

Aleksandra Mirecka

## **CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION A CURRENT THERAPEUTIC AND EPIDEMIOLOGICAL PROBLEM**

### **ZAKAŻENIA CLOSTRIDIUM DIFFICILE – NADAL AKTUALNY PROBLEM LECZNICZY I EPIDEMIOLOGICZNY**

Regional Specialist Hospital of dr. Wł. Biegański in Łódź, Department of Laboratory Diagnostics  
Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. Wł. Biegańskiego w Łodzi, Dział Diagnostyki Laboratoryjnej

#### ABSTRACT

*Clostridium difficile* (CD) is the most common etiologic agent of antibiotic-associated diarrhea. The number of infections has increased dramatically in the last decade. Although the diseases caused by CD are mostly related to health care and antibiotic therapy, some are community-acquired cases. This article explains the pathogenesis of this microorganism, pointing to depletion of intestinal microflora diversity and the inadequate response of the immune system as an important factor predisposing the development of CD infection. Previous published studies have demonstrated an increased incidence of hypervirulent ribotype 027 in Poland and Europe and also the emergence of other ribotypes in various parts of Europe with increased potential for pathogenicity. A high percentage of CD strains, which were isolated in Poland demonstrated resistance to ciprofloxacin, imipenem, erythromycin and moxifloxacin and multidrug resistance. In addition, there was observed a trend to increase in the value of MIC for vancomycin and metronidazole. Factors that may affect the reduction of effectiveness in drug therapy include the sublethal doses achieved in the intestinal lumen, heterogeneity of resistance to metronidazole, the ability to form the biofilms, presence of protein, which repair damaged DNA, transformation of an antibiotic to inactive form and mutations leading to changes to the binding sites of vancomycin.

**Key words:** *Clostridium difficile*, antibiotic therapy, antibiotic-associated diarrhea, antibiotic-resistance

#### STRESZCZENIE

*Clostridium difficile* (CD) jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym poantybiotykowych biegunek. Liczba zakażeń w ostatniej dekadzie gwałtownie wzrosła. Choć zachorowania wywołane przez CD są głównie związane ze służbą zdrowia i antybiotykoterapią, to część z nich dotyczy przypadków pozaszpitalnych. Artykuł wyjaśnia patogenezę tego drobnoustroju, wskazując zubożenie różnorodności flory jelitowej oraz nieadekwatny poziom pobudzenia układu odpornościowego jako istotne czynniki predysponujące do rozwoju zakażenia. Na podstawie opublikowanych badań wykazano wzrost częstości występowania w Polsce i Europie hipervirulentnego rybotypu 027 oraz pojawienie się w różnych rejonach Europy innych rybotypów o zwiększonym potencjale chorobotwórczości. Wysoki odsetek szczepów CD wyizolowanych w Polsce wykazuje oporność na ciprofloksacynę, imipenem, erytromycynę i moksifloksacynę oraz charakteryzuje się wielolekoopornością. Ponadto zaobserwowano tendencję do wzrostu wartości MIC dla wankomycyny i metronidazolu. Czynniki, które mogą wpływać na zmniejszenie skuteczności stosowanych w terapii leków to subletalne dawki osiągnięte w świetle jelita, heterogenność poziomu oporności na metronidazol, zdolność do tworzenia biofilmu, obecność białek naprawiających uszkodzone DNA, przekształcenie antybiotyku do postaci nieaktywnej oraz mutacje prowadzące do zmiany miejsca wiązania wankomycyny.

**Słowa kluczowe:** *Clostridium difficile*, antybiotykoterapia, biegunka poantybiotykowa, lekooporność

## INTRODUCTION

*Clostridium difficile* infection (CD) is the most common cause of antibiotic-associated diarrhea in developed countries. The incidence in the selected areas has risen 4-fold over the last decade (1). Increased number of severe cases are associated with higher mortality, which consists up to 9-38% (2). Recurrent infections are an additional problem, which affects 15-35% of cases (3). The cost of CD infection in Europe is estimated to be € 3 billion per year and is expected to be higher, because patients with predisposing factors still arrive (4).

## CHARACTERISTICS OF ETIOLOGIC AGENT

CD is a bacterium commonly found in the external environment: soil, water, and in the digestive tract of animals and humans. This Gram-positive, anaerobic bacilli occurs in two forms, as a vegetative cell and spore. Vegetative cells usually survive 15 minutes on dry, indoor surfaces. Unfavorable environmental conditions cause the sporulation, what changes the sensitive form in highly resistant. This characteristic combined with resistance to commonly used antibiotics makes it easy to survive in the hospital environment. Commonly used alcohol-based disinfectants or quaternary ammonium salts do not eliminate the spores, which can survive several months in the hospital environment (5). Particularly high surface contamination occurs around patients with diarrhea. Therefore, infections can be spread by toilet seat, wash-basins, cabinets, beds, telephones and medical equipment: stethoscopes, sleeves to pressure measurements or thermometers. Environmental contamination, though much smaller, also occurs around the asymptomatic carriers, who can also be a source of infections (6). However, the current guidelines do not recommend detection or isolation of asymptomatic carriers.

Because 30% of cases are not related to healthcare and antibiotic therapy (7), it is suggested that CD infection could be a food-borne disease. The presence of these bacilli was detected in beef, pork, turkey, vacuum-wrapped meat and meat sauces (8). Transmission may be promoted by the fact that freezing meat and short term heating does not eliminate the contamination. Spores survive a 10 minute exposure to a temperature of 85°C, and even two-hours heating to 71°C (9). Sensitivity to temperature varies in the different strains. Kai Deng et al. presented that one of the analyzed strains even shows an increased ability to germinate spores after 4 months storage in food products at room temperature (5).

## WSTĘP

Zakażenie *Clostridium difficile* (CD) jest najczęstszą przyczyną poantybiotykowych biegunek w krajach rozwiniętych. Liczba przypadków w ostatniej dekadzie wzrosła na wybranych terenach aż 4-krotnie (1). Zwiększona liczba przypadków o ciężkim przebiegu związana jest z coraz wyższą śmiertelnością sięgającą 9-38% (2). Dodatkowe problemy stwarzają nawroty zakażeń, które dotyczą 15-35% przypadków (3). Skalę zagadnienia obrazują wydatki, jakie ponoszone są w Europie z tego powodu, a które szacowane są na 3 miliardy Euro roczne (4). Niestety w przyszłości należy się spodziewać dalszego wzrostu zapadalności, ponieważ przybywa pacjentów z czynnikami predysponującymi do rozwoju choroby.

## CHARAKTERYSTYKA CZYNNIKA ETIOLOGICZNEGO

CD to bakteria powszechnie występująca w środowisku zewnętrznym: w glebie, wodzie oraz w przewodzie pokarmowym zwierząt i ludzi. Jest Gram-dodatnią, bez-tlenową laseczką występującą w dwóch formach - jako komórka wegetatywna oraz przetrwalnik. Komórki wegetatywne zwykle przeżywają do 15 minut na suchych powierzchniach w zamkniętym pomieszczeniu. Niekorzystne warunki środowiska wywołują proces sporulacji, przekształcający wrażliwą postać komórki w formę uśpioną. Cecha ta połączona z opornością na powszechnie stosowane antybiotyki ułatwia przeżycie w środowisku szpitalnym. Pospolicie stosowane środki dezynfekcyjne na bazie alkoholu lub czwartorzędowych soli amoniowych nie eliminują przetrwalników. Czas przeżycia spor w środowisku szpitalnym może wynosić kilka miesięcy (5). Szczególnie wysokie skażenie powierzchni występuje wokół chorego pacjenta z biegunką. Zatem drogą szerzenia się zakażeń mogą być deski sedesowe, umywalki, szafki, uchwyty łóżek, telefony oraz sprzęt medyczny: stetoskopy, rękawy do mierzenia ciśnienia, czy termometry. Skażenie środowiska, choć znacznie mniejsze, wykryto również w otoczeniu bezobjawowych nosicieli, którzy również mogą być źródłem transmisji zakażeń (6). Jednak aktualne rekomendacje nie zalecają wykrywania nosicielstwa, ani izolacji bezobjawowych przypadków.

Ponieważ nawet 30% zachorowań dotyczy przypadków niezwiązanych ze służbą zdrowia i antybiotykoterapią (7), sugeruje się możliwość przekazania infekcji drogą pokarmową. Obecność tych laseczek wykryto u zwierząt hodowlanych oraz w produktach spożywczych, takich jak wołowina, wieprzowina, mięso indycze, mięso pakowane próżniowo, czy sosy mięsne, nasuwa przypuszczenie transmisji pokarmowej oraz odzwierzęcej (8). Takiej transmisji może sprzyjać fakt, że mrożenie mięsa oraz krótkotrwała obróbka termiczna nie eliminuje skażenia. Przetrwalnik przeżywa 10 minutową ekspozycję na temperaturę 85°C oraz nawet dwugodzinne podgrzewanie

## THE PATHOGENESIS

Spores are resistant to digestive juices, which allows bacteria safe passage through the stomach to the intestines, where it starts the process of germination to vegetative form. Bacterial flagella allow cell locomotion to binding surface. In this process, surface cysteine protease Cwp84 is involved, which allows to penetrate protective layer of mucus. Adherence to the specific epithelial receptor by the pathogenic adhesins is the first stage of the infection (10). However, colonization of the bowel does not always cause symptoms of disease. Asymptomatic carriage occurs in 3-15% of adults (11). A high incidence of colonization was observed in hospitalized patients and nursing homes residents. According to a study conducted in the United States 46% of the residents can be carriers (12). Particularly frequent colonization, consisting of 37%-70% of population was observed in newborns and infants (13). It was observed that such small children showed no symptoms of disease, probably due to immaturity of receptors for bacterial toxins (14).

CD is acquired from the mother or from the surrounding environment and can easily settle in the uncolonized digestive tract of neonates. During ageing colonization resistance is developed. CD is displaced by saprophytic microflora, which block the space to adhere, use nutrients and often produce bacteriocins. The representatives of the saprophytic anaerobic intestinal flora, such as: *Coprococcus*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* and *Ruminococcus* produce butyric acid, which is the main source of energy for colonocytes, and in addition inhibits inflammation and increases the tightness of the intestinal barrier by stimulating the production of mucin and antimicrobial peptides. Patients with CD infection have a paucity of bacteria producing butyric acid, compared to healthy controls (15). Intestinal microflora transform primary bile acids to compounds, which strongly inhibit spore germination (10). Bifidobacterium, breast milk-derived genus have an important protective role. It has been shown that breast-fed babies are less likely to develop CD infection (14% vs. 30%). After the first year of life the colonization decreases to characteristic levels for adults (16). Antibodies, which were produced during this time, protect against infection in further life. Antibiotic therapy, chemotherapy and stress have a negative effect on the intestinal microflora, and regeneration requires a long time. The imbalance through the depletion of intestinal diversity unlocks the ecological niches, which promotes the development of infection.

The main factors causing the symptoms of disease are two toxins produced by the CD: enterotoxin TcdA and cytotoxin TcdB. Glycosyltransferase activity

do 71°C (9). Wrażliwość na temperaturę jest różna u poszczególnych szczepów. Co ciekawe, w pracy Kai Deng i wsp. jeden spośród analizowanych szczepów zwiększył zdolność do kiełkowania spor po 4 miesiącach przetrzymywania w 23°C w produktach spożywczych (5).

## PATOGENEZA

Przetrwalnik wykazuje oporność na soki trawienne, co umożliwia bakteriom bezpieczne przejście przez żołądek, aż do jelit, gdzie rozpoczyna się proces kiełkowania do postaci wegetatywnej. Dzięki wici komórka bakteryjna wykazuje zdolność aktywnego ruchu, który umożliwia dotarcie do miejsc uchwytu. W procesie tym udział bierze powierzchniowa proteaza cysteinowa Cwp84, która umożliwia sforsowanie ochronnej warstwy śluzu. Pierwszym etapem zakażenia jest przyleganie komórek bakteryjnych do swoistych receptorów nabłonka, w którym kluczową rolę odgrywają patogenne adhezyny (10). Jednak kolonizacja jelit nie zawsze prowadzi do wystąpienia objawów chorobowych. Szacuje się, że około 3-15% dorosłych osób jest bezobjawowymi nosicielami tej bakterii (11). Wysoką częstość kolonizacji obserwuje się u pacjentów szpitalnych oraz rezydentów domów opieki społecznej. W badaniach przeprowadzonych w USA nosicielstwo stwierdzono u 46% pensjonariuszy (12). Ciekawym zjawiskiem jest szczególnie częsta kolonizacja przewodu pokarmowego noworodków i niemowląt, dotycząca 37%-70% tej populacji (13). U tak małych dzieci nie obserwuje się objawów chorobowych, prawdopodobnie ze względu na niewykształcone jeszcze receptory dla bakteryjnych toksyn (14).

Szczep patogennej laseczki, który nabywany jest od matki lub z otaczającego środowiska, łatwo osiedla się w niezagospodarowanym przez mikroorganizmy przewodzie pokarmowym młodego człowieka. Jednak wraz z wiekiem dochodzi do rozwinięcia tzw. oporności kolonizacyjnej. CD zostaje wypierany przez zasiedlające jelita saprofityczne drobnoustroje, które blokują miejsca przylegania, zużywają substancje odżywcze oraz często produkują szkodliwie dla patogenów bakteriocyny. Przedstawiciele saprofitycznej beztlenowej flory jelitowej, np. rodzaje: *Coprococcus*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* produkują kwas masłowy, który jest dla kolonocytów głównym źródłem energii, dodatkowo hamuje stan zapalny oraz zwiększa szczelność bariery jelitowej poprzez stymulowanie produkcji mucyny i przeciwbakteryjnych peptydów. U pacjentów zakażonych CD wykazano znacznie mniejszą liczbę bakterii produkujących maślan w porównaniu do osób zdrowych (15). Ponadto drobnoustroje saprofityczne przekształcają pierwotne kwasy żółciowe, mające właściwości stymulacji kiełkowania przetrwalników, do związków silnie hamujących ten proces (10). Ważną rolę ochronną spełnia pozyskany z mlekiem matki rodzaj *Bifidobacterium*. Wy-

of these enzymes provide to deactivate the proteins: RhoA, Rac1, Cdc42, which are responsible for the polymerization of actin fibers. The effects of this action are changes in cytoskeleton, causing death of colonocytes and excessive secretion of water and electrolytes into the intestine. Only those strains of CD which produce toxins are considered to be pathogenic. It is suggested, that 86% of CD strains may produce toxins (17). In addition, about 20% of the strains produce a binary toxin, which is likely to intensify the action of other toxins and stimulates epithelial cells to stick the microtubule out, which facilitates adhesion (18). It is believed that their additional presence enhances the risk of relapse (19). Furthermore, the toxins induce a strong inflammatory response in the intestinal lumen by activating cytokines, stimulating macrophages to produce TNF- $\alpha$  and inducing neutrophil chemotaxis. Massive disintegration of tissues and epithelial barrier disruption is observed. An efficient immune system is essential to reduce and eliminate the infection, but over-activity can lead to damage in the intestines. Infiltration of inflammatory cells, mucins, fibrin and fragments of damaged cells create a band defined as a pseudomembranes.

The host immune response has a greater impact on the course of infection than virulence factors of the pathogen. It has been shown that high levels of IL-8, IL-23 and CXCL5 predicts prolonged time of disease (18). This data suggest, how important role of eradication of CD infection plays properly balanced immune system. Bacterial toxins and activity of immune response directly cause symptoms of diarrhea, which can be mild to persistent and debilitating. Concomitant symptoms can be abdominal pain, fever, nausea and vomiting. The most severe clinical form is pseudomembranous colitis, which may lead to obstruction and toxic megacolon. Such cases require a colectomy and are burdened with high mortality.

Risk factors of CD infection, in addition to antibiotic therapy are reduced efficiency of the immune system, the use of proton pump inhibitors, prolonged hospitalization, a history of gastrointestinal surgery, parenteral nutrition, diabetes, vitamin D deficiency, Crohn's disease, and ulcerative colitis. Patients over 65 years old and those which receive chemotherapy are especially susceptible to infection (20), (21).

#### EPIDEMIOLOGY OF CD INFECTIONS

The standardized typing methods was needed due to rapid increase of CD infections and spreading strains with high pathogenicity potential in many countries. The most popular method for differentiation of strains within the CD species is PCR-ribotyping. This technique is based on the detection of differences in

kazano, że u dzieci karmionych piersią rzadziej występuje nosicielstwo CD (14% vs 30%). Po pierwszym roku życia kolonizacja spada do poziomu charakterystycznego dla osób dorosłych (16). Wytworzone w tym czasie przeciwciała chronią przed infekcją w dalszym życiu. Antybiotykoterapia, chemioterapia, a nawet stres wpływają negatywnie na skład flory jelitowej, której odbudowa wymaga długiego czasu. Zachwianie równowagi poprzez zubożenie różnorodności gatunkowej odblokowuje nisze ekologiczne, co sprzyja rozwojowi zakażenia.

Głównymi czynnikami wywołującymi objawy chorobowe są dwie toksyny produkowane przez CD: enterotoksyna TcdA oraz cytotoksyna TcdB. Są to enzymy o aktywności glukozylo-transferazy, które inaktywują białka odpowiedzialne za polimeryzację włókien aktyny (RhoA, Rac1, Cdc42), co prowadzi do zmian w cytoskieletcie powodujących śmierć kolonocytów. Efektem jest nadmierne wydzielanie wody i elektrolitów do światła jelita. Tylko te szczepy CD, które produkują toksyny, uznaje się za chorobotwórcze. Według niektórych źródeł może dotyczyć to 86% szczepów (17). Ponadto około 20% szczepów produkuje toksynę binarną, która prawdopodobnie wzmacnia działanie pozostałych toksyn oraz stymuluje komórki nabłonka do wysuwania mikrotubuli, co ułatwia etap kolonizacji (18). Uważa się, że jej dodatkowa obecność wpływa na podwyższone ryzyko nawrotów (19). Poza tym toksyny wywołują silną odpowiedź zapalną w świetle jelita, aktywując cytokiny prozapalne, stymulując makrofagi do produkcji TNF- $\alpha$  oraz działając chemotaktycznie na neutrofile. Efektem jest masywna dezintegracja tkanek i rozszczelnienie bariery jelitowej. Choć sprawny układ immunologiczny jest niezbędny w ograniczeniu i eliminacji zakażenia, to jego nadmierna aktywność może doprowadzić do uszkodzenia jelita. Nacieki z komórek zapalnych, mucyn, włókien oraz fragmenty uszkodzonych komórek tworzą pasma określane jako błony rzekome.

Niektóre źródła podają, że większy wpływ na przebieg zakażenia ma stan układu immunologicznego pacjenta niż właściwości chorobotwórcze patogenu. Dowiedziono, że wysoki poziom IL-8, IL-23 oraz CXCL5 prognozuje wydłużony czas trwania choroby (18). To obrazuje, jak ważny dla skutecznej eradykacji zakażenia jest odpowiednio zrównoważony poziom pobudzenia układu odpornościowego.

Bezpośrednim skutkiem działania toksyn bakteryjnych oraz odpowiedzi immunologicznej na toczące się zakażenie jest biegunka o różnym nasileniu, od łagodnej po uporczywą i wyniszczającą. Objawami towarzyszącymi mogą być kurczowe bóle brzucha, gorączka, nudności oraz wymioty. Najcięższą postacią kliniczną jest rzekomoblioniaste zapalenie jelit, które może doprowadzić do niedrożności, czy toksycznego rozdęcia okrężnicy. Takie przypadki wymagają kolektomii i są obciążone dużą śmiertelnością.

DNA with high variability region that occurs between 23SrRNA and 16SrRNA. It has been described over 300 different ribotypes so far, but only a few of them particularly often cause infections and outbreaks.

Increased incidence of infections, which were noted in the U.S. and Europe is associated with the emergence of a hypervirulent strain belonging to PCR ribotype 027. This strain was also spread in Asia and Australia (22). Increased virulent potential is associated with a high resistance to fluoroquinolones, to increased production of toxins A and B, and an additional binary toxin production (23).

RT027 for the first time was isolated in Poland in 2005 (24). The analysis of strains, which was isolated in 2008-2010 from the three Polish hospitals (Warsaw, Płock, Poznań) revealed that 23% was belonged to ribotype 027 (25). However, the data collected in 2011-12 in study ClosER (*Clostridium difficile* European Resistance) show that RT 027 consist 45% among Polish isolates (26). Prevalence of RT027 coincides with other observations. In accordance with their results, 57.8% of strains isolated from 10 Polish hospitals in 2012 belonged to this hypervirulent ribotype (27). This worrying trend which occurs in Poland, was confirmed by a wide analysis carried out by the EUCLID (*The European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea*) in 2013. This study included about 600 toxigenic strains received from 19 countries of Europe. A total of 125 ribotypes were identified, of which the most prevalent was RT027 (19%). The highest proportion of strains belonging to the RT 027 were recorded in Germany (43%), Hungary (17%), Poland (16%) and in Romania (12%) (28). Comparison of the epidemiological data from 2008 reveals almost 4-fold increase in prevalence of RT027 in Europe (29). In addition, this study showed that the higher incidence rate of RT027 is correlated with less diversity of other ribotypes, what confirms able to effective spread. It is also noted that this study showed a high diversity of ribotypes between countries from different parts of Europe. Although hypervirulent ribotype is highly dominated in the countries of the East and West, but number of isolations from North and South of Europe is small or negligible (28).

Epidemiological analysis of the situation in the individual countries revealed occurrence of other endemic strains with high virulent potential. The example illustrating this phenomenon is the occurrence of RT176 in the Czech Republic, which accounted for 38% of all ribotypes. Furthermore, RT176 is the second most often isolated ribotype in Poland (30). Interestingly, RT176 shows similarities to RT027. Both ribotypes produce binary toxin and have a characteristic deletion in 117 nucleotide position

Czynnikami predysponującymi do rozwoju zakażenia wywołanego przez CD, poza antybiotykoterapią jest obniżona sprawność układu immunologicznego, stosowanie inhibitorów pompy protonowej, długotrwała hospitalizacja, przebyte zabiegi operacyjne dotyczące przewodu pokarmowego, żywienie pozajelitowe, cukrzyca, niedobór witaminy D, choroba Leśniowskiego-Crohna, czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Szczególnie podatne na zakażenie są osoby powyżej 65 roku życia oraz poddane chemioterapii (20), (21).

#### EPIDEMIOLOGIA ZAKAŻEŃ CD

Gwałtowny wzrost zakażeń oraz rozprzestrzenianie się w wielu krajach szczepów o zwiększonym potencjale chorobotwórczości wymusiło konieczność ujednoczenia metod typowania. Najpopularniejszą metodą różnicowania szczepów w obrębie gatunku CD jest PCR-rybotypowanie. Technika ta opiera się na wykrywaniu różnic w regionie DNA o wysokiej zmienności, który występuje pomiędzy podjednostkami 23S rRNA i 16S rRNA. Opisano dotychczas ponad 300 różnych rybotypów, jednak tylko kilka spośród nich szczególnie często wywołuje zakażenia i wybuchy epidemii szpitalnych.

Intensywny wzrost zakażeń notowany w USA oraz Europie związany jest z pojawieniem się hiperwirulentnego szczepu należącego do rybotypu 027, który rozprzestrzenił się również w Azji i Australii (22). Jego wzmożony potencjał chorobotwórczy wiąże się z wysoką opornością na fluorochinolony, zdolnością do zwiększonej produkcji toksyn A i B oraz dodatkowego wytwarzania toksyny binarnej (23).

W Polsce po raz pierwszy RT027 został wyizolowany w 2005 roku (24). W analizie szczepów pochodzących z trzech polskich szpitali (Warszawa, Płock, Poznań) z lat: 2008-2010 już 23% izolatów należała do rybotypu 027 (25). Natomiast dane zebrane w latach 2011-12 w programie ClosER (*Clostridium difficile* European Resistance) wykazują aż 45% udział rybotypu 027 wśród polskich izolatów (26). To wyraźne rozprzestrzenianie się RT027 pokrywa się z innymi obserwacjami. Zgodnie z wynikami ich badań w 2012 roku aż 57,8% szczepów z pochodzących z 10 polskich szpitali należało do tego hiperwirulentnego rybotypu (27). Ta niepokojąca tendencja, która występuje w Polsce, znalazła poniekąd potwierdzenie w szerokiej analizie przeprowadzonej przez EUCLID (*The European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea*) w 2013 roku. W ramach tego projektu badano około 600 toksynotwórczych szczepów nadesłanych z 19 krajów Europy. Wyodrębniono w nim 125 różnych rybotypów, z czego najczęściej występował

within the toxins gene, which results in increased levels of toxigenicity. Another strain with high transmission potential – RT018, was described by Italian scientists as the most common in their study (42.4%) (31). At the beginning of XXI century, it managed to displace an earlier prevalent strain - RT126. This epidemiological success results from a better adherence to intestinal epithelial cells and more efficient production of toxins in comparison to its predecessor (32). High toxigenicity and the production of additional toxins are easy for direct links with increased virulence and spread. However, some study results deny the correlation between this kind of ribotype and severity of infection (33). The evolutionary effectiveness of selected strains is an example indicating that independently in many places in the world can develop new isolate with increased spreading potential, and can crowd out worse adapted competitors.

#### ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF CD

Epidemic success of CD is mostly associated with resistance to commonly used drugs in hospitals. Elimination of intestinal microflora during antibiotic treatment allows resistant pathogen to selective growth and leads to symptoms of the disease. Analysis based on susceptibility of Polish CD isolates gathered in 2012 showed a high percentage of resistance to ciprofloxacin (100%), imipenem (87.9%), erythromycin (85.5%) and moxifloxacin (83.1%) (27). These results are consistent with the report of ClosER project, which was conducted on nearly 1000 strains collected from 22 European countries. According to its content, there is a highest proportion of multidrug-resistant strains in Poland (26).

Another important issue is the level of effectiveness of drugs which are commonly used to treat infections caused by CD: metronidazole, vancomycin, and fidaxomicin. All European isolates which were sent to study ClosER, showed sensitivity to the latest medicine, fidaxomicin (26). In addition, 96.84% of the strains were sensitive to vancomycin and 97.82% to metronidazole. These results should be regarded as satisfying, however detailed analysis of antibiotic sensitivity from different countries shows that some in regions there appears a tendency for arise in the values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC). Particularly worrying is that the highest percentage of Polish strains with decreased susceptibility to metronidazole, accounted to 40%. It should be mentioned that only 20 strains received from Poland were tested, which is not a representative sample. However, the number of reduced sensitivity cases is 4.5 times greater than the number of similar strains obtained from the second highest frequent in this ranking, Denmark. The

właśnie RT027 (19%). Najwyższy odsetek szczepów należących do tego rybotypu odnotowano w Niemczech (43%), na Węgrzech (17%), w Polsce (16%) oraz w Rumunii (12%) (28). Porównanie danych epidemiologicznych z 2008 roku ujawnia prawie 4-krotny wzrost czystości występowania RT027 w Europie (29). Ponadto w badaniu tym wykazano, że wyższa częstość występowania RT027 w danym kraju, skorelowana była z mniejszą różnorodnością innych rybotypów, co potwierdza skuteczność jego potencjału do rozprzestrzeniania. Warto również podkreślić, że omawiane badanie wykazało dużą odmienność i różnorodność w występowaniu poszczególnych rybotypów pomiędzy krajami z różnych stron Europy. Choć hiperwirulentny rybotyp wyraźnie zdominował kraje na wschodzie i zachodzie, to na północy i południu kontynentu częstość jego izolacji jest mała lub znikoma (28).

Analizując szczegółowo sytuację epidemiologiczną w poszczególnych krajach można zauważyć endemiczne występowanie innych szczepów o prawdopodobnie równie dużym potencjale chorobotwórczości. Przykładem obrazującym to zjawisko jest występowanie RT176 w Czechach, który we wspomnianym wcześniej badaniu, był najczęstszy i stanowił 38% wszystkich rybotypów. W Polsce zajmuje on drugie miejsce pod względem częstości występowania (30). Co ciekawe, RT176 wykazuje podobieństwo do RT027. Oba rybotypy produkują toksynę binarną oraz posiadają charakterystyczną delecję w pozycji 117 nukleotydu w obrębie genu regulującego produkcję toksyn, która skutkuje wzmożoną toksynotwórczością. Inny szczep o wysokim potencjale transmisji – RT018 opisują włoscy naukowcy, wskazując jako najczęstszy w ich badaniu (42,4%) (31). Z początkiem XXI wieku zdołał on wyprzeć rozpowszechniony wcześniej RT126. Jego sukces epidemiologiczny wiązany jest z większą zdolnością przylegania do komórek nabłonka jelit oraz efektywniejszą produkcją toksyn w porównaniu do poprzednika (32). Cechy, takie jak zwiększona produkcja toksyn, czy wytwarzanie dodatkowej toksyny są łatwe do bezpośredniego powiązania z podwyższoną wirulencją i niewątpliwie ułatwiają rozprzestrzenianie. Jednak mimo to wyniki niektórych badań negują korelację pomiędzy rodzajem rybotypu a stopniem ciężkości zakażenia (33).

Przedstawione przykłady skuteczności ewolucyjnej wybranych szczepów wskazują, że niezależnie od siebie w wielu miejscach na świecie mogą powstać izolaty o predyspozycjach do szerzenia zakażenia nawet pomiędzy różnymi kontynentami oraz wypieranie gorzej przystosowanych konkurentów.

#### LEKOWRAŻLIWOŚĆ CD

Sukces epidemiczny, jaki odniósł CD związany jest przede wszystkim z opornością na leki powszechnie

proportion of Polish strains with reduced sensitivity to vancomycin (MIC=4 mg/L) was approximately 5% of cases (26). Interestingly, earlier Polish data from 2012 not recorded cases with drastic reduction in the sensitivity of vancomycin and metronidazole but only increased the value of the MIC<sub>90</sub> compared with strains collected in the years 2004-2006 (27). These differences may arise from the use of other methods of antibiotic susceptibility measure. In Polish studies the E-test method was used, while in the project ClosER the spiral gradient method was used. Both techniques can give results that differ by 1-2 dilution compared to the reference method, which is dilution in agar (34), (35). Incidents of underreporting MIC values by using the E-test method are described in particular for metronidazole (36), which indicates that the kind of method used can affect the result.

In addition, on our continent and beyond, there has been observed the emergence of strains which are resistant to vancomycin and metronidazole. In a study performed in Israel in 2014, the most often isolated ribotype 027 (31.8% of all isolated strains) showed reduced susceptibility to vancomycin, having MIC values of 4 mg/L in 87.7% of the cases. In addition, the metronidazole MIC values > 2 mg/L had 44.6% of strains belonging to this ribotype (37).

The reasons for the lack of effectiveness of antibiotic treatment may be different. The concentration of metronidazole, which occurs in the intestinal lumen, may be insufficient to eliminate the infection. The sublethal dose can select cells with reduced sensitivity to the antibiotic. It was found that the level of resistance to metronidazole on CD can be heterogeneous, which means that some parts of the bacterial cells of the same strain may exhibit higher MIC values (38). This phenomenon may be hard to detect during laboratory diagnostics. Metronidazole is administered in an inactive form, which after penetration into the bacterial cells is transformed by nitroreductase to a highly cytotoxic compound, which damages bacterial DNA. The mechanism of resistance to this drug has not been explained so far, and is probably multi-factorial. One factor may be the ability of the pathogen to produce altered nitroreductase. The result of this is the inability to produce forms of the drugs which are toxic to the bacteria.

Another strategy of resistance is the production by the CD of proteins involved in the repair of damaged DNA (39). Also, resistance to vancomycin is not exactly known; it has been suggested that the cause of resistance may be mutations leading to changes in the binding sites of the drug. The same kind of resistance mechanism was observed in glycopeptide-resistant enterococci (40).

stosowane w szpitalnictwie. Eliminacja saprofitycznej flory jelitowej podczas antybiotykoterapii umożliwia selektywne namnażanie opornego patogenu i rozwój choroby. Analiza lekowrażliwości polskich izolatów CD zebranych w 2012 roku wykazała wysoki odsetek oporności na ciprofloksacynę (100%), imipenem (87,9%), erytromycynę (85,5%), moksifloksacynę (83,1%) (27). Wyniki te znalazły potwierdzenie w raporcie rozległego projektu ClosER, który przeprowadzono na prawie 1000 szczepach zebranych z 22 krajów Europy. Zgodnie z jego treścią w Polsce występuje najwyższy odsetek szczepów charakteryzujących się wielolekoopornością (26).

Kolejną ważną kwestią jest poziom skuteczności leków powszechnie używanych w terapii zakażeń wywołanych przez CD – metronidazolu, wankomycyny oraz fidaksomycyny. Wszystkie europejskie izolaty nadesłane do badania ClosER, wykazywały wrażliwość wobec najnowszego leku-fidaksomycyny (26). Ponadto 96,84% szczepów charakteryzowała się wrażliwością na wankomycynę, a 97,82% wrażliwością na metronidazol. Choć w skali ogólnej wyniki te należy uznać za satysfakcjonujące, to niestety analizując szczegółowo lekowrażliwość szczepów z poszczególnych krajów można zauważyć regiony, w których występuje tendencja do narastania wartości minimalnego stężenia hamującego (*Minimal Inhibitory Concentration* – MIC). Wyjątkowo niepokojącą informacją jest najwyższy pośród badanych krajów Europy procent polskich szczepów z obniżoną wrażliwością na metronidazol, wynoszący aż 40%. Należy wspomnieć, że przebadano tylko 20 szczepów nadesłanych z Polski, co stanowi mało reprezentatywną próbę. Mimo to, skala przypadków obniżonej wrażliwości jest o ponad 4,5 razy większa od liczby analogicznych szczepów uzyskanych w drugiej, pod tym niechlubnym względem kraju, jakim była Dania. Natomiast odsetek polskich szczepów o obniżonej wrażliwości wobec wankomycyny (MIC 4 mg/L) kształtował się na około 5% (26). Co ciekawe, wcześniejsze dane pochodzące z Polski z 2012 roku nie odnotowały przypadków tak drastycznego obniżenia skuteczności wankomycyny i metronidazolu, a jedynie podwyższoną wartość MIC<sub>90</sub> w porównaniu ze szczepami zebranymi w latach 2004-2006 (27). Różnice te mogą wynikać z zastosowania innych metod oznaczenia wartości MIC. W polskich badaniach zastosowano metodę E-test, natomiast w projekcie ClosER użyto metody *spiral gradient*. Obie techniki mogą dawać wyniki różniące się o 1-2 rozcieńczenia w porównaniu do referencyjnej metody rozcieńczeń w agarze (34), (35). Przypadki zaniżania wartości MIC przy użyciu pasków E-test zostały opisane zwłaszcza dla metronidazolu (36).

Ponadto zarówno na naszym kontynencie, jak i poza nim odnotowano pojawienie się oporności na oba stosowane w terapii leki. W badaniu przeprowadzonym w Izraelu w 2014 roku, najczęściej izolowany rybotyp

Another cause of therapeutic failures may be the ability of the CD to grow a form of a biofilm. Bacterial cells secrete numerous proteins, DNA and polysaccharides that form a thick mucus that isolates the pathogen from the defense mechanisms of the host; protecting against oxidative stress, toxic substances and antibiotics. Biofilm developing cells exhibit a 100 times greater resistance to the drugs used in treatment and an enhanced ability to sporulate. This phenomena may be the cause of recurrent infections. Increasing incidences of therapeutic failure may be caused by the adaptation of the CD to survive in the presence of antibiotics. It should be noted that almost half of relapses are caused by a new strain. Therefore, health condition and the diversity of the intestinal microbiome is indicated as the main reason for therapeutic failure.

#### REFERENCES

1. Pépin J, Valiquette L, Alary ME ,et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004;171(5):466-72.
2. Mitchell B G, Gardner A. Mortality and *Clostridium difficile* infection: a review. *Antimicrob Resist Infect Control* 2012;1:1-6.
3. Shields K, Araujo-Castillo RV, Theethira TG i in. Recurrent *Clostridium difficile* Infection: From Colonization to Cure. *Anaerobe* 2015;34:59–73.
4. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006;12, supplement 6:2-18.
5. Deng K, Plaza-Garrido A, Torres JA , et al. Survival of *Clostridium difficile* Spores at Low Temperatures. *Food Microbiol* 2015; 46:218-221.
6. Barbut F. How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment. *J Hosp Infect* 2015; 89(4):287-95.
7. Lessa FC. Community-associated *Clostridium difficile* infection: How real is it? *Anaerobe* 2013; 24:121-123.
8. Hoover DG, Rodriguez-Palacios A. Transmission of *Clostridium difficile* in foods. *Infect Dis Clin North Am* 2013;27(3):675-85.
9. Rodriguez-Palacios A. Lejeune J.T. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(9):3085-91.
10. Sun X, Hirota SA. The role of host and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol* 2015; 63:193-202.

027 (stanowiący 31,8% wszystkich izolowanych szczepów) przejawiał obniżoną wrażliwość na wankomycynę, wyrażoną jako MIC=4 aż w 87,7% przypadków. Ponadto wartości MIC >2 mg/L dla metonidazolu wykazywało 44,6% szczepów należących do tego rybotypu (37).

Przyczyny braku skuteczności antybiotykoterapii mogą być różne. Stężenie metronidazolu, które występuje w świetle jelita, może być niewystarczające do eliminacji zakażenia. Wówczas subletalne dawki leku selekcjonują komórki o obniżonej wrażliwości wobec antybiotyku. Dowiedzono, że poziom oporności na metronidazol u CD może być niejednorodny, co oznacza, że część komórek bakteryjnych tego samego szczepu może wykazywać wyższe wartości MIC (38). Takie zjawisko może stwarzać problemy diagnostyczne utrudniające jego wykrycie.

Metronidazol jest podawany w nieaktywnej postaci, która dopiero po wnikięciu do wnętrza komórki bakteryjnej pod wpływem działania nitroreduktazy ulega przekształceniu do wysoce cytotoksycznego związku uszkadzającego DNA. Mechanizm oporności na ten lek nie został do końca wyjaśniony i prawdopodobnie jest wieloczynnikowy. Jednym z nich może być nabycie przez drobnoustroj zdolności do wytwarzania zmienionej nitroreduktazy, która przekształca antybiotyki do postaci uniemożliwiającej wytworzenie toksycznej dla bakterii formy leku.

Inną strategią oporności jest wytwarzanie przez CD białek biorących udział w naprawie uszkodzonego DNA (39). Również oporność na wankomycynę nie została dokładnie poznana, sugeruje się, że mutacje prowadzące do zmiany miejsca wiązania leku, mogą być jej przyczyną. Analogiczny mechanizm oporności występuje u enterokoków opornych na glikopeptydy (40).

Przyczyną niepowodzeń terapeutycznych może być zdolność CD do wzrostu w postaci biofilmu. Komórki bakteryjne wydzielają liczne białka, DNA oraz polisacharydy tworzące gęstą, śluzową osłonę, która odgradza patogen szczelną barierą przed mechanizmami obronnymi gospodarza, chroni przed stresem oksydacyjnym, toksycznymi substancjami oraz antybiotykami. Komórki rozwijające biofilm wykazują nawet 100-krotnie większą oporność na stosowane w terapii leki oraz charakteryzują się zdolnością do sporulacji. Zjawiska te mogą być przyczyną nawrotowych infekcji. Na wzrastającą częstość niepowodzeń terapeutycznych z pewnością wpływają opisane przypadki adaptacji CD do przetrwania w obecności antybiotyków.

Należy podkreślić, że niemal połowa przypadków nawrotów związana jest z zakażeniem nowym szczepem. Dlatego też, jako główną przyczynę braku skuteczności terapii wskazuje się stan zdrowia pacjenta, na który ogromny wpływ ma różnorodność mikrobiomu jelit.

11. Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infect Dis* 2015;15:516.
12. Rodriguez C, Korsak N, Taminiau B, et al. *Clostridium difficile* infection in elderly nursing home residents. *Anaerobe* 2014;30:184-7.
13. The Child Organizational Principles to Guide and Define. Policy Statement. *Clostridium difficile* Infection in Infants and Children. *Pediatrics* 2013;131(1):96-200.
14. Santiago B, Guerra L, Garcia-Morin M, et al. *Clostridium difficile* isolation in children hospitalized with diarrhoea. *Anales de Pediatría* 2015;82(6):417-425.
15. Zhang L, Dong D, Jiang C, et al. Insight into alteration of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection and asymptomatic *C. difficile* colonization. *Anaerobe* 2015;34:1-7.
16. Nicholson MR, Thomsen IP, Edwards KM. Controversies Surrounding *Clostridium difficile* Infection in Infants and Young Children. *Children* 2014;1:40-47.
17. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, et al. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 2007;13 (11):1048-57.
18. Cowardin CA, Petri WA. Host Recognition of *Clostridium difficile* and the Innate Immune Response. *Anaerobe* 2014;30:205-209.
19. Stewart DB, Berg A, Hegarty JP. Single Nucleotide Polymorphisms of the tcdC Gene and Presence of the Binary Toxin Gene Predict Recurrent Episodes of *Clostridium difficile* Infection. *Annals of Surgery* 2014;260(2):299-304.
20. Larentis DZ, Rosa RG, dos Santos RP, et al. Outcomes and Risk Factors Associated with *Clostridium difficile* Diarrhea in Hospitalized Adult Patients. *Gastroenterol Res Pract* 2015; Article ID 346341:1-6.
21. Sahay T, Ananthakrishnan AN. Vitamin D deficiency is associated with community-acquired *Clostridium difficile* infection: a case-control study. *BMC Infectious Diseases* 2014;14:661.
22. He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature Genetics* 2013;45(1):109-113.
23. Carlson PE, Walk ST, Bourgis ET, et al. The relationship between phenotype, ribotype, and clinical disease in human *Clostridium difficile* isolates. *Anaerobe* 2013;24:109-116.
24. Pituch H, Bakker D, Kuijper E, et al. First isolation of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027/toxinotype III in Poland. *Pol J Microbiol* 2008;57(3):267-8.
25. Obuch-Wozzatyński P, Lachowicz D, Schneider A, et al. Occurrence of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 and its closely related PCR-ribotype 176 in hospitals in Poland in 2008-2010. *Anaerobe* 2014;28:13-17.
26. Freeman J, Vernon J, Morris K, et al. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(3):248.e9-248.e16.
27. Lachowicz D, Pituch H, Obuch-Wozzatyński P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains belonging to different polymerase chain reaction ribotypes isolated in Poland in 2012. *Anaerobe* 2015;31:37-41.
28. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, et al. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Euro Surveill* 2016;21(29):1-11.
29. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011;377(9759):63-73.
30. Pituch H, Obuch-Wozzatyński P, Lachowicz D, et al. Surveillance and outbreak report. Hospital-based *Clostridium difficile* infection surveillance reveals high proportions of PCR ribotypes 027 and 176 in different areas of Poland, 2012 to 2013. *Eurosurveillance* 2015;20(38):1-7.
31. Baldan RE, Trovato A, Bianchini V, et al. *Clostridium difficile* PCR Ribotype 018, a Successful Epidemic Genotype. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2575-2580.
32. Barbanti F, Spigaglia P. Characterization of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 018: A problematic emerging type. *Anaerobe* 2016;42:123-129.
33. Walk ST, Micic D, Jain R, et al. *Clostridium difficile* Ribotype Does Not Predict Severe Infection. *Clin Infect Dis* 2012;55(12):1661-1668.
34. Wexler H M, Molitoris E, Murray PR, et al. Comparison of Spiral Gradient Endpoint and Agar Dilution Methods for Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: a Multilaboratory Collaborative Evaluation. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):170-174.
35. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJC. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(3):526-546.

36. Aspevall O, Lundberg A, Burman LG, et al. Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Clostridium difficile* and Its Relation to PCR Ribotypes in a Swedish University Hospital. *Antimicrob Agents Ch* 2006;50(5):1890-1892.
37. Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, et al. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2015;83(1):21–24.
38. Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, et al. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol* 2008;46(9):3028-32.
39. Chong PM, Lynch T, McCorrister S. Proteomic analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* clinical isolate resistant to metronidazole. *PLoS One* 2014;9(1):e82622.
40. Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, et al. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(1):41-4.

Received: 21.02.2017

Accepted for publication: 6.03.2017

Otrzymano: 21.02.2017 r.

Zaakceptowano do publikacji: 6.03.2017 r.

**Address for correspondence:**

**Adres do korespondencji:**

mirecka@op.pl