόνα 32 : Χαρακτηριστικές αποικίες *C. difficile* σε αιματούχο άγαρ.



3.2.1.3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΧΡΩΣΗΣ ΚΑΤΑ GRAM

Η χρώση κατά Gram αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην μικροβιολογία καθώς διαφοροποιεί τα βακτήρια με βάση τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος σε θετικά και αρνητικά καθώς βασίζεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη στους δύο τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γετιανής (Crystal Violet) και διάλυμα ιωδίου (Lugol) με σχηματισμό συμπλόκου κρυσταλλικού ιωδους – ιωδίου. Στη συνέχεια ξεπλένονται με αιθανόλη οπότε σε ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται, η εξωτερική μεμβράνη αποσταθεροποιείται και αυξάνεται η διαπερατότητα της. Το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται και το κύτταρο αποχρωματίζεται. Στο επόμενο βήμα ακολουθεί η σαφρανίνη που χρωματίζει μόνο τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια η αιθανόλη, σχηματίζει πόρους στο παχύ στρώμα πεττιδογλυκάνης και προκαλεί τη συρρίκνωση του οδηγώντας σε εγκλωβισμό του συμπλόκου κρυσταλλικού ιωδους – ιωδίου

εντός του κυττάρου.

Κάθε χρώση διαρκεί 1 λεπτό και ακολουθείται από ξέπλυμα με νερό βρύσης. Ο αποχρωματισμός, τρίτο στάδιο μετά τα διάλυμα Crystal Violet και διάλυμα ιωδίου Lugol, γίνεται με έτοιμο διάλυμα ακετόνης και αιθανόλης (decolorizing) και ακολουθεί ο μεταχρωματισμός με το διάλυμα σαφρανίνης για 10-15 δευτερόλεπτα. Το παρασκεύασμα ξεπλένεται, ξηραίνεται και μικροσκοπείται σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα Gram αρνητικά βακτήρια χρωματίζονται αχνά κόκκινα ενώ τα θετικά, όπως το *C. difficile*, χρωματίζονται σκούρα ιώδη (εικόνα 33).

Εικόνα 33 : *C. difficile* - χρώση κατά Gram (Ανατύπωση από : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/difficile.htm>)



3.2.2. ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Έλεγχος ευαισθησίας έγινε σε εννέα αντιβιοτικά (Βανκομυκίνη, Μετρονιδαζόλη, Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Τετρακυκλίνη, Ριφαμπικίνη, Λεβοφλοξασίνη, Σιπροφλοξασίνη και Μοξιφλοξασίνη) με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-tests, Biomerieux) με τουλάχιστον 15 διαφορετικές κλιμακωτές συγκεντρώσεις που αποτελούν ένα έτοιμο σύστημα προσδιορισμού της MIC. Η δοκιμασία πραγματοποιείται σε Muller Hinton Agar με 5% απινιδωμένο αίμα προβάτου όπως συνίσταται από τις οδηγίες της CLSI για τα αναερόβια βακτήρια.

Κατάλληλο εναιώρημα μικροβίων, θολρότητας ίσης με 1.0 McFarland, ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού και στην συνέχεια τοποθετούνται οι ταινίες των αντιβιοτικών. Το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος είναι ο κυριότερος παράγοντας για την αναπαραγωγικότητα της μεθόδου καθώς μεγάλο μέγεθος οδηγεί σε ψευδώς αυξημένη αντοχή του μικροοργανισμού. Το εναιώρημα γίνεται με την ανάμειξη 3-5 μεμονομένων και ομοιόμορφων αποικιών από μη εκλεκτικό υλικό σε στείρο φυσιολογικό ορό ή θρεπτικό ζωμό. Εντός 15 λεπτών από την παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος βαμβακοφόρος στυλεός εμβαπτίζεται στο

μικροβιακό εναιώρημα και στη συνέχεια επιστρέφεται σε 3 κατευθύνσεις με περιστροφή του τρυβλίου κατά 60⁰ κάθε φορά. Εντός 5-15 λεπτών από την επίστρωση, με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετούμε τις ταινίες E-tests χωρίς να τις μετακινούμε μετά την τοποθέτησή τους. Τα δείγματα τοποθετούνται εντός 15 λεπτών μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας σε κλίβανο και επωάζονται στους 37⁰C για 40-72 ώρες σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂).

Η αξιολόγηση των τρυβλίων γίνεται βάση του σημείου που η έλλειψη συναντά την ταινία. Αυτή είναι και η τιμή της MIC. Οι κατηγορίες ευαισθησίας των μικροβίων με βάση την MIC έχουν αναφερθεί (παράγραφος 2.11.1.) και χωρίζονται σε «ευαίσθητο», «μετρίως ευαίσθητο» και «ανθεκτικό» ανάλογα με την θεραπευτική επιτυχία του αντιβιοτικού. Στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος ευαισθησίας σε εννέα αντιβιοτικά.

ΥΛΙΚΑ

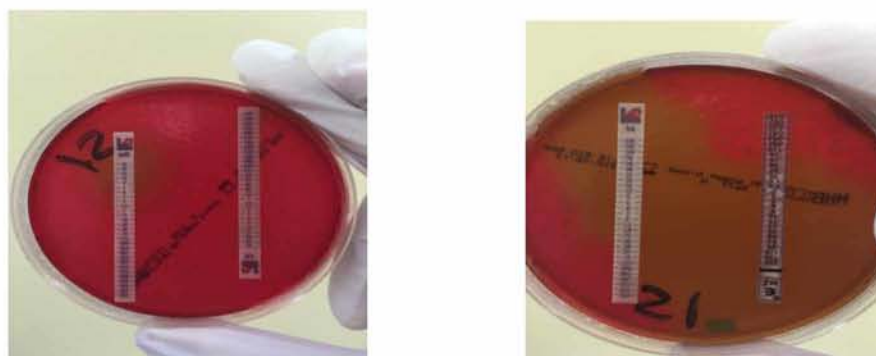
- Τρυβλία Muller Hinton Agar με 5% Sheep Blood
- Ταινίες E-test Erythromycin, Biomerieux
- Ταινίες E-test Clindamycin, Biomerieux
- Ταινίες E-test Ciprofloxacin, Biomerieux
- Ταινίες E-test Moxifloxacin, Biomerieux
- Ταινίες E-test Levofloxacin, Biomerieux
- Ταινίες E-test Tetracycline, Biomerieux
- Ταινίες E-test Vancomycin, Biomerieux
- Ταινίες E-test Metronidazole, Biomerieux
- Ταινίες E-test Rifampicin, Biomerieux
- Αμπούλες στείρου φυσιολογικού ορού 3 ή 5ml
- Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί
- Νεφελόμετρο για μέτρηση κλίμακας McFarland
- Λαβίδες
- Λυχνία Bunsen – Φλόγιστρο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τα στελέχη *C. difficile* μετά την ταυτοποίηση και την καλλιέργεια τους σε αιματούχο άγαρ, όπως αναφέρεται στη παράγραφο 3.2.1.3-B, ελέγχονται για την ευαισθησία τους στα ανωτέρω αντιμικροβιακά. Από το αιματούχο άγαρ με αποστειρωμένους βαμβακοφόρους στυλεούς δημιουργείται εναιώρημα από 3-5 αποικίες με ανάδευση του δείγματος και μέτρηση της

θολερότητας του 1,0 McFarland. Στη συνέχεια εμβαπτίζοντας νέο βαμφακοφόρο στυλεό και απορρίπτοντας την περίσσεια με πίεση στα τοιχώματα το εναιώρημα επιστρώνεται σε τρεις διευθύνσεις ως αναφέρθηκε άνω. Με αποστειρωμένη λαβίδα, η οποία έπειτα από κάθε χρήση θερμαίνεται και αποστειρώνεται σε λυχνία Bunsen, τοποθετούνται οι ταινίες E-test. Τα τρυβλία επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες και αξιολογούνται (εικόνα 34). Λόγω της ευαισθησίας του μικροοργανισμού στο οξυγόνο, το οποίο έχει άμεση τοξική επίδραση στην βιωσιμότητα της βλαστικής μορφής του *C. difficile*, όλη η διαδικασία, από την στιγμή που η καλλιέργεια του μικροοργανισμού στο αιματούχο άγαρ θα εξέλθει από τις αναερόβιες συνθήκες έως την τοποθέτηση των E-test και την επώαση τους, θα πρέπει είτε να εκτελεσθεί σε αναερόβιες συνθήκες είτε σε σύντομο χρονικό διάστημα, λιγότερο από δύο ώρες, ώστε να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα του μικροοργανισμού.

Εικόνα 34 : Έλεγχος ευαισθησίας στελεχών σε αντιβιοτικά με E-test.



3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA EXTRACTION)

Το δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic Acid, DNA) περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν την βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και αρκετών ιών. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το περισσότερο γενετικό υλικό βρίσκεται στον πυρήνα και μικρές ποσότητες σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια.

Το γενετικό υλικό του *C. difficile* αποτελεί απαραίτητη πρώτη ύλη για την εφαρμογή μοριακών τεχνικών. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η απελευθέρωση του σε διαλυτή μορφή, μετά την ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και των μεμβρανών των κυτταρικών οργανιδίων όπως είναι οι πυρήνες και η απομόνωση του σε καθαρή μορφή. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης καθορίζεται από πολλές παραμέτρους όπως το αρχικό υλικό και το είδος (πχ χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδρικό, κτλ) (106). Απομόνωση γενετικού υλικού μπορεί να γίνει με χρήση απλών χημικών αντιδραστηρίων όπως SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) για την

λύση των κυτταρικών μεμβρανών, πρωτεΐνάση K που αποικοδομεί τις κυτταρικές πρωτεΐνες, διαλύματα αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης αιθανόλης για τον διαχωρισμό DNA από τις πρωτεΐνες και καθαρισμό του γενετικού υλικού με παγωμένη αιθανόλη 70%. Επίσης, απομόνωση γίνεται με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων που έχουν απλοποιήσει κατά πολύ την απομόνωση του γενετικού υλικού και βασίζεται στην επιλεκτική και παροδική πρόσδεση των μορίων DNA σε μια μεμβράνη με γέλη πυριτίου που βρίσκεται στο εσωτερικό κατάλληλης στήλης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης με αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης DNA.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η τεχνολογία των μαγνητικών σφαιριδίων για την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων που είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Το σύστημα εκτελεί αυτόματα όλα τα απαραίτητα βήματα, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την έκλυση του καθαρού γενετικού υλικού. Τα πλεονεκτήματα είναι η ελαχιστοποίηση του κινδύνου επιμόλυνσης, ο σύντομος χρόνος απομόνωσης (45 λεπτά) και η ελάχιστη τεχνογνωσία του χειριστή. Ενώ το αρκετά υψηλό κόστος αντιδραστηρίων και μηχανήματος αποτελούν μειονέκτημα (94).

Υπάρχουν διαφόρων ειδών μαγνητικά σφαιρίδια, που έχουν πυρήνα σιδήρου και φέρουν στη επιφάνεια τους κατάλληλη επικάλυψη για την δέσμευση των επιθυμητών μορίων. Τα μαγνητικά σφαιρίδια για την απομόνωση DNA έχουν συνήθως επικάλυψη διοξειδίου του πυριτίου, που επιτρέπει την ισχυρή πρόσδεση μορίων DNA υπό συνθήκες χαμηλού PH και υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Τα βήματα της απομόνωσης με χρήση αυτόματου μηχανήματος διαφέρουν ανά μηχανήμα αλλά τα βασικά περιλαμβάνουν την τοποθέτηση του δείγματος σε κατάλληλο σωληνάριο στην τράπεζα εργασίας του μηχανήματος, ανάδευση της κασέτας με τα προδιανεμημένα αντιδραστήρια και τοποθέτηση του στο μηχανήμα. Επιλογή του επιθυμητού προγράμματος απομόνωσης και παραλαβή των σωληναρίων με το καθαρό γενετικό υλικό. Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε σύστημα απομόνωσης Magtration® System 12GC PLUS με τα αντιδραστήρια Magtration Reagent MagDEA DNA 200 (GC).

ΥΛΙΚΑ

- Κασέτες προγεμισμένες με αντιδραστήρια
- Ρύγχη (tips)
- Υποδοχείς για ρύγχη
- Δοκιμαστικοί σωλήνες (tubes) 1,5ml με καπάκια
- Ισοπροπυλική αλκοόλη
- Αμπούλες στείρου φυσιολογικού ορού 3 ή 5ml
- Αποστερωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί

- Νεφελόμετρο για μέτρηση κλίμακας McFarland
- Αποστειρωμένα πουάρ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

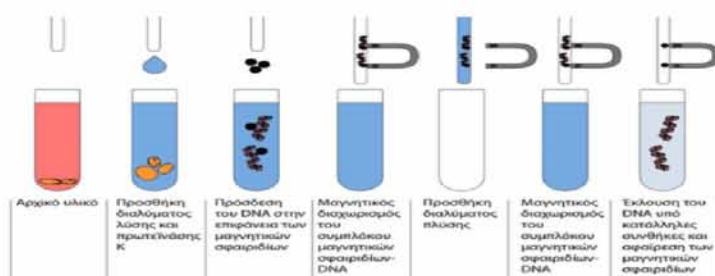
Από εικοσιτετράωση καλλιέργεια παρασκευάζουμε εναιώρημα θολερότητας 2-2,5 κλίμακας McFarland σε 1ml dH₂O. Ακολούθως, μετά από ήπια ανακίνηση τοποθετούμε την προγεμισμένη κασέτα στο μηχάνημα (εικόνα 35) και στις υποδεδειγμένες θέσεις τοποθετούμε σωληνάρια με το δείγμα, με ισοπροπυλική αλκοόλη αλλά και άδεια καθώς και ρύγχη με τους υποδοχείς τους. Επιλέγουμε με βάση τις οδηγίες τον τελικό όγκο έκλουσης του δείγματος (50μl ή 100μl), ξεκινά η έκλουση και για 6-12 δείγματα ο απαιτούμενος χρόνος είναι περίπου 45 λεπτά.

Η διαδικασία απομόνωσης συνοψίζεται στα στάδια: λύση του δείγματος παρουσία χαοτροπικών αλάτων και απορρυπαντικού, εφαρμογή μαγνητικού πεδίου και δέσμευση των μορίων DNA σε μαγνητικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου, απομάκρυνση των μη δεσμευμένων κυτταρικών στοιχείων, διαδοχικές πλύσεις για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων και τέλος έκλουση του καθαρού DNA σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα (94).

Εικόνα 35 : Κασέτα προγεμισμένη με αντιδραστήρια. Περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την απομόνωση του DNA (Ανατύπωση από : Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λυλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. Αθήνα, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/641>)



Εικόνα 36 : Στάδια απομόνωσης DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων. Αρχικά γίνεται λύση του δείγματος με κατάλληλο διάλυμα και πρωτεϊνάση K, προστίθενται μαγνητικά σφαιρίδια και εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο. Τα μόρια DNA προσροφώνται σε μαγνητικά σωματίδια και με διαδοχικές πλύσεις απομακρύνονται άλατα και αναστολείς (Ανατύπωση από : Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λυλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. Αθήνα, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/641>)



3.2.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.4.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αρχική ιδέα γεννήθηκε το 1983 από τον K.Mullis με την πρώτη δημοσίευση να ανακοινώνεται 2 χρόνια μετά και ο ίδιος να λαμβάνει το Νόμπελ Χημείας το 1993. Το περιοδικό Science το 1989 αναφέρει την PCR ως “το μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα” και την Taq DNA πολυμεράση ως “το μόριο της χρονιάς”.

Η κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής ιατρικής με αναρίθμητες ερευνητικές και διαγνωστικές εφαρμογές. Αποτελεί *in vitro* μέθοδο κλωνοποίησης και πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων αλληλουχιών γενετικού υλικού με απόκτηση μεγάλης ποσότητας DNA για μετέπειτα χειρισμούς όπως είναι η ηλεκτροφόρηση και η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων. Αποτελεί ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού έως και ένα τρισεκατομμύριο φορές.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά για 25 με 35 φορές σε θερμικό κυκλοποιητή (Thermal Cycler) που φέρει θερμαινόμενη πλάκα με δυνατότητα εναλλαγής θερμοκρασιών με ταχύτητα και ακρίβεια. Οι επιθυμητές θερμοκρασίες είναι ρυθμιζόμενες καθώς και η διάρκεια κάθε σταδίου. Εξαρτώνται από τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή. Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης εκτός από το αρχικό DNA είναι η DNA πολυμεράση, μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων, τουλάχιστον ένα ζευγάρι εκκινητών που καθορίζουν το μέγεθος των αντιγράφων του γενετικού υλικού καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα με στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και την δράση του ενζύμου.

Η DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο που επιτελεί τα επαναλαμβανόμενα βήματα του πολλαπλασιασμού. Καταλύει τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας διαβάζοντας την άθικτη αλυσίδα DNA την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας. Η δράση της ασκείται μόνο στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας με μοναδική κατεύθυνση επιμήκυνσης την κατεύθυνση 5'-3' και απαραίτητη προϋπόθεση την ύπαρξη ολιγονουκλεοτιδίων. Η ανακάλυψη της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, όπως η *Taq*, η οποία είναι ανθεκτική στην

υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης του γενετικού υλικού διατηρώντας την λειτουργία της διευκόλυνε την εκτέλεση της PCR. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο ζει σε θερμές πηγές με μέση θερμοκρασία 70-75°C. Το ένζυμο έχει δραστηριότητα 800bp/min στους 75°C και διάρκεια ημιζωής 40 λεπτών στους 95°C άρα έχει αντοχή στις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας της PCR.

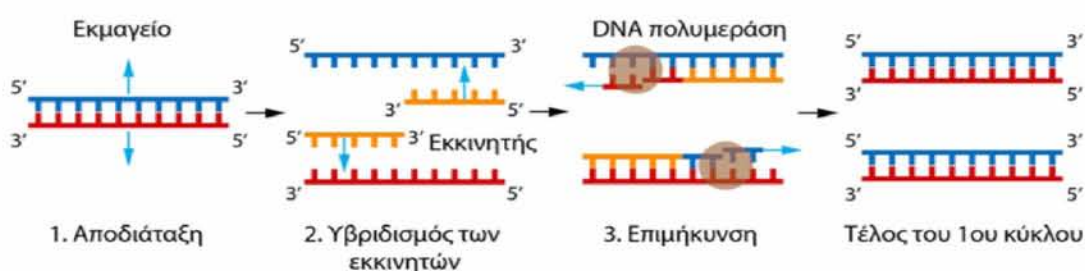
- Αποδιάταξη (denaturation): Οι δυο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται και διαχωρίζονται με θέρμανση στους 94-95°C για 10-15 λεπτά με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών της διπλής έλικας.
- Υβριδισμός (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται στους 55-65°C για 30-60 δευτερόλεπτα και οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες στο εκμαγείο του DNA, στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία ποικίλλει ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών.
- Επιμήκυνση (elongation) ή προέκταση (extension): Για την σύνθεση της νέας αλυσίδας η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C που αποτελεί την μέγιστη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000bp ανά λεπτό (94).
- Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 94-95°C για 30 δευτερόλεπτα, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν, να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης.

Η τεχνική της PCR έχει το βασικό πλεονέκτημα της σύντομης χρονικής διάρκειας. Με την τεχνική αυτή δίνεται η δυνατότητα παραγωγής περισσότερων από 10^5 αντιγράφων γνωστής αλληλουχίας γενετικού υλικού. Για 30 κύκλους μιας αντίδρασης απαιτούνται 3-6 ώρες. Η αντίδραση είναι εξαιρετικά ευαίσθητη με δυνατότητα παραγωγής του DNA-στόχου ακόμα και αν υπάρχει ένα μόνο αρχικό αντίγραφο. Παράγοντες που επιδρούν στην PCR είναι το δείγμα του DNA που είναι επαρκές σε ποσότητα λιγότερη του ενός μικρογραμμαρίου ολικού γενωμικού υλικού, η DNA πολυμεράση που έχει μεγάλη εξειδίκευση και αντοχή έως τους 72°C, η επιλογή των εκκινητών με βέλτιστο μήκος τις 20-26 βάσεις (bp) και περιεκτικότητα σε G και C 40-60%, η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} που αποτελεί μεταλλικό συμπράγοντα της DNA πολυμεράσης με μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στην ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης και συνήθη βέλτιστη συγκέντρωση 1.5mM, τη συγκέντρωση των dNTPs που κυμαίνεται μεταξύ 50-200μM, την παρουσία ενισχυτών και αναστολέων της αντίδρασης και ο αριθμός των κύκλων. Περίσσεια συγκέντρωσης των ιόντων Mg^{2+} θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις dNTPs μπορεί να οδηγήσουν

στην παραγωγή παραπροϊόντων. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C. Μεγάλες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες για την αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή. Αναστολείς της PCR είναι η φύση των βιολογικών δειγμάτων, η μέθοδος απομόνωσης του DNA, τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενετικού υλικού, ιοντικά επιφανειοδραστικά ενώ ενισχυτές είναι η γλυκερόλη, το φορμαμίδιο, κα.

Το κύριο προϊόν της PCR ονομάζεται **amplicon**. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος αντίδρασης διπλασιάζεται η αλληλουχία του DNA-στόχου με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του ειδικού προϊόντος (εικόνα 37). Το μήκος του προϊόντος αντιστοιχεί στην απόσταση που ορίζουν οι δύο εκκινητές και δεν μπορεί να υπερβεί τις 1000-1300 βάσεις.

Εικόνα 37 : Αρχή μεθόδου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Η αύξηση των προϊόντων είναι εκθετική γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο της PCR.



ΥΛΙΚΑ

- DNA από στελέχη *C. difficile* (μετά από DNA extraction)
- Water for Injection (WFI) – Στείρο απυρετογόνο H₂O
- *Taq* DNA πολυμεράση
- *Taq* Buffer + KCl (ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης)
- MgCl₂
- Εκκινητές (Primer Forward, Primer Reverse)
- Μείγμα dNTPs (δεοξυνουκλεοτίδια)
- Θερμοκυκλοποιητής - Thermal Cycler
- Συσκευή κάθετου νηματικής ροής κλάσης II
- Αυτόματος αναδευτήρας Vortex
- Σωληνάρια Eppendorf για PCR
- Αυτόματα σιφώνια-Πιπέτες
- ποστειρωμένα ρύγχωι
- Φυγόκεντρος

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την εκτέλεση έκαστης αντίδρασης PCR απαιτείται η παρασκευή μείγματος (mastermix) των συστατικών της αντίδρασης με συγκεκριμένη ποσότητα πολλαπλάσια του αριθμού των δειγμάτων υπολογίζοντας πάντα ένα θετικό και έναν αρνητικό μάρτυρα (πίνακας 6). Η ανάμειξη γίνεται σε Eppendorf με ήπια ανάδευση σε Vortex και μοιράζεται σε tubes (45μL/tube) και προστίθεται 5μL DNA από κάθε στέλεχος ώστε ο τελικός όγκος αντίδρασης έκαστου δείγματος να είναι 50μL. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται γνωστό στέλεχος και ως αρνητικός αποστειρωμένο H₂O. Όλα τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα με συνθήκες επιλογής του ερευνητή και αναλόγως τις απαιτήσεις της αντίδρασης.

Πίνακας 6 : Ακριβής σύνθεση μείγματος αντίδρασης PCR με τελικό όγκο αντίδρασης 50μL

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ | ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL) |
|-------------------------|---------------|
| Taq Buffer + KCl | 5 |
| MgCl ₂ | 3 |
| Μείγμα dNTPs | 1 |
| Primer Forward (F) | 0,5 |
| Primer Reverse (R) | 0,5 |
| Taq DNA πολυμεράση | 0,4 |
| WFI | 34,6 |
| DNA <i>C. difficile</i> | 5 |
| ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ | 50 |

3.2.4.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΞΙΝΩΝ

Στην παρούσα μελέτη το σύνολο των στελεχών *C. difficile*, ανεξάρτητα από τον αρχικό έλεγχο με ανοσοχρωματογραφία για παραγωγή τοξίνης, ελέγχθηκε σε μοριακό επίπεδο με την εφαρμογή PCR για την έκφραση των γονιδίων *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* και *cdtB* που κωδικοποιούν τις τοξίνες A, B και δυαδική (Binary). Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Taq DNA πολυμεράση FERMENTAS και οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή BIORAD. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των προαναφερθέντων γονιδίων καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης αναφέρονται στον πίνακα 7. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR εξετάστηκαν με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2% μετά από ανάμειξη με χρωστική ουσία και απεικονίστηκαν με τη χρήση υπεριώδους φωτός (UV

illumination) βάση της τεχνικής ηλεκτροφόρησης που θα αναφερθεί στην συνέχεια.

Πίνακας 7 : Αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια στόχους και μέγεθος προϊόντος PCR (Ανατύπωση από : PLoS One. 2016 Mar 24;11(3):e0151964.doi: 10.1371/journal.pone.0151964. eCollection 2016. Molecular Characterization of *Clostridium difficile* Isolates from Human Subjects and the Environment. Tian TT et al)

| ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΟΜΩΝΥΜΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (5'-3') | ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (bp) |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| <i>tcdA</i> Forward | GCA TGA TAA GGC AAC TTC AGT GGT A | 629 |
| <i>tcdA</i> Reverse | AGT TCC TCC TGC TCC ATC AAA TG | |
| <i>tcdB</i> Forward | CCA AAR TGG AGT GTT ACA AAC AGG TG | 410 |
| <i>tcdB</i> Reverse A | GCA TTT CTC CAT TCT CAG CAA AGT A | |
| <i>tcdB</i> Reverse B | GCA TTT CTC CGT TTT CAG CAA AGT A | |
| <i>cdtA</i> Forward A | GGG AAG CAC TAT ATT AAA GCA GAA GC | 221 |
| <i>cdtA</i> Forward B | GGG AAA CAT TAT ATT AAA GCA GAA GC | |
| <i>cdtA</i> Reverse | CTG GGT TAG GAT TAT TTA CTG GAC CA | |
| <i>cdtB</i> Forward | TTG ACC CAA AGT TGA TGT CTG ATT G | 262 |
| <i>cdtB</i> Reverse | CGG ATC TCT TGC TTC AGT CTT TAT AG | |

3.2.4.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *C. difficile* ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Στην παρούσα μελέτη το σύνολο των στελεχών *C. difficile* που βρέθηκαν ανθεκτικά, μετά τον έλεγχο ευαισθησίας με ταινίες E-test, στα αντιβιοτικά ερυθρομυκίνη ή/και κλινδαμυκίνη και τετρακυκλίνη ελέγχθησαν για την παρουσία των γονιδίων, *ermB* και *tetM* αντίστοιχα, που σχετίζονται με την αντοχή στα αντιμικροβιακά αυτά. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Taq* DNA πολυμεράση FERMENTAS και οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των προαναφερθέντων γονιδίων καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης αναφέρονται στον πίνακα 10 ενώ η σύνθεση των μειγμάτων και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης των αντιδράσεων στον πίνακα 6 (παράγραφος 3.2.4.1 – όπου Forward και Reverse οι αντίστοιχοι εκκινητές) και 11 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR εξετάσθηκαν με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2% μετά από ανάμειξη με χρωστική

ουσία και απεικονίστηκαν με τη χρήση υπεριώδους φωτός (UV illumination) βάση της τεχνικής ηλεκτροφόρησης που θα αναφερθεί στην συνέχεια.

Πίνακας 10 : Εκκινητές για ανίχνευση γονιδίων *ermB* και *tetM* που σχετίζονται με αντοχή σε ερυθρομυκίνη/κλινδαμυκίνη και τετρακυκλίνη.

1. Villasenor-Sierra et al, 2012, Int J Infect Dis, Mar; 16(3).
2. Κοτρώτσιου Δήμητρα, «Φαινοτυπική και γονοτυπική μελέτη της ανθεκτικότητας του *Ureoplasma urealyticum* στη Βόρεια Ελλάδα, 2013.

| ΓΟΝΙΔΙΟ ΣΤΟΧΟΣ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (5'-3') | ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΝΤΟΣ (bp) |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <i>ermB</i> F ¹ | CGA GTG AAA AAG TAC TCA ACC | 652 |
| <i>ermB</i> R ¹ | CTT GCT CAT AAG TAA CGG TAC | |
| <i>tetM</i> F ² | TTA TCA ACG GTT TAT CAG G | 379 |
| <i>tetM</i> R ² | CGT ATA TAT GCA AGA CG | |

Πίνακας 11 : Α) Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *ermB*.

Β) Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *tetM*.

A)

| | |
|-------------------|---------------|
| ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ | 95 °C, 5 min |
| ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ | 95 °C, 60 sec |
| ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗ | 52 °C, 60 sec |
| ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ | 72 °C, 60 sec |
| ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΚΛΩΝ | 34 |
| ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ | 72 °C, 6 min |

B)

| | |
|-------------------|---------------|
| ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ | 95 °C, 5 min |
| ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ | 95 °C, 60 sec |
| ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗ | 52 °C, 45 sec |
| ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ | 72 °C, 45 sec |
| ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΚΛΩΝ | 40 |
| ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ | 72 °C, 6 min |

Επιπλέον, τα στελέχη με αντοχή στις κινολόνες ελέγχθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων στην περιοχή καθορισμού αντοχής των φθοριοκινολονών QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) είτε στην GyrA είτε στην GyrB υπομονάδα της DNA γυράσης.

Τα στελέχη συγκρίθηκαν με την πρότυπη αλληλουχία *C. difficile* CD196 (107). Απαραίτητη προϋπόθεση η ενίσχυση της αλληλουχίας των περιοχών αυτών με PCR. Έτσι αναζητήθηκαν και

ενισχύθηκαν τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* που κωδικοποιούν τις περιοχές αυτές ενώ στην συνέχεια έγινε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών GYRA και GYRB, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια. Για την PCR οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των προαναφερθέντων γονιδίων καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 12 (108) ενώ η σύνθεση των μειγμάτων και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης των αντιδράσεων στον πίνακα 6 (παράγραφος 3.2.4.1 – όπου Forward και Reverse οι αντίστοιχοι εκκινητές) και 13 αντίστοιχα.

Πίνακας 12 : Εκκινητές για ανίχνευση γονιδίων *gyrA* και *gyrB* που κωδικοποιούν τις περιοχές GyrA και GyrB στις οποίες οι μεταλλάξεις σχετίζονται με αντοχή στις φθοριοκινολόνες.

| ΓΟΝΙΔΙΟ ΣΤΟΧΟΣ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (5'-3') | ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΝΤΟΣ (bp) |
|----------------|---------------------------------|-----------------------|
| <i>gyrA</i> F | AAT GAG TGT TAT AGC TGG ACG | 390 |
| <i>gyrA</i> R | TCT TTT AAC GAC TCA TCA AAG TT | |
| <i>gyrB</i> F | AGT TGA TGA ACT GGG GTC TT | 390 |
| <i>gyrB</i> R | TCA AAA TCT TCT CCA ATA CCA | |

Πίνακας 13 : Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *gyrA* και *gyrB*.

| | |
|-------------------|---------------|
| ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ | 95 °C, 5 min |
| ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ | 95 °C, 60 sec |
| ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗ | 52 °C, 45 sec |
| ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ | 72 °C, 60 sec |
| ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΚΛΩΝ | 38 |
| ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ | 72 °C, 6 min |

3.2.4.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MULTILOCUS SEQUENCE TYPING, MLST

Η Τυποποίηση Πολυτοπικού Προσδιορισμού Αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) είναι μια μέθοδος τυποποίησης στελεχών σε μοριακό επίπεδο με ευρεία επιδημιολογική εφαρμογή. Προτάθηκε το 1998 ως μια παγκόσμια μέθοδος για τον χαρακτηρισμό βακτηρίων με αφορμή αρχικά την *Neisseria meningitidis* (109). Η διάδοση της έγινε εφικτή χάρη στην εξέλιξη της μοριακής μικροβιολογίας με την ευρεία διαθεσιμότητα και την μείωση του κόστους του

καθορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και την παροχή ελεύθερων βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών συνεχώς ενημερωμένων μέσω διαδικτύου. Οι βάσεις αυτές λειτουργούν ως “κοινή” γλώσσα που επιτρέπει παγκόσμια την σύγκριση βακτηριακών στελεχών.

Η μέθοδος MLST βασίζεται στην ανεύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (nucleotide sequence) εσωτερικής περιοχής επτά γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες βασικού μεταβολισμού του μικροοργανισμού και είναι διατηρημένα, ενώ βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα του είδους και δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής. Το μέγεθος των θραυσμάτων κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 450-500bp και είναι τέτοιο ώστε να μπορεί να αλληλουχηθεί με ακρίβεια και στους δύο κλώνους με έναν αυτοματοποιημένο DNA αλληλουχητή. Για κάθε γονιδιακό κομμάτι υπάρχει η πιθανότητα προσδιορισμού διαφορετικής αλληλουχίας που χαρακτηρίζεται ως ξεχωριστό αλληλόμορφο/αλλήλιο και συγκρίνεται με πρότυπες αλληλικές κατατομές ώστε κάθε στέλεχος να καθορίζεται από τα αλληλόμορφα των επτά γονιδίων που καθορίζουν το αλληλικό προφίλ ή τον τύπο αλληλουχίας (allelic profile ή sequence type, ST). Στελέχη με τον ίδιο ST θεωρούμε ότι ανήκουν στον ίδιο κλώνο.

Το πλεονέκτημα της MLST είναι ότι τα αποτελέσματα αλληλούχισης μπορούν εύκολα να συγκριθούν με εκείνα μιας μεγάλης βάσης δεδομένων οπότε ο υποκειμενικός παράγοντας, όπως η σύγκριση μεγεθών τμημάτων DNA σε gel, εξαλείφεται και το αποτέλεσμα δεν είναι διφορούμενο. Η εφαρμογή κατευθείαν στο κλινικό δείγμα ενισχύοντας με PCR τα επτά γονίδια αποτελεί πλεονέκτημα της μεθόδου.

Τα δείγματα της MLST, στη συγκεκριμένη μελέτη, δουλεύτηκαν βάση της διαδικασίας που περιγράφεται από τον Griffiths et al (28). Αρχικά γίνεται απομόνωση μικροοργανισμού, ταυτοποίηση σε είδος, απομόνωση γενετικού υλικού και ενίσχυση εσωτερικού τμήματος των γονιδίων. Τα γονίδια στόχος για το *C. difficile* ήταν τα : *adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sod* και *tpi* (πίνακας 14). Για την αντίδραση ενίσχυσης των γονιδίων χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές (πίνακας 14) καθώς και συνθήκες αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης. Για τα έξι από τα επτά γονίδια οι συνθήκες ήταν ίδιες εκτός από το γονίδιο *tpi* που απαιτούσε υψηλότερη θερμοκρασία αναδιάταξης ώστε να κάνει πιο ειδική σύνδεση με τον εκκινητή και να μειωθεί το ποσοστό παραπροϊόντων. Για κάθε γονίδιο παρασκευάστηκε ξεχωριστό μείγμα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το καθένα. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Taq* DNA πολυμεράση και ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 50μL (πίνακας 6). Τα ενισχυμένα προϊόντα μαζί με τους αντίστοιχους εκκινητές τους στάλθηκαν σε εξειδικευμένο εργαστήριο για αλληλούχιση. Οι αλληλουχίες που αναγνώστηκαν καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων της τεχνικής MLST www.pubmlst.org για να προκύψει ο ST.

Πίνακας 14 : Εκκινητές για MLST *C. difficile* και μέγεθος προϊόντων (Ανατύπωση από :Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile* – David G, et al – Journal Of Clinical Microbiology, Mar 2012, p 770-778)

| Γονίδιο Στόχος | Εκκινητής | Αλληλουχία εκκινητή (5'-3') | Προϊόν (bp) |
|----------------|-----------|--------------------------------|-------------|
| <i>adk</i> | adk1F | TTA CTT GGA CCT CCA GGT GC | 635 |
| | adk1R | TTT CCA CTT CCT AAG GCT GC | |
| <i>atpA</i> | atpA1F | TGA TGA TTT AAG TAA ACA AGC TG | 674 |
| | atpA1R | AAT CAT GAG TGA AGT CTT CTC C | |
| <i>dxr</i> | dxr3F | GCT ACT TTC CAT TCT ATC TG | 525 |
| | dxr4R | CCA ACT CTT TGT GCT ATA AA | |
| <i>glyA</i> | glyA1F | ATA GCT GAT GAG GTT GGA GC | 625 |
| | glyA1R | TTC TAG CCT TAG ATT CTT CAT C | |
| <i>recA</i> | recA2F | CAG TAA TGA AAT TGG GAG AAG C | 705 |
| | recA2R | ATT CAG CTT GCT TAA ATG GTC | |
| <i>sodA</i> | sodA5F | CCA GTT GTC AAT GTA TTC ATT TC | 585 |
| | sodAR | ATA ACT TCA TTT GCT TTT ACA CC | |
| <i>tpi</i> | tpi2F | ATG AGA AAA CCT ATA ATT GCA G | 640 |
| | tpi2R | TTG AAG GTT TAA CAC TTC CAC C | |

ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ MLST ΓΙΑ ΤΟΝ *C. difficile*

adk :

Πρωτεΐνη : adenylate kinase

Λειτουργία: Καταλύει την αναστρέψιμη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας μεταξύ ATP και AMP. Παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της κυτταρικής ενεργειακής ομοιόστασης και στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων αδενίνης.

Καταλυτική δράση : $ATP + AMP = 2 ADP$

atpA :

Πρωτεΐνη : ATP συνθάση της υπομονάδας A

Λειτουργία : Παράγει ATP από ADP παρουσία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης. Η άλφα αλυσίδα είναι ρυθμιστική υπομονάδα.

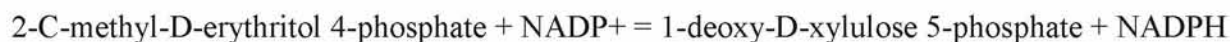
Καταλυτική δράση : $ATP + H_2O + H^+ = ADP + \text{poshate} + H^+$

dxr :

Πρωτεΐνη : 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase

Λειτουργία : Καταλύει την NADP-εξαρτώμενη αναδιάταξη και αναγωγή της 1-deoxy-D xylulose-5-phosphate (DXP) σε 2-C-methyl D-erythritol 4-phosphate (MEP)

Καταλυτική δράση :

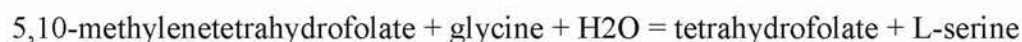


glyA :

Πρωτεΐνη : Serine hydroxymethyltransferase

Λειτουργία : Καταλύει την αναστρέψιμη ενδομετατροπή της σερίνης και γλυκίνης με τετραϋδροφολικό (THF) που χρησιμεύει ως μεταφορέας ενός ατόμου άνθρακα. Αυτή η αντίδραση είναι η κύρια πηγή μονο-άνθρακα για την βιοσύνθεση πουρινών, μεθειονίνης και άλλων σημαντικών βιομορίων.

Καταλυτική δράση :



recA :

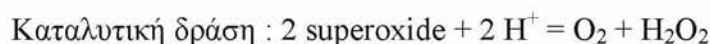
Πρωτεΐνη : RecA (Recombinase A)

Λειτουργία : Μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση του ATP παρουσία μονόκλωνου DNA, την ATP-εξαρτώμενη πρόσληψη μονόκλωνου DNA από δίκλωνο DNA και την ATP-εξαρτώμενη υβριδοποίηση ομόλογων μονόκλωνων DNA. Αλληλεπιδρά με LexA προκαλώντας την ενεργοποίηση του και στη συνέχεια στην αυτοκαταλυτική του διάσπαση.

sodA :

Πρωτεΐνη : Superoxide dismutase (Δισμουτάση της υπεροξειδάσης)

Λειτουργία : Καταστρέφει τις ρίζες που παράγονται φυσιολογικά μέσα στα κύτταρα και είναι τοξικές για τα βιολογικά συστήματα.



tpi :

Πρωτεΐνη : Triosephosphate isomerase (Τριφωσφορική ισομεράση)

Λειτουργία : Εμπλέκεται στη νεογλυκογένεση. Καταλύει στερεοειδικά τη μετατροπή της φωσφορικής διυδροξυακετόνης (DHAP) σε 3-φωσφορική D γλυκεραλδεϋδη (G3P)

Καταλυτική δράση: D-glyceraldehyde 3-phosphate = glyceraldehyde 3-phosphate.

(Οι πληροφορίες όπως αναφέρονται στο www.uniprot.org)

3.2.4.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για την απομάκρυνση των προσμίξεων της αντίδρασης, δηλαδή των υπολειμμάτων των εκκινητών, των dNTPs, του ενζύμου και των αλάτων, είναι απαραίτητος ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισης τους. Στην παρούσα μελέτη ο καθαρισμός έγινε με βάση τις οδηγίες του Pure Link PCR Purification Kit της Invitrogen.

ΥΛΙΚΑ

- Binding Buffer (B2) με ισοπροπανόλη
- Wash Buffer (W1) με αιθανόλη
- Elution Buffer Q 10mM Tris-HCl, pH 8,5
- Προϊόντα PCR
- Αυτόματες πιπέτες και ρύγχοι
- Φυγόκεντρος Mini Spin
- Σωληνάκια περισυλλογής (Collection tubes – 1,7 ml)
- Σωληνάρια έκλουσης (Elution tubes)
- Συσκευή Vortex

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τα βήματα που ακολουθούν αποτελούν το το συνιστόμενο πρωτόκολλο καθαρισμού του κατασκευαστή:

1) ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΟΥ DNA

Κάθε δείγμα PCR πριν φτάσει για καθαρισμό ηλεκτροφορείται, όπως θα δούμε στη συνέχεια. Έτσι αντί για τελικό όγκο 50μL υπολογίζουμε 40-45μL και σε αυτή την ποσότητα προσθέτουμε τον τετραπλάσιο όγκο Binding Buffer (B2) με ισοπροπανόλη και αναδεύουμε επαρκώς. Το δείγμα μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρωσης PureLink PCR, όπου και δεσμεύεται στο δείγμα στη στήλη και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.500 rpm απορρίπτοντας στη συνέχεια το διήθημα.

2) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

Σε κάθε στήλη προστέθηκαν 650μL Washing Buffer με αιθανόλη και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 11.500 rpm απορρίπτοντας στη συνέχεια το διήθημα. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά στις 13.400 rpm για την απομάκρυνση υπολειμμάτων Washing Buffer και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης κάθε

στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης PureLink (1,7ml) και οι προηγούμενοι σωλήνες απορρίπτονται.

3) ΕΚΛΟΥΣΗ ΤΟΥ DNA

Στο τελικό στάδιο, προστίθενται 50μL Elution Buffer (E1) στο κέντρο κάθε στήλης για να αποδεσμευθεί όλη η ποσότητα του γενετικού υλικού από την στήλη και επωάζεται για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 4 λεπτά στις 13.400 rpm. Τελικά κάθε στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που απομένει περιέχει καθαρό το προϊόν της PCR το οποίο ηλεκτροφορείται για επιβεβαίωση της παρουσίας του. Τα καθαρισμένα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -20°C και να χρησιμοποιηθούν για αλληλούχιση.

3.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθος, το φορτίο, τη στερεοδιάταξη τους και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η αρχική ιδέα για ανάλυση του DNA με ηλεκτροφόρηση ήρθε από τον Vin Thorne, έναν βιοχημικό /ιολόγο, τη δεκαετία του '60 στη Γλασκώβη. Το υλικό ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το είδος και το μέθοδος του δείγματος. Έτσι για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ή μικρών μορίων χρησιμοποιείται πηκτή ακρυλαμίδης, για μεγάλα μόρια νουκλεϊνικών οξέων πάνω από 100 βάσεις χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης ενώ για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης η πηκτή αμύλου. Πρόκειται για απλή, γρήγορη και οικονομική τεχνική ικανή να διαχωρίζει μείγματα θραυσμάτων DNA τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες μεθόδους.

Το άγαρ απομονώνεται από φύκη (red algae) και αποτελείται από αγαρόζη και αγαροπηκτίνη. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose & L-galactopyranose). Το ουδέτερο φορτίο καθώς και η χαμηλού βαθμού χημική πολυπλοκότητα της αγαρόζης την καθιστούν ιδανικό υλικό επιδρά με βιομόρια. Η πηκτή από καθαρή αγαρόζη έχει σχετικά μεγάλους πόρους και επιτρέπει έτσι το διαχωρισμό μεγάλων μορίων. Τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι τα μικρότερα τμήματα κινούνται περισσότερο γιατί διαπερνούν πιο εύκολα τους πόρους της πηκτής. Τα νουκλεϊκά οξέα, μετακινούνται από αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια λόγω του αρνητικού φορτίου τους. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και με τη χρήση ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA.

Στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% για την ηλεκτροφόρηση όλων των προϊόντων PCR, πριν και μετά τον καθαρισμό του προϊόντος.

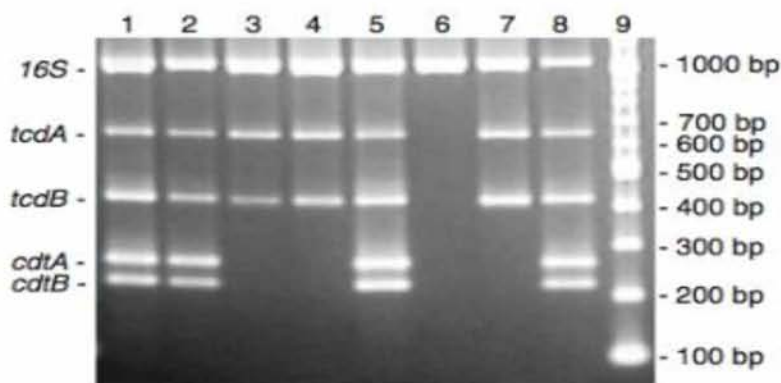
ΥΛΙΚΑ

- Water for Injection
- Διάλυμα TBE (Tris-Boric Acid-EDTA)
- Σκόνη αγαρόζης
- Φαρμακευτικός ζυγός
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Αυτόματες πιπέτες και ρύγχοι
- Δείκτης γνωστών μοριακών βαρών GeneRuler 100bp DNA Ladder, 0,1μg/μl
- Χρωστική DNA loading dye (Κυανό της βρωμοφαινόλης)
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας UV
- Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου, EtBr 10mg/ml
- Εκμαγείο και “χτενάκια” για στερεοποίηση του πηκτώματος
- Κωνική φιάλη
- Φούρνος Μικροκυμάτων

ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Για την παρασκευή του διαλύματος TBE 0,5X αναμειγνύουμε σε αναλογία 950ml WFI με 50 ml TBE 10X.
- Σε κωνική φιάλη αναμειγνύουμε 150 ml με 1,5 gr αγαρόζης ώστε να προκύψει διάλυμα 1%. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι διαύγασης και διάλυσης της αγαρόζης.
- Προστίθενται 8-10 ml EtBr και αναδεύεται ήπια.
- Τοποθετούνται τα χτενάκια στο εκμαγείο για τη δημιουργία βυθισμάτων υποδοχής του DNA και αποχύνεται προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
- Αφού στερεοποιηθεί αφαιρούνται τα χτενάκια και το πήκτωμα είναι έτοιμο για χρήση.
- Εντός της συσκευής ηλεκτροφόρησης υπάρχει διάλυμα TBE 0,5X στο οποίο εμβαπτίζουμε το πήκτωμα με τα βυθίσματα προς τον αρνητικό πόλο.
- 4μl DNA από κάθε δείγμα αναμειγνύονται με 1μl χρωστικής, Κυανό της Βρωμοφαινόλης, και ακολουθήση η «φόρτωση» των δειγμάτων στα βυθίσματα. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων προστίθεται μάρτυρας μοριακού βάρους.
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 160 Volts και ένταση 50 mA για 20 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα “αναγνώσθηκε” σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφήθηκε από την ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή. (παράδειγμα ηλεκτροφόρησης σε εικόνα 39).

Εικόνα 39 : Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης τοξινών *C. difficile* (Ανατύπωση από : New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B and the binary toxin genes applied to a Danish strain collection- Persson S, Torpdahl M, and Olsen KEP. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:1057-1064)



3.2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ, Sequencing)

Η ανάπτυξη των κατάλληλων μεθόδων έδωσε τη δυνατότητα διαβάσματος βάση προς βάση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA. Η επικρατέστερη και διασημότερη μέθοδος αλληλούχισης, έως και σήμερα, ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του '70. Πρόκειται για ενζυμική μέθοδο αλληλούχισης με «τερματισμό επιμήκυνσης της αλυσίδας» με την βοήθεια τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων που ανακάλυψε ο Βρετανός F.Sanger που τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1980 και η μέθοδος φέρει το όνομα του.

Η τεχνική στηρίζεται στη χρήση τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων, των τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) τα οποία στην θέση 3' της δεοξυριβόζης φέρουν υδρογόνο αντί για υδροξύλιο και έτσι δεν διαθέτουν 3'-OH ομάδα για το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού. Έτσι, ενώ τα dNTPs ενσωματώνονται φυσιολογικά στη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA μέσω των 5' τριφωσφορικών ομάδων τους δεν επιτρέπουν την ενσωμάτωση επόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου. Κάθε δείγμα DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί υποβάλλεται σε μια τροποποιημένη PCR, που αποτελείται από τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις. Σε κάθε αντίδραση PCR προστίθεται το μόριο DNA προς αλληλούχιση (που λειτουργεί ως εκμαγείο DNA), ένας εκκινητής, πολυμεράση, τα τέσσερα dNTPs και ένα διαφορετικό κάθε φορά ραδιοσημασμένο ddNTP. Καθώς τα dNTPs είναι σε περίσσεια στην αντίδραση, το διδεοξυνουκλεοτίδιο ενσωματώνεται τυχαία σε διάφορες θέσεις του μορίου DNA, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μίγμα τμημάτων DNA, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης του ddNTP. Τελικά, ο εντοπισμός των τμημάτων γίνεται με τη χρήση σημασμένου dATP με ^{32}P . Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με ικανότητα διαχωρισμού

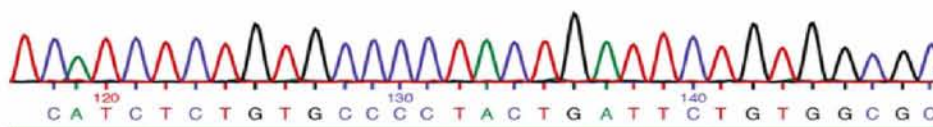
κομματιών DNA που διαφέρουν μόνο κατά μια βάση. Με αποτύπωση της ηλεκτροφόρησης και καταγραφή των ζωνών προϊόντων ανάλογα με το μέγεθος και το ddNTP διαβάζεται η αλληλουχία. Είναι μέθοδος χρονοβόρα και επικίνδυνη λόγω των ραδιενεργά σημασμένων μορίων.

Πλέον υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αυτόματα συστήματα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων. Η βασική αρχή παραμένει η ίδια. Η διαφορά είναι στη χρήση φθορίζουσών χρωστικών για την σήμανση των διδεοξυνουκλεοτιδίων και η χρήση τριχοειδών σωλήνων για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης. Τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (το καθένα σημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική) προστίθενται όλα μαζί στην PCR και ενσωματώνονται τυχαία σε διαφορετικά σημεία της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας. Με την ενσωμάτωσή τους εμποδίζουν την περαιτέρω επέκταση της αλυσίδας DNA. Έτσι, δημιουργούνται κομμάτια DNA που διαφέρουν κατά μία βάση και το καθένα «έχει διαφορετικό χρώμα», ανάλογα με τη χρωστική του ddNTP, που έχει ενσωματωθεί στην τελική βάση. Όλα τα προϊόντα κάθε δείγματος ηλεκτροφορούνται σε ένα τριχοειδές. Τα επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική μόρια DNA αναγνωρίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή. Το σύστημα ανίχνευσης λειτουργεί με λέιζερ, το οποίο διεγείρει τη χρωστική που είναι προσδεσμένη σε κάθε ddNTP στο άκρο κάθε τμήματος DNA. Η κάθε χρωστική εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος. Ειδικοί αισθητήρες καταγράφουν τα σήματα και με χρήση κατάλληλου αλγόριθμου αποδίδεται η βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος DNA. Η αλληλουχία του DNA αναπαριστάται σε ένα χρωματογράφημα, όπου απεικονίζεται η ένταση καθενός από τα φθορίζοντα σήματα ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης. Κάθε βάση αναπαριστάται ως μια καμπύλη διαφορετικού χρώματος (εικόνα 40 και 41) (110).

Εικόνα 40 : Αναπαράσταση της ενζυμικής μεθόδου αλληλούχισης κατά Sanger. Α) Συστατικά αντίδρασης αλληλούχισης Β) Σύστημα ανίχνευσης αναγνωρίζει την χρωστική, και άρα την αντίστοιχη βάση, που φέρει κάθε προϊόν στο 3' άκρο του.



Εικόνα 41 : Χρωματογράφημα αλληλούχισης κατά Sanger. Κάθε ένα από τα τέσσερα χρώματα αντιστοιχεί σε διαφορετική βάση.



Στη μελέτη των στελεχών *C. difficile* η ανάγνωση των αλληλουχιών και η στοίχιση-ευθυγράμμιση τους (sequence alignment) έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Tamura et al, 2007). Η επεξεργασία αυτή καθιστά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώσιμες και συγκρίσιμες. Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων της τεχνικής MLST www.pubmlst.org και ανάλογα τους αποδόθηκε ένα αριθμός αλληλομόρφου. Οι επτά αριθμοί που προέκυψαν από τη σύγκριση των αλληλουχιών, αντιστοιχώντας στα επτά γονίδια της MLST, αποτέλεσαν το χαρακτηριστικό προφίλ για κάθε στέλεχος. Αυτός ο συνδιασμός υποβλήθηκε στη βάση δεδομένων www.pubmlst.org και αποδόθηκε ένας αριθμός που αντιστοιχεί τον τύπο αλληλουχίας, ST.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ–ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη το πειραματικό υλικό αποτέλεσαν 36 στελέχη *C. difficile* που απομονώθηκαν από διαρροϊκά κόπρανα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Γ.Ν.Λ) και επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση μεταξύ του συνόλου των στελεχών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια ενός έτους (2015).

Εν συντομία στο εργαστήριο προσεκομίσθησαν συνολικά 622 δείγματα κοπράνων από νοσηλευόμενους ασθενείς διαφόρων κλινικών του Π.Γ.Ν.Λ, οι οποίοι εκδήλωσαν διάρροια κατά τη νοσηλεία τους. Για τα δείγματα αυτά το πρωτοκόλλου διερεύνησης λοίμωξης από CDI περιλαμβάνει ανίχνευση του αντιγόνου της γλουταμινικής δεϋδρογενάσης (GHD) με ανοσοχρωματογραφία. Ταυτόχρονα το τεστ ανιχνεύει και την παρουσία τοξινών στα κόπρανα Α και Β, ένδειξη λοίμωξης από CDI. Σε όσα από τα δείγματα το αντιγόνο GHD ήταν θετικό, ανεξάρτητα από την ανίχνευση τοξινών ακολούθησε καλλιέργεια σε χρωμογόνο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό και σε αιματούχο θρεπτικό υλικό σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν βάση της ανάπτυξης στο εκλεκτικό υλικό, της Gram χρώσης και της χαρακτηριστικής μορφολογίας και οσμής των καλλιεργημάτων.

Τα 36 δείγματα απομονώθηκαν εξίσου από τα δύο φύλα ενώ τα περισσότερα δείγματα προήλθαν από τις παθολογικές κλινικές του νοσοκομείου. Θετικά για *C. difficile* δείγματα από τι τη Γαστρεντερολογική και Πνευμονολογική κλινική ενώ σπανιότερα δείγματα από τις κλινικές Χειρουργική, Νεφρολογική, Ογκολογική, Αιματολογική, κα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εξαιρετικά μικρό ποσοστό θετικών δειγμάτων από τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας.

4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα προς μελέτη στελέχη έγινε σε 9 αντιβιοτικά (Βανκομυκίνη, Μετρονιδαζόλη, Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Τετρακυκλίνη, Ριφαμπικίνη, Λεβοφλοξασίνη, Σιπροφλοξασίνη και Μοξιφλοξασίνη) με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού, E-test Biomeriaux, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η ερμηνεία και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε βάση των κατευθυντήριων οδηγιών της CLSI για αναερόβια βακτήρια, πίνακας 16.

Πίνακας 16 : Όρια ευαισθησίας και αντοχής (1: CLSI 2015, 2:Spigaglia et al,2011, 3:Spigaglia et al,2008)

| E-tests | MIC Interpretive Criteria (g/ml), CLSI | | |
|----------------------------|--|-----|----|
| | S | I | R |
| Clinamycin ¹ | 2 | 4 | 8 |
| Moxifloxacin ¹ | 2 | 4 | 8 |
| Tetracycline ¹ | 4 | 8 | 16 |
| Metronidazole ¹ | 8 | 16 | 32 |
| Erythromycin ² | 2 | 4 | 8 |
| Ciprofloxacin ³ | 2 | 4 | 8 |
| Levofloxacin ³ | 2 | 4 | 8 |
| Vancomycin ² | 2 | 4-8 | 16 |
| Rifampicin ² | 1 | 2 | 4 |

Από τον έλεγχο της αντιμικροβιακής αντοχής προκύπτει ότι το σύνολο των στελεχών ήταν ευαίσθητα στην μετρονιδαζόλη και στην βανκομυκίνη ενώ αντίθετα παρατηρείται αντοχή στις φθοριοκινολόνες με το ποσοστό της σιπροφλοξασίνης να είναι 100% ενώ της μοξιφλοξασίνης και της λεβοφλοξασίνης 78% και 94,5% αντίστοιχα. Επίσης το ποσοστό αντοχής που προέκυψε για την ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη ήταν παρόμοιο, 75%, ενώ ενδιαφέρον είναι ότι τα 23 από τα 36 (64%) στελέχη είχαν ταυτόχρονη αντοχή σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη. Η MIC στα στελέχη αυτά βρέθηκε >256g/ml και για τα δυο αντιβιοτικά. Αντίστοιχα το ποσοστό αντοχής στην τετρακυκλίνη και στην ριφαμπικίνη είναι παρόμοιο, με 16 από τα 36 στελέχη να παρουσιάζουν αντοχή, αριθμός που αντιστοιχεί στο 44,5% των δειγμάτων. Τέλος προκύπτει ότι όλα τα στελέχη εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Συγκεκριμένα το 16,7% είχαν αντοχή σε ένα και το 22,2% σε δύο αντιμικροβιακούς παράγοντες ενώ το 72,2% εμφάνισε αντοχή σε τρεις ή περισσότερους.

Για όλα τα εξετασθέντα αντιβιοτικά υπολογίστηκε η MIC₅₀, MIC₉₀ και MIC_{mean value} όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 17).

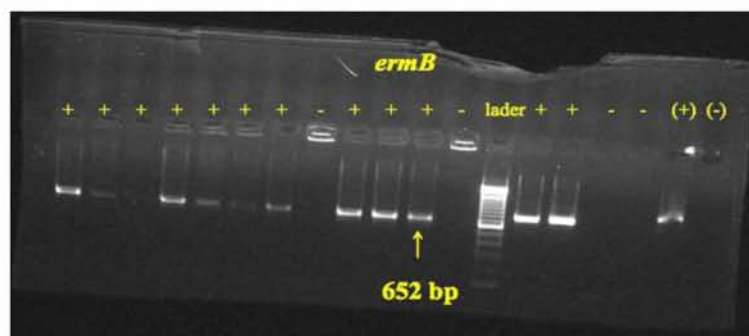
Πίνακας 17: MIC₅₀, MIC₉₀ και MIC_{mean value}

| ANTIBIOTIKO | MIC _{mean value} | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|----------------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ | 7,48 | 72,74 | 152,92 |
| ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗ | 9,198 | 33,175 | 130,661 |
| ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ | 0,180 | 0,355 | 0,458 |
| ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗ | 0,233 | 0,145 | 0,275 |
| ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ | 32 | 32 | 32 |
| ΜΟΞΙΦΛΟΞΑΣΙΝΗ | 1,68 | 16,27 | 25,9 |
| ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ | 1,6 | 26,3 | 28,81 |
| ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ | 11,442 | 1,225 | 6,501 |
| ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ | 0,917 | 0,003 | 12,033 |

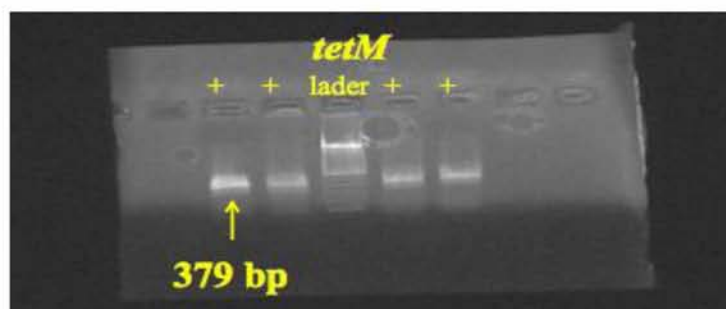
Ακολούθησε ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε όσα στελέχη ήταν ανθεκτικά στα ανωτέρω αντιμικροβιακά. Για τις κινολόνες αναζητήθηκαν μεταλλάξεις στις περιοχές *GyrA* ή/και *GyrB* που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* αντίστοιχα (εικόνα 44). Από τον έλεγχο αυτό προέκυψε ότι τα 23 από τα 36 στελέχη (63,9%) εμφάνισαν γνωστή μετάλλαξη στις περιοχές αυτές. Συγκεκριμένα τα 16 στελέχη εμφάνισαν γνωστή μετάλλαξη στη θέση 82 της περιοχής *GyrA* με αντικατάσταση της Θρεονίνης (Thr) με Ιντερλευκίνη (Ile), τα 3 εμφάνισαν μετάλλαξη στη θέση 416 της *GyrB* με αντικατάσταση της σερίνης (Ser) με αλανίνη (Ala) και 5 στελέχη εμφάνισαν και τις δυο προηγούμενες μεταλλάξεις ταυτόχρονα. Τα στελέχη με μεταλλάξεις στις περιοχές αυτές συνδιάστηκαν με υψηλές MIC στις κινολόνες καθώς τα 21 από τα 23 με μετάλλαξη είχαν MIC >32g/ml και στα τρία αντιμικροβιακά που ελέγχθησαν.

Αντίστοιχα το *ermB* γονίδιο βρέθηκε σε 19 από τα 23 στελέχη με φαινότυπο «αντοχή» σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη (82,6%) (εικόνα 42). Η MIC στα στελέχη αυτά βρέθηκε >256g/ml και για τα δυο αντιβιοτικά. Για την τετρακυκλίνη αναζητήθηκε η συσχέτιση αντοχής με την παρουσία του γονιδίου *tetM* το οποίο ανιχνεύθηκε σε 15 από τα 16 στελέχη που εξετάστηκαν (94%) (εικόνα 43). Η παρουσία του *tetM* γονιδίου δεν σχετίζεται με πολύ υψηλή τιμή MIC καθώς για τα 15 θετικά στο γονίδιο στελέχη η μέση τιμή της MIC είναι 35,86g/ml.

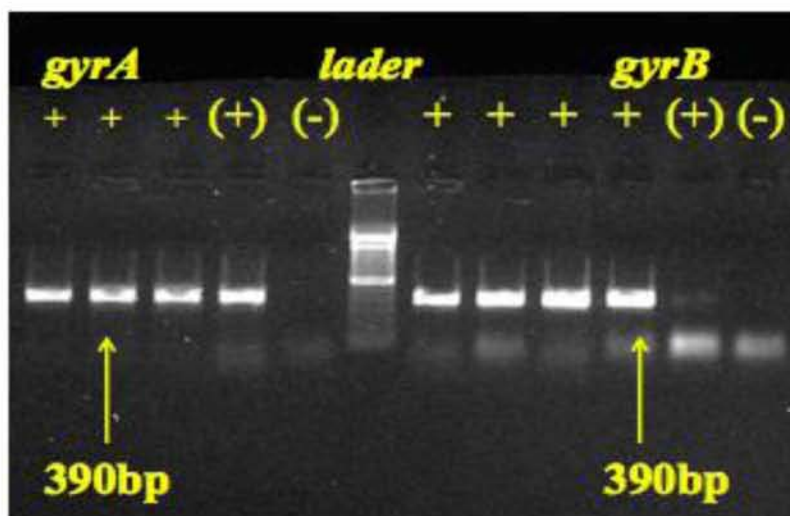
Εικόνα 42 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης με PCR, γονίδιο *ermB* (..... bp) - όπου (+) ο θετικός μάρτυρας και (-) ο αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 43 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης με PCR, γονίδιο *tetM* (379 bp)



Εικόνα 44: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης με PCR – γονίδια *gyrA* (390bp) & *gyrB* (390bp) – όπου (+) ο θετικός μάρτυρας και (-) ο αρνητικός μάρτυρας.



4.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ – ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα αποτελέσματα της μοριακής τυποποίησης με τη μέθοδο της MLST (εικόνα 45) που εφαρμόστηκε για όλα τα στελέχη *C. difficile* της παρούσας μελέτης οδήγησαν στην κατανομή τους σε 13 γνωστούς STs. Επικρατέστερος βρέθηκε να είναι ο ST37 με ποσοστό 38,9% επί του συνόλου ενώ δεύτερος ο ST11 με ποσοστό 19,4%. Οι υπόλοιποι, ST46, ST42, ST35 και ST110 βρέθηκαν σε ποσοστό 5,5% έκαστος ενώ με μικρότερο ποσοστό, 2,8%, ακολούθησαν οι ST12, ST193, ST236, ST19, ST16, ST14 και ST135.

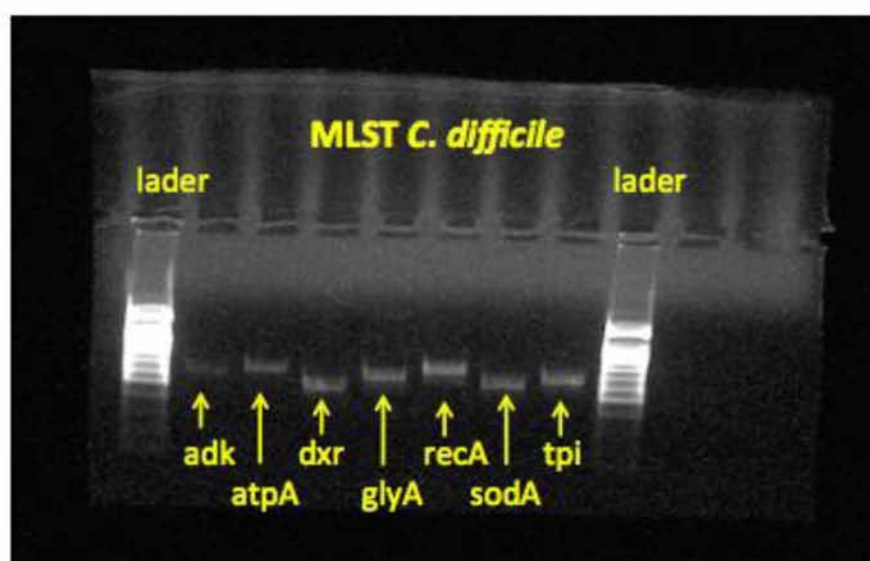
Η ανίχνευση γονιδίων για την παραγωγή τοξινών, A, B και Binary/Δυαδική, με την μέθοδο της PCR έδειξε ότι όλα τα στελέχη είχαν γονίδια παραγωγής των τοξινών A και B ταυτόχρονα. Όσον αφορά την ανίχνευση της δυαδικής τοξίνης στα στελέχη της μελέτης, 8 από τα 36, που ανήκαν στους ST11 και ST193 βρέθηκαν θετικά επιπλέον και για την Δυαδική τοξίνη. Στο σύνολο των δειγμάτων δεν βρέθηκαν στελέχη θετικά στην Τοξίνη B και αρνητικά στην A (A-/B+) (πίνακας 18).

Τα αποτελέσματα βάση φαινότυπου αντοχής και παρουσίας γονιδίων ή μεταλλάξεων που να ενοχοποιούνται γι' αυτήν, σε συνδιασμό με την κατανομή των STs καταγράφονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 18: Κατανομή στελεχών ανά ST και το προφίλ τους βάση γονιδίων παραγωγής τοξινών. Κυριαρχεί ο ST37 με 37% ενώ οι STs 11, 81 και 193 φέρουν επιπλέον γονίδιο και για την Δυσαική τοξίνη.

| STs | % | TOXINS |
|---------------|-------------|--|
| ST 37 | 38,9 | A⁺B⁺/Binary⁻ |
| ST 11 | 19,4 | A⁺B⁺/Binary⁺ |
| ST 110 | 5,5 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 42 | 5,5 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 46 | 5,5 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 35 | 5,5 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 193 | 2,8 | A⁺B⁺/Binary⁺ |
| ST 12 | 2,8 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 236 | 2,8 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 19 | 2,8 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 16 | 2,8 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 14 | 2,8 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |
| ST 135 | 2,8 | A ⁺ B ⁺ /Binary ⁻ |

Εικόνα 45 : Ηλεκτροφόρηση γονιδίων MLST *C. difficile* μετά από ενίσχυση προϊόντων με PCR.



Πίνακας 19: Πίνακας συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων.

*Στην παρένθεση αναφέρεται ο αριθμός των στελεχών που αντιστοιχεί στον κάθε ST

| ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ | ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ | STs |
|--------------------|--------------------------------|---|--|
| CLI | 1 | NF | 46 |
| LVX | 5 | NF (4/5) Ser416A Ala (1/5) | 14 (1)*, 135 (1), 12 (1), 193 (1), 236 (1) |
| CLI/LVX | 2 | NF | 16 (1), 110 (1) |
| ERY/LVX | 2 | NF (1) Thr82A Ile (1) | 19 (1) 37 (1) |
| ERY/CLI/RIF | 1 | <i>ermB</i> | 54 |
| ERY/CLI/LVX | 4 | NF (2/4) Ser416A Ala (1/4) Thr82A Ile (2/4) | 46 (1), 42 (1), 11 (1), 35 (1) |
| ERY/LVF/TETRA | 2 | Thr82A Ile (1/2) Ser416A Ala (2/2) <i>tetM</i> (2/2) | 11 (2) |
| CLI/LVF/TET | 1 | Ser416A Ala <i>tetM</i> | 11 |
| ERY/CLI/LVF/TET | 3 | <i>ermB</i> (3/3) <i>tetM</i> (3/3) Thr82A Ile (3/3) Ser416A Ala (2/3) | 35 (1), 11 (2) |
| ERY/CLI/LVF/RIF | 6 | <i>ermB</i> (6/6) Thr82A Ile (6/6) | 37 (6) |
| ERY/CL/LVF/TET/RIF | 9 | <i>ermB</i> (9/9) <i>tetM</i> (9/9) Thr82A Ile (8/9) Ser416A Ala (1/9) | 37 (7), 11 (1), 42 (1) |
| ΣΥΝΟΛΟ | 36 | | |

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το *C. difficile* αποτελεί τα τελευταία χρόνια το βασικό αίτιο διαρροϊκού συνδρόμου που σχετίζεται με τη λήψη αντιβιοτικών. Η παθογόνος δράση του οφείλεται κυρίως στην παραγωγή τοξινών που προκαλούν φλεγμονή και αύξηση διαπερατότητας του εντέρου, με συνεπακόλουθη διάρροια η οποία μπορεί να κυμαίνεται από ελαφρά και αυτοπεριοριζόμενη με τη διακοπή της ενοχοποιούμενης αγωγής έως απειλητική για τη ζωή ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα. Η νόσος μπορεί να εμφανιστεί ως σποραδικό κρούσμα αλλά και ως νοσοκομειακή επιδημία.

Είναι ένας ιδιαίτερα ανθεκτικός μικροοργανισμός καθώς με την ικανότητα του να μετατρέπεται σε σπόρο επιβιώνει τόσο στις αντίξες συνθήκες του περιβάλλοντος και στην απολύμανση, οπότε διασπείρεται με μεγάλη ευκολία, όσο και στο εσωτερικό του στομάχου υπό τη δράση του γαστρικού οξέος, οπότε φτάνοντας στο παχύ έντερο αποικίζει τον ασθενή και λόγω ευνοϊκών συνθηκών μεταπίπτει στην βλαστική του μορφή και ανταγωνίζεται τη φυσιολογική χλωρίδα της περιοχής. Το μεγαλύτερο ποσοστό των λοιμώξεων από *C. difficile* συμβαίνουν μετά ή κατά τη διάρκεια θεραπείας με αντιβιοτικά. Τα τελευταία μεταβάλλουν την φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου και επιτρέπουν στο βακτήριο, είτε ενδογενούς είτε εξωγενούς προέλευσης, να πολλαπλασιάζεται σε μεγάλους αριθμούς. Αρχικά ενοχοποιήθηκε η κλινδαμυκίνη όμως πολύ νωρίς σχετίστηκε με τη χρήση των περισσότερων αντιβιοτικών και κυρίως με την αμπικιλίνη, κεφαλοσπορίνες Β' γενιάς και άλλα ευρέως φάσματος ενώ αρκετοί είναι και οι προδιαθεσικοί παράγοντες από την πλευρά του ασθενούς, όπως ηλικία >65 ετών, νοσηλεία σε ΜΕΘ, μακρά νοσηλεία, κα. Κυρίως αφορά νοσοκομειακούς ασθενείς καθώς μεταξύ των οποίων μεταδίδεται με εξαιρετική ευκολία κυρίως μέσω του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού. Αποτελεί το συχνότερο αίτιο ενδοноσοκομειακής λοίμωξης, το μοναδικό σπορογόνο Gram (+) αυστηρά αναερόβιο παθογόνο βακτήριο σε χώρους δημόσιας υγείας και την κύρια αιτία μικροβιακής ενδοноσοκομειακής διάρροιας γι' αυτό και πρέπει να αναζητείται συστηματικά.

Η έλλειψη ευρέως αποδεκτών κατευθυντήριων οδηγιών, η διαφοροποίηση των διαγνωστικών πρωτοκόλλων από εργαστήριο σε εργαστήριο και συχνά η έλλειψη κατάλληλου διαγνωστικού υλικού σε αρκετά εργαστήρια καθιστούν την εκτίμηση της συχνότητας του *C. difficile* αρκετά δύσκολη. Επιπλέον, στην Ελλάδα δεν υπάρχει σύστημα επιδημιολογικής υποχρεωτικής επιτήρησης της λοίμωξης από το συγκεκριμένο βακτήριο οπότε η υποδήλωση δεν αντικατοπτρίζει τα πραγματικά ποσοστά απομόνωσης του μικροοργανισμού. Στην Ελλάδα οι πρώτες μελέτες έρχονται από την Κρήτη με ποσοστό ανεύρεσης του *C. difficile* στο 14,4%. Ενώ σε μεταγενέστερες μελέτες το ποσοστό είναι ελαφρώς μικρότερο όπως και στην παρούσα μελέτη (~7%). Φαίνεται λοιπόν πως το *C. difficile* υπάρχει και διασπείρεται στο περιβάλλον των

ελληνικών νοσοκομείων ενώ με τα σύγχρονα τεστ ανοσοχρωματογραφίας και τα χρωμογόνα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά η απομόνωση και η ταυτοποίηση δεν αποτελεί πλέον πρόβλημα.

Η Ελλάδα ανήκει στις χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά κατάλωσης αντιβιοτικών τόσο σε ενδονοσοκομειακό επίπεδο αλλά και σε ασθενείς κοινότητας. Έτσι τα τελευταία χρόνια είναι αντιμετώπιση με πολυανθεκτικά στελέχη. Σε αυτό το πρόβλημα, και παρά την υποδήλωση της νόσου, έρχεται να προστεθεί και ο αυξανόμενος αριθμός λοιμώξεων από *C. difficile* και ο κίνδυνος εμφάνισης υπερλοιμογόνων στελεχών του μικροοργανισμού. Λόγω αυτής της υπερκατανάλωσης αντιβιοτικών ευρέως φάσματος στη χώρα είναι σημαντικό να γνωρίζουμε την επιδημιολογία και τους μηχανισμούς αντοχής του *C. difficile* καθώς η διαταραχή της χλωρίδας από την χορήγηση αντιβιοτικών και η ταυτόχρονη αντοχή του μικροοργανισμού στα φάρμακα αυτά αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης CDI και μειώνουν τις θεραπευτικές επιλογές.

Στην παρούσα μελέτη τα στελέχη που απομονώθηκαν προήλθαν από νοσηλευόμενους ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά την διάρκεια ενός έτους με πρόσφατη υπό διερεύνηση διάρροια. Τα απομονωθέντα στελέχη ελέγχθησαν με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικών, E-tests, για την ευαισθησία τους σε εννέα αντιβιοτικά : Βανκομυκίνη, Μετρονιδαζόλη, Τετρακυκλίνη, Ριφαμπικίνη, Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Σιπροφλοξασίνη, Λεβοφλοξασίνη και Μοξιφλοξασίνη και τα αποτελέσματα ερμηνεύθηκαν βάση οδηγιών CLSI για αναερόβιους μικροοργανισμούς. Κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε με αντοχή σε μετρονιδαζόλη και βανκομυκίνη. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα απογοητευτικά σε ότι αφορά τις φθοριοκινολόνες. Το ποσοστό αντοχής των στελεχών στην Σιπροφλοξασίνη ήταν 100% ενώ αντίστοιχα υψηλό ήταν και για τις νεότερες φθοριοκινολόνες, της μοξιφλοξασίνης και της λεβοφλοξασίνης 78% και 94,5% αντίστοιχα. Επίσης το ποσοστό αντοχής που προέκυψε για την ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη ήταν 75% και για τα δύο. Ενώ ενδιαφέρον είναι ότι τα στελέχη που εμφάνισαν ταυτόχρονα αντοχή σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη, αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως, ήταν 23 από τα 36 (64%). Αντίστοιχα το ποσοστό αντοχής στην τετρακυκλίνη και στην ριφαμπικίνη είναι όμοιο με 16 από τα 36 στελέχη να παρουσιάζουν αντοχή, αριθμός που αντιστοιχεί στο 44,5% των δειγμάτων. Το σύνολο των στελεχών βρέθηκε ευαίσθητο σε Μετρονιδαζόλη και Βανκομυκίνη, τις βασικές θεραπευτικές επιλογές σε μέτρια έως σοβαρή λοίμωξη από *C. difficile*.

Η παρούσα διπλωματική επίσης προσανατολίστηκε στην διερεύνηση της μοριακής βάσης του μηχανισμού αντοχής έναντι στα αντιβιοτικά (ερυθρομυκίνη & κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη και στις κινολόνες). Από τα στελέχη που ελέγχθηκαν με αντοχή σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη (23/36) στο 82,6% (19/23) ανιχνεύθηκε το *ermB* ενώ αντίστοιχα υψηλό ήταν και το ποσοστό των ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη στελεχών με παρουσία του *tetM* (94%). Επιπλέον στο 63,9% (23/36) των στελεχών με αντοχή στις κινολόνες βρέθηκαν γνωστές μεταλλάξεις είτε μόνο

στη περιοχή GyrA σε 16 στελέχη (Thr82Ile), είτε μόνο στην GyrB σε 3 στελέχη (Ser416Ala) είτε και στις δύο ταυτόχρονα 5 στελέχη (Thr82Ile & Ser416Ala). Τα υπόλοιπα ανθεκτικά στελέχη στις κινολόνες χωρίς μετάλλαξη στις περιοχές A και B της γυράσης είναι υπό μελέτη για άλλες μεταλλάξεις έξω από την ελεγχθείσα περιοχή και άλλους πιθανούς μηχανισμούς αντοχής. Η αντοχή όμως στις κινολόνες παραμένει ισχυρά συσχετισμένη με την παρουσία μεταλλάξεων στις περιοχές GyrA και GyrB.

Τέλος, στα στελέχη της παρούσας μελέτης έγινε μοριακός έλεγχος γονιδίων τοξινών, A, B και δυαδικής, και Τυποποίηση Πολυτοπικού Προσδιορισμού Αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) για τον χαρακτηρισμό των τύπων αλληλουχίας (STs) των στελεχών που μελετήθηκαν. Οι STs που βρέθηκαν ήταν οι : ST037, ST011, ST035, ST046, ST042, ST110, ST012, ST193, ST236, ST019, ST014, ST0135 & ST016. Ο κλώνος που επικρατεί είναι ο ST037 με 38,9% και ακολουθεί ο ST011 με 19,4%. Τα περισσότερα στελέχη των δύο αυτών τύπων αλληλουχίας εμφάνισαν αντοχή σε πάνω από τρεις τάξεις αντιβιοτικών. Όλα τα στελέχη έφεραν τα γονίδια για την παραγωγή των τοξινών A και B (A+/B+) . Τα στελέχη των ST011 και ST193 εκτός αυτών έφεραν και τα γονίδια της Δυαδικής τοξίνης (A+/B+/BINARY+) και σε συνδιασμό με την αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά τα καθιστούν στελέχη αυξημένης λοιμογόνου δύναμης.

Η ριβοτύπιση των στελεχών αποτελεί το επόμενο βήμα στις μελέτες του *C. difficile* ώστε να υπάρχει απόλυτα κοινή γλώσσα μεταξύ των μελετητών του βακτηρίου παγκοσμίως. Παρ' όλα αυτά υπάρχει μια αντιστοιχία τύπων αλληλουχίας με ριβότυπους. Στο υπερλοιμογόνο στέλεχος RT027 που συναντάται σε ποσοστό 18,5% σε χώρες της Ευρώπης όπως Γερμανία, Πολωνία, Ουγγαρία και Ρουμανία με υπερπαραγωγή τοξινών A, B λόγω μερικής εξάλειψης του γονιδίου *tcdC* συνοδά με παραγωγή δυαδικής τοξίνης και αντοχή στις κινολόνες συχνά αντιστοιχεί ο ST01. Αυτός ο τύπος δεν ανευρέθηκε στα προς μελέτη στελέχη ενώ δεν αναφέρεται σε μελέτες στελεχών στην Ελλάδα. Όμως το, επίσης αυξημένης λοιμογόνου δύναμης, στέλεχος RT078 που συναντάται στο 14% των στελεχών στην Ελλάδα και είναι το τρίτο σε συχνότητα σε χώρες της Ευρώπης σχετίζεται με τον ST11 που απομονώθηκε στο 19,4% των στελεχών της παρούσας μελέτης. Το υπερλοιμογόνο αυτό στέλεχος υπερπαραγάγει και αυτό τοξίνη A και B λόγω μερικής εξάλειψης ή μετάλλαξης στο *tcdC* καθώς και Δυαδική τοξίνη ενώ παρουσιάζει υψηλά ποσοστά αντοχής στις κινολόνες και σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελώντας αναδυόμενο πρόβλημα για τα ελληνικά νοσοκομεία.

Σε πρόσφατη μελέτη, η λοίμωξη από *C. difficile* λόγω του RT027 και του RT078 παρουσιάζονται με παρόμοια κλινική βαρύτητα και νοσηρότητα αλλά η λοίμωξη που σχετίζεται με τον RT078 επηρεάζει πληθυσμό μικρότερης κατά μέσο όρο ηλικίας και ήταν πιο συχνή στην κοινότητα αν και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στέλεχος και μεταξύ των απομονωθέντων στα

ευρωπαϊκά νοσοκομεία (111). Από πρόσφατες μελέτες φαίνεται ότι εκτός από κυρίαρχος ριβότυπος σε ζώα, βοοειδή και χοίρους, επιβεναιώνεται ότι αποτελεί το τρίτο πιο διαδεδομένο είδος σε λοιμώξεις *C. difficile* κοινότητας ενώ μόνο στην Ελλάδα το ποσοστό μεταξύ των νοσοκομειακών μικροοργανισμών είναι >10% σε αντίθεση με την υπόλοιπη Ευρώπη που κατέχει την 11η θέση με ποσοστό επιπολασμού 2,8% με αυξανόμενη όμως τάση. Η βαρύτητα της νόσου και η θνησιμότητα είναι παρόμοιες με του στελέχους RT027 ενώ και για τα δύο στελέχη η προηγούμενη χρήση φθοριοκινολονών αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα για CDI (65, 112).

Ο βασικός ST της παρούσας μελέτης, ST037, έχει συσχετισθεί με τον ριβότυπο RT017 και αποτελεί δυνητικό επιδημικό στέλεχος σε περιοχές της Ασίας και Λατινικής Αμερικής. Φαίνεται να μοιράζεται μερικά γονοτυπικά χαρακτηριστικά στα γονίδια των *tcdA* και *tcdB* με ορισμένων γνωστών υπερλοιμογόνων στελεχών ενώ παρουσιάζει υψηλά ποσοστά αντοχής σε Ερυθρομυκίνη και Κλινδαμυκίνη (113).

Από την μελέτη στελεχών *C. difficile* βασιζόμενη στη μέθοδο MLST σε ασθενείς στην περιοχή της Θεσσαλίας συμπεραίνουμε την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία των στελεχών, με επικράτηση των κλώνων ST037 αλλά και του ST11 και την πολυαντοχή τους σε πάνω από τρεις τάξεις αντιβιοτικών. Ενθαρρυντικό αποτελεί το αποτέλεσμα του ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά μετρονιδαζόλη και βανκομυκίνη επιτρέποντας την χρήση τους στη θεραπεία λοιμώξεων από *C. difficile*.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- i) **BRISTOL STOOL CHART** : Διάγραμμα για την μορφολογία των κοπράνων. Είναι μια ιατρική βοήθεια για την ταξινόμηση των ανθρώπινων κοπράνων σε επτά κατηγορίες. Δημιουργήθηκε από τους Dr Lewis και Dr Heaton στο Πανεπιστήμιο του Μπρίστολ και εκδόθηκε για πρώτη φορά στο σκανδιναβικό Journal of Gastroenterology το 1997. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μορφή των κοπράνων είναι χρήσιμη ένδειξη για τον χρόνο διέλευσης των κοπράνων από το παχύ έντερο.
- ii) **ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ**: Στον έλεγχο για *C. difficile* η μικροσκοπική εξέταση δεν παρέχει πολύτιμες πληροφορίες γι' αυτό και δεν συμπεριλαμβάνεται στον αλγόριθμο της εργαστηριακής διάγνωσης. Σαν λοιμώδεις διάρροια με φλεγμονή στην μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος πιθανόν, χωρίς να είναι παθογνομικό, θα υπάρχουν πυοσφαίρια καθώς και ελάττωση της υπόλοιπης χλωρίδας.

ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Etymologia : *Clostridium difficile*. Emerg Infect Dis. 2010, April; 16 (4):674 - <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/4/pdfs/e1-1604.pdf>
2. Bartlett JG, Wen Chang TE, Gurwith M, Gorbach SL and Onderdonk AB. Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing *Clostridia*. In: N Engl J Med 1978; 298:531-534 March 9, 1978 ,DOI: 10.1056/NEJM197803092981003.
3. Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile* : an important pathogen of food and animals. Anaerobe 2006; Feb;12(1):1-4. Epub 2005 Oct 25. Review.
4. Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, Johnson S, Gerding DN, McDonald LC, Limbago BM. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. Emerg Infect Dis. 2008 Jul;14(7):1039-45. doi: 10.3201/eid1407.071641. PubMed PMID: 18598622; PubMed Central PMCID: PMC2630049.
5. Collins MD1, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JA. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol. 1994 Oct;44(4):812-26.
6. Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny : Gram-negative spore formers and the other misplaced clostridia. Environ Microbiol. 2013 Oct;15(10):2631-41. Doi: 10.1111/1462-2920.12173. Epub 2013 Jul 9.
7. Rodriguez C, Van Broeck J, Taminiau B, Delmee, Daube G. *Clostridium difficile* infection : Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. Microbial Pathogenesis, 2016; 97 – pp 59-78.
8. Engelkirk PG, Dupen-Engelkirk J. Laboratory Diagnosis of Infectious diseases: essential of diagnostic microbiology. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, pp 422-423.
9. Edwards AN, Suarez JM, McBride SM. Culturing and Maintaining *Clostridium difficile* in an Anaerobic environment. Vis Exp. 2013; (79): 50787, Published online 2013 Sep 14. doi: 10.3791/50787 - URL: <http://www.jove.com/video/50787>
10. http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/kumm_jakl/growth&adapt.htm
11. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 1979; 9: 214–9.
12. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 411-416.
13. UK Standards for Microbiology Investigations. Processing of Faeces for *Clostridium*

difficile Issued by the Standards Unit, Microbiology Services Bacteriology, B 10, Issue no: 1.5, Issue date: 02.04.14 - Page: 1 of 23 – 2014.

14. Yang JJ, Nam YS, Kim MJ, Cho SY, You E, Soh YS, Lee HJ. Evaluation of a Chromogenic Culture Medium for the Detection of *Clostridium difficile*. Yonsei Med J. 2014 Jul;55(4):994-998. English.
15. Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Διαγνωστική Μικροβιολογία Koneman's. 2011 – Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, σελ 936-937.
16. <http://www.medscape.com/viewarticle/754326> 11
17. Holger Bruggemann and Grhard Gottschalk. Clostridia – Molecular Biology in Post genomic era. Caister Academic Press 2009 ISBN: 978-1-904455-38-7, pp 157.
18. Kirk JA, Banerji O, Fagan RP. Characteristics of the *Clostridium difficile* cell envelope and its importance in therapeutics. Microbial Biotechnology, 2016 Jun, doi: 10.1111/1751-7915.12372
19. Péchiné S, Janoir C, Collignon A. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with Clostridium difficile-associated disease. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5018-25.
20. Fagan RP, Albesa-Jové D, Qazi O, Svergun DI, Brown KA, Fairweather NF. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. Mol Microbiol. 2009 Mar;71(5):1308-22. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06603.x. Epub 2009 Jan 29.
21. Faulds-Pain A, Twine MS, Vinogradov E, Strong PCR, Dell A, Buckley AM, Douce GR, Valiente E, Logan SM, Wren BW. The post-translation modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence. Mol Microbiol. 2014 Oct; 94(2):272-289.
22. Wüst J, Sullivan NM, Hardegger U, Wilkins TD. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J Clin Microbiol. 1982 Dec;16(6):1096-101.
23. Sebahia M, Wren BW, Mullany P, et al. The multidrug resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile mosaic genome. 2006; Nature Genetics, Vol 38, No 7, July 2006.
24. www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/peptoclostridia
25. Scaria J, Ponnala L, Janvilisri T, Yan W, Mueller LA, Chang YF. Analysis of Ultra low genome conservation in *Clostridium difficile*. Plos One, Published: December 8, 2010. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015147>

26. Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT, Witney AA, Hinds J, Wren BW. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *J Bacteriol.* 2006 Oct;188(20):7297-305.
27. Janvilisri T1, Scaria J, Thompson AD, Nicholson A, Limbago BM, Arroyo LG, Songer JG, Gröhn YT, Chang YF. Microarray identification of *Clostridium difficile* core components and divergent regions associated with host origin. *J Bacteriol.* 2009 Jun;191(12):3881-91. doi: 10.1128/JB.00222-09. Epub 2009 Apr 17.
28. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJ, Jolley KA, Kirton R, Peto TE, Rees G, Stoesser N, Vaughan A, Walker AS, Young BC, Wilcox M, Dingle KE. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):770-8. doi: 10.1128/JCM.01796-09. Epub 2009 Dec 30.
29. Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, et al. The multidrug resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile mosaic genome. 2006; *Nature Genetics*, Vol 38, No 7, July 2006.
30. Hargreaves KR, Clokie MR. A Taxinomic Review of *Clostridium difficile* Phages and Proposal of a Novel Genus, “Phimmp04likevires”. *Viruses.* 2015 May; 7(5): 2534-2541.
31. Mullany P, Allan E, Roberts A.P. Mobile Genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Res Microbiology*, 2015 May;166(4):362-7.
32. Van Eijk E, Anvar SY, Browne HP, Leung WY, Frank J, Schmitz AM, Roberts AP, Smits WK. Complete genome sequence of the *Clostridium difficile* laboratory strain 630Δerm reveals differences from strain 630, including translocation of the mobile element CTn5. *BMC Genomics*, 2015 Jan 31;16:31.
33. Brouwer MS, Roberts AP, Hussian H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun.* 2013;4:2601.
34. Michael Sebastian Maria Brouwer. Investigation into the mobile genetic elements of *Clostridium difficile*. 2013; Doctoral thesis, UCL. <http://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/1383042>
35. Hall C, Toole E. Intestinal flora in new-born infants with description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am. J. Diseases Children*, 1935; 49:390-402.
36. Snyder ML,. Further studies on *Bacillus difficilis*. *J. Infect. Dis.* 1937; 60,223-231.
37. Snyder M.L. The normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age : I. Seral studies, *J.Infect.Dis.* 1940; 66, 1-16.
38. Smith L.D, King E.O. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *J.*

- Bacteriol. 1962 Jul; Vol 84, pp 65-67.
39. McBee, R.H. Intestinal flora of some Antarctic birds and mammals J. Bacteriol. 1960 Feb; 79(2):311-312.
 40. Danielsson D., Lambe D.W., Persson S. The immune response in a patient to an infection with *Bacteroids fragilis* sub species *fragilis* and *Clostridium difficile*. Acta pathol. Microbiol. Scand. 1972; B80 (5):709-12.
 41. Modaber I. *Clostridium difficile*. Acta Med Iran. 1975;18(3-4):111-28.
 42. Hafiz S, Oakley CL. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. J Med Microbiol. 1976 May;9(2):129-36.
 43. Hafiz S, McEntegart MG, Morton RS, Waitkins SA. *Clostridium defficiel* in the urogenital tract of males and females. Lancet. 1975 Feb 22;1(7904):420-1.
 44. Finney, JMT. Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. Johns Hopkins Hosp Bull. 1893;4:53-55.
 45. Sherwood L. Gorbach, M.D. Antibiotics and *Clostridium difficile*. N Engl J Med 1999; 341:1690-1691.
 46. Carey W.D., Brotman M., Clindamycin colitis-an emergiing problem. West J Med. 1974 Dec; 121(6):504-507.
 47. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic - associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med. 1978 Mar 9;298(10):531-4.
 48. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 1979 Feb;9(2):214-9.
 49. Werner H, Antibiotic-induced pseudomembranous *Clostridium difficile* colitis. A new etiopathogenetically definable infectious disease. Fortschr Med. 1979 Sep 6;97(33):1411-4.
 50. Heinlen L, Ballard JD. *Clostridium difficile* Infection. Am J Med Sci. 2010 Sep;340(3):247-52.
 51. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ, 2004 Jul;171(1):51-8.
 52. Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis. 1998 May;26(5):1027-34.
 53. Riddle DJ, Dubberke ER. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. Infect Dis Clin North Am. 2009 Sep;23(3):727-43.
 54. DePestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection. J Pharm Pract, 2013 Oct; 26(5): 464-475.

55. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Jul; 7(7):526-36.
56. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Tuye B, Beaudoin A, Frost EH, Glica R, Brassard P, Dendukuri N, Beliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A. Host and Pathogen factors for *Clostridium difficile* Infection and colonization. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18): 1693-703.
57. Ackermann G, Thomalla S, Ackermann F, Schaumann R, Rodloff R, Ruf BR. Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic-associated diarrhoea. *J Med Microbiol*. 2005, Feb(Pt 2) : 149-53.
58. *Clostridium difficile* infection in Europe – A CDI Europe Report. <http://www.multivu.com/assets/60637/documents/60637-CDI-HCP-Report-original.pdf>
59. Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*, 2015 Jul 16;373(3):287-8.
60. Stephen M, Vindigni MD, Surawicz M. *C. difficile* infection : Changing epidemiology and management paradigms. *Clin and Translat Gastroenterol*. 2015; 6, e99.
61. Gupta A, Khanna S. Community-acquired *Clostridium difficile* infection : an increase public health threat. *Infect Drug Resist*. 2014; 7:63-72.
62. Yassin SF, Young Fadok TM, Zein NZ, Pardi DS. *Clostridium difficile* – Associated diarrhea and colitis. *Mayo Clinics Proceedings*, July 2001; 76(7): 725-730.
63. English National Point Prevalence Survey on Healthcare-associated Infections and Antimicrobial Use, 2011. http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714084352/http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317134305239
64. Loo VG, Poirer L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault AM, Nguyen T, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2442-9.
65. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergweff AA, Dekker FW, Kuijper EJ. Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47:1162-70.
66. Khademi H, Kristiansen S. The Role of CDT in Pathogenesis of *Clostridium difficile* associated disease. Department of Science, Systems and Models, Roskilde University. <http://dSPACE.ruc.dk/bitstream/1800/6614/1/Bachelor%20project%20final%20report.pdf>
67. Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC, Weintraud A, Nord CE. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital : antimicrobial resistance, toxin

- profiles and ribotypes. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Apr;33(4):339-342.
68. Maraki S, Georgiladakis A, Tselentis Y, Samonis G. A 5 year study of the bacterial pathogens associated with acute diarrhea on the island of Crete, Greece and their resistance to antibiotics. *Eur J Epidemiol*. 2003;18(1):85-90.
 69. Samonis G, Vardakas KZ, Tansari GS, Dimopoulou D, Papadimitriou G, Kofteridis DP, Maraki S, Karanika M, Falagas ME. *Clostridium difficile* in Crete, Greece: epidemiology, microbiology and clinical disease. *Epidemiol Infect*. 2016 Jan;144(1):161-170.
 70. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe : the European, multicenter, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* Infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis*. 2014 Dec;14(12):1208-1219.
 71. Monot M, Eckert C, Lemire A, Hamiot A, Dubois T, Tessier C, Dumoulaud B, Hamel B, Petit A, Lalande V, Ma L, Bouchier C, Barbut F, Dupuy B. *Clostridium difficile* : New insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci Rep*. 2015 Oct 8;5:15023.
 72. Voth DE, Ballard GD. *Clostridium difficile* toxins : mechanism of action and role in disease. *Clin microbial Rev*. 2005 Apr;18(2):247-63.
 73. Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Intern Med J*. 2007 Aug;37(8):561-8.
 74. Dillon ST, Rubin EJ, Yakubovich M, Pothoulakis C, LaMont JT, Feig LA, Gilbert RJ. Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Infect Immun*. 1995 Apr;63(4):1421-6.
 75. Jank T, Gieseemann, Aktories K. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B : new insights into structure and function. *Glycobiology*. 2007. Vol 17 (4):15R-22R.
 76. Monaghan TM. *C. difficile* infection : an issue of infectious disease, clinics of North America. New perspectives in *Clostridium difficile* disease pathogenesis. *Inf Dis Clin N Am* 2015;19:1-11.
 77. Perelle S, Gibert M, Bourlioux P , Corthier G, Popoff MR. Production of a Complete Binary Toxin (Actin-Specific ADP Ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect and Immun* 1997; 65: 1402-7.
 78. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*. 2014 Jan 1;5(1):15-27.
 79. Wanahita A, Goldsmith EA, Musher DM. Conditions associated with leukocytosis in a tertiary care hospital, with particular attention to the role of infection caused by

- Clostridium difficile*. Clin Infect Dis 2002; 34: 1585-92.
80. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* infection. Annu Rev Med 1998; 49:375-390.
 81. <http://www.learningradiology.com/archives2008/COW%20304-Pseudomembranous%20colitis/pseudomemcorrect.html>
 82. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001;7:411-16.
 83. Cohen SH, Gerding ND, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2012 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Infection Control and Hospital Epidemiology, Vol 31, No.5 (May 2010), pp 431-455
<http://www.jstor.org/stable/10.1086/651706>
 84. Brazier JS. Role of laboratory investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. Clin Infect Dis 1993;16:S228-233.
 85. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment and prevention of *Clostridium difficile* Infections. Am J Gastroenterol 2013; 108:478-479; Doi:10.1038/ajg.2013;pub online 26 Feb 2013.
 86. Bouza E, Munoz P, Alonso R. Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 2005;11(4):757-64
 87. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of Vancomycin, Teicoplanin, Metronidazole and Fusidic Acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1996; 22:813-8.
 88. Fekety R, Shah AB. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. J Am Med Assoc 1993;269:71-5.
 89. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a review. Arch Intern Med. 2001; 161: 525-33.
 90. Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* INFECTION. J Hosp Infection. 2008 Dec;70(4):298-304.
 91. Loui TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue YK. Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 2011 Feb 3;364(5):422-31.
 92. McFarland LV. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? Journal of Medical Microbiology. 2005;54:pp101-111.
 93. Smith LD, King OE. Occurrence of *C. difficile* in infections in man. J Bacteriol. 1962;84:65-67.

94. Barlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis.* 1977 Nov;136(5):701-5.
95. Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infections. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(1):S4-11.
96. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* Infectio. *Ther Adv Infect Dis.* 2016 Feb;3(1):23-42.
97. Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirer L; CDAD-CSI Study Group. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Oct;50(10):3473-5.
98. Spiggaglia P. Practical aspects of in vitro antimicrobial susceptibility testing. Postgraduate Technical workshop of *Clostridium difficile*. Maribor, 2-4/9/2015. http://icds.si/icds-2015/oral/INV11_spigaglia.pdf
99. Baines SD, Wilcox MH. Antimicrobial Resistance and Reduced Susceptibility in *Clostridium difficile* : Potential Consequences for Induction, Treatment, and Recurrence of *C. difficile* Infection. *Antibiotics.* 2015;4(3):267-298.
100. Sebalt M, Bouanchaud D, Bieth G. Nature plasmidique de la resistance a plusieurs antibiotics chez *C. perfringens* type A, souche 659. *C.R.Acad. Sci. Ser. D* 280:2401-2404.
101. Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, Hamill RJ. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clinical Infectious Diseases* 2005;40:1586-1590.
102. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Oct;66(10):2227-34.
103. Lyras D, Storie C, Huggins AS, Crellin PK, Bannam TL, Rood JI. Chloramphenicol resistance in *Clostridium difficile* is encoded on Tn4453 transposons that are closely related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jul;42(7):1563-7.
104. O'Connor JR, Galang MA, Sambol SP, Hecht DW, Vedantam G, Gerding DN, Johnson S. Rifampin and rifamixin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Aug;52(8):2813-7.
105. Alfa MJ, Sepehri S. Combination of culture, antigen and toxin detection, and cytotoxin neutralization assay for optimal *Clostridium difficile* diagnostic testing. *Can J Infect Med Microb.* 2013 Summer;24(2):89-92.
106. Παλαιολόγου Δ, Κατσαρέλη Ε, Παπανικολάου Γ. Απομόνωση DNA. Σελ 103.

107. Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C, Lawley TD, Sebaihia M, Quail MA, et al. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*. 2009;10:R102.
108. Spigaglia P, Barbanti F, Louie T, Barbut F, Mastrantonio P. Molecular Analysis of the *gyrA* and the *gyrB* Quinolone Resistance-Determining Regions of Fluoroquinolone-Resistant *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. June 2009;53(6):2463-68.
109. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Nat Acad Sci, USA*. 1998;95; 3 3140-45.
110. Ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας DNA και χαρακτηρισμός μεταλλάξεων.
<https://repository.kallipos.gr/handle/11419/648>
111. Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller. *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017 and 027 are associated with lethal *C difficile* infection in Hesse, Germany. *Eurosurveillance*, 2009 Nov;Vol 14 (45).
112. Rupnik M, Widmer A, Zimmermann O, Eckert C, Barbut F. *Clostridium difficile* Toxinotype V, Ribotype 078, in Animals and Humans. *J Clin Microbiol*. Jun 2008;46(6):2146.
113. Du p, Cao B, Wang J, Li W, Jia H, Zhang W, Lu J, Li Z, Yu H, Chen C, Cheng Y. Sequence variation in *tcdA* and *tcdB* of *Clostridium difficile* : ST37 with truncated *tcdA* is a potential epidemic strain in China. *J Clin Microbiol*. 2014 Sept;52(9):3264-70.

