

Dorota Rożkiewicz¹, Maria Lucyna Zaremba², Krzysztof Fiedoruk², Tamara Daniluk², Małgorzata Ściepuk², Bożena Kurzątkowska¹, Artur Sulik¹, Elżbieta Oldak¹

TOKSYNA A *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* I INNE ENTEROPATOGENY
W KALE DZIECI HOSPITALIZOWANYCH Z POWODU
OSTREJ BIEGUNKI*

¹Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: Elżbieta Oldak

²Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: Maria Lucyna Zaremba

Określono częstość występowania toksyny A Clostridium difficile i innych enteropatogenów w kale dzieci przyjętych do leczenia szpitalnego z powodu ostrej biegunki w porównaniu do dzieci z innymi chorobami (bez biegunki). Toksynę A C.difficile z porównywalną częstością wykrywano w kale dzieci z biegunką i bez biegunki (p>0,05). U 72% dzieci z biegunką zidentyfikowano różne patogeny jelitowe, w tym u 19% rozpoznano biegunkę indukowaną przez C.difficile (CDAD).

Słowa kluczowe: toksyna A Clostridium difficile, biegunka pozaszpitalna, patogeny jelitowe
Key words: Clostridium difficile toxin A, community-acquired diarrhoea, enteric pathogens

WSTĘP

Zarówno rzekomoblioniaste zapalenie okrężnicy jak i biegunka poantybiotykowa, które należą do głównych chorób związanych z zakażeniem *Clostridium difficile* (1-3) są wywoływane przez szczepy wytwarzające co najmniej dwie egzotoksyny, znane jako toksyna A i B (4). Te dwa główne czynniki wirulencji (patogenności) tych bakterii są kodowane przez dwa odrębne geny zlokalizowane na chromosomie (gen *ted A* i *ted B*) (5). Obie toksyny – A i B są istotne dla rozwoju choroby skojarzonej z *C.difficile*, jednak panuje opinia, że toksyna A ma większe znaczenie w patogenezie choroby biegunkowej. Toksyna A (o masie cząsteczkowej 308 Kda) wywołuje działanie enterotoksyczne objawiające się wydalaniem płynów, uszkodzeniem błony śluzowej jelita i stanem zapalnym, w odróżnieniu od silnego działania, głównie cytotoksycznego toksyny B (4,6). Dotychczasowe bada-

* Część wyników pracy przedstawiono na XXV Jubileuszowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Bydgoszcz, 23-25.09.2004; streszczenie opublikowane w Post Mikrobiol 2004, 43, supl. 1, 204.

nia nie dają jednak jednoznacznych odpowiedzi, co do znaczenia *C. difficile* w wywoływaniu ostrej biegunki u dzieci (1,7-10) zwłaszcza, że w próbkach kału mogą współwystępować toksynotwórcze i nie wytwarzające toksyn szczepy *C. difficile* (1,8), a szczepy toksynotwórcze mogą być izolowane z kału zarówno od dzieci z biegunką jak i bez biegunki (1,7,9,10).

W diagnostyce zakażeń wywoływanych przez *C. difficile* wykorzystywane są różne metody i strategie, z których nie wszystkie umożliwiają określenie patogennego szczepu tego gatunku (1-3,11-13). Wykrywanie tylko toksyn w próbkach kału (A lub B lub obu) jest standardową strategią diagnostyki CDAD (*Clostridium difficile associated diarrhoea /disease*) w 90% laboratoriów krajów europejskich, na co wskazują ostatnie dane ESGCD (ESCMID Study Group on *C. difficile*); około 60% laboratoriów wykrywa tylko toksynę A *C. difficile* (12). Wykrywanie tylko toksyny A w kale jest również częstą praktyką laboratoryjną w wielu krajach pozaeuropejskich (2) oraz w niektórych ośrodkach krajowych (13).

Celem własnych badań było określenie częstości wykrywania toksyny A *C. difficile* oraz innych patogenów jelitowych w kale dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki oraz innych podstawowych chorób (bez biegunki).

MATERIAŁ I METODY

Badania świeżych próbek kału (do 3 godz. od pobrania) na obecność toksyny A *C. difficile* wykonano w ciągu 2 miesięcy u łącznej liczby 74 dzieci, w momencie ich przyjmowania i kwalifikacji do leczenia szpitalnego. Stosowano gotowy zestaw *Oxoid C. difficile Toxin A Test* zawierający przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko toksynie A *C. difficile*. Ekstrakcję toksyny A *C. difficile* z próbek kału oraz wykonanie i interpretację wyników oznaczenia obecności toksyny, w szybkim teście jakościowym (wynik w czasie 30 minut), przeprowadzano zgodnie z procedurami opisanymi w ulotce załączonej przez producenta zestawu. Każdorazowo w dniu badania kilku lub nawet pojedynczej próbki kału dodatkowo wykonywano badania z załączonym roztworem dodatkowej kontroli, która jest rozcieńczonym jałowym przesączem hodowli toksynotwórczego szczepu *C. difficile* (ATCC 43255). Kontrolę ujemną stanowił rozcieńczalnik próbek kału. Wszystkie świeże próbki kału były badane równolegle na obecność bakterii jelitowych i grzybów, a kały biegunkowe ponadto na obecność antygenów rotawirusów i adenowirusów (Slidex Rota-Adeno Kit, *bioMérieux*). Do hodowli i identyfikacji bakterii oraz grzybów stosowano standardowe metody postępowania (3,14). Do hodowli *Escherichia coli* O:157:H7 (EHEC) stosowano podłoże MacConkey'a z sorbitolem (*Oxoid*). Typowanie serologiczne szczepów *Salmonella* i enteropatogennych *E. coli* (EPEC) wykonano przy użyciu surowic diagnostycznych firmy Biomed w Krakowie.

Dla każdego pacjenta opracowano ankietę uwzględniającą m.in. rozpoznanie, wiek, płeć, miejsce zamieszkania, dominujące objawy chorobowe i czas ich trwania, wcześniejszą antybiotykoterapię, przebieg choroby i czas leczenia w klinice. Na przeprowadzenie powyższych badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej AM w Białymstoku. Rozpoznanie CDAD u badanych dzieci ustalano w oparciu o następujące kryteria: obecność toksyny A *C. difficile* w kale, występowanie biegunki co najmniej 2 dni przed hospitalizacją i brak innych udokumentowanych patogenów. Ponadto, szczególną uwagę zwracano na ewentualne przyjmowanie antybiotyków w okresie 3 tygodni przed hospitalizacją (11).

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 6.0. Do wykazania różnic istotnych statystycznie stosowano testy χ^2 i poziom istotności $p=0,05$.

WYNIKI

Na podstawie danych z wywiadu i badania przedmiotowego 74 dzieci przyjętych do leczenia w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci AM w Białymstoku, u 43 (58,1%) ustalono rozpoznanie *dyspepsia* lub *gastroenterocolitis* (ostra biegunka), a u 31 (41,9%) – inne rozpoznania, bez towarzyszących objawów żołądkowo-jelitowych (grupa bez biegunki). Wiek badanych dzieci był w granicach od 6 miesięcy do 16 lat i 5 miesięcy (zakres 0,5-16,4 roku, $X=5,2, \pm 4,88$). Przeważały dzieci ze środowiska miejskiego (47/74-63,5%) i płci żeńskiej (40/74-60,8%).

Toksynę A *C.difficile* wykazano w kale u łącznej liczby 35 (47,3%) spośród 74 dzieci przyjętych do leczenia. W kale dzieci z ostrą biegunką częstość wykrywania toksyny A była niższa (18/43-41,9%) (tab. I) niż w kale dzieci bez biegunki (17/31-54,8%) (tab. II); nie były to jednak różnice istotne statystycznie ($p=0,2699 > p=0,05$). Toksynę A *C.difficile* wykryto u 11 (45,8%) spośród 24 chłopców z biegunką (tab.I) i u 10 (47,6%) wśród 21 bez biegunki (tab. II). U dziewczynek częstości te wynosiły odpowiednio 36,8% (7/19) i 70% (7/10). Analizowane częstości były porównywalne ($p>0,05$). Nie wykazano również różnic istotnych statystycznie ($p>0,05$) w częstości wykrywania toksyny A w zależności od płci u dzieci z biegunką (tab. I) i bez biegunki (tab. II). Różnic takich nie stwierdzono również w zależności od miejsca zamieszkania (miasto, wieś).

Wśród 18 dzieci z biegunką (wiek 0,7-16,4 roku; $X=3,7 \pm 3,85$), u których wykazano toksynę A, 11 (61,1%) było z grup wieku od ≤ 1 do 5 lat, a 7 (38,9%) z grup wieku $>5 - >14$

Tabela I. Częstość wykrywania toksyny A *C.difficile* w kale dzieci z biegunką

Table I. Frequency of *C.difficile* toxin A detection in stool specimens from children with diarrhoea

Wiek w latach (liczba dzieci)	Płeć		Miejsce zamieszkania		Razem (43)
	męska (24)	żeńską (19)	miasto (33)	wieś (10)	
≤ 1 (13)	1	2	2	1	3
$>1-2$ (15)	3	2	4	1	5
$>2-3$ (3)	1	1	1	1	2
$>3-4$ (2)	1	0	1	0	1
$>4-5$ (0)	0	0	0	0	0
$>5-6$ (4)	3	0	1	2	3
$>6-14$ (4)	2	1	2	1	3
>14 (2)	0	1	1	0	1
Razem (43)	11 (45,8%)*	7 (36,8%)*	12 (36,4%)*	6 (60,0%)*	18 (41,9%)

* $p>0,05$

* $p>0,05$

Tabela II. Częstość wykrywania toksyny A *C.difficile* w kale dzieci bez biegunki
 Table II. Frequency of *C.difficile* toxin A detection in stool specimens from children without diarrhoea

Wiek w latach (liczba dzieci)	Płeć		Miejsce zamieszkania		Razem (31)
	męska (21)	żeńską (10)	miasto (14)	wieś (17)	
≤ 1 (0)	0	0	0	0	0
>1-2 (4)	0	2	2	0	2
>2-3 (2)	0	0	0	0	0
>3-4 (1)	1	0	1	0	1
>4-5 (1)	0	0	0	0	0
>5-6 (3)	1	1	1	1	2
>6-14 (16)	6	4	4	6	10
>14 (4)	2	0	0	2	2
Razem (31)	10 (47,6%)*	7 (70,0%)*	8 (57,1%)*	9 (52,9%)*	17 (54,8%)

* p>0,05

* p>0,05

lat (tab. I). Odwrotne zależności dotyczyły 17 dzieci bez biegunki (wiek 1,4-15,5 roku; $X=8,9 \pm 4,48$), u których wykazano toksynę A; tylko troje dzieci (17,6%) było z grup wieku ≤1 do 5 lat, a 14 (82,4%) z grup >5 roku życia (tab. II). Porównanie tych częstości wykazało różnice istotne statystycznie ($p<0,05$).

Toksyna A *C.difficile* była wykrywana z porównywalną częstością ($p>0,05$) w kale dzieci wcześniej leczonych antybiotykami (5/15 – 33,3%) oraz w kale dzieci bez wcześniejszej antybiotykoterapii (30/59 – 50,8%) (tab. III). Podobne zależności dotyczyły za-

Tabela III. Toksyna A *C.difficile* w kale dzieci hospitalizowanych i wcześniejsza antybiotykoterapia
 Table III. *C.difficile* toxin A in stool specimens from hospitalized children and previously antibiotic therapy

Rozpoznanie	Toksyna A / liczba dzieci	Antybiotykoterapia (15) +		Antybiotykoterapia (59) -	
		Toksyna A		Toksyna A	
		+	-	+	-
Ostra biegunka	*18 / 43	5	7	13	18
**Inne	*17 / 31	0	3	17	11
Razem	35 / 74	5	10	30	29

* p > 0,05

** *meningitis parotidea* (21), *pharyngitis* (5), *varicella* (3), *mononucleosis* (1), *toxocarosis* (1)

równu dzieci z biegunką (5/12 (41,7%) i 13/31 (41,9%); $p>0,05$) jak i bez biegunki (0/3 i 17/28; $p>0,05$).

W kale dzieci z biegunką wykazano występowanie pałeczek Gram-ujemnych należących do 10 gatunków rodziny *Enterobacteriaceae* (pałeczki jelitowe) i 3 gatunków ziarniaków Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *E. faecium*). W próbkach kału dzieci bez biegunki występowało 7 gatunków pałeczek jelitowych (nie wykazano *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* i *Morganella morganii*) i 2 gatunki ziarniaków Gram-dodatnich (brak *Enterococcus faecium*) oraz gatunek *Pseudomonas aeruginosa* (5/31). W żadnej próbce kału nie wykazano bakterii należących tylko do jednego gatunku. Z porównywalną, najwyższą częstością występował gatunek *Escherichia coli* w kale dzieci z biegunką (37/43-86%) i w kale dzieci bez biegunki (30/31-96,8%) ($p>0,05$). Z żadnej próbki nie izolowano *E. coli* O:157:H7. Tylko 2 szczepy *E. coli* należały do EPEC (O55:K59 i O111:K98). Częstość występowania innych gatunków pałeczek jelitowych w kale obu grup dzieci była również porównywalna ($p>0,05$). Dotyczyło to liczby szczepów bakteryjnych następujących gatunków: *Klebsiella pneumoniae* i *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* i *P. vulgaris* oraz *Salmonella* Enteritidis (7/43-16,3% i 2/31-6,5%), a także *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*.

W kale dzieci z biegunką i bez biegunki z porównywalną częstością były izolowane ponadto drożdżaki z gatunku *Candida albicans* (13/43-30,2% i 10/31-32,3%) ($p>0,05$). Przeprowadzona analiza częstości występowania szczepów poszczególnych gatunków bakterii i *C. albicans* w zależności od współwystępowania (35/74) lub nie (39/74) toksyny A *C. difficile* nie wykazała różnic istotnych statystycznie dla żadnego z nich ($p>0,05$). Różnic takich nie stwierdzono także, gdy porównano częstość izolacji szczepów poszczególnych gatunków bakterii i *C. albicans* w obu grupach rozpoznania (ostra biegunka i inne) w zależności od współwystępowania bądź nie toksyny A *C. difficile*.

Ostatecznie, w oparciu o kompleksową analizę wyników badań bakteriologicznych kału 43 dzieci, u 17 (39,5%) z nich określono bakteryjny czynnik etiologiczny, który był potencjalnym enteropatogenem (tab. IV). Oznacza to, że bakterie wskazanego gatunku były dominujące w hodowli z kału (wzrost bardzo obfity +++; $>10^5$ CFU/1g kału), wśród współwystępujących szczepów innych gatunków bakteryjnych i/lub *C. albicans* (wzrost skąpy +; $\leq 10^3$ CFU/1g kału). U dalszych 6 (14%) dzieci z biegunką wykazano obecność enteropatogennych wirusów (*Rotavirus* i *Adenovirus*), u których nie występowało współzakażenie (koinfekcja) z innymi gatunkami bakterii uznanymi jako patogeny jelitowe (tab. IV). Ogółem u 23 (53,5%) dzieci z biegunką określono patogeny jelitowe, wśród których u 10 (43,5%) występowało zakażenie podwójne z *C. difficile* (toksyna A (+)).

U 20 (46,5%) dzieci z biegunką nie został określony enteropatogen, wśród których u 8 (40%) stwierdzono kryteria kliniczne i obecność toksyny A *C. difficile*. Ostatecznie u 8 (18,6%) dzieci rozpoznano chorobę biegunkową związaną z zakażeniem *C. difficile* (CDAD), nabytą w warunkach pozaszpitalnych, według przyjętych na wstępie kryteriów (p. Materiał i Metody). U 6/8 (75%) dzieci z kryteriami klinicznymi, bez określonego innego czynnika etiologicznego, tylko *C. difficile* (tox A+), nie występował czynnik ryzyka, tj. wcześniejsza antybiotykoterapia.

Podczas leczenia szpitalnego u 7 (16,3%) dzieci z biegunką obserwowano nawrót choroby (średnio w 6 dobie hospitalizacji), z porównywalną częstością wśród dzieci z dodatnim (3/18-16,7%) i z ujemnym wynikiem (4/25-16%) ($p>0,05$) toksyny A w kale w dniu

Tabela IV. Toksyna A *C.difficile* i enteropatogeny w próbkach kału dzieci z ostrą biegunką
 Table IV. *C.difficile* toxin A and enteropathogens in stool specimens from children with acute diarrhoea

Enteropatogeny (liczba dzieci)	Toksyna A <i>C.difficile</i>	
	+	-
Bakteryjne (17)	7	10
<i>Salmonella</i> Enteritidis (7)	4	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	1	4
<i>Escherichia coli</i> EPEC (2)	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	1	2
Wirusowe (6)	3	3
<i>Rotavirus</i> (2)	1	1
<i>Adenovirus</i> (4)	2	2
Określone – razem (23)	10	13
Nieokreślone (20)	8	12
Razem (43)	18	25

hospitalizacji. U 3 (9,7 %) dzieci z innymi rozpoznaniem również wystąpiła biegunka w 4-5 dobie pobytu w szpitalu; u 2 z nich były stosowane antybiotyki tylko w szpitalu, a toksyna A wykryta była tylko w ponownym badaniu kału biegunkowego (wynik ujemny w dniu przyjęcia). U co najmniej 3 dzieci (dwoje z biegunką bez toksyny A i jedno bez biegunki i bez toksyny A), biegunka szpitalna mogła mieć związek z antybiotykoterapią i nadmiernym namnożeniem *Candida albicans* w przewodzie pokarmowym.

DYSKUSJA

Zgodnie z sugestiami pochodzącymi z niektórych ośrodków zagranicznych i krajowych (1,9,10,15), że *C.difficile* może być potencjalnym czynnikiem sprawczym w ostrej biegunce u dzieci, wykonano badania porównawcze w tym kierunku. Do rozpoznania choroby biegunkowej u dzieci związanej z *C.difficile* (CDAD) zastosowano szybki test diagnostyczny ograniczony tylko do wykrycia obecności toksyny A *C.difficile* w kale dzieci z biegunką i bez biegunki. Takie postępowanie, uważane za metodę (strategię) standardową, jest powszechne w rutynowej diagnostyce w ośrodkach zagranicznych (2,12) oraz w ośrodku warszawskim (13). Za optymalną strategię w diagnostyce CDAD uważane jest równoległe izolowanie *C.difficile* (metody hodowlane) i wykrywanie toksyny w kale lub potwierdzenie toksynotwórczości wyosobnionych z próbek kału szczepów *C.difficile* (1,3,12). Strategia optymalna dla diagnostyki CDAD jest stosowana w ponad 50% laboratoriów w krajach takich jak Belgia, Holandia i Francja (12), a także w ośrodku warszawskim (10,13). Natomiast minimalna strategia, do której zalicza się prowadzenie tylko ho-

dowli lub wykrycie antygeny czy nieswoistych enzymów nie umożliwia określenia statusu toksynotwórczych *C. difficile*, które tylko jako takie mogą mieć istotne znaczenie kliniczne (2,12).

Z badań własnych wynika, że toksyna A *C. difficile* była wykrywana z wysoką, porównywalną ($p > 0,05$) częstością zarówno w kale od dzieci z biegunką (41,9%) jak i bez biegunki (54,8%). Ten fakt może wskazywać na występowanie toksynotwórczych szczepów w przewodzie pokarmowym u dzieci badanej populacji bez objawów biegunki (kolonizacja lub zakażenie bezobjawowe), a tym samym na znikomą wartość testu na wykrywanie toksyny A dla ustalenia biegunki o etiologii *C. difficile* (45,2% (14/31) – swoistość i 35,9% (14/39) – ujemna wartość predykcyjna).

Ze względu na powszechnie znany fakt, że ostra poantybiotykowa biegunka (AAD; *antibiotic associated diarrhoea*) u pacjentów hospitalizowanych, zarówno u dorosłych jak i dzieci, często ma związek z zakażeniem wywołanym przez *C. difficile* (CDAD) (1-3,16,17), w dalszej analizie wyników uwzględniono czynnik ryzyka, jakim mogłaby być również wcześniejsza antybiotykoterapia dla indukcji biegunki u dzieci nabytej w warunkach pozaszpitalnych. Nie wykazano jednak związku pomiędzy wcześniejszą antybiotykoterapią i obecnością w kale toksyny A *C. difficile*. Toksyna A z porównywalną częstością ($p > 0,05$) była wykrywana w kale dzieci z wcześniejszą antybiotykoterapią i bez antybiotykoterapii w badanej populacji dzieci; dotyczyło to zarówno dzieci z biegunką jak i bez biegunki ($p > 0,05$).

W naszej pracy zaadaptowano kryteria dla CDAD stosowane w laboratoriach francuskich podczas badania próbek kału pochodzących od chorych z rozpoznaną biegunką poantybiotykową (do 3 tygodni przed chorobą stosowane antybiotyki) (11). Wśród tych kryteriów, wcześniejsza antybiotykoterapia okazała się mało przydatnym markerem dla czułości (5/12 – 41,7%) i wartości predykcyjnej dodatniej (5/18 – 27,8%) stosowanego testu *Oxoid Toxin A* u 43 dzieci z ostrą biegunką pozaszpitalną. Test *Oxoid Toxin A* według kryteriów *Barbuta* i wsp. (11), łącznie z wcześniejszą antybiotykoterapią, charakteryzował się 50% (2/4) czułością i 25% (2/8) dodatnią wartością predykcyjną; swoistość (62,5% – 10/16) i ujemna wartość predykcyjna (83,3% – 10/12) również nie były wysokie. Natomiast test *Oxoid Toxin A* charakteryzował się 100% czułością (8/8) i 100% ujemną wartością predykcyjną (25/25) dla pozaszpitalnej biegunki u dzieci, trwającej ≥ 2 dni, z dodatnim wynikiem toksyny A w kale, przy braku określonych innych enteropatogenów. Swoistość przy tych kryteriach dla CDAD wynosiła 71,4% (25/35), a wartość dodatnia predykcyjna 44,4% (8/18) dla testu *Oxoid Toxin A*. Obniżona dodatnia wartość predykcyjna i swoistość spowodowana była faktem współwystępowania toksyny A *C. difficile* z innymi określonymi enteropatogenami u 10 (43,5%) dzieci z ostrą biegunką pozaszpitalną (zakażenie podwójne).

Pituch i wsp. (13) wykazali, że częstość wykrywania CDAD w kale 53 chorych z biegunką poantybiotykową w strategii optymalnej wynosiła 41,5%, a w strategii standardowej 30,2%. Testy na wykrywanie toksyny A w kale (*Oxoid Kits* lub *TCD* f. *Becton-Dickinson*) charakteryzowały się wysoką (93,5%) swoistością w porównaniu do hodowli szczepów toksynotwórczych *C. difficile*. Około 27% izolowanych *C. difficile* z kału nie wytwarzało toksyn, w kale od tych chorych nie wykrywano również toksyny. Autorzy (13) wykazali też obecność toksyny A bez hodowli toksynotwórczych *C. difficile*. *Barbut* i wsp. (11) wykazali, że *Toxin A Test* wykazuje 100% specyficzność i 100% pozytywną wartość

predykcijną dla diagnostyki CDAD poantybiotykowej. Obserwowano niższą (77,4%) swoistość i ujemną wartość predykcijną (96,6%) w porównaniu do hodowli szczepów toksynotwórczych *C.difficile*, dla których te wartości wynosiły 100%.

Jak dotąd nie jest możliwe jednak dokonanie poprawnego porównania epidemiologii biegunek poantybiotykowych szpitalnych i pozaszpitalnych, a nawet częstości CDAD pomiędzy szpitalami w jednym kraju, w których badania prowadzone są od lat. Zróżnicowana częstość CDAD i epidemiologia CDAD w wielu krajach wynika z bardzo różnych (lub braku w ogóle) kryteriów przyjmowanych przy podejmowaniu badań nad *C.difficile* oraz metod i strategii, które są stosowane w diagnostyce CDAD (1-3,12).

Ferreira i wsp. (9) wykrywali szczepy toksynotwórcze *C.difficile* tylko w kale dzieci w wieku od 5 miesięcy do 5 lat z ostrą biegunką z niską częstością wynoszącą 5,5%; częstość ta była dwukrotnie wyższa w grupie wiekowej 6-11 miesięcy (9,1%) w porównaniu do grupy noworodek – 5 m.ż. (4,5%) i 1- 5 lat życia (4,2%). Autorzy ci od żadnego dziecka bez biegunki z podobnych grup wiekowych nie izolowali szczepów *C.difficile*, a także nie obserwowali różnic w częstości ich wykrywania w kale dzieci z biegunką leczonych i nie leczonych antybiotykami.

Knobel i wsp. (15) przeprowadzili podobne badania wśród dzieci leczonych z powodu biegunki w okresie 3 miesięcy w uniwersyteckim szpitalu w Barcelonie. Tylko w 3 przypadkach (15,8%) biegunka mogła być skojarzona z antybiotykiem jako czynnikiem ryzyka (2 przypadki biegunki pozaszpitalnej i 1 – nabytej w szpitalu). Autorzy (15) toksynę A *C.difficile* wykryli u 6 dzieci, tylko < 2 roku życia, co stanowiło 60% pacjentów tej grupy wiekowej. W badaniach własnych w okresie 2 miesięcy częstość wykrywania toksyny A w grupie wiekowej ≤1-2 wynosiła 28,6% (8/28 tej grupy wiekowej); podobnie niższą częstość obserwowano dla grupy wiekowej ≤1 r.ż. – 23,1% (3/13) i >1-2 lat –33,3% (5/15). W badaniach własnych wykazano ponadto, że u 5/43 (11,6%) dzieci z biegunką i toksyną A była wcześniejsza antybiotykoterapia, wśród których tylko dwoje (2/8) z nich spełniało przyjęte kryteria dla rozpoznania CDAD, a u trójga z nich były określone inne czynniki patogenne takie jak: *Salmonella* Enteritidis, *Klebsiella pneumoniae* i *Rotavirus* (po 1 kazdy),co uznano jako zakażenie podwójne z *C.difficile* (3/10).

Biegunkę pochodzenia szpitalnego w materiale własnym związaną z antybiotykiem i zakażeniem *C.difficile* rozpoznano u 2 (6,5%) wśród dzieci leczonych z powodu innych chorób niż biegunka, u których w badaniu w dniu przyjęcia nie wykazano toksyny A *C.difficile*. *Oguz* i wsp. (16) wśród 100 dzieci z biegunką szpitalną, u 69 z nich określili czynniki etiologiczne; CDAD rozpoznano u 16%. Wszystkie przypadki CDAD – szpitalnej biegunki były związane z antybiotykoterapią, a wiek tych dzieci był w zakresie od 2 miesięcy do 13 lat (średnia 5,4 roku). Autorzy (16) wykazali również obecność toksyn A i B w kale 10% (5/50) dzieci <2 lat życia, u których pomimo leczenia antybiotykami w szpitalu, nie występowała biegunka.

Pinto i wsp. (17) wyizolowali 14 (6,7%) szczepów *C.difficile* z kału 210 badanych dzieci hospitalizowanych (96) i leczonych ambulatoryjnie (114). Szczepy toksynotwórcze *C.difficile* wykryto u 4,2% dzieci hospitalizowanych i 3,5% dzieci ambulatoryjnych. Wykluczenie udziału innych drobnoustrojów pozwoliło autorom na stwierdzenie, że laseczki *C.difficile* mogą być czynnikiem etiologicznym biegunek szpitalnych i pozaszpitalnych u dzieci (17).

W badaniach własnych zakażenie pojedyncze *C.difficile* (CDAD) rozpoznano u 8

(18,6%) dzieci z biegunką, które z *Salmonella* Enteritidis (16,3%) były dominujące wśród 17 (39,5%) dzieci z określonym czynnikiem bakteryjnym wykrytym w klasycznych metodach hodowli. Zakażenie wirusowe wykazano łącznie u 6 (14%) dzieci z biegunką, 2 (4,7%) rotawirusowe, a 4 (9,3%) – adenowirusowe. Niska częstość zakażeń rotawirusowych u dzieci z ostrą biegunką w tym materiale wynika z ograniczenia okresu badań dzieci tylko do 2 miesięcy. Z całorocznych systematycznych badań prowadzonych w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci AM w Białymstoku w 2003 roku wiadomo, że częstość zakażeń rotawirusami u dzieci do lat 7 leczonych z powodu ostrej biegunki wynosiła 16% (18).

Meisel-Mikołajczyk i wsp. (19) wykonały badania nad mikroflorą jelitową z hodowlą szczepów *C.difficile* i potwierdzeniem ich toksyczności u 23 dzieci w wieku od 14 dni do 18 miesięcy (<1-2 lat) z biegunką w momencie hospitalizacji, podobnie jak w badaniach własnych. Autorki wykazały obecność tylko 2 (8,7%) szczepów toksynotwórczych *C.difficile*; częstość ta była 3-krotnie niższa w porównaniu do badań własnych wśród dzieci z podobnej grupy wiekowej. Inne bakterie patogenne (EPEC – 43,5%, *Klebsiella* spp. – 8,7% i *S.aureus* – 8,7%) wykazane przez Autorki (19) u dzieci z biegunką występowały z porównywalną częstością w kale dzieci zdrowych, z wyjątkiem enteropatogennych szczepów *E.coli* (EPEC), które dominowały u dzieci z najmłodszej grupy wiekowej (<2 lat) z biegunką. Autorki nie odnotowały biegunki poantybiotykowej związanej z *C.difficile* podczas ponownego badania kału pod koniec hospitalizacji dzieci (19). Z innych badań Meisel-Mikołajczyk i wsp. (10) przeprowadzonych u dzieci w wieku od 2 miesięcy do 4 lat w dniu hospitalizacji wynika, że częstość wykrywania toksynotwórczych szczepów *C.difficile* u dzieci z biegunką (4,7%) była wyższa niż u dzieci bez biegunki (1,4%); często też izolowane były *C.difficile* niewytwarzające toksyn.

Zarówno wieloletnie już badania prowadzone przez Meisel-Mikołajczyk, Martirosian i innych z ośrodka warszawskiego (10,13,19,20) oraz z różnych ośrodków zagranicznych (1,9,16,17), a także podjęte wstępne badania własne wskazują na możliwy udział *C.difficile* w indukcji biegunki szpitalnej i pozaszpitalnej u dzieci.

WNIOSKI

1. Częstość wykrywania toksyny A *Clostridium difficile* w kale dzieci z biegunką i bez biegunki była porównywalna ($p>0,05$), bez istotnego statystycznie związku z wcześniejszą antybiotykoterapią w obu grupach badanych dzieci ($p>0,05$).
2. Patogeny jelitowe (58% bakterie i 14%-wirusy) wykazano u 72% dzieci z ostrą biegunką pozaszpitalną, wśród których u 49% występował jeden, a u 23% dwa patogeny (zakażenie mieszane z *C.difficile*).
3. Biegunka indukowana *Clostridium difficile* (CDAD) (19%) i *Salmonella* Enteritidis (16%) były czynnikami najczęściej stwierdzanymi u dzieci z ostrą biegunką pozaszpitalną.
4. *Clostridium difficile* Toxin A Test (Oxoid) może być z powodzeniem wykorzystany jako test skryningowy do badania tylko kałów biegunkowych i do diagnostyki CDAD u dzieci spełniających kryteria takie jak: biegunka ≥ 2 dni, brak innego określonego czynnika enteropatogennego, dodatni test na toksynę A.

D Rozkiewicz¹, ML Zaremba², K Fiedoruk², T Daniluk², M Ściepuk²,
B Kurzątkowska¹, A Sulik¹, E Oldak¹

CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN A AND OTHER ENTEROPATHOGENS IN STOOL
SPECIMENS OF CHILDREN HOSPITALIZED DUE TO ACUTE DIARRHOEA

SUMMARY

A total of 74 fresh stool specimens obtained from children with acute diarrhoea (43) and without diarrhoea (31) were examined simultaneously for bacteria pathogens (culture methods) and for *Clostridium difficile* toxin A (*Oxoid Toxin A Kits*) and enteric viruses (only diarrhoeal samples) (*Slidex Rota-Adeno Kits*; *bioMérieux*). One (49%) or dual with *C. difficile* (23%) enteric pathogens associated with community-acquired diarrhoea (58% bacteria and 14% viruses) in 31 (72%) children were recognized. *Clostridium difficile* associated diarrhoea (CDAD) (18,6%) and *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis (16,3%) the most commonly were observed. Children were considered to have CDAD if they met special criteria such as the positive test for *C. difficile* toxin A, the presence of diarrhoea for at least 2 days and no other documented enteric pathogens. It was found that antibiotic usage in the previous 3 weeks as a main risk factor for CDAD not be frequent (only 2/8 CDAD). The frequency of *C. difficile* toxin A detection in the diarrhoeal stool specimens from children treated or not treated with antibiotics was comparable ($p>0,05$); this same observed when stool specimens from children without diarrhoea were tested. The frequency of toxin A detection in stool specimens from children with acute diarrhoea (41,9%) and without diarrhoea (54,8%) was comparable ($p>0,05$) also. In conclusion, we recommended detection of toxin A by *C. difficile* toxin A Test as the rapid screening in diarrhoeal stool specimens only because the high predictive value of a negative test and the high sensitivity for CDAD with special criteria were found.

PIŚMIENNICTWO

1. Onderdonk AB, Allen SD. *Clostridium*. W: Manual of clinical microbiology (eds. Murray P.R. et al), 6th ed., Washington: ASM Press;1995:574-86.
2. Thomas C, Stevenson M, Riley TV. Antibiotic and hospital-acquired *Clostridium difficile* – associated diarrhoea: systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1339-50.
3. Zaremba ML, Borowski J. Mikrobiologia lekarska. Wyd. 3, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL;2001:864s.
4. Lysterly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:1-18.
5. Karasawa T, Nojiri T, Hayashi Y, i in. Laboratory diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction: presence of toxin genes and their stable expression in toxigenic isolates from Japanese individuals. *J Gastro* 1999;34:41-5.
6. Borriello SP. Host and microbial determinant of the spectrum of *Clostridium difficile* mediated gastrointestinal disorders. *Microbiol Ther* 1985;15:231-6.
7. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, i in. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microb Mol Biol Rev* 1998;62:1157-70.
8. Borriello SP, Honour P. Concomitance of cytotoxicogenic and non cytotoxicogenic *Clostridium difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:1006-7.
9. Ferreira CEA, Nakano V, Durigon EL, i in. Prevalence of *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in São Paulo city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:287-99.

10. Meisel-Mikołajczyk F, Rafałowska K, Torbicka E, i in. Mikroflora jelitowa u dzieci z wyhodowaniem szczepów *Clostridium difficile* i *Bacteroides fragilis* w momencie hospitalizacji. *Pediatr Pol* 1999;4:333-7.
11. Barbut F, Mace M, Lalande V, i in. Rapid detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:480-3.
12. Barbut F, Delmçe M, Brazier JS, and the ESCMID Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:989-96.
13. Pituch H, Obuch-Woszczatyński P, Gholamreza SR, i in. Wykrywanie toksynotwórczości szczepów *Clostridium difficile* przy pomocy szybkich metod diagnostycznych. *Med Dośw Mikrobiol* 1998;50:55-61.
14. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, i in. *Manual of clinical microbiology*, Wyd.6, Washington, ASM Press;1995:1482s.
15. Knobel H, Salvado M, Segura C. *Clostridium difficile* and diarrhea associated with the use antibiotic in the origin of nosocomial and community-acquired diarrhea. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1996;14:96-100.
16. Oguz F, Uysal G, Dasedmir S, i in. The role of *Clostridium difficile* in childhood nosocomial diarrhea. *Scand J Infect Dis* 2001;33:731-3.
17. Pinto LJ, Alcides AP, Ferreira EO, i in. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol* 2003;52:1095-9.
18. Sulik A, Ołdak E, Rożkiewicz D, i in. Prospektywne badanie zakażenia rotawirusami dzieci hospitalizowanych w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci AM w Białymstoku w 2003 r. *Przeegl Epidemiol* 2004;58:475-81.
19. Meisel-Mikołajczyk F, Rafałowska K, Martirosian G, i in. Bakteryjna flora przewodu pokarmowego w przebiegu biegunki u niemowląt na wstępie i przy końcu hospitalizacji. *Pediatr Pol* 1995;52:553-8.
20. Szczęsny A, Martirosian G. Epidemiologia zakażeń *Clostridium difficile*. *Przeegl Epidemiol* 2002;56:49-56.

Otrzymano: 17.02.2005 r.

Adres autorów:

Dr n. med. Dorota Rożkiewicz
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Samodzielny Publiczny Dziecięcy Szpital Kliniczny AM w Białymstoku
ul. Waszyngtona 17, 15-174 Białystok
tel. (0-85) 745 06 93