

Универзитет „Кирил и Методиј“, Медицински факултет - Скопје

**„ Идентификација, антимикробна осетливост и
молекуларна типизација на *Clostridioides difficile* “
(докторска дисертација)**

**Ментор:
Проф.д-р Елена
Трајковска Докиќ**

**Докторанд:
Асс.др. Кирил Михајлов**

Скопје, 2019

Содржина

Листа на кратенки.....	2
Абстракт	3
Abstract.....	5
1. Вовед.....	7
2. Мотив.....	33
3. Цели.....	34
4. Материјал и методи.....	35
5. Статистичка анализа.....	44
6. Резултати.....	45
7. Дискусија.....	87
8. Заклучоци.....	100
9. Референци.....	102

Листа на кратенки:

ААД	Антибиотик-асоцирана дијареа
ПМК	Псевдомембранозен колитис
УВ	Ултравioletови
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> инфекција
ADP	Аденозин дифосфат
PCR	Полимераза верижна реакција (polimeraze chain reaction)
МИК	Минимална инхибиторна концентрација
CDRN	Мрежа за риботипизирање на <i>C. difficile</i> (<i>Clostridium difficile</i> Ribotyping Network)
ESGCD	Европска група за проучување на <i>C. difficile</i>
MLVA	Мултилокусна анализа на варијабилен број повторувани тандеми (Multilocus variable number tandem repeat analysis)
ИПП	Инхибитори на протонска пумпа
СЗО	Светска здравствена организација
EDTA	Етилендиамин тетраоцетна киселина
SDS PAGE	Натриум додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза
REA	Анализа со рестриктивни ендонуклеази
RAPD PCR	Амплификација по случаен избор на полиморфна ДНК (Random amplification of Polymorphic DNA)
REP PCR	Репетитивна екстрагенска палиндромска ПВР (Repetitive extragenic palindromic PCR)
MLST	Мулти-локусно секвенционирачко типизирање (Multi-locus sequence typing)
AFLP	Полиморфизам на должината на амплифицираните фрагменти (Amplified fragment length polymorphism)
slpAST	Секвенционирање на генот за површинскиот протеин А (Surface layer protein A gene sequencing)
PFGE	Гел електрофореза во пулсирачко поле (Pulsed field gel electrophoresis)
CCFA	Цефокситин-Циклосерин-Фруктоза агар
ГДХ	Глутамат дехидрогеназа
ITS	Интергенски раздвојувачки регион
EDTA	Етилендиамин тетраоцетна киселина
CCNA	Одредување /неутрализација на цитотоксичност на клеточна култура (Cell cytotoxicity neutralization assay)
TC	Токсикогена култура (toxigenic culture)
ESCMID	Европско здружение за клиничка микробиологија и инфективни болести (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)

Апстракт

Вовед

Clostridioides difficile е еден од најзначајните интрахоспитални патогени. Оваа спорогена анаеробна бактерија се почесто се изолира од фецес, пред се кај повозрасни болнички пациенти на антибиотска терапија и е асоцирана со неколку клинички манифестации почнувајќи од дијареа, па се до псевдомембранозен колит.

Цели

Целите на ова испитување беа испитување на застапеноста на *Clostridioides difficile* во примероците од суспектни пациенти, одредување на токсичноста на соевите директно од примероците и од пораснатите култури, одредување на генотипската припадност на изолатите, одредување на нивната антибиотска осетливост, како и евентуалната поврзаност на овие фенотипски и генотипски карактеристики кај изолатите.

Материјал и методи

Сите фекални примероци примени во периодот 1.2015-1.2019 на Институтот за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Скопје со цел дијагноза на инфекција со *Clostridioides difficile* беа испитувани за имунохроматографско докажување на антигенот глутамат дехидрогеназа (ГДХ) и токсините А и Б на *Clostridioides difficile*. Истовремено истите примероци беа садени на две подлоги со цел култивирање и тоа директно на цефокситин-цикloserин-фруктоза агар (CCFA) и на Колумбија крвен агар по извршување на алкохол шок тестот. Вака засадените плочи беа инкубирани анаеробно, 48 часа на 37°C со цел изолација на *Clostridioides difficile*. Пораснатите колонии беа идентификувани по карактеристичниот макроскопски изглед и преку микроскопскиот препарат обоен по Грам, а дефинитивната идентификација се вршеше со помош на автоматскиот систем VITEK 2. Од пораснатите култури истотака беше испитувано присуство на токсините А и Б со истите имунохроматографски китови. Од културите беа собрани 80 изолати на *Clostridioides difficile* од исто толку пациенти кои беа типизирани со методот на ПВР риботипизација како најупотребувана типизирачка метода за оваа бактерија во Европа. На истите 80 изолати беше испитувана и антимикуробната осетливост со помош на Етест кон осум антибиотици и тоа: ванкомицин, метронидазол (според EUCAST граничните точки) и тетрациклин, клиндамицин, еритромицин, имипенем, ципрофлоксацин и моксифлоксацин (според CLSI граничните точки).

Резултати

Анализата на вкупно 1380 фекални примероци кои беа добиени на Институтот за микробиологија и паразитологија во периодот јануари 2015 – јануари 2019 година од суспектни пациенти за *C. difficile* инфекција (CDI) покажа застапеност на бактеријата во 13% од примероците, додека пак лабораториска дијагноза за CDI (докажан токсин во фецесот) беше поставена кај 12,1% од примероците. Бројот на испратените фекални примероци од различни клиници и амбуланти со барање за лабораториска дијагноза на CDI не соодветствуваше со бројот на позитивните наоди. Најголемо несовпаѓање беше детектирано на хируршките клиници.

Процентуалната разлика во однос на изолирањето на *C. difficile* помеѓу половите во целиот примерок за истражување (80те изолати) не беше статистички сигнификантна.

Просечната возраст на пациентите од кои потекнуваа 80те изолати во студијата беше 54 години. 56,25% од пациентите беа на возраст над 60 години. Ниту еден изолат на *C. difficile* не потекнуваше од новороденчиња и доенчиња (помали од 1 година). Процентот на токсогени соеви меѓу изолатите беше 92,5%. Кај 93% од токсогените изолати беа докажани и двата токсина (А и Б), а кај 7% само токсинот Б. Присуство на токсин А, без присуство на токсин Б не беше докажано кај ниту еден изолат.

Риботипизацијата на сите 80 изолати на *C. difficile* покажа дека тие припаѓаат на 20 различни риботипови. Најзастапен риботип риботип беше 001/072, на кој припаднаа 32 (40%) од изолатите. Најголем број од изолатите од риботипот 001/072 потекнуваа од пациенти кои беа хоспитализирани на хируршките клиници, а ниту еден од нив не беше изолиран од пациенти надвор од клиничкиот центар „Мајка Тереза“. Риботипот 014/020 беше застапен со 10 изолати (12,5%). Риботипови застапени со по 5 (6,25%) изолати беа: 002, 017 и 027. Со по 3 изолати (3,7%) беа застапени риботиповите 005, 255/258, SLO 046 и SLO 047. Риботиповите 003, 012, 015, 023, 046, 070, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187 беа застапени со по еден изолат.

Двата токсина (А и Б) беа докажани кај сите изолати од сите риботипови, со исклучок на сите изолати од риботипот 017 каде беше докажан само токсинот Б и сите изолати од риботиповите SLO 046 и SLO 047 кои беа нетоксогени.

Сите осумдесет изолати на *C. difficile* во оваа студија покажаа добра осетливост кон ванкомицин и метронидазол. Процентите на резистенција на изолатите на *C. difficile* кон тетрациклин, клиндамицин, еритромицин, имипенем, ципрофлоксацин и моксифлоксацин беа: 1,25%, 49%, 55%, 57 %, 100% и 45% соодветно.

Највисок процент на резистенција кон испитуваните антибиотици е забележан кај изолатите на *C. difficile* со потекло од пациентите хоспитализирани на хируршките клиници. Највисоки проценти на резистенција кон испитуваните антибиотици се забележани кај изолатите кои му припаѓаат на доминантниот риботип 001/072 и кај хипервирулентните риботипови 017 и 027.

Дискусија и заклучоци

На некои од клиниките во комплексот „Мајка Тереза“ постои селективност во однос на испраќањето на примероци за лабораториска дијагноза на CDI, што резултира со субдијагностицирање на оваа инфекција.

Лабораториското дијагностицирање на CDI треба да се заснова на дводелниот алгоритам кој вклучува детекција на ГДХ и на токсините А и Б на *C. difficile*, директно во фекалните примероци. Дополнителното испитување на токсините од културата на *C. difficile* незначително го намалува бројот (%) на лажно-негативните резултати.

Ванкомицин и метронидазол би требало да останат прва опција за терапија на CDI. Терапијата со клиндамицин, еритромицин, имипенем, ципрофлоксацин и моксифлоксацин може да се смета за ризик фактор за добивање на CDI. Посебно висок ризик има кај пациентите кои примаат ципрофлоксацин.

Доминантен риботип во нашите болници е риботипот 001/072. Горенаведените резултати укажуваат на постоење поврзаност помеѓу риботиповите и антибиотската резистенција кај *C. difficile*. Стекнувањето на резистенција кон антибиотици е еден од главните фактори за дистрибуцијата и движењето на риботиповите, пред се во болничката средина, но и за појавата на нови типови. Следењето на овие генотипски и фенотипски карактеристики на изолатите може да биде од големо епидемиолошко значење.

Клучни зборови: *Clostridioides difficile* инфекција, *C. difficile*, антибиотска осетливост, риботипизација

Abstract

Introduction

Clostridioides difficile is one of the most important intra-hospital pathogens. This sporogenic anaerobic bacteria has commonly been isolated from feces, mostly from older hospitalized patients on antibiotics and has been associated with few clinical manifestations from diarrhea to pseudomembranous colitis.

Aims

Aims of this study were to investigate the presence of *Clostridioides difficile* in samples from suspected patients, to determine the toxicity of the strains directly from the samples and also from the cultures, to determine the genotype of the isolates, to determine their antibiotic susceptibility and eventual associations of such genotypic and phenotypic characteristics between the isolates.

Material and methods

All fecal samples accepted from 1.2015-1.2019 at the Institute of microbiology and parasitology, Medical faculty in order to diagnose *Clostridioides difficile* infection (CDI), were subject to immunochromatographic detection of glutamate dehydrogenase (GDH) antigen and toxins A and B of *Clostridioides difficile*. In order to cultivate them, same samples were planted on two plates: directly on Cycloserine-Cefoxitin-Fructose agar (CCFA) and on Columbia blood agar after doing the alcohol shock test. Such planted plates were incubated anaerobically for 48 hours on 37°C in order to isolate *Clostridioides difficile*. Grown colonies were identified by characteristic macroscopic appearance and also microscopically by Gram staining. Definitive identification was done by using the automated system VITEK 2. Grown cultures were also used to determine the presence of toxins A and B with the same immunochromatographic kits. Eighty isolates of *Clostridioides difficile* from as many patients were collected from the cultures and were later typed using the PCR ribotyping method as the most used one in Europe for typing of this bacterium. The antimicrobial susceptibility towards the eight antibiotics: vancomycin, metronidazole (according to EUCAST breakpoints) and tetracycline, clindamycin, erythromycin, imipenem, ciprofloxacin and moxifloxacin (according to CLSI break points) by using the E test on all eighty isolates was also determined.

Results

Analysis of the 1380 fecal samples received from suspected patients for CDI at the Institute of microbiology and parasitology in the period of January 2015- January 2019, showed presence of the bacterium in 13% of the samples, while laboratory diagnosis of CDI (confirmed toxin in the feces) was confirmed in 12,1% of the samples. Number of fecal samples sent from different clinics requesting laboratory diagnosis of CDI wasn't proportional with the number of positive diagnosis. The biggest such discrepancy was observed within samples from surgery clinics.

Percentual difference in terms of isolating *C. difficile* between genders in the research sample (80 isolates) showed no statistical significance. Average age of the patients which the 80 isolates were taken from was 54. 56,25% from the patients were above 60 years old. None of the isolates were taken from infants younger than 1 year. Percentage of toxigenic strains among the isolates was 92,5%. In 93% of the toxigenic isolates both toxins (A and B) were detected and in 7% only toxin B was detected. Presence of only toxin A was not detected in any of the isolates.

Ribotyping of the 80 isolates of *C.difficile* showed that they belong to 20 different ribotypes. The most common one was 001/072, with 40 % (32) of the isolates. Most of the isolates from this ribotype were from patients hospitalized at the surgery clinics and none of them was from patients outside of the clinical center "Mother Theresa".

Ten isolates belonged to the ribotype 014/020(12,5%). Five isolates belonged to each of the ribotypes 002, 017 and 027. Ribotypes 005, 255/258, SLO 046 and SLO 047 were represented by 3 isolates each and ribotypes 003, 012, 015, 023, 046, 070, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187 were represented by 1 isolate each.

Isolates of all ribotypes produced bout of the toxins (A and B), except all isolates from ribotype 017 which produced only toxin B and all isolates from ribotypes SLO 046 and SLO 047 which were non toxigenic.

All 80 of the *C.difficile* isolates in this study showed good susceptibility towards vancomycin and metronidazole. Resistance percentages towards tetracycline, clindamycin, erythromycin, imipenem, ciprofloxacin and moxifloxacin were 1,25%, 49%, 55%, 57%, 100% and 45% respectively.

Highest antimicrobial resistance percentages were detected in isolates taken from patients of surgery clinics. Highest antimicrobial resistance percentages were detected in isolates belonging to the dominant ribotype 001/072 and hypervirulent ribotypes 017 and 027.

Discussion and conclusions

There is a selectivity on some of the clinics in the “Mother Teresa” complex in terms of sending specimens for laboratory diagnosis of CDI, resulting in underdiagnosis of this infection.

Laboratory diagnosis of CDI should be based on the two-step algorithm, including detecting of GDH and toxins A and B of *C.difficile* , directly from the fecal samples. Additional searching of toxins from the culture of *C. difficile*, lowers the number (%) of false negative results nonsignificantly.

Vancomycin and metronidazole should remain first option therapy for CDI. Therapy with clindamycin, erythromycin, imipenem, ciprofloxacin and moxifloxacin could be a risk factor for acquiring CDI. Patients on ciprofloxacin are at especially high risk.

The most dominant ribotype in our hospitals is 001/072. Results mentioned above are indicating connection between ribotypes and antimicrobial resistance in *C. Difficile*. Acquiring antimicrobial resistance is one of the main contributors of distribution and mobility of ribotypes, especially in the hospital environment and also a big factor in emerging of new types. Tracking of these genotypic and phenotypic characteristics of the isolates can be of great epidemical value.

Key words: *Clostridioides difficile* infection, *C. difficile*, antimicrobial susceptibility, ribotyping

1. Вовед

1.1. Историски податоци и рекласификација во *Clostridioides*

Clostridium difficile до неодамна припаѓаше во фамилијата *Clostridiaceae* и родот *Clostridium*, кого го сочинуваат Грам позитивни, анаеробни спорогени бацили. Кога за првпат била изолирана, во далечната 1935 година од фецес на новороденчиња, оваа бактерија била наречена *Bacillus difficilis*. Подоцнежните истражувања ја издвоиле оваа бактерија од родот *Bacillus* и ја сместиле во родот *Clostridium*. Заради потешкотиите при нејзиното култивирање, оваа бактерија била преименувана во *Clostridium difficile*. Во текот на првите четири децении од своето пронаоѓање оваа бактерија важела како комензал на дигестивниот тракт на новороденчињата (1). Во 1977-та година бил изолиран токсин на *C. difficile* од пациент со псевдомембранозен колитис (ПМК) (2), но се до 1978-та *C. difficile* не бил идентификуван како причина за инфекција, односно не бил сметан за хуман патоген. (3,4,5)

До денес се идентификувани преку 100 видови во рамките на она што до неодамна се сметаше за родот *Clostridium*, од кои само тринаесет се патогени за луѓето и животните (6). Овој род продуцира повеќе протеински токсини од било кој друг род (7) и за разлика од другите видови патогени бактерии, главниот механизам за нивната патогеност е преку дејството на овие токсини кои се меѓу најјаките во природата (7).

Clostridium difficile беше рекласифициран во 2016 (339), кога стана неопходно бактеријата да се придодаде во нов род, со оглед на тоа што претходно во 2015 беше препорачано да се ограничи припадноста во родот *Clostridium* на *Clostridium butyricum*. Долги години оваа бактерија припаѓаше на родот *Clostridium* поради фенотипските сличности со останатите припадници (Грам позитивен споруирачки стапчест анаероб), но со помош на молекуларни методи (анализа на генската секвенца за 16S rDNA) беа докажани значајни разлики. По додавањето во фамилијата *Peptostreptococcaceae*, логично беше името на новиот род да биде *Peptoclostridium*. Сепак во предвид се зема досегашната широка примена на името на оваа бактерија кое што се протега не само во микробиолошките или медицински кругови, туку и во пошироката популација и со цел да се избегнат недоразбирања и забуни се постигна договор името на родот да биде *Clostridioides*. На тој начин се задржува употребата на кратенките како *C. difficile*, *C.diff* и CDAD.

1.2. Микро и макроморфологија на *Clostridioides difficile*

Вегетативните клетки на *C. difficile* се поголеми од повеќето други бактерии. Тие се долги околу 3-16 μm , а широки од 0.5 до 1.9 μm . Истите продуцираат суптерминални спори (8) кои се многу резистентни на сушење, УВ зраци, како и на повеќето начини на стерилизација и дезинфекција. *C.difficile* е микроорганизам со

оптимална температура на раст и размножување од 37°C. Опишани се како подвижни облигатни анаероби, иако покажуваат варијабилна аеротолеранција и подвижност (9). Повеќето соеви се подвижни благодарение на перитрихијално распоредените флагели. Колониите на *C. difficile* по 48 часовна инкубација во анаеробни услови на 37°C се: големи, рамни, сиви и личат на „здробено стакло“. Тие имаат карактеристичен мирис на коњски измет како резултат на продукцијата на изовалерична и изокапроична киселина и п-крезол, кои се продуцираат во неколку различни метаболни циклуси кај бактеријата (10).

1.3. Вируленција и патогенеза на инфекциите со *C. difficile*

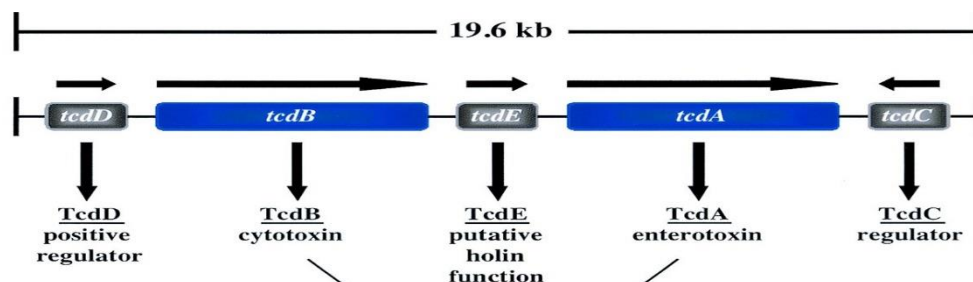
- Клеточни фактори на вируленција

Поголемиот број на соевите на оваа бактерија поседуваат флагели кои освен во движењето имаат улога и во клеточната адхеренција (11). Исто така некои соеви се инкапсулирани, што им овозможува да го избегнат имуниот одговор на домаќинот (12).

Некои од клеточните протеини на *C. difficile* помагаат во колонизацијата на цревата. За површинските протеини е докажано дека имаат имунореактивни својства (13) и дека учествуваат во адхезијата на клетките од домаќинот (14). Меѓу другите вакви се фибронектин врзувачките протеини (15), Cwp66 (16) и “Heat shock” протеинот GroEL (17), кои исто така стимулираат имун одговор (18).

- Токсин А (TcdA) и токсин Б (TcdB)

Вируленцијата на *C. difficile* е резултат на продукцијата на двата главни токсини, токсинот А и токсинот Б. Соевите на *C. difficile* кои не ги продуцираат овие токсини, не предизвикуваат болест (19). Токсините А и Б се гликозилтрансферази со голема молекулска маса од 308 kDa и 270 kDa, соодветно. Токсинот А делува како ентеротоксин, а токсинот Б е јак цитотоксин (20,21). Двата токсини се кодирани од гените *tcdA* и *tcdB* соодветно. Овие гени се поставени на патогениот сегмент од 19.6 kb (PaLoc) заедно со гените *tcdC*, *tcdE* и *tcdD* (слика 1.1). Гените *tcdC* и *tcdD* се негативниот и позитивниот регулатор соодветно, на гените кои ги кодираат токсинот А и Б (22), додека пак *tcdE* е одговорен за дејството на холинот (23), односно ослободувањето на токсините од клетката.



Слика 1.1 Структура на PaLoc сегментот, стрелката ја покажува насоката по која гените се транскрибираат (24)

Кога првпат била откриена поврзаноста меѓу *C. difficile* и псевдомембранозниот колитис (ПМК), првите испитувања покажале дека само токсинот Б е одговорен за

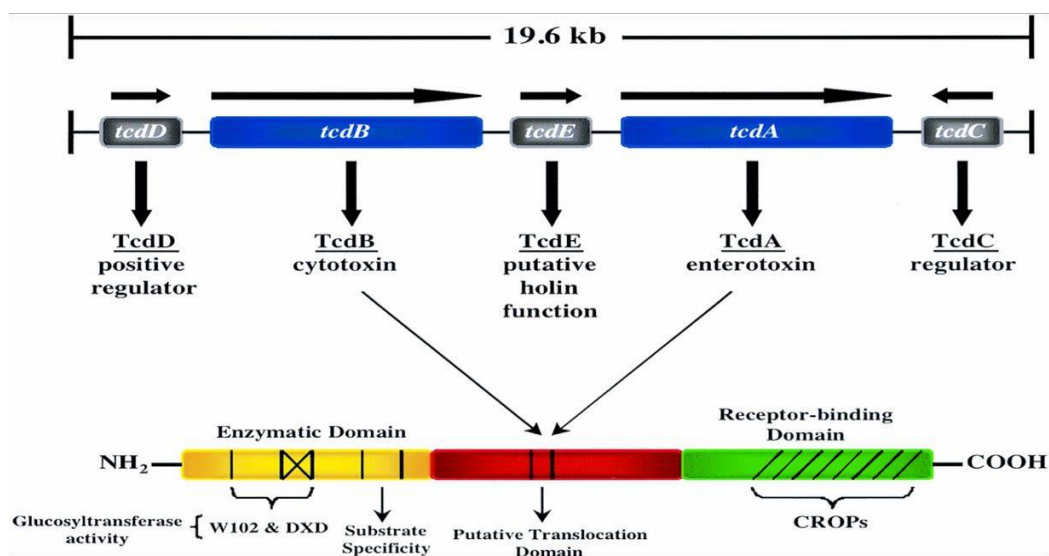
симптомите на инфекцијата со *C. difficile* (CDI). Токсинот А бил изолиран подоцна (25). Потоа, кога заедно биле испитувани двата токсина, имало сомневање дека токсинот А е попотентниот од двата и дека токсинот Б нема потенцијал самостојно да предизвика болест (26,27,28,29).

Изолацијата на првиот токсин А-/Б+ сој и неговата карактеризација поттикнала многу истражувања за ефектот само на токсинот Б на клеточни култури од цицачи. Наодите од овие студии покажале дека токсинот Б има способност да предизвика заболување независно од токсинот А и со тоа е потврдено дека токсин А-/Б+ соевите имаат капацитет да предизвикаат симптоматска болест (30,31).

Изолацијата на овие соеви (токсин А-/Б+) од пациенти со CDI е се почеста (32) и покрај тоа што претходно биле реткост. Ваквите соеви можат да предизвикаат заболување со иста тежина како и соевите кои ги продуцираат двата токсина (33). Истражувањата за независното дејство на двата токсина долго време биле во застој поради тоа што со *C. difficile* е многу тешко да се манипулира генетски и поради тоа вируленцијата на соевите кои продуцираат само токсин А не можела да се испитува, бидејќи овие соеви не се среќаваат во природата (34).

Новите методологии овозможуваат, преку користење на генетско менување на соевите на *C. difficile*, изведување на нови студии за проучување на независното дејство на двата токсина кај животински модел. Спротивно на претходните наоди, овие резултати покажаа дека токсинот Б е основен за вирулентноста, додека генетски променетите соеви кои го лачат само токсинот А значително ја губат способноста да предизвикаат болест (34). Овие наоди се во контрадикција со претходните трудови според кои токсините А и Б делуваат синергистички (35,36).

Двата токсина имаат висок процент на сличност на ниво на аминокиселински состав (63%) (37), а ова се рефлектира и во структурата. И двата токсина можат да бидат поделени на три региони (домени): рецептор врзувачки регион, каталитички или ензимски регион и транслокациски регион. (слика 1.2)



Слика 1.2 Приказ на структурата на протеинските региони (домени) на токсините А и В кај *C. difficile*. (24)

Најголема сличност помеѓу двата токсина е забележана кај каталитичкиот регион (38). Ова е регион кој моногликозилира Rho GTP-ази во самата клетка и е одговорен за промените во клеточната физиологија. Цитотоксичниот ефект на двата токсина е идентичен, со таа разлика што токсинот А има способност да предизвика и акумулација на течности (39). Денес има други студии кои противречат на ова (40). Друга значајна разлика помеѓу двата токсина е варијабилноста која е докажана во рецептор врзувачкиот регион и најверојатно на ова се должат разликите во врзувањето на токсините за специфичните рецепторите (41).

Двата токсина бактеријата ги продуцира за време на доцната log и стационарната фаза на раст (38), адаптирајќи се на условите кои ги среќава во цревата на домаќинот. Токсините навлегуваат во клетките на домаќинот со ендоцитоза. Рецепторите за двата токсина се разликуваат. Рецепторот за токсинот А е дисахарид Gal β 1-4GlcNac кој е пронајден на I, X и Y крвните антигени кои меѓу другото се наоѓаат и на епителните клетки (42). Рецепторот за токсинот Б сепак не е идентификуван, но неговата способност да се инфилтрира во различни клетки сугерира постоење на заеднички рецептор (38). Откако токсинот и рецепторот ќе бидат внесени, настанува ацидификација на ендозомот кој ги обвиткува, што поттикнува структурални промени кај токсинот со кои каталитичкиот регион се ослободува во цитозолот. Двата токсина го предизвикуваат својот ефект на клетките преку гликозилација на Rho фамилијата протеини. Тоа се протеини важни за многу процеси во клетката, вклучувајќи регулирање на актинскиот цитоскелет, нарушување на поврзувањето меѓу клетките и клеточниот циклус (43,44).

Гликозилацијата на Rho GTP-азите води до инактивација и инхибиција на нивната регулаторна активност во клетката, што понатака води до деполимеризација на актинскиот цитоскелет и оштетување (заоблување) на клетката и на крај апоптоза. Заоблувањето на клетките исто така доведува до раскинување на меѓуклеточните врски како резултат на нарушување на структурата на актинскиот цитоскелет, но и поради тоа што Rho протеините исто така учествуваат во регулацијата на меѓуклеточните врски. Губењето на меѓуклеточните врски понатаму води до зголемена пермеабилност на цревниот епител што предизвикува дијареа која е карактеристична за CDI (45). Иако и двата токсина имаат капацитет да предизвикаат промени во физиологијата на клетката домаќин, како и идентичен цитопатоген ефект на клетките, се смета дека цитотоксинот (Б) е попотентен токсин во споредба со ентеротоксинот (А) (45).

- Бинарен токсин

Покрај TcdA и TcdB, некои соеви на *C. difficile* продуцираат и бинарен токсин (CDT) кој е идентификуван како актин-специфична аденозиндифосфат (ADP) рибозилтрансфераза. Овој токсин е идентичен со другите јота токсини кај родот *Clostridium* кои делуваат специфично на актинот во клетките (46). Улогата на бинарниот токсин кај CDI е сепак непозната, но сепак за него е докажано дека има цитопатоген ефект на неговите клетки *in vitro* (47). Сите соеви на *C. difficile* не продуцираат бинарен токсин што покажува дека овој токсин не е неопходен за вируленцијата на бактеријата. Продукцијата на овој токсин најчесто се среќава заедно со токсините А и Б и е најпозната кај соевите на хипервирулентниот риботип

027 (48). Мал број извештаи укажуваат на постоење на *C. difficile* соеви кои продуцираат единствено бинарен токсин (49,50,51).

- Секретија на други фактори на вируленција

За разлика од повеќето други бактерии, *C. difficile* не продуцира дополнителни фактори на вируленција како на пример екстрацелуларни ензими. И покрај тоа што продукцијата на токсините како главни фактори на вируленција е многу добро документирана, некои студии се изведени со цел да се испита продукцијата на други фактори како што се хидролитички и протеолитички ензими (52,53,54,55,56). Иако во некои студии е покажано дека *C. difficile* може да продуцира екстрацелуларни ензими како хепаринази и хијалуронидази, бројот на испитувани соеви во студиите е мал, а и нивото на овие ензими варира помеѓу соевите (55,56). Варијацијата во продукцијата на екстрацелуларни ензими покажува дека тие не се клучни во вируленцијата на *C. difficile*, но доколку се присутни придонесуваат за неговиот опстанок во дигестивниот тракт (45).

- Хипервирулентни соеви на *C. difficile*

Соевите на *C. difficile* кои продуцираат поголема количина на токсини се означени како хипервирулентни. Овие соеви се често асоцирани со потешки инфекции, компликации и повисок степен на морбидитет како и релапси (57). Во зависност од типизирачкиот метод кој се користи, доминантниот хипервирулентен сој е познат како риботип 027/ PFGE тип NAP- 1/токсинотип III и REA група VI и првпат бил изолиран и пријавен во 1985 (58). Во тоа време сепак не бил сметан за посебно важен сој и бил многу редок. Од 2002 во Канада овој сој се појавува се почесто водејќи до епидемии и значаен број смртни случаи во Монреал. До 2005 овој хипервирулентен сој веќе е изолиран кај пациенти од неколку други земји вклучувајќи ги САД, Англија и Холандија (59). Овој сој денес е широко распространет низ многу земји во Европа (60), а потврден е и низ многу земји во светот вклучително во Австралија, Кореја, Јапонија и Хонг Конг (61,62,63,64). Риботипот 027 не само што продуцира зголемена количина на токсините А, В и бинарен токсин, туку за него се знае дека се одликува со зголемено ниво на спорулација (65) и зголемена антимицробна резистенција, најчесто кон флуорокинолоните (66).

Причината за зголемената продукција на токсини е примарно покажано дека се должи на специфична делеција од 18bp во *tcdC* генот, кој е негативен регулатор на продукцијата на токсини. Денес има докази дека оваа делеција не само што не влијае на регулацијата на токсинот (67), туку и дека геномите на другите соеви на *C. difficile* имаат слични делеции и мутации без негативен ефект на регулацијата на токсините и протеините (68,69,70). Неодамнешните анализи исто така покажале дека соевите од риботипот 027 имаат додатни 234 гени во споредба со сојот 630 (риботип 012) (71) коишто се најверојатно одговорни за разликите во вируленцијата и антибиотската резистенција. Со ова хипервируленцијата на риботипот 027 станува помалку јасна од порано и најверојатно е резултат на комбинација на неколку фактори.

Во поново време се појавуваат и други хипервирулентни соеви како на пример риботиповите 017 и 078. Обата соја се поврзуваат исто така со сериозни епидемии на CDI, а претходно биле доста поретки (72). Риботипот 078 ги продуцира токсините А и В, има делеција во *tcdC* генот и продуцира бинарен токсин (73). Изолатите кои припаѓаат на риботипот 017 покажуваат високо ниво на резистенција кон флуорокинолони, но не продуцираат токсин А (72). Тоа е уште еден индикатор дека токсинот В е подеднакво важен за предизвикувањето болест како и токсинот А.

Во целина трендот е дека хипервирулентните соеви најпрво се скоро непознати кај популацијата, па потоа истите многу брзо се прошируваат низ неа. Ова беше случај кај соевите од PCR риботипот 027 во неколку земји. Истото се случува од неодамна со соевите од PCR риботипот 078 кај пациентите во Велика Британија и Холандија (60).

-Продукција на спори

Способноста на *C. difficile* да продуцира високо отпорни ендоспори овозможува ефективна трансмисија и преживување во надворешната средина, како и долготрајно опстојување во цревата и покрај антибиотскиот третман на домаќинот. Нозокомијалната трансмисија на *C. difficile* во најголема мера се должи на ингестија на спорите кои што од контаминираните површини се пренесуваат преку воздухот (74). Спорулацијата игра главна улога во трансмисијата на *C. difficile* (75). Исто така, спорите многу ефективно се исфрлаат од пациентите со *C. difficile* инфекција (CDI) преку обилната дијареа која е главен симптом на инфекцијата. Пресметано е дека околу 10^5 спори можат да се исфрлат во секој грам од фецесот на пациент со CDI, што ја зголемува трансмисијата (76).

Спорулацијата започнува кога вегетативните клетки на *C. difficile* се изложени на неповолни услови, како на пример недостаток на хранливи материи (77). Во таква средина спората се формира внатре во клетката мајка. Ова овозможува зачувување на сојот додека условите не станат поволни и тогаш спората повторно герминира во вегетативна клетка која може да произведе токсин и да предизвика болест. Спорите на *C. difficile* герминираат во присуство на одредени жолчни соли кои можат да се најдат во тенкото црево кај луѓето (78). Токму ова ја детерминира локацијата на герминацијата на спорите во телото на домаќинот. Неколку жолчни соли имаат улога во герминацијата на спорите на *C. difficile*. Натриум таурохолатот покажува најдобра ефикасност, но и глицинол и тиогликолатот учествуваат како ко-герминанти (77,79). Кога спорите се веќе формирани, тие многу тешко можат да се елиминираат бидејќи традиционалните средства за чистење и дезинфекција се најчесто неефикасни (80). Натриум хипохлорит може да ги елиминира спорите (81) но тој е доста токсичен, а со тоа и опасен за употреба (82). Високото ниво на релапси на CDI се должи на спорите (83) поради тоа што тие можат да останат непроменети во цревата за време на антибиотскиот третман. Спорите не можат да предизвикаат болест, па симптомите поминуваат. По завршувањето на антибиотскиот третман условите во цревата повторно стануваат поволни, спорите герминираат во вегетативни клетки кои лачат токсини и со тоа болеста повторно се враќа. Без ефективна продукција на спори, трансмисијата на *C. difficile* би била многу потешка.

1.4 Епидемиологија, трансмисија и превенција

- Епидемиологија

C. difficile е најчестата причина за нозокомијална дијареа во развиените земји (84). Носителството и колонизацијата варираат помеѓу возрастните групи, при што е пресметано дека носителството не е повеќе од 3% кај здравата возрастна популација, но кај новороденчињата може да достигне до 70% (85). Кај здравствените работници исто така е откриена повисока стапка на колонизација (86), како и кај хоспитализираните пациенти (87).

Пред 2003, процентот на CDI беше значајно понизок низ Северна Америка и Европа. Зголемувањето на бројот на CDI кое што се појави последните години, е последица на појавувањето и ширењето на соевите од PCR риботипот 027, кои според испитувањата еволуирале во повирulentни и потрансмисивни соеви од оние претходно (88). Кога се појавиле епидемиите на CDI во 2003, најпогодени биле повозрасните хоспитализирани пациенти кои примале антибиотици. Иако ова сеуште е случај, има се повеќе извештаи за луѓе кои не припаѓаат во ризичните групи, а сепак развиваат CDI (89,90,91). Една голема мултицентрична студија изведена во САД во 2011 година (378) излезе со податоци дека таа година речиси пола милион луѓе во оваа држава развиле CDI, кај 83 000 од нив болеста најмалку еднаш се повторила, а 29 000 од нив починале во рок од 30 дена по првичната дијагноза.

Порастот на инциденцата на CDI, како и на епидемиите што ги предизвикува оваа бактерија особено во хоспиталните средини, доведоа до воведување на разни типизирачки методи кои овозможуваат да се докажат хоспиталните инфекции, резервоарите и начинот на трансмисија на *C.difficile*. Во 2007 беше формирана мрежа за риботипизирање на *Clostridium difficile* во Англија (CDRNE). Со вклучувањето на лабораториите од Северна Ирска во 2009, името се менува во Мрежа за риботипизирање на *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* Ribotyping Network (CDRN)). Денес постојат осум лаборатории кои се дел од CDRN кои освен риботипизирање, работат и фингерпринт на соевите со помош на Мултилокусна анализа на варијабилен број повторувани тандеми (Multi-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis -MLVA). Поусовршени техники на фингерпринт се воведени како подискриминирачки методи од риботипизацијата со цел разграничување внатре во рамките на риботиповите. Вакво типизирање е потребно за да се соберат повеќе информации за ширењето и трансмисијата на *C.difficile*, посебно затоа што извештаите од 2007/2008 покажуваат преминација на три риботипови во Велика Британија (001, 027 и 106) и истите се одговорни за 70% од инфекциите со *C.difficile* (92).

Поголемиот број на лаборатории не го култивираат *C. difficile* и поради тоа следењето на антибиотската осетливост на изолатите е недоволно. Шемата на случајни примероци е воведена во 2005 со цел да се следи епидемиологијата на риботиповите и антибиотската осетливост на изолатите на *C. difficile* низ Велика Британија. Таа опфаќа само болници од Велика Британија од каде се испраќаат одреден број на *C.difficile* токсин позитивни примероци собрани во одредени

периоди кои се праќаат во Референтната лабораторија за анаероби во Кардиф, Велика Британија. Тука изолатите се риботипизираат и се тестираат за антибиотска резистенција кон осум антибиотици (ванкомицин, метронидазол, еритромицин, моксифлоксацин, ко-амоксиклав, пеницилин, имипенем и пиперацилин-тазобактам) со помош на Е тест методологија (93). Со помош на оваа шема е пронајдено покачување во минималната инхибиторна концентрација (МИК) кон метронидазол кај изолатите кои припаѓаат на трите најчести риботипови на *C.difficile* во Велика Британија (001, 027 и 106) во споредба со претходните години. Овие МИК-ови се исто така значително повисоки кај овие риботипови во споредба со поретко изолираните риботипови (93). Почестите риботипови исто така покажуваат повисоки вредности за МИК-овите кон еритромицин и моксифлоксацин, со тоа што изолатите од риботипот 027 се резистентни на овие два антибиотика (93).

- Следење на CDI во Европа

Слични системи за следење и пријавување на *C.difficile* освен во Велика Британија постојат и во Франција, Белгија и Холандија. Уште пред епидемиите и зголемувањето на инциденцата на *C.difficile* асоцираните болести, во 2001 беше формирана Европска група за проучување на *Clostridium difficile* (ESGCD), со цел подигање на свесноста за овие инфекции и следење на нивното ширење низ Европа. Ова здружение успеа да обезбеди многу важни информации за промените во епидемиологијата на *C. difficile* и посебно за риботипот 027 (94). Ваквите големи збирки на податоци од поголем регион овозможуваат рано забележување на трендовите, кои во поинакви услови би останале незабележани. Појавата и ширењето на риботипот 027 доведе до зголемено типизирање, пријавување и следење на изолатите на *C. difficile* низ Европа и Северна Америка. По појавата на овој хипервирулентен сој, риботипот 027 преовлада во неколку земји последниве години. Сепак постојат и извештаи за намалување на инциденцата на овој риботип во одредени земји (70). И покрај доминацијата на риботипот 027 во некои земји, постојат многу варијации во однос на фреквенцијата на различните риботипови меѓу изолатите кај различни држави (94). Таков пример имаме со риботипот 106, кој е еден од најчестите риботипови кај изолатите од Велика Британија, а во останатите земји многу ретко се среќава (95).

- *C. difficile* кај животните

Изолацијата на *C. difficile* од животни покажува дека и кај нив се доминантни различни риботипови во зависност од видот. Најчесто изолиран риботип кај коњи, прасиња и телиња е риботипот 078 (96,97,98). Многу студии исто така потврдуваат дека и месото кое се наоѓа во малопродажба може да биде контаминирано со *C.difficile* (99,100,101,102,103,104). Во месните производи најчесто е изолиран риботипот 078 (102,103). Изолати на *C. difficile* се пронајдени и во многу други прехранбени производи (105,106). Се поголемата изолација на оваа бактерија од прехранбените производи го отвора прашањето за можна трансмисија помеѓу луѓето и животните (107,108), иако сеуште нема цврсти докази за ова. Сепак постојат докази дека некои соеви можат да предизвикаат болест и кај луѓето и кај прасињата

(109).

- Трансмисија на *C. difficile*

Трансмисијата на *C. difficile* настанува по феко-орален пат, преку ингестија како на спори, така и на вегетативни клетки. Иако е возможно да настане ингестија на вегетативни клетки и со тоа трансмисија на инфекциите со оваа бактерија, тоа е многу малку веројатно поради неможноста бактеријата да опстане долго во аеробни услови, како и во киселата желудочна средина. Спорите на *C. difficile* од друга страна можат да опстојуваат долго време како во аеробни услови така и на ниска рН, со што имаат главна улога во трансмисијата. При нивното исфрлање од инфицираните пациенти, настанува воздушна дисеминација во околината каде што тие можат да се одржат на многу различни површини кои претставуваат резервоар на инфекција (110). Спорите не ги исфрлаат само инфицираните пациенти, туку и асимптоматските носители. Исфрлањето може да продолжи и до четири недели по престанокот на лечењето на CDI (111). Пред се контаминацијата со спорите на оваа бактерија настанува во неживата болничка средина (110 - 120). Контаминација е пријавувана и на апарати за мерење на крвен притисок (121) како и на разна друга медицинска опрема (122). Спорите на *C. difficile* можат да се изолираат не само од болничките површини, туку и од воздухот (123) што претставува голем проблем во однос како на чистењето така и во самата контрола на инфекциите.

Во трансмисијата на *C. difficile* се вклучени и здравствените работници (124,125) најчесто како резултат на неправилната хигиена на нивните раце. Исто така во некои трудови се споменуваат и униформите и обувките на здравствените работници како резервоари на *C. difficile* (126). Честата контаминација на болничката средина со спорите на *C. difficile* е причина за честите интрахоспитални инфекции, кои според СЗО се дефинираат како инфекции кои се развиваат во тек на престојот на пациентите во болница (најмалку 24-48 часа од нивниот прием, како и до 12 недели по нивното отпуштање). *C. difficile* инфекциите пак кои се стекнати во заедницата се дефинираат како инфекции кои се развиваат по дванаесеттата недела од отпуштањето на пациентите од болница се до нивниот повторен прием во болницата (127). Ако CDI настанува помеѓу четвртата и дванаесеттата недела од отпустот, многу е тешко да се разграничи дали инфекцијата е болничка или стекната во заедницата. Иако причините сеуште не се целосно познати, инциденцата на инфекциите со *C. difficile* надвор од болничката средина е во пораст (128-131).

- Превенција на инфекциите со *C. difficile*

Пациентите кои се суспектни за CDI потребно е веднаш да бидат изолирани од останатите пациенти. Во болничка средина во која е откриена епидемија со CDI, мора да се отворат посебни одделенија со цел изолација на поголема група пациенти. Докажано е дека изолацијата како на поединечни пациенти така и на група пациенти има голема улога во редуцијата на трансмисијата и во ставањето на епидемијата под контрола. (National *Clostridium difficile* Standards Group, 2004),(127).

Ефикасното отстранување на спорите од болничката средина преку физичко отстранување или преку користење на спороцидни средства како на пример хипохлорит е најефикасен начин за редукција на инфекциите и трансмисијата меѓу пациентите. Постојат неколку средства за чистење со спороцидна активност како на пример пероцетна киселина, глутаралдехид и некои хлорни препарати, но сепак не сите од овие агенси се погодни за употреба внатре во болниците (132). Важно е да се користат токму вакви средства, од причина што за некои други средства за чистење е докажано дека ја индуцираат спорулацијата кога се нанесуваат на вегетативните клетки и со тоа само ја влошуваат ситуацијата (133). Хлорот и пероцетната киселина многу често се среќаваат во средствата за чистење. Иако хлорот поефикасно ги убива спорите, се смета дека средствата со пероцетна киселина се побезбедни за употреба (134).

Освен апликацијата на хемикалии на цврсти површини, антимикробните својства на самите површини, како на пример бакарот, биле исто така проучувани. Има докази дека во одредени услови спорите се многу поподложни на уништување кога се на бакарна површина (135,136).

Спорите на *C. difficile* не само што ја контаминираат болничката средина, туку ја контаминираат и болничката опрема за повеќекратна употреба. Докажано е дека некои предмети како термометри и апарати за мерење на крвен притисок имаат големо влијание во трансмисијата на оваа бактерија, а потоа е покажано дека со замена на класичните термометри со алтернативни кои се за еднакратна употреба може значајно да се намали инциденцата на CDI (137,138). Според препораките, собите на пациентите со *C. difficile* потребно е да се чистат секојдневно со дезинфициенс за цврсти површини на база на хлор (најмалку 1000 ppm достапен хлор) (127). Откако пациентот ќе ја напушти болничката соба, потребно е душекот, чаршафите и завесите да бидат заменети (127).

Воздушната дисеминација на спорите на *C. difficile* не само што ги контаминира површините, туку и дел од нив остануваат во воздухот (139). Тука тие се многу потешки за елиминирање. Во такви случаи се препорачува третман со вапоризација на водороден пероксид (140,141,142). Спорите на *C. difficile* освен болничката средина ги контаминираат и рацете на болничкиот персонал (143,144). Редовното и целосно миење на рацете со сапун и вода го намалува ризикот од понатамошна инфекција. Сите здравствени работници е потребно да ги мијат рацете пред и по контактот со пациенти со CDI. При работа со овие пациенти се препорачува и употреба на ракавици и мантили за еднакратна употреба (127).

Со цел да се намали инциденцата на CDI, потребна е рестрикција на препишувањето антибиотици со широк спектар. Антибиотици кои се најчесто асоцирани со појавување на CDI се пеницилините, флуорокинолоните, третогенерациските цефалоспорини и клиндамицинот, иако речиси било кој антибиотик може да биде причинител (19,145). Причината поради која антибиотиците со широк спектар се најчесто асоцирани со CDI е нивното таргетирање на речиси сите бактерии од цревната флора, посебно во услови кога пациентот веројатно ќе ингестира спори на *C. difficile*. Антибиотиците со широк спектар вообичаено се даваат како профилактична терапија или во случај кога причинителот на инфекцијата е непознат. Со рестрикцијата на препишување на

антибиотици со широк спектар значајно може да се намали бројот на случаи на CDI (146 -154).

1.5 Носителство и инфекција со *Clostridioides difficile*

- Асимптоматско носителство

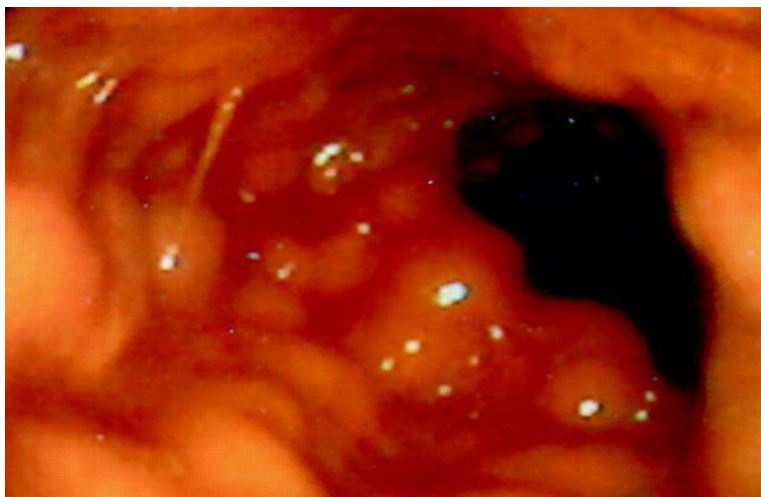
Асимптоматското носителство на *C.difficile* кај возрасните може да биде резултат на предходна инфекција (155) пред хоспитализација (87), но и како резултат на носителство на нетоксогени соеви (156). Високата стапка на асимптоматско носителство кај новороденчињата е резултат на неразвиеноста на цревните рецептори за кои се врзуваат токсините на *C. difficile* (157). Со населувањето на нормалната цревна флора се појавува отпорност кон колонизација која го ерадицира *C. difficile* пред созревањето на рецепторите (158). Значајните разлики во пријавените случаи на носителство на *C. difficile* помеѓу новороденчињата и возрасните покажуваат дека имунитетот и отпорноста кон колонизација којашто ја обезбедува нормалната цревна микрофлора имаат големо влијание. Поради начинот на кој CDI најчесто се дијагностицираат (детектирање на токсините), вистинската стапка на носителство на *C. difficile* е непозната. Иако често се шпекулира дека носителството е резултат на присуство на нетоксогени соеви, сепак можно е и носителство на токсогени соеви каде што патогеноста во голема мера е инхибирана од присуството на комензалната микрофлора.

-Антибиотик асоцирана дијареа (ААД)

Антибиотик асоцираната дијареа (ААД) се опишува како необјаснета епизода на дијареа која започнала за време или во период од два месеца по завршувањето на антибиотската терапија (159). Повеќето антибиотици можат да доведат до развој на антибиотик асоцирана дијареа (87), со тоа што стапката на тоа случување варира во зависност од видот на антибиотикот (160). Најчесто тоа се антибиотиците со широк спектар на делување, особено оние кои делуваат на цревната микрофлора (160). Антибиотик асоцираната дијареа е резултат на уништувањето на комензалната цревна флора што доведува до намножување на опортун патогените бактерии. Намножувањето на *C. difficile* е најчестата причина за инфективна антибиотик асоцирана дијареа (ААД). Други микроорганизми кои учествуваат во развој на ААД се: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Сепак голем дел од случаите на ААД не се резултат на инфекција туку едноставно физиолошки одговор кон антибиотиците во цревата (161). Симптомите на ААД вклучуваат лесна до умерена дијареа, некогаш пропратена со абдоминална болка, треска, малаксаност и дехидратација. Кај некомплицирани случаи ова може да се надмине едноставно со прекинување на антибиотскиот третман и рехидрација на пациентот. Кај посериозните случаи на ААД, потребен е антибиотски третман со метронидазол или ванкомицин за да се елиминира *C.difficile*.

- Псевдомембранозен колитис

Псевдомембранозниот колитис (ПМК) е првпат опишан во 1893 (162). Најчесто е предизвикан од *C.difficile*. Поради тоа што случаите на ПМК предизвикани од други агенси се многу ретки, термините псевдомембранозен колитис и *C. difficile* колитис честопати наизменично се употребуваат. Се до моментот кога употребата на антибиотици добила голем замав, случаи на ПМК речиси да не се пријавувале. Клиндамицинот е првиот антибиотик кој бил посочен како причина за ПМК во 1974 (163). Псевдомембранозниот колитис се појавува кај 10% од случаите на ААД (164), а кај преку 90% од овие случаи на ПМК *C.difficile* е причината (165). Симптомите кај ПМК се идентични, но потешки од оние кои се јавуваат кај CDI (обилна воденеста дијареа и јака абдоминална болка, честопати пропратена со треска и болна осетливост на абдоменот) (166). Ендоскопскиот преглед на дебелото црево открива присуство на жолти псевдомембранозни плаки (Слика 1.3) кои се состојат од мртви мукозни клетки, слуз, фибрин и неутрофили. Честопати површината зафатена со овие плаки е во корелација со тежината на симптомите (19). Можна е и појава на колитис без псевдомембрани, со тоа што во таков случај симптомите се поблаги.



Слика 1.3 Дебело црево кај пациент со псевдомембранозен колитис како резултат на инфекција со *C.difficile*

- Фулминантен колитис

Фулминантниот колитис се појавува кај приближно 1-3% од сите случаи на CDI и може да доведе до понатамошни компликации како перфорација и перитонит, со висока стапка на морталитет. Пациентите се тешко болни, со болка во абдоменот и дистензија, треска и тахикардија. Доколку се развие токсичен мегаколон или паралитичен илеус со губење на мускулниот тонус, тогаш дијареата може да не е присутна. Во овие случаи неопходна е хируршка интервенција за да се спречат натамошни компликации и смрт.

- Токсичен мегаколон

Токсичен мегаколон е состојба каде што колонот рапидно се дилатира. Ова може да ги спречи перисталтичките движења и следствено на тоа да отсутствува дијареа кај пациентот. Дилатацијата на колонот исто така предизвикува абдоминална дистензија, а може да се присутни и болна осетливост и треска. Токсичниот мегаколон е ретка, но животозагрозувачка компликација на CDI којашто носи висок ризик од перфорација, сепса и шок. Третманот е најчесто хируршки и се состои од делумна или целосна колектомија, иако се даваат и стероиди за намалување на воспалението и дилатацијата.

- Перфорација на дебелото црево и перитонитис

При екстремна дилатација и воспаление на дебелото црево, може да дојде до негова перфорација со консеквентен перитонитис, состојба која доколку не се третира може брзо да заврши фатално. Случаите на CDI ретко прогресираат до овој степен, но сепак вакви случаи постојат и тие се со многу висока стапка на морталитет. За овие случаи е неопходна хируршка интервенција, во комбинација со антибиотска терапија и рехидратација.

- Релапс и реинфекција со *C. difficile*

Стапката на повторување кај CDI е доста висока и според пријавените случаи се движи од 7-35% (167,168,169). Сеуште не е јасно зошто повторувањето на CDI е толку високо во споредба со другите инфекции. Исто така е многу тешко да се одреди дали тоа повторување е релапс или реинфекција без користење на молекуларни типизирачки методи. Релапсот е дефиниран како повторување на CDI до дваесет и осум дена од претходната дијагноза, а по тој период се смета за реинфекција (127). Релапсот најчесто е асоциран со неуспех на терапијата при што *C. difficile* не е успешно ерадициран од цревата и по завршувањето на антибиотската терапија пациентот повторно има симптоми заради присуството на истиот сој. Оваа состојба е резултат на ретенција на спорите кои се отпорни на антибиотските во цревата (19,170). Останува и другата можност, а тоа е дека високата стапка на повторувани инфекции со оваа бактерија не е резултат на релапс, туку реинфекција. Многу студии потврдуваат постоење на голем број реинфекции (167, 171-175). Реинфекцијата со *C.difficile* е доста веројатно дека ќе настане во моментот на опоравување на пациентот од претходната епизода на CDI. Некогаш се потребни и три месеци за нормалната цревна флора повторно да се воспостави (170) и во тој период пациентите се многу подложни на реинфекција. За ова да се случи освен осетливоста на пациентот, потребно е и присуство во средина во која може да дојде до ингестија на спорите. Најчесто ваквата средина е самата болница. Отсуството на типизирање на соевите оневозможува разликување на релапсите и реинфекциите. Во европските држави каде што риботипизацијата е стандарден метод на типизирање, доминираат одредени риботипови. Но дури и да се успее да се риботипизираат сите изолати, изолацијата на истиот риботип кај пациентот во две прилики не може со сигурност да потврди релапс. Во ваков случај

е можно пациентот да има реинфекција со два различни соја од истиот риботип. Мултилокусна анализа на варијабилен број повторувани тандеми (Multilocus variant number tandem repeat analysis-MLVA) е нова типизирачка метода која се препорачува од CDRN и која има поголема дискриминирачка моќ и дава повеќе информации за еволуцијата на соевите на *C. difficile*. На овој начин може да се обезбедат многу корисни информации за трансмисијата на оваа бактерија.

-Екстраинтестинални инфекции

Случаите во кои е изолиран *C.difficile* кај екстраинтестинални инфекции се ретки, но сепак има одреден број пријавени случаи (176-198). Изолацијата на *C.difficile* од екстраинтестинална локализација, честопати е придружена со други бактерии (полимикробна инфекција), посебно кога тоа место е во близина на колонот и поради тоа може лесно да дојде до фекална контаминација (198). Она што е интересно кај овие случаи е што изолираните соеви на *C. difficile* се најчесто нетоксогени и посебно се чести кај деца (198).

1.6. Ризик фактори за развој на CDI

- Антибиотска терапија

Најголемиот ризик фактор за стекнување на CDI е претходен долготраен третман со антибиотици. Иако сите антибиотици можат да бидат причина за развој на CDI, испитувањата покажуваат дека најзначајни ризик фактори се антибиотиците со широк спектар на делување: третогенерациските цефалоспорини, флуорокинолоните, пеницилините и клиндамицинот (199). Во неколку студии е докажано дека со прекинување на употребата на овие антибиотици, значително се намалува и стапката на CDI (146-154).

Со внесувањето на антибиотиците не се наштетува само на целните бактерии, туку и на оние кои ја сочинуваат нормалната цревна микрофлора, кои вообичаено се осетливи. Со елиминација на нормалната микрофлора во цревата се овозможува опортуно патогените бактерии, каде припаѓа и *C. difficile*, да извршат колонизација и да ги манифестираат своите патогени особини, предизвикувајќи инфекција. Студиите покажале дека антибиотската терапија не само што е ризик фактор за појава на CDI, туку и самите антибиотици во цревата ја поттикнуваат продукцијата на токсините (200-205), герминацијата на спорите (205) како и експресијата на колонизациските фактори во цревата (206, 207).

- Инхибитори на протонска пумпа (ИПП)

Сеуште е нејасно дали ИПП се ризик фактор за CDI поради тоа што студиите даваат контрадикторни резултати (208-217). Инхибиторите на протонската пумпа ја редуцираат гастричната секреција и се препишуваат за различни состојби меѓу кои желудочен рефлукс и пептични улкуси. Претпоставките на некои автори се дека зголемената рН во желудникот, поради редукција во желудочната секреција, овозможува премин на *C. difficile* во цревата каде што понатаму врши колонизација, а потоа и инфекција (59). Ингестијата на спорите на *C. difficile* е главниот пат на

трансмисија и со оглед на тоа дека се резистентни на киселоста во желудникот, нејасно е зошто ИПП би го зголемувале ризикот за CDI. На пример, при состојба на ахлорхидрија, секрецијата на желудочна киселина е или отсутна или многу ниска со што рН вредноста достигнува до седум. Доколку ИПП го зголемуваат ризикот за CDI преку наведениот механизам, тогаш би се очекувало овие пациенти да се под зголемен ризик (210). Исто така се претпоставува дека спорите се стимулирани да герминираат од жолчните соли во желудникот и покачената рН потоа овозможува опстанок на вегетативните клетки (216). Друга претпоставка е дека вијабилноста на вегетативните клетки е зголемена на влажни површини, и кога овие ќе се ингестираат ќе успеат да го преживеат поминувањето низ желудникот поради покачената рН.

- Возраст на пациентите

Напреднатата возраст е ризик фактор за развој на CDI. Иако најголемиот број пациенти се постари од 65 години, се поголем е бројот и на помлади. Иако возраста е битен фактор за вакво заболување, тешко е да се гледа изолирано и најчесто е во комбинација со други фактори, како што е престој во болница, антибиотска терапија и присуство на други коморбидитети.

- Престој во болница

Болничкиот престој претставува ризик за колонизација со *C. difficile*. Истражувањата покажуваат дека 10-35% од хоспитализираните пациенти се колонизирани со *C. difficile* (87,218), додека позитивен наод за токсин има пријавено кај 2-8% од хоспитализираните пациенти (87). На ова мора да се додаде дека изолацијата на *C. difficile* од фекални примероци е пропорционална со должината на болничкиот престој (218). Причината за ова најверојатно лежи во зголеменото присуство на спорите од оваа бактерија во болничката средина (143).

- Иmun одговор

Симптомите во врска со CDI може да варираат во голема мера. На почетокот се сметало дека тоа е поради различната вируленција на соевите на *C. difficile*, но потоа е утврдено дека имуниот одговор на пациентот може значително да влијае на тежината и на долготрајноста на симптоматологијата (219).

Имунокомпромитираните пациенти се под зголемен ризик за CDI. Дури и некои минорни разлики меѓу пациентите можат да влијаат на симптомите кои би можеле да се почувствуваат. Во неколку студии е покажано дека покачените концентрации на антитела кон токсините може да обезбедат некаква заштита како од симптоматска инфекција така и од повторна инфекција кај оние кои претходно имале епизода на CDI (220 - 228). По ова е воведена имуноглобулинската терапија како опција за третман (229). Исто така е покажано дека промените во генот за IL-8 може да доведат до зголемена осетливост кон заболувања асоцирани со оваа бактерија (230).

1.7 Дијагноза на CDI

- Клиничка дијагноза

На CDI треба да се посомневаме во случај кога имаме пациент кој додека е под терапија со антимикробни средства или кратко време по завршување со антимикробната терапија добива необјаслива епизода на дијареа. Ова само по себе е доволно за клиничарот да испрати примерок од фецес за тестирање, иако сомневањето понатаму треба да се засили со тоа што пациентот би покажал и други симптоми како на пример абдоминална болка и треска. Дијагнозата се потврдува во лабораториска анализа за детекција на токсините на *C. difficile* директно во примерок од фецес.

-Лабораториска дијагноза

Во дијагностичките лаборатории најшироко прифатен начин за дијагноза на CDI е преку двоетапниот метод за детекција на ензимот глутамат дехидрогеназа (ГДХ) кој е конститутивен и високоспецифичен антиген на оваа бактерија, следено со детекција на токсинот Б или на обата токсина (А и Б). За таа цел најчесто се применуваат имуноензимски техники (EIA), но постојат и други тестови кои се побрзи и поедноставни од имуноензимските. Тоа се имунохроматографските тестови, кои ги детектираат како ГДХ, така и токсините директно во фецес за многу кратко време. Имунохроматографските тестови се евтини и полесни за изведување од имуноензимските тестови и поради тоа се најчесто користени за дијагноза на CDI. Сепак овие тестови имаат релативно ниска специфичност и сензитивност. За нив се пријавени како лажно позитивни така и лажно негативни резултати (231). Бидејќи претходно се мислеше дека само соевите на *C. difficile* кои продуцираат токсин А се способни да предизвикаат болест, дијагностичките тестови беа така направени што го детектираа само овој токсин. Со идентификувањето на А-/В+ соеви кај пациенти со CDI, започна да се препорачува користење на тестови кои ќе можат да ги детектираат и двата токсина.

Култивирањето на фекалните примероци на селективен медиум, а потоа и одредувањето на цитотоксичноста е друг метод со кој може да се дијагностицира CDI, детектирајќи ги истовремено и *C. difficile* и неговите токсини. Фекалните примероци можат да бидат засадени на селективен агар за *C. difficile*, како на пример циклосерин цефокситин фруктоза агар (CCFA), кој би го инхибирал растот на останатите фекални бактерии и теоретски би можел да порасне само *C. difficile*. Како алтернатива, мал дел од фецесот може да се суспендира во апсолутен етанол кој би ги елиминирал сите бактериски клетки и единствено спорите би можеле да преживеат. Суспензијата потоа се култивира на подлога за анаероби збогатена со познат герминант на спорите на *C. difficile* како на пример натриум таурихолат. И оваа подлога е селективна за раст на *C. difficile*. Типичните колонии на *C. difficile* се сивкасти, рамни, со изглед како здробено стакло. На ова се надоврзува карактеристичниот мирис на коњски измет. Останати тестови со кои може да се потврди се бојењето по Грам, како и користење на автоматски системи како API и VITEK. За култивирање на *C. difficile* потребно е 48 часовна инкубација во анаеробна

атмосфера, што е значително подолго од имунохроматографските тестови за детекција на токсините. Култивирањето само по себе не е погодно како дијагностички метод поради асимптоматското носителство на *C. difficile*. Се препорачува секогаш истовремено со култивирањето да се изведува и некоја метода за детекција на токсинот, како начин за дијагноза на CDI. Иако ова во голема мера ги намалува погрешните дијагнози (232), тоа носи поголеми материјални трошоци, ангажираност на персоналот и пролонгирање до издавање на резултатот. Култивирањето на оваа бактерија е од голема полза за понатамошното испитување на особините на добиените изолати, особено нивната вируленција, типските специфики и осетливоста кон антимикробните агенси.

Во поново време се користат и real-time PCR техники кои ги детектираат гените за секој од токсините или генот за глутамат дехидрогеназата. Објавени се неколку различни методи на real-time PCR за детекција на различни гени кај *C. difficile* вклучително и *tcdB* (233,234,235), *tcdA* и *tcdB* (236) и *tcdC* (237) како и мултиплекс real-time PCR тест за детекција на 4 гени на *C. difficile* (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB*) (238). Сите овие методи покажале високо ниво на сензитивност и специфичност, како и побрзо добивање на резултат во споредба со другите методи (239, 237,240).

1.8 Третман на CDI

Примарно во третманот на CDI, посебно кај полесните некомплицирани случаи се препорачува исклучување на инкриминираниот антибиотик и давање пробиотик. Антибиотик со дејство кон *C. difficile* се дава кај потешките случаи.

-Метронидазол

Метронидазолот покажува микробицидна активност кон протозоите и кон многу анаеробни бактерии. Метронидазолот е во групата на нитроимидазоли, антимикробни пролекови за кои е потребно да настане редукција во услови на низок редокс потенцијал со цел да ја покажат својата активност. Метронидазолот е сеуште најпрефериран избор за терапија на повеќето случаи на CDI поради тоа што е поселективен и поефтин од ванкомицинот, кој е единствен друг општо прифатен третман за CDI. Селективната активност на метронидазолот се препишува на специфичниот метаболизам кој се среќава во анаеробните и протозоалните клетки. Кога метронидазолот дифундира во клетката со низок редокс потенцијал, фередоксинот донира електрони на нитро групата од метронидазолот. Редукцијата на нитро групата овозможува лекот да помине во својот активен облик, при што поттикнува нарушување на синтезата на нуклеински киселини и последователна смрт на клетката. Метронидазолот е најефективен при орално внесување и речиси целосно се апсорбира. Иако секој случај треба да се процени индивидуално, вообичаено кај некомплицирани случаи се дава во доза од 500 mg три пати дневно за време од десет до четиринаесет дена. На некои места се препорачува и интравенска апликација и се потенцира дека на овој начин дури може да се постигне и поголем терапевтски ефект (241,242). Метронидазолот исто така е доста поефтин од ванкомицинот за третман на овие заболувања. За споредба во САД тој трошок изнесува два долари дневно за метронидазол наспроти триесет за ванкомицин (243). Резистенција кон метронидазол е забележана кај некои изолати на *C. difficile* и истата е опишана од повеќе автори

(244,245,246). Во некои случаи кога CDI се третирани со метронидазол терапискиот одговор одсуствува (247).

- Ванкомицин

Ванкомициноот е многу потентен гликопептиден антибиотик кој се користи за третман на сериозни инфекции со грам позитивни бактерии. Ванкомициноот има бактерициден ефект преку инхибиција на синтезата на пептидогликанот во клеточниот ѕид. Се аплицира интравенски кај најголемиот број инфекции, што сепак води до некои несакани дејства и одредена токсичност. Ванкомициноот има голема хидрофилна молекула и не поминува ефикасно низ ѕидот на цревата. Поради тоа за третман на CDI се потребни чести орални апликации со цел постигнување на високи терапевтски концентрации во цревата. Во последните години употребата на ванкомицин за третман на CDI се намали поради високата цена и загриженоста од појава и ширење на резистенција кон ванкомициноот кај останатите цревни бактерии како на пример ентерококите. Сепак, во многу случаи ванкомициноот сè уште се користи за третман на CDI, како на пример при релапси или тешки комплицирани случаи, бремени жени, алергични или пациенти кои не реагираат на метронидазол (248).

- Останати опции за антибиотски третман

- Рифаксимин

Рифаксимин е синтетички антибиотик кој ја инхибира синтезата на протеини и е веќе одобрен за третман на патничка дијареа во САД. Рифаксиминот не се апсорбира и поради тоа се постигнуваат високи концентрации во цревата (249). Овој лек покажал одлична активност *in vitro* против изолатите на *C. difficile* (250), но исто така со успех е користен и *in vivo* посебно кај повторувачки епизоди на CDI (251,252). Иако е доста ветувачки лек, веќе се откриени резистентни соеви кај некои пациенти (253,254,252). Проблем е и високата цена.

- Нитазоксанид

Нитазоксанидоот е многу сличен на метронидазолот. Тој е про лек со сличен механизам на дејство и примарно бил користен како антипротозоален агенс. Клиничките тестирања покажале дека нитазоксанидоот е подеднакво ефикасен како и ванкомициноот и метронидазолот во третман на CDI (255,256, 252,257,258) и може да биде опција за третман.

- Фидаксомицин

Фидаксомициноот е нов макроциклински антибиотик познат и под некои други имиња како дифимицин, OPT-80, PAR-101 и тиакумицин В (259). Моментално се наоѓа во трета фаза на клинички испитувања во САД (260). Фидаксомициноот делува преку инхибиција на синтеза на РНК и има бактерициден ефект. Има потесен спектар на делување и со тоа помал ефект на останатата бактериска микрофлора во цревата

(261). Студиите покажале подобрен тераписки ефект и помал степен на повторни инфекции со користење на овој лек (261) .

-Линезолид

И за линезолидот исто така е потврдено дека има добра активност *in vitro* кон изолатите на *C. difficile*. Исто како и ванкомицинот, така и линезолидот е доста скап и се користи за сериозни инфекции со Грам позитивни бактерии. Овој лек останува една од малкуте опции за третман кога бактериите веќе развиле резистенција кон вакомицин и поради тоа не е веројатно дека во ситуација кога има други алтернативи за третман на CDI може да биде прифатен како терапија од прв избор.

- Фузидинска киселина

За фузидинската киселина е покажано дека има одлична активност *in vitro* кон *C.difficile*, а тестирана е исто така и *in vivo* (262,263,264). Иако за фузидинската киселина е докажано дека е подеднакво ефикасна како и метронидазолот во третманот на CDI, сепак има пријавено релапси (262,263,264). Фузидинската киселина ја инхибира синтезата на протеини кај Грам позитивните бактерии со бактериостатски ефект и веројатно ова придонесува за високата стапка на релапси. Кон фузидинската киселина постојат резистентни изолати на *C.difficile* кои се изолирани од пациенти по третман на CDI (264). Резистенцијата се стекнува доста лесно и затоа не се советува овој лек да се дава сам. Поради ова фузидинската киселина е со лимитиран потенцијал во третманот на CDI.

- Тигециклин

Тигециклинот е бактериостатски антибиотик со широк спектар кој припаѓа на групата глицилциклини, нова класа на антибиотици каде што е прв претставник. Од она што се знае досега, *in vitro* активноста на тигециклинот кон изолатите на *C.difficile* е одлична (252,265,266) и не влијае на продукцијата на токсини или на спорулацијата во цревата (266). Иако од мал број студии, сепак постојат докази за успешен третман на CDI со тигециклин (267).

- Пробиотици

Пробиотиците се препорачуваат и како профилакса и како третман кај CDI. Сепак досегашните студии покажуваат варијабилни резултати за нивната ефикасност (268,269,270,271). Најчесто користени пробиотици се *Saccharomyces boulardii* и *Lactobacillus rhamnosus*. Целта на оваа терапија е репопулација на цревата и превенција на CDI преку колонизациска отпорност. Повеќето студии при испитувањето на ефектот на пробиотиците во превенцијата или третманот на CDI не даваат цврсти докази за нивната употреба (272). Иако многумина тврдат дека не може да има штета доколку се земаат пробиотици како превенција или додаток на антибиотската терапија, сепак кај тешко имунокомпромитираните пациенти тие може да предизвикаат инфекција (273).

- Имунотерапија

а) *Clostridium difficile* вакцина (ACAM-CDIFF™)

Вакцината за *C. difficile* е токсидна вакцина која моментално е во втора фаза од клиничко испитување во Велика Британија (243). Доколку се докаже нејзината ефикасност, би требало да се дава кај сите ризични групи. Моментално за време на клиничките испитувања, вакцината се дава кај оние кои се во прва епизода на CDI со надеж дека таа ќе спречи релапси. Вакцината содржи токсид А и токсид Б и поттикнува создавање на серумски антитоксични IgG антитела кон соодветните токсини (274).

б) Интравенозни хиперимуни глобулини

Интравенозните хиперимуни глобулини првенствено се користат да превенираат релапси на CDI, но и како терапија при тешки случаи на CDI каде што останатите опции се покажале како малку ефикасни или пак пациентот има повеќе повторувани инфекции (229,226,275,276,277,278,279,280). Сепак во една студија е покажано дека интравенозните имуноглобулини не се поефикасни од останатите конвенционални третмани (281). Целта во овие случаи е да се обезбедат антитоксични антитела во имуниот систем на пациентите кои не успеале да обезбедат соодветен имун одговор.

- Фекална терапија на инфекција со *C. difficile*

Фекалната трансплантациона терапија не е широко прифатена и достапна, но во еден труд (282) се посочува како многу ефикасна како во третманот, така и во превенцијата на повторуваните CDI. Фекален донор е најчесто некој во блиска врска со пациентот (282). Фекалната трансплантација се врши со помош на назогастрична сонда или колоноскоп (282). Целта на овој тип терапија е реколонизација на цревата со популација на комензални микроорганизми слични на оние кои ги имал пациентот пред инфекцијата. Ова понатака превенира или значително го намалува ризикот од прераснување и доминација на *C. difficile*. Моментално во неколку држави се вршат клинички испитувања за ефектите од употребата на фекалната терапија.

- Третман на *C. difficile* токсините

а) Толевамер

Толевамерот е нов неантимикробен лек кој се користи со цел врзување и инактивирање на токсините на *C. difficile* (283). Голема предност на овој тип терапија е во тоа што овој полимер нема антимикробна активност и поради тоа не предизвикува никакво нарушување на цревната флора. И покрај добрите резултати од втората фаза на клиничките испитувања, во третата фаза тие биле

незадоволителни, бидејќи се покажало дека толевамерот е понефикасен од ванкомициноот при третирањето на CDI. Овие резултати се потврдени и со користење на цревен модел (284).

1.9 Геном на *C. difficile* и методи за типизирање

Геномот на *C. difficile* за првпат е секвенциониран во 2006. За таа цел бил одбран високо резистентен сој (*C. difficile* 630, риботип 012), изолиран од пациент со ПМК во 1982 (285). Хромозомот на овој сој е 4.29 mbp, од кои речиси 11% отпаѓаат на транспозони, кои најверојатно допринеле за зголемување на патогеноста и вируленцијата на микроорганизмот (285). Уште два други генома на *C. difficile* се секвенционирани оттогаш и двата припаѓаат на риботипот 027 (соевите CD196 и R20291). Сојот CD196 бил изолиран од пациент во Франција во 1985, додека пак сојот R20291 бил изолиран од пациент во Велика Британија во 2006 (88). Истражувањето и споредувањето на овие три секвенционирани геноми даде сознанија не само за варијациите помеѓу различните риботипови, туку и за разликите меѓу соевите во рамките на еден риботип, како и за можноста како овие соеви еволуирале до тоа ниво.

- Имунохемиско типизирање

Техниките на имунохемиски отпечаток (фингерпринт) биле првите методи користени за идентификација на разликите помеѓу изолатите на *C. difficile* (286,287,288). И покрај тоа што не биле користени кај подалечни типови изолати, овие експерименти биле основа на серотипизацијата. Овие техники ја проучуваат интеракцијата меѓу антигените и антителата и тие може да потврдат доколку одреден број изолати на бактерии се идентични. За таа цел антигените се екстрахираат од клеточната површина за подоцна да може да се врзат со антисерумот кој е добиен од животни во кои е внесен целоќлеточен екстракт од *C. difficile*. Ова најчесто се прави со вкрстена имуноелектрофореза и техники на блотирање. Имунохемиските методи денес ретко се користат за типизирање на *C. difficile* поради развојот на посензитивните молекуларни методи.

- Серотипизирање

Серотипизацијата е првиот метод кој се користел за дискриминирање на различните типови на *C. difficile*. Овој метод се базира на разликите во антигенската градба на површината на клетката кај различните соеви. Серотипизацијата може да се изведува со помош на аглутинација на плочка или ELISA и користејќи зајачки антисерум. Серогрупите на *C. difficile* за првпат биле дефинирани во 1985 (289), а на ова претходело имунохемиското типизирање на *C. difficile* (286,288). Идентификувани се десет серогрупи. Секоја се означува со голема латинична буква, а дваесетте под-серогрупи на групата А можно е понатака да се идентификуваат со PAGE. Потврдена е одредена корелација на серотипизацијата со токсинотипизацијата (290).

-Типизирање според површинскиот (S) протеин

Типизирањето по површинскиот (S) протеин е фенотипска техника со која се екстрахираат протеини од површинскиот слој на *C.difficile*. Екстракцијата се врши со помош на етилендиамин тетраоцетна киселина (EDTA), уреа или гванидин хидрохлорид, по што се изведува натриум додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза (SDS PAGE) на екстрахираните протеини. Повеќето бактерии поседуваат S слој кој се состои од повторувани структури на еден единствен протеин. Овој слој кај *C. difficile* се состои од два повторувани протеини. Овие два протеина може да варираат во нивната молекуларна маса. Поголемиот протеин е околу 56-48 kDa, додека помалиот е во опсег од 45-37 kDa. Варијациите кај овие S протеини се кодирани од *slpA* генот кој може да биде таргетиран со генотипски методи. Малата варијабилност во масата на двата протеина овозможува изолатите да се групираат според молекулската маса. Иако типизирањето по површинскиот (S) протеин има помала дискриминирачка моќ од молекуларните техники, сепак има поголем капацитет од другите фенотипски методи, а добро корелира и со риботипизацијата (291). Точните својства и функции на овие површински протеини се непознати, но се претпоставува дека имаат адхезивни и имуногени својства (292, 293,294). Исто така е нејасна и нивната улога во серотипизацијата.

- Антибиограмски профил

Антибиограмскиот профил е најчестиот фенотипски типизирачки метод. Најчесто се користи заедно со генотипските методи во научните студии. Овие профили не само што даваат многу корисни фенотипски информации за изолатите, туку и овозможуваат следење на резистенцијата на ниво на целата популација на *C.difficile*. Појавата на резистенција кон флуорокинолоните кај изолатите на *C. difficile* како и високите стапки на морталитет кај пациентите кои се инфицирани со вакви соеви на *C. difficile*, поттикнаа идентификација на сојот од хипервирулентниот риботип 027 (295) кој е асоциран со одреден антибиограмски профил (резистенција кон флуорокинолони и еритромицин и осетливост кон клиндамицин) (296). Резистенцијата на *C.difficile* кон антибиотиците веројатно е резултат на промените на ниво на геномот, условени од многубројните транспозони.

- Биохемиско типизирање

Биохемиското типизирање се користи со цел откривање на варијациите на биохемиските односно метаболните патишта во самиот организам. Со воведувањето на API (analytical profile index), ова типизирање стана многу поедноставно за изведба, но сепак денеска овој метод се користи првенствено за детерминирање на видовите, а не за нивно типизирање. И покрај тоа што биохемиското типизирање дава многу корисни информации за бактериските видови, резултатите може да бидат многу варијабилни и тешки за квантификација и компарација. Во споредба со другите понови типизирачки методи, дискриминаторната моќ на биохемиското типизирање е многу мала и кај некои бактериски специеси може да е тотално неупотреблива.

- Токсинотипизација

Токсинотипизацијата кај различните изолати на *C. difficile* се користи со цел детектирање на варијабилноста во PaLoc (290), иако кога за прв пат била применета, биле анализирани само гените за токсините А и Б (290). Токсинотипизацијата вклучува PCR за иницијална амплификација на регионите во рамките на PaLoc, потоа со помош на рестрикциски ензими се одвојуваат фрагменти кои можат да се анализираат и компарираат- полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (restriction fragment length polymorphisms-RFLP). Комбинацијата на рестрикциските фрагменти од референтниот сој VPI 10463 на *C. difficile* се користи за споредба на токсинотиповите. Овој сој и сите останати кои имаат идентичен изглед на фрагментите од PaLoc се означени како токсинотип 0. Досега се идентификувани 24 различни токсинотипови (297), кои се означуваат со римски броеви. Токсинотипизацијата покажува многу добра корелација со риботипизацијата (298), анализата со рестриктивни ендонуклеази (REA) (50), а во помала мера и со серотипизацијата (290). Во секој случај, нејзината дискриминирачка моќ во споредба со некои други техники е ограничена (299).

-Типизација со бактериофаги и бактериоцини

Постојат неколку објавени студии за употребата на бактериофагите и бактериоцините за типизација и карактеризација на соевите на *C. difficile*. Ова е постар, фенотипски типизирачки метод, за кој студиите се правени пред воведувањето на молекуларните техники и поради тоа полека се исфрла од употреба. И покрај тоа оваа техника била мошне корисна и се користела за многу епидемиолошки типизации (300,301,302,303). Типизацијата со бактериофаги ги карактеризира изолатите преку тестирање на нивната осетливост кон различни бактериофаги. Ова е резултат на постоење на различни површински клеточни рецептори кај различните соеви, за кои се врзуваат различни бактериофаги (304). Бактериоцините се инхибиторни продукти кои се излучуваат од бактериите и кои се строго специфични за видовите. Осетливоста кон бактериоцините е доста варијабилна меѓу соевите и токму ова е искористено за нивна типизација (305). И типизацијата со бактериоцини како и таа со бактериофаги се макотрпни за изведување и не се доволно дискриминирачки како што се молекуларните техники .

-Анализа со рестриктивни ендонуклеази (REA)

Анализата со рестриктивни ендонуклеази (REA) е метод кој овозможува анализа на севкупната геномска ДНК. Со помош на рестрикциските ензими се создаваат (REA) профили кои се состојат од стотици карактеристични ДНК фрагменти. Кога оваа техника за првпат била употребена за типизирање на *C. difficile* (306), било заклучено дека REA е мошне ефикасен и дискриминирачки метод, а и денес е една од најдискриминирачките техники за типизација на *C. difficile* (307). Сепак поради огромниот број фрагменти кои се создаваат со оваа техника, анализата на гелот како и споредбата помеѓу лабораториите е мошне сложена (308).

- Мултилокусна анализа на варијабилен број повторувани тандеми (Multi-locus variable number tandem repeat analysis-MLVA)

Мултилокусната анализа на варијабилен број повторувани тандем (MLVA) е високодискриминирачка ПБП техника која се базира на методологијата на променлив број повторувања на тандемите (variable number of tandem repeats-VNTR). Во (VNTR) се анализира должината на тандем повторувачката секвенца во еден локус, додека во MLVA се анализираат неколку локуси. Кога се користи MLVA за типизација на изолатите на *C. difficile*, се анализира должината на повторуваните тандеми во седум различни локуси со користење на прајмери кои се врзуваат за овие варијабилни региони (308). MLVA заедно со REA се методи за кои е докажана најголема дискриминирачка моќ при типизирање на *C. difficile* во студијата која ги споредуваше седумте најпопуларни типизирачки методи (307). Исто така е покажано дека високата дискриминирачка моќ овозможува лесно разграничување на сличните соеви кои се појавуваат при прикажување преку дендограм (307). Од 2008, CDRN објави дека MLVA е достапна за клиничките изолати кои треба дополнително да се типизираат, но сепак за користење на овој сервис мора да се задоволат доста строги критериуми (92).

-Амплификација по случаен избор на полиморфна ДНК (Random amplification of Polymorphic DNA-RAPD PCR)

За разлика од другите ПБП базирани методи, за амплификацијата по случаен избор на полиморфна ДНК (RAPD) не е потребно претходно познавање на целиот геном. Се користи еден краток прајмер (од само 10 bp), кој треба да се врзе во непознатиот регион на ДНК, но за да биде успешна амплификацијата двата прајмера треба да се поврзат во вистинската насока и да бидат доволно блиску еден до друг. Основата на RAPD е во тоа што полиморфизмот во геномот на различните изолати ќе доведе или до отсуство или до додавање на фрагменти на ампликонот, создавајќи различни слики односно отпечатоци. Поради тоа што не е познато каде точно прајмерите би се врзале при RAPD и дали воопшто некаде ќе се врзат, иницијалните температури на прилепување се значително пониски од тие во класичната ПБП со цел да се олесни врзувањето. Сепак ниските температури на врзување, како и малите должини на прајмерите може да доведат и до неспецифично врзување, а ова понатака може да доведе до проблеми во однос на репродуцибилноста и дискриминирачката моќ на методот. Кога RAPD се користела за типизација на изолатите на *C. difficile*, честопати биле пријавувани проблеми во однос на репродуцибилноста (309,310). Иако оваа метода не е толку дискриминирачка како MLVA, REA и PFGE, таа бара помалку труд и е доста поефтина.

-Репетитивна екстрагенска палиндромска ПБП (Repetitive extragenic palindromic PCR – REP PCR)

Репетитивната екстрагенска палиндромска ПБП (REP-PCR) е техника која ги користи повторувачките секвенци, 35-40 бп во должина, кои се наоѓаат низ геномот на повеќето Грам негативни и неколку Грам позитивни бактерии. За таа цел се

користат комплементарни прајмери кои се врзуваат за овие секвенци кои понатака водат до амплификација на регионите помеѓу репетитивните секвенци. По нејзиното создавање (311), REP-PCR се користи за типизација на многу видови бактерии токму поради високото ниво на репродукцибилност и високата дискриминаторска моќ на оваа метода. REP-PCR не се користи често за типизација на *C. difficile*, и покрај првичните студии кои покажаа дека оваа метода е подискриминирачка од риботипизацијата (312). Подоцнежните студии исто така покажале дека REP-PCR дава можност за субтипизација во рамките на потврдените риботипови (313).

-Мулти-локусно секвенционирачко типизирање (Multi-locus sequence typing – MLST)

Мулти-локусното секвенционирачко типизирање (MLST) е еден од првите геномски методи со капацитет да ја истражува промената на генетиката и епидемиологијата на бактериската популација со тек на времето и е користен за неколку бактериски видови. Причината поради која MLST може да обезбеди информации за еволуцијата на видовите бактерии е во тоа што тука имаме секвенционирање на неколку витално значајни гени (314), и кај типизирањето на *C.difficile* тоа се случува еднаш во геномот (315). Секвенционирањето и следењето на овие гени во групи на изолати понатаму овозможува да се одредат генетските линии и сродства преку користење на математички аналитички програми. При испитување на *C. difficile* или некој од другите бактериски видови од еволутивна перспектива MLST е многу корисен метод, но сепак не е погоден за рутинско типизирање од причина што секвенционирањето на седум индивидуални локуси го прави многу тежок за изведба. Иако овој метод има добра дискриминирачка моќ, неодамнешната студија покажа дека не е толку дискриминирачки како MLVA или REA (307). Сепак MLST како метод може да обезбеди дополнителни информации кои овие останати методи не може да ги обезбедат (316).

-Полиморфизам на должината на амплифицираните фрагменти (Amplified fragment length polymorphism – AFLP)

Полиморфизмот на должината на амплифицираните фрагменти е генотипска техника која за прв пат е опишана во 1993 и потоа патентирана од Keugene (317). Оваа техника ги користи и рестрикциските ензими и ПВР за детекција на полиморфизмот низ целата геномска ДНК. Најпрвин се користат рестрикциски ензими за да се дигестира целокупната клеточна геномска ДНК и потоа на вака добиените рестрикциски фрагменти се врзуваат т.н. адаптери. Потоа се користат два прајмера кои се комплементарни и на адаптерот и на рестрикциското место и на нивниот 3'завршеток се додаваат селективни нуклеотиди што ја прави амплификацијата уште поспецифична. Единствено фрагментите кои поседуваат комплементарни секвенци со комплексот прајмер-нуклеотид ќе бидат амплифицирани и понатака резултатите се визуелизираат со помош на полиакриламид гел или капиларна електрофореза. Кога AFLP за прв пат била употребена за типизација на *C.difficile*, се покажало дека е подискриминирачка од PFGE (318), а исто така е покажано и дека дава резултати кои се компарабилни со

риботипизацијата (319). Иако е релативно лесна за изведба и не бара толку многу работа во споредба со другите молекуларни типизирачки методи, не се користи често од причина што се смета дека MLVA, REA и риботипизацијата се подискриминирачки.

-Секвенционирање на генот за површинскиот протеин А (Surface layer protein A gene sequencing - slpAST)

Овој метод за првпат е применет во 2002 година како алтернатива на серотипизацијата (320). Базирајќи се на варијациите кои се гледаат во протеините на површниот слој кај изолатите на *C. difficile*, методот (slpAST) претставува секвенционирање на генот кој е одговорен за оваа варијација. Овој метод е комбинација на ПВР и секвенционирање на изолирана секвенца и поради тоа бара многу повеќе работа од исклучиво ПВР техниките. Сепак (slpAST) се смета за подискриминирачка од риботипизацијата и може да дефинира типови во рамките на риботиповите (307,321), а како секвенционирачка техника е полесно компарабилна со други лаборатории (321), што овозможува интерлабораториска размена на резултати.

-Гел електрофореза во пулсирачко поле (Pulsed field gel electrophoresis-PFGE)

Гел електрофорезата во пулсирачко поле (PFGE), како метод со кој можат да се одвојат фрагменти на ДНК со голема должина (>50kb) е воведена во 1984 од Шварц и Кантор (322). Оваа метода се користи многу често за типизација на многу бактерии и често била сметана за златен стандард, особено за типизација на изолатите на *C.difficile* во Северна Америка, при што новоидентификуваните соеви се означуваат со (North American PFGE) NAP и потоа со последователен број. Уште од откривањето се увиде дека дискриминирачката моќ на оваа метода е мошне висока (323), но сепак некои соеви на *C. difficile* не може да бидат типизирани поради деградација на нивната ДНК. Од таа причина се воведуваа и други методи кои би дале репродуктивни и дискриминирачки резултати кај *C.difficile*, но сепак тој проблем конечно се надмина при една модификација на методата во 2005 (324). Дискриминирачката моќ на PFGE кај изолатите на *C.difficile* е многу добра и речиси идентична со таа на REA (323,307), но сепак оваа техника бара многу повеќе работа и ангажираност во споредба со ПВР методите (307).

-ПВР риботипизација (PCR ribotyping)

ПВР риботипизацијата се користи како златен стандард во Европа за генотипизација на изолатите на *C. difficile* и досега се дефинирани преку стотина риботипови (325). Се користат пражмери кои се врзуваат за 16S- 23S интергенскиот раздвојувачки регион кај *C. difficile*, и иако 16S и 23S гените се константни, должините на раздвојувачките региони меѓу нив се многу варијабилни. Ова овозможува создавање на индивидуални строго специфични отпечатоци за

различните риботипови (245). Иницијалниот протокол за ПВР риботипизацијата бил доста долг и тежок, па поради тоа подоцна е модифициран за да се овозможи негова примена во рутинската типизација на клиничките изолати (326). ПВР риботиповите се идентификуваат според редоследот по кој се откриваат и се означуваат со троцифрен број. И покрај тоа што ПВР риботипизацијата е многу дискриминирачка метода, преминацијата на одредени риботипови значи дека посебно во услови на епидемија, овој метод честопати не може да обезбеди доволни епидемиолошки информации (327).

2.Мотив за изработка

Во последните две декади преваленцата на инфекцијата предизвикана од *Clostridioides difficile* (CDI) кај пациентите од општата популација, особено кај хоспитализираните пациенти (пациенти со други коморбидитети, имунодефициенција, понапредната возраст), покажува нагорен тренд ширум целиот свет. Најмалку 40% од хоспитализираните пациенти примаат антибиотици кои вршат силен селективен притисок врз нормалната флора во дигестивниот систем, доведувајќи до нејзин дизбаланс. Со елиминација на „добрите“ бактерии од дигестивниот тракт, *C. difficile* како условно патогена бактерија, добива подобри услови за размножување и манифестирање на своите патогени способности. Токму овие промени претставуваат добар предуслов за развиток на CDI. Според ова, најзначаен ризик фактор за развиток на CDI кај пациентите е нивната експозиција на антибиотиците со широк спектар на делување, особена на: трето-генерациските цефалоспорини, флуорокинолоните, карбапенемите и клиндамицинот. Според најновите истражувања, преваленцата на *C.difficile* инфекциите кај хоспитализираните пациенти во Европа е многу варијабилна и се движи од 0.3% до 20%. Изразено како процент од сите болнички инфекции таа се движи од 0% во Бугарија, 0.6% во Словенија и 1,1% Грција, па се до 10% во Германија и 20% во Унгарија (328). Како последица на ненавременото дијагностицирање и несоодветното лекување на CDI, во пораст се и компликациите до кои таа доведува: антибиотик асоцирана дијареа, псевдомембранозен колитис, токсичен мегаколон, заради што 10-15% од инфицираните пациенти завршуваат летално.

Имајќи го во предвид сето ова, се наметнува потребата за испитување на застапеноста и дистрибуцијата на CDI во нашата средина, т.е. кај нашите пациенти.

Непостоењето на податоци за антимикуробната осетливост на *C. difficile* кај нас, наспроти извештаите од голем број европски земји за појавата на резистентни *C. difficile* соеви на метронидазол и ванкомицин (кои имаат најголемо клиничко значење од терапевтски аспект), претставува исто така добар предизвик за испитување на антимикуробната осетливост на изолатите на *C. difficile* кон овие антимикуробни агенси. Од друга страна пак, испитувањето на антимикуробната осетливост и резистенција на изолатите на *C. difficile* кон антибиотиците кои се идентификувани како најзначајни ризик фактори за развиток на CDI, би помогнало во спроведување на соодветна антибиотска терапија кај нашите пациенти, терапија која не би предизвикала дизбаланс во нормалната цревна флора, што би помогнало во намалување на преваленцата на инфекциите што би ги предизвикала оваа бактерија. Одредувањето на антибиограмскиот профил кај изолатите на *C. difficile* е една од најчесто применуваните фенотипски методи за нивна типизација.

Воведувањето на соодветна генотипизирачка метода за типизација на добиените изолати на *C. difficile*, би овозможило подобро следење на дистрибуцијата на оваа бактерија, во клиниките при универзитетскиот клинички комплекс „Мајка Тереза“ во Скопје. Компарирањето на добиените типови на *C. difficile* со нивната осетливост/резистенција кон различни антимикуробни агенси, би било од особено епидемиолошко значење во правец на расветлување на патиштата по кои се шири *C. difficile* инфекцијата.

3.Цели на трудот

3.1. Да се испита застапеноста на *Clostridioides difficile* во примероци од пациенти суспектни за *C. difficile* инфекција.

3.2. Да се одреди токсичноста на соевите и видот на токсините директно од примерокот и од пораснатите култури.

3.3. Да се испита генотипската припадност на добиените изолати на *C. difficile*.

3.4. Да се одреди антимикуробната осетливост на соевите на *C. difficile* кон клинички значајните антимикуробни средства, како и кон антибиотиците кои се сметаат за најзначаен ризик фактор за развивање на оваа инфекција.

3.5. Да се испита фенотипската и генотипската поврзаност меѓу добиените изолати на *C. difficile*, врз база на токсичноста и видот на токсинот, антибиотската осетливост/резистенција кон повеќе антимикуробни агенси и постоењето на одредени риботипови.

4. Материјал и Методи

Испитувањето е дизајнирано во вид на ретроспективно-проспективна студија. Во неа беа вклучени 80 изолати на *C. difficile* кои потекнуваа од пациенти со клинички симптоми за CDI, упатени од амбулантите во Скопје како и од хоспитализираните пациенти на различни клиници при Универзитетскиот клинички комплекс “Мајка Тереза” во Скопје. Од сите пациенти, без разлика на полот и возраста, кои во периодот од јануари 2015 до јануари 2019 година беа упатувани на Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје со цел да се постави лабораториска дијагноза за CDI, беше земен по еден фекален примерок. Добиените примероци беа обработувани со стандардни бактериолошки техники пропишани за таа цел (329), за да се дијагностицира CDI и/или да се детектира само колонизација на пациентите со *C. difficile*. Изолираните и идентификувани изолати на *C. difficile* понатаму беа користени за испитување на нивната осетливост кон поголем број антимикробни средства, од кои некои имаат терапевтско значење, а други спаѓаат во ризик фактори за развој на CDI. На крај добиените изолати на *C. difficile* беа типизирани. За да се избегне дуплирање на изолатите (што би влијаело на крајните резултати), во испитувањето беа вклучени само по еден изолат од секој поединечен пациент.

Критериуми за вклучување во студијата:

- Со стандардните методи за изолација и идентификација изолатите да припаѓаат на *C. difficile*
- Сите токсични и нетоксични изолати на *C. difficile* добиени од испитуваните примероци

Критериуми за исклучување во студијата:

- Повеќе идентични соеви на *C. difficile* од ист пациент

По извршената изолација и идентификација како и по испитување на осетливоста на соевите кон одредени антимикробни средства, до понатамошните испитувања соевите беа чувани во Феликсов длабок агар и на памучен брис (како спори) на собна температура. За секој идентификуван сој се водеше документација со податоци за потеклото на сојот (име и презиме на пациентот, пол и возраст на пациентот, клиниката каде е хоспитализиран или амбулантата од каде е упатен).

4.1. Култивирање на примероците

Секој фекален примерок беше засадуван на две цврсти подлоги, при што еден дел

од примерокот беше саден директно, а другиот дел по изведување на алкохол-шок тестот, како што е наведено во понатамошниот текст:

1. 100 μ l од примерокот беа засадени директно на селективната подлога за изолација на *C. difficile*: Цефокситин-Циклосерин-Фруктоза агар (CCFA агар, Oxoid, UK);
2. 1 ml од примерокот беше додаден во исто толкаво количество на алкохол. Смесата беше инкубирана 1 час на собна температура, за да се обезбеди селективен раст и размножување на *C. difficile* за сметка на пропратната цревна микрофлора (алкохол-шок тест), а потоа од содржината се издвојуваа 100 μ l кои потоа беа засадени на Колумбија крвен агар (Oxoid, UK). Вака засадените плочи беа внесувани во лонци каде што се генерира анаеробна атмосфера со кесички Анаероскулт (Oxoid, UK) и истите беа инкубирани во термостат на 37° C, континуирано во тек на 48 часа.

По завршување на инкубацијата од 48 часа се пристапуваше кон анализирање на добиената култура (слика 4.1).



Слика 4.1. Култура на *C. difficile* на CCFA агар

Суспектните колонии (сиви, средно големи, лесно испакнати, нехемолитични, со неравна површина, со назабени рабови и со мирис на коњски измет) беа употребувани за подготовка на препарати кои потоа беа обојувани според Грам. На тој начин беше испитувана микроморфологијата на пораснатата бактерија (Слика 4.2).



Слика 4.2. Микроскопскиот препарат од култура на *C. difficile* обоен по Грам

Доколку при микроскопирањето се најдеа долги, Грам позитивни бацили, со субтерминално поставена спора се пристапуваше кон субкултивирање на

пораснатите колонии на две плочи Колумбија крвен агар при што:

Едната плоча беше инкубирана анаеробно на 37°C во тек на 48 часа со цел да се изврши последователна дефинитивна идентификација со помош на автоматизиран апарат VITEK 2 (Biomerieux, France), изведување на методот токсикогена култура, како и да се испита антимиembroбната осетливост на изолатите на *C. difficile*.

Другата плоча беше инкубирана анаеробно на 37° C во тек на 5 дена, со цел да се обезбеди што побогата спорулација на бактериите. Така добиените спори потоа се собираа со памучен брис и на тој начин изолатите на *C. difficile* дополнително на изолатите кои се чуваа во Феликсов агар, можеа да се чуваат до нивната понатамошна обработка.

4.2. Идентификација на изолатите со автоматизиран систем VITEK 2 Compact (Biomerieux, Франција)

Со VITEK 2 автоматизираната метода (Слика 4.3а) беше изведувана дефинитивна идентификација на изолатите на *C. difficile* врз база на нивната прецизна биохемиска идентификација со помош на колориметриска технологија, преку која системот ги чита тест картичките (Слика 4.3б), (во овој случај за анаеробни бактерии) со 64 бунарчиња со различни реагенси на секои 15 минути, со три различни бранови должини. Единствено претходно беше употребувана чиста култура, од која понатака беше правена суспензија со густина 3 McFarland во посебна епруветка која се поврзуваше со картичката и се внесуваше во апаратот. Резултатот се добиваше во тек на наредните 24 часа.



(a)



(b)

Слика 4.3а Апарат VITEK 2 Слика 4.3б Картичи за апаратот VITEK 2

4.3. Имунохроматографско одредување на глутамат дехидрогеназа (ГДХ) антиген во фецес со комерцијален кит (Mascia Brunelli, Италија)

Истовремено со засадувањето на примероците, директно во нив беше испитувано и присуството на глутамат дехидрогеназата (ГДХ), кој е високоспецифичен, конститутивен ензим на *C. difficile* и истиот овозможува детекција на оваа бактерија, што означува присуство на *C. difficile* во испитуваниот примерок, т.е. колонизација

на пациентот со оваа бактерија. За таа цел беше користен брз имунохроматографски тест (Mascia Brunelli, Italia).

Принцип на тестот: Мембраната која е поставена во касетката на секој поединечен тест е обложена со антитела кон ГДХ (црвена линија) во тест регионот. За време на тестирањето, примерокот реагира со обоените честички обложени со анти-ГДХ антитела кои што се претходно фиксирани на тест лентата. Смесата со примерокот се движи низ мембраната со помош на капиларност. При движењето на примерокот низ тест мембраната, тој се меша со коњугатот со обоените честички. Во случај на позитивен резултат, специфичните антитела присутни на мембраната реагираат со коњугатот и создаваат една обоена линија. Смесата продолжува да се движи низ мембраната кон имобилизираните антитела кои се нанесени во регионот со контролната црта. Појавувањето на зелена црта во контролната линија (втората линија) служи за верификација дека е додадено доволна количина примерок и тој правилно се движел, а исто така служи и како внатрешна контрола за реагенсите.

Постапка: Фецесот беше собиран во чисти и суви чашки (без конзерванси или транспортни медиуми). Примерокот се чуваше во фрижидер до 7 дена пред испитување. Пред да започне тестирањето фецесот, тестовите и пуферот се доведуваат на собна температура. Тестирањето започнуваше со отворање на капачето на шишенцето со екстракцискиот пуфер. Потоа, со посебна пипета, се собираше од три различни места на фецесот. 250 µl од фецесот беа пренесувани во шишенцето за екстракција, по што шишенцето се вортексираше 15 секунди. На крај се кршеше капачето од шишенцето со екстракцискиот пуфер и се капнуваа 4 капки во бунарчето на китот за тестирање. Резултатот се читаше 10 минути по дисперзија на примерокот.

Интерпретација на резултатот:

Позитивен тест: во централното прозорче се појавуваат две линии. Црвената линија, која е обележана со Т е тест линијата, додека зелената линија, која е обележана со С е контролната линија.

Негативен: се појавува само зелената линија (контрола) обележана со С. Црвената тест линија отсутува.

Невалиден тест: отсуство на зелената контролна линија, без разлика дали се појавува црвената. Ова може да биде резултат на недоволна количина примерок, неправилна техника при постапката или разградба на реагенсите.

4.4. Детектирање на двата токсини на *C. difficile* (токсин А и токсин Б) поодделно, директно во фекалните примероци и од културата на *C. difficile* со користење на брз имунохроматографски тест (Mascia Brunelli, Италија).

За да може да се диференцира дали детектираниот сој на *C. difficile* е причинител на инфекција или пак е тој само колонизатор на дебелото црево кај пациентот, во секој примерок беше испитувано и присуството на двата најзначајни фактори на вируленција (токсин А и токсин Б) поодделно, со помош на брз имунохроматографски тест.

Принцип на тестот: Во една заедничка касетка се сместени две мембрани за детекција на токсините А и Б на *C. difficile*. Обоен коњугат на латекс со анти токсин

А или анти токсин Б моноклонални антители е поставен на левиот крај на мембраната. По собирањето на примерокот во тубата со екстракцискиот раствор, примерокот се меша и потоа неколку капки од ова се додаваат со двете бунарчиња на тест китот. Како што понатака тече примерокот, обележаниот коњугат антители-боја се врзува со антигенот токсин А или токсин Б (доколку ги има во примерокот), формирајќи антиген-антитело комплекс. Овој комплекс потоа се врзува за моноклоналното анти токсин А или токсин Б антитело во позитивната реакциска зона, давајќи црвена линија. Во отсуство на токсин А или токсин Б, црвената линија не се појавува. Реакциската смеса продолжува да се движи преку позитивната реакциска зона кон контролната зона. Неврзаниот коњугат се врзува со реагенсот од контролната зона продуцирајќи зелена линија со која се потврдува дека сите реагенси функционираат исправно.

Постапка: Примерокот се собира во сад во кој не смее да има конзерванси, детергенти, серум, бидејќи сите тие соединенија можат да интерферираат со тестот. Разредениот примерок може да се чува до три дена во фрижидер на 4⁰С. За долготрајно чување на неразредени примероци се препорачува температура од -20⁰С. Не се препорачува повеќекратно замрзнување и одмрзнување на примерокот. Пред започнување на тестирањето потребно е сите реагенси да постигнат собна температура. Најпрво се отвора екстракциската туба од која се зема дел од примерокот со посебна пипета од три различни места. Потребни се околу 125 мг на фецес. Потоа пипетата се враќа во екстракциската туба, се промешува и се чека 3 минути. Доколку се пренесе премала количина фецес или доколку не се промеша добро во екстракциската туба, тоа може да доведе до лажно негативни тест резултати. Поради тоа се препорачува вортексирање. Доколку фецесот е течен, тогаш се земаат 4-6 капки (125 µl) од секој примерок во екстракциската туба, по што се меша внимателно и се вортексира 15 секунди. По првиот чекор се крши капачето на тубата и се капнува по 3-4 капки (100 µl) во секое од бунарчињата. Резултатите се читаат по 10 минути. Во однос на контролите потребно е да се додаде по 3-4 капки (100 µl) од позитивната / негативната контрола во бунарчињата на тест китот и да се прочита резултатот по десет минути.

Интерпретација на резултатот:

1. Две зелени линии во контролниот регион (С): токсинот А и токсинот Б не се детектирани.
2. Две зелени линии во контролниот регион (С) и две црвени линии во тест регионот (Т): токсинот А и токсинот Б се детектирани.
3. Две зелени линии во контролниот регион (С) и само една црвена во тест регионот кај лентата за токсинот А: само токсинот А е детектиран.
4. Две зелени линии во контролниот регион (С) и само една црвена во тест регионот кај лентата за токсинот Б: само токсинот Б е детектиран.
5. Секоја друга комбинација на лентите означува невалиден резултат. Во таков случај е потребно испитувањето да се повтори.

Од сите успешно култивирани примероци, од кои беа собрани изолати на *C.difficile* за понатамошно испитување, беше испитувана и ин витро продукција на токсините А и Б, со тн. токсикогена култура. Во овој случај мал дел од културата понатака

беше користен како примерок за изведување на имунохроматографското докажување на токсините на гореопишаниот начин.

4.5. Испитување на антибиотската осетливост на изолатите на *C. difficile*

Осетливоста на изолатите на *C. difficile* кон клинички најзначајните антибимикробни средства: ванкомицин и метронидазол, беше испитувана преку одредување на минималните инхибиторни концентрации (МИК) со помош на градиентните Е-тестови (Biomerieux, Франција). Истовремено, беше испитувана и осетливоста на истите изолати на *C. difficile* кон неколку антибиотици кои се сметаат за главен ризик фактор за развиток на *C. difficile* инфекција: клиндамицин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин, еритромицин, тетрациклин и имипенем.

Одредување на осетливоста на *C. difficile* кон осум антибиотици со помош на Е-тест (Biomerieux, Франција)

Е-тестот е квантитативен тест за одредување на антимикробната осетливост на бактериите базирана истовремено на дифузија и дилуција на антимикробното средство. Лентата на Е-тестот (по чија должина е распределен концентрацискиот градиент на антимикробното средство) се поставува на претходно засадената цврста подлога (Колумбиа агар) со испитуваниот изолат. Засадената плоча се инкубира на 37° C, за време од 48 часа, во анаеробна атмосфера. Антимикробното средство дифундира од лентата кон рабовите на плочата. По завршување на инкубацијата се гледа бактерискиот раст и симетричната инхибиторна елипса. МИК вредноста се чита од скалата во µg/ml на местото каде што елипсата се допира со лентата. На овој начин беше одредувана осетливоста на соевите на *C. difficile* кон следните антимикробни средства (табела 4.1).

Табела 4.1. Антимикробни средства со нивните концентрациски градиенти кои беа користени за испитување на осетливоста на *C. difficile*

Антибиотик	Концентрацискиот градиент (µg/ml):
Ванкомицин	0.016 – 256
Метронидазол	0.016 – 256
Тетрациклин	0.016 – 256
Еритромицин	0.016 – 256
Клиндамицин	0.016 – 256
Ципрофлоксацин	0.002-32
Моксифлоксацин	0.002-32
Импипенем	0.002-32

На табела 4.2 се наведени критериумите според кои беше интерпретирана антимикуробната осетливост на испитуваните изолати на *C. difficile*.

Табела 4.2: Критериуми за интерпретација на антимикуробната осетливост на изолатите на *C. difficile* според вредноста на МИК

	VAN**	MTZ**	TC*	EM*	CM*	CI*	MX*	IP*
S (µg/ml)	≤2	≤2	≤4	≤2	≤2	≤2	≤2	≤4
I (µg/ml)	-	-	8	4	4	4	4	8
R (µg/ml)	>2	>2	≥16	≥8	≥8	≥8	≥8	≥16

*Интерпретацијата се базира на CLSI M100-S25

** Интерпретацијата се базира на The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.

4.6. PCR Риботипизација

Класификацијата на *C. difficile* како интрахоспитален патоген налага користење на типизирачки методи за полесна детекција и епидемиолошко следење на овие инфекции. Молекуларните методи, каде се вбројува ПВР риботипизацијата, во денешно време важат за најдискриминирачки и најстандардизирани. Всушност ПВР риботипизацијата е најупотребувана и најстандардизирана типизирачка метода за *C. difficile* во Европа.

Кај *C. difficile* PCR риботипизацијата се базира на амплификација на интергенскиот раздвојувачки регион (ITS) помеѓу 16S и 23S rDNA. Бидејќи овој оперон е присутен во неколку копии во геномот на *C. difficile*, а исто така копиите се разликуваат во должините на ITS, еден пар прајмери може да даде различни комбинации на траки со големина меѓу 200 и 700 бп. Траките се визуелизираат на агарозен гел. Овие комбинации на траки може да се анализираат или визуелно или со соодветен софтвер. Најчесто се користи BioNumerics, Applied Maths. Софтверот овозможува анализа, складирање и размена на податоците на стандардизиран начин.

PCR риботипизацијата е опишана од повеќе автори (330-334). Моментално повеќето лаборатории ги користат прајмерите и протоколите опишани од Stubbs и сор. (334) или Videt и сор. (333) и обата метода даваат комбинации на траки кои се компарабилни. PCR риботип е дефиниран како група на соеви со идентична комбинација на траки. Една единствена различно поставена трака претставува нов риботип. Огромна колекција на соеви од различни извори се чува во Референтниот центар за анаероби во Кардиф, Велика Британија. Тој содржи повеќе од 200 риботипови означени со броеви (пр., 001, 027, 106,...) (334). PCR риботипизацијата е стандарден типизирачки метод во Европа. Сепак, при анализата на агарозниот гел може да се јават потешкотии при стандардизирањето и поради тоа PCR риботиповите може правилно да бидат детерминирани само доколку лабораторијата поседува референтни соеви. Ако референтните соеви не се достапни, се користи локална номенклатура и типовите може да се споредуваат единствено во рамките на локалната колекција.

Од неодамна е воведен и нов метод на PCR риботипизација базиран на капиларна

гел електрофореза, поддржан од онлајн датабаза, што може да биде решение за проблемот кој се јавува кога треба да се прави споредба на резултатите од типизирањето помеѓу лабораториите (335). Молекуларните типизирачки методи се разликуваат во нивната дискриминирачка моќ и во времето кое е потребно за да се добијат резултатите. Многу студии споредувале две или повеќе типизирачки методи во локални услови (336,337), а некои големи меѓународни компаративни студии типизирале многу поголеми и добро карактеризирани колекции на соеви (338,307). Во САД и Европа се користат два различни типизирачки системи (PFGE – Гел електрофореза во пулсирачко поле и PCR риботипизација последователно) и ова и те како влијае на меѓународната компарабилност. Досега се направени извесни напори да се унифицира типизирачката номенклатура, пр. со правење корелација помеѓу специфичен пулсотип и PCR риботип (339) и ова за прв пат се примени за време на неодамнешното појавување на NAP-1/ BI/027 (218). Со развојот на некои нови методи како на пример PCR риботипизација базирана на секвенционер, оваа ситуација би требала да се подобри.

- Риботипизација на изолатите на *C. difficile*

Подготовка на 50 x концентриран TAE пуфер

Се мешаат 2.0 M Tris, 2.0 M оцетна киселина и 50 mM EDTA. Ph вредноста на овој раствор е меѓу 7.5 и 8.0. Вака подготвениот растворот се чува долго време и служи за подготовка на работен раствор.

Работниот (неконцентрираниот) раствор се подготвува со разредување на 20 мл од 50 X TAE со 980 мл на дестилирана вода. Пред употреба пуферот се лади на 4-8° Ц.

Раствор за обојување на ДНК : 0.2 µg/ ml на етидиум бромид во дестилирана вода.

Протокол за работа

Прајмерите опишани од Bidet и сор. се користат за амплификација на интергенетските раздвојувачки региони помеѓу 16S и 23S rDNA. Секвенците на прајмерите од 5' кон 3' :

Прајмер што се прилепува на 3' крајот на 16S rRNA генот:
GTGCGGCTGGATCACSTCCT

Прајмер што се прилепува на 5' крајот на 23S rRNA генот:
CCSTGCACCSTTAATAACTTGACC

Реакциска смеса:

H ₂ O	37.0 µl
10Xпуфер со MgCl ₂	5.0 µl
(крајната концентрација на MgCl ₂ во реакциската смеса треба да биде 1.5 mM)	
20mM dNTP	2.0 µl
Прајмер1 (50pmol/ µl)	1.0 µl
Прајмер2(50 pmol/ µl)	1.0 µl
TaqDNAполимераза(5U/ µl)	0.25 µl
PCR мастермиксот се распределува во PCR епруветки и се додаваат 3 µl DNA.	

Услови за амплификација

A. Иницијална денатурација на 95°Ц за време од 5 минути

Б. 35 циклуси кои се составени од следните три чекори:

- 1 минута на 95°C за денатурација
- 1 минута на 57°C за прилепување
- 1 минута на 72°C за елонгација

В. Завршна елонгација на 72°C за време од 10 минути

По амплификацијата, продуктот се концентрира со загревање на 75°C за време од 45 минути, а потоа истиот се идентификува со агароза-гел електрофореза.

Електрофореза на агарозен гел:

Се подготвува 3% агарозен гел (Certified™ Low Range Ultra Agarose; Bio-Rad, California, USA) во 1X TAE пуфер, на тој начин што во 100 мл TAE пуфер се додаваат 3 грама агароза. Оваа мешавина се раствора со постепено загревање, а потоа таа се разлива во кадичка за електрофореза. По аплицирање на 20 µl од секој PCR продукт, се вклучува електрофорезата на 2.5 V/cm, за време од 5 часа. По завршување на електрофорезата, гелот се обојува со етидиум бромид во тек на 10-20 минути, а потоа во друга кадичка со дестилирана вода уште 10 – 30 минути се врши плакнење на гелот. На крај гелот се фотографира со помош на посебен систем за документација (BioDocAnalyze Darkhood, Analytik Jena). PCR риботиповите за коишто се достапни референтни соеви се означуваат со стандардната Кардиф номенклатура, додека за останатите се користи внатрешна номенклатура. За таа цел најчесто се користи софтверот BioNumerics, Applied Maths. Софтверот овозможува анализа, складирање и размена на податоците на стандардизиран начин.

Во оваа студија риботипизацијата на изолатите се вршеше во Институтот за здравје, околина и храна во Марибор, Словенија. Сите останати испитувања беа вршени на Институтот за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Скопје.

5. Статистичка анализа

Податоците добиени во текот на истражувањето беа статистички обработени со користење на соодветни статистички програми SPSS software package, version 22.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

Анализата на атрибутивните (квалитативни) серии е правена преку одредување на коефициент на односи, пропорции и стапки, а истите се прикажани како апсолутни и релативни броеви. Нумеричките (квантитативни) серии се анализирани со употреба на мерките на централна тенденција (просек, медијана, минимални вредности, максимални вредности, интерактивни рангови), како и со мерки на дисперзија (стандардна девијација, стандардна грешка).

Pearson Chi square test, Yates corrected, Fischer exact test и Fisher Feeman Halton exact test беа користени за утврдување на разликата меѓу одредени атрибутивни дихотомни белези во двете групи на испитаници. Spearman коефициентот на ранг корелација беше употребен за утврдување на поврзаноста помеѓу антибиотската осетливост и групата на риботипови односно староста на пациентите во години.

За тестирање на значајноста на разликата меѓу одредени нумерички параметри со неправилна дистрибуција на фреквенции беа користени непараметарски тестови за два независни примероци (Mann Whitney U test) и за повеќе независни примероци (Kruskal-Wallis H test). Факторите на ризик беа квантифицирани преку користење на однос на веројатности (Odd ratio – OR) и интервалите на доверба – confidence intervals (CI). За споредба на пропорциите беше користен Difference test.

За утврдување на статистичка значајност се користеше ниво на сигнификантност од $p < 0.05$.

6.1 Резултати

Истражувањето претставуваше аналитичка студија на пресек (cross sectional study). Примерокот на студијата, беше селектиран со метод на прост случаен избор, а него го сочинуваа изолати на *C. difficile* добиени од пациенти со клинички симптоми за CDI. Примероците за изолација на *C. difficile* беа добивани од амбулантите во Скопје како и од хоспитализираните пациенти на различни клиници при Универзитетскиот клинички центар “Мајка Тереза” во Скопје. Со студијата беа опфатени сите фекални примероци кои во периодот од јануари 2015 до јануари 2019 година беа упатени на Институтот за Микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје со цел да се постави лабораториска дијагноза за CDI.

6.1 Застапеност на *C. difficile*

Во периодот на имплементација на истражувањето (јануари 2015 до јануари 2019 година), до Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје беа испратени вкупно 1380 примероци (фецес) од пациенти со клинички симптоми за CDI (График 1).

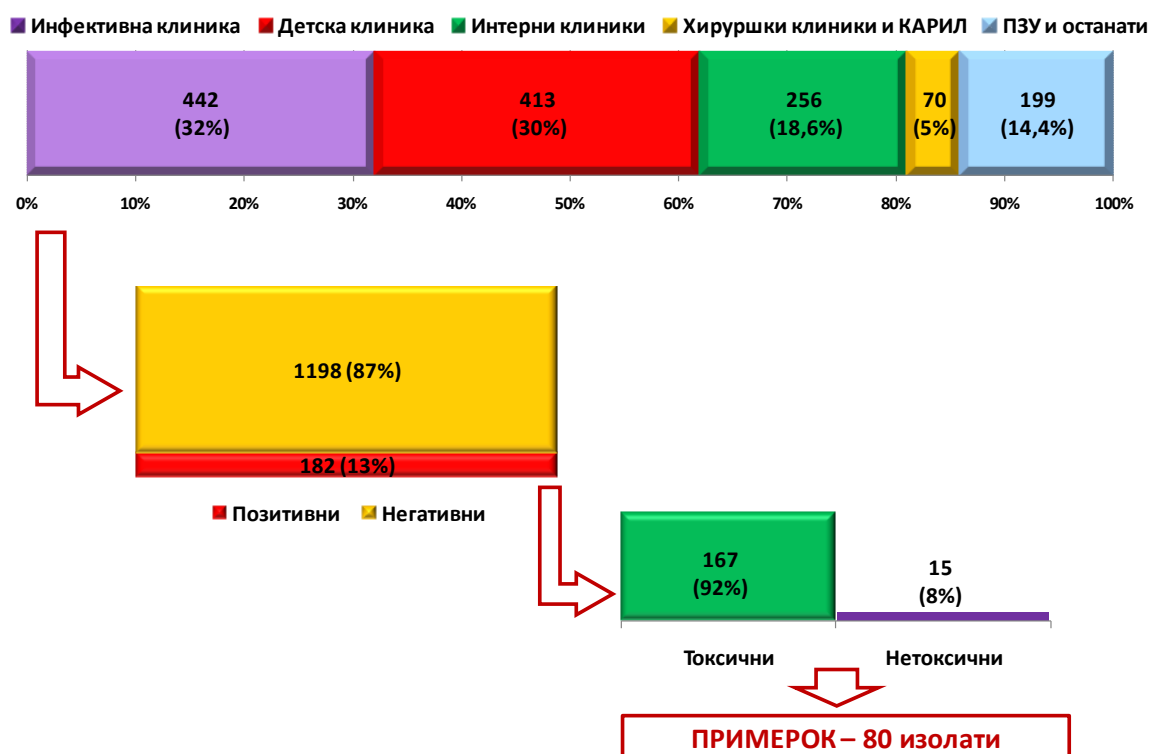


График 1. Процес до селекција на изолатите на *C. difficile*

Анализата на дистрибуцијата на 1380 (100%) фекални примероци според местото од каде што беа испратени укажа дека најголемиот дел од нив 442

(32%) беа од Клиниката за инфективни болести и фебрилни состојби, 413 (30%) од Клиниката за детски болести, 256 (18,6%) од интерните клиници, 70 (5%) од хируршките клиници и 199 (14,4%) од ПЗУ и останати болници надвор од клиничкиот комплекс „Мајка Тереза“ (График 1). Анализата на испратените примероци од пациенти суспектни за CDI укажа дека *C. difficile* беше детектиран кај 182 (13%) од примероците. Дополнителната анализа укажа дека во овие 182 примероци, токсини на *C. difficile* биле детектирани во 167 (92%), што значи дека лабораториска дијагноза на CDI беше поставена кај 12,1%, односно кај 167 од вкупно 1380 испратени примероци од суспектни пациенти (График 1).

Согласно инклузиониот критериум за вклучување само еден примерок по пациент, и по елиминирањето на неуспешно зачуваните изолати предмет на ова истражување беше примерок од 80 изолати на *C. difficile*.

Потеклото на овие изолати беше од пациенти на Клиниката за инфективни болести (10 од 442 испратени примероци или 2,3%), Клиниката за детски болести (7 од 413 испратени примероци или 1,7%), Клиниките за интерни болести (31 од 256 испратени примероци или 12,1%), Клиниките за хируршки болести (22 од 70 испратени примероци или 31,4%) и од ПЗУ (приватни здравствени установи) и други болници надвор од клиничкиот комплекс „Мајка Тереза“ (10 од 199 испратени примероци или 5%).

6.1.1. Карактеристики според возраст и пол

Тестирањето на дистрибуцијата на фреквенциите за возраста (години) на пациентите чии изолати на *C. difficile* го сочинуваат примерокот, укажа на неправилна дистрибуција за Shapiro-Wilk $W=0,8681$; $p=0,00001$. Согласно анализата, за понатамошната статистичка обработка беа применети непараметарски тестови (График 2).

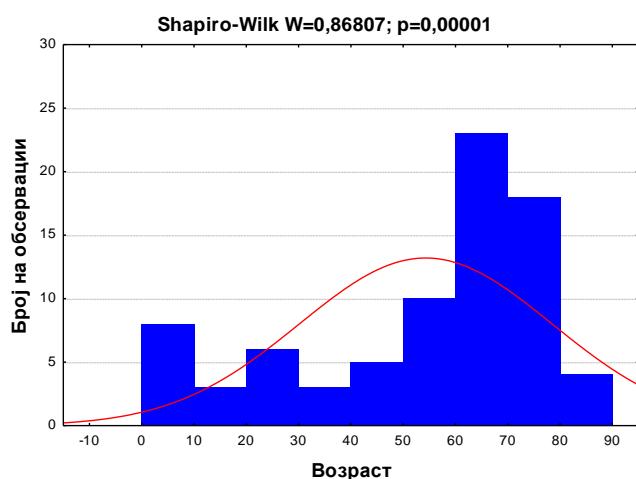


График 2. Хистограм на дистрибуција на фреквенции за возраст

Во целиот примерок на изолати на *C. difficile*, просечната возраст на пациентите изнесуваше $54,3 \pm 24,2$ години со мин/ макс. возраст од 2/84 години. Согласно Median (IQR)=63 (42-73), на возраст под 63 години беа 50% од пациентите во примерокот (Табела 1).

Бројот на изолати на *C. difficile* од мажи односно жени изнесуваше 41 (51,25%) vs. 39 (48,75%), со однос помеѓу половите од 1,05:1. Процентуалната разлика помеѓу половите во целиот примерок не беше статистички сигнификантна за $p>0,05$ (Difference test: Difference 2,50% [(-12,71-17,55) CI 95%]; Chi-square=0,099; df=1; $p=0,099$).

Табела 1. Анализа на изолати на *C. difficile* според пол и возраст на пациенти во години

Групи	Просек (Mean)	Број (N)	Стандардна девијација (Std. Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Мажи	52,58	41	26,72	2	84	38	63	77
Жени	56,13	39	21,38	4	82	51	64	70
Вкупно	54,31	80	24,18	2	84	42	63	73

Mann-Whitney U Test: Z=-0,1396; p=0,8890 *сигнификантно за p<0,05

Во однос на полот на пациентите од кои се добиени изолатите на *C. difficile*, просечната возраст кај мажите изнесуваше $52,6 \pm 26,7$ години со мин/мак возраст од 2/84 години и 50% од испитаниците на возраст под 63 години за Median (IQR)=63 (38-77). Просечната возраст кај жените изнесуваше $56,1 \pm 21,4$ години со мин/мак возраст од 4/82 години и 50% пациентите на возраст под 64 години за Median (IQR)=64 (51-70) (Табела 1 и График 3). За $p > 0,05$, не беше утврдена сигнификантна разлика помеѓу половите во однос на возраста (Mann-Whitney U Test: Z=-0,1396; p=0,8890).

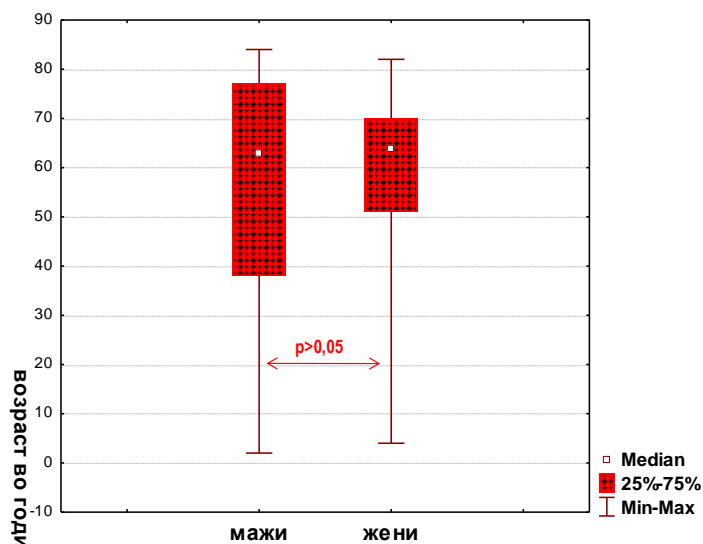


График 3. Анализа на примерокот на изолати на *C. difficile* според пол и возраст на пациентите

Дополнително, беше направена анализа на пациентите од кои беа добиени изолатите на *C.*

difficile во однос на осум дефинирани возрасни групи (Табела 2). Најголем број на изолати имаше од возрасната група 61 – 70 години и тоа 23 (28,7%) следено со 22 (27,5%) од групата над 70 години, и 10 (12,5%) од групата 51-60 години. Ниеден изолат на *C. difficile* не беше добиен од пациент на возраст од 0-1 година. Изолатите од машки пол, во најголем дел и тоа 13 (31,7%) беа од пациенти на возраст над 70 години, следено со 8 (19,5%) од возрасната група 61-70 години. Кај женскиот пол најмногу изолати на *C. difficile* имаше во возрасната група 61-70 години застапена со 15 (38,5%), следено со 9 (23,1%) од групата над 70 години.

За $p > 0,05$, не беше утврдена сигнификантна асоцијација помеѓу полот и возрасната група на пациентите на која и припаѓаат изолатите на *C. difficile* (Fisher Freeman Halton exact test: p=0,0717). При анализата беше исклучена групата 0-1 година од која немаше изолати на *C. difficile* и групата од 31-40 години со нула изолати на *C. difficile* кај пациенти од женски пол (Табела 2).

Табела 2. Анализа на изолатите на *C. difficile* според возрасна група на пациентите

Возрасни групи (години)	Пол			p
	Маж	Жени	Вкупно	
0 – 1	Број	0	0	Fisher Freeman Halton exact test: p=0,0717
	%	0%	0%	
2 – 10	Број	6	2	
	%	14,63%	5,13%	
11 – 20	Број	2	1	
	%	4,88%	2,56%	
21 – 30	Број	1	5	
	%	2,44%	12,82%	
31 – 40	Број	3	0	
	%	7,32%	0%	
41 – 50	Број	4	1	
	%	9,76%	2,56%	
51 – 60	Број	4	6	
	%	9,76%	15,38%	
61 – 70	Број	8	15	
	%	19,51%	38,46%	
> 70	Број	13	9	
	%	31,71%	23,08%	

¹исклучени од анализа возрасните групи од 0-1 и 31-40 *сигнификантно за p<0,05

6.1.2. Анализа на примерокот од 80 изолати на *C. difficile* според местото на испраќање на примероците за дијагноза на CDI

Направена беше анализа на примерокот од 80 изолати на *C. difficile* според местото од каде беа испратени примероците за поставување на лабораториска дијагноза на CDI (Табела 3).

Табела 3. Анализа на изолатите на *C. difficile* според местото на испраќање на примероците

Место на испраќање на фекалните примероци	Добиени изолати	
Хируршки клиници	Број	22
	%	27,5%
Интерни клиници	Број	31
	%	38,8%
Клиника за детски болести	Број	7
	%	8,7%
Клиника за инфективни болести и фебрилни состојби	Број	10
	%	12,5%
ПЗУ и останати	Број	10
	%	12,5%

Согледано беше дека најголем број од изолатите беа од Интерните клиници и тоа 31 (38,8%), следено со тие од Хируршките клиници 22 (27,5%). Поеднаков број од по 10 (12,5%) беа добиени од примероци испратени од Клиниката за инфективни болести и фебрилни состојби и од ПЗУ и останати. Најмал број на изолати на *C. difficile* беа добиени од Клиниката за детски болести 7 (8,7%). Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на примерокот од изолати на *C. difficile* е дадена на График 4.



График 4. Анализа на добиените изолати на *C. difficile* според место на испраќање на фекалните примероци

6.2.1. Присуство на токсини на *C. difficile*

За да може да се диференцира дали детектираниот сој на *C. difficile* е причинител на инфекција или пак е тој само колонизатор на дебелото црево кај пациентот, од примерок односно од култура беше испитувано и присуството на двата најзначајни фактори на вируленција (токсинот А и токсинот Б) поодделно, со помош на брз имунохроматографски тест. Анализата беше направена во однос на четири можности на индивидуално и комбинирано присуство на овие два токсини и тоа: а) ниту А ниту Б; б) А+Б; в) Б и г) А (Табела 4-5 и График 5-6).

Табела 4. Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок/ култура

<i>C. difficile</i>			Доказани токсини (N=80)				p
			ниту А ниту Б	А + Б	Б		
Изолати	Фекален примерок	Број	14	61	5	Pearson Chi-square test=3,6923; df=2; p=0,1578	
		%	17,50%	76,25%	6,25%		
	Култура	Број	6	69	5		
		%	7,50%	86,25%	6,25%		

*сигнификантно за $p < 0,05$

Доказани токсини во фекален примерок - изолатите на *C. difficile* беа анализирани според доказани токсини во фекален примерок (Табела 4 и График 5). Беше утврдено дека во 14 (17,5%) случаи не беше детектиран ниту А ниту Б токсинот; во 61 (76,2%) случи беше детектирана комбинацијата на токсините А+Б; и во 5 (6,25%) случаи беше детектиран само токсинот Б. Во ниеден од фекалните примероци од кој потекнаа изолатите на *C. difficile* не беше детектиран само токсинот А.

Доказани токсини од култура - изолатите на *C. difficile* беа анализирани и според доказани токсини од култура (Табела 4 и График 5). Беше утврдено дека

во 6 (7,5%) случаи не беше детектиран ниту А ниту Б токсинот; во 69 (86,2%) случаи беше детектирана комбинацијата на токсините А+Б; и во 5 (6,25%) случаи беше детектиран само токсинот Б. Во ни една од културите на *C. difficile* не беше детектиран само токсинот А.

Анализата на изолатите на *C. difficile* според докажаните токсини во фекален примерок односно во култура укажа на еднакво присуство на токсинот Б односно отсуство на токсинот А (Табела 4 и График 5). За $p > 0,05$, не беше утврдена сигнификантна асоцијација помеѓу докажаните токсини на *C. difficile* и анализата во примерок/ култура (Pearson Chi-square test=3,6923; df=2; $p=0,1578$). Детектирањето на токсините А+Б беше несигнификантно поголемо во културата на *C. difficile* споредено со фекален примерок, додека и отсуството на токсините А и Б беше несигнификантно поголемо во фекален примерок споредено со култура на *C. difficile*. Анализата според докажани токсини во примерок/ култура е прикажана на График 5.

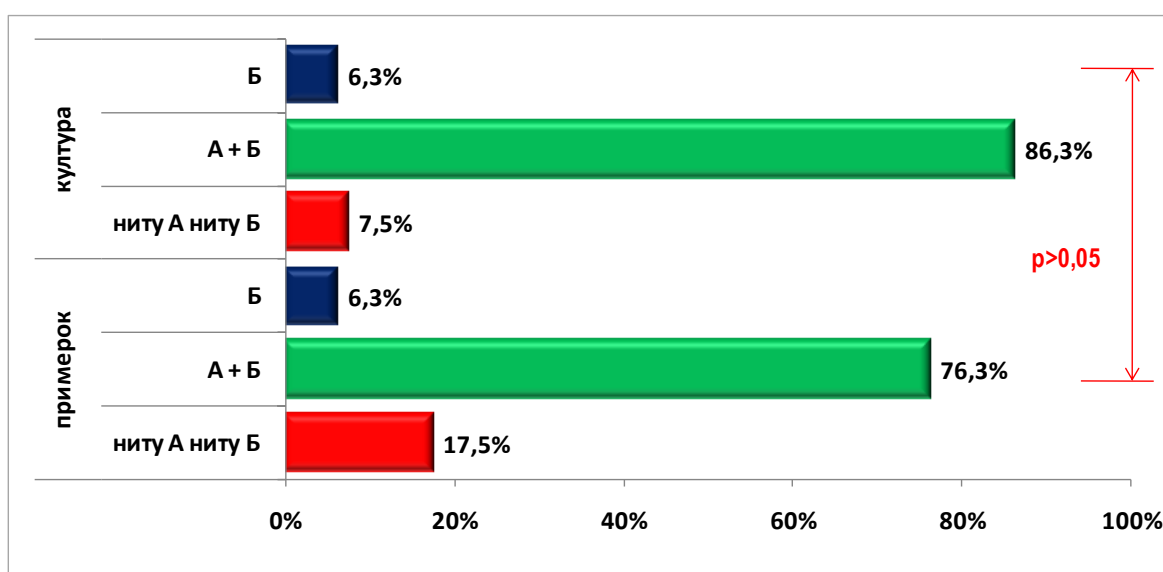


График 5. Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок/ култура

6.2.2 Совпаѓање на докажани токсини во фекален примерок и во култура

Допонително беше направена анализа за утврдување на совпаѓањето на докажаните токсини на *C. difficile* од фекален примерок односно од култура. При тоа, согласно вредностите добиени со користење на овие две методи, добиените токсини беа поделени во три групи и тоа: а) ниту А ниту Б; б) А+Б и в) Б.

Табела 5. Совпаѓање на докажани токсини во фекален примерок и во култура

Докажани токсини <i>C. difficile</i>		Култура			
		ниту А ниту Б	А + Б	Б	
Фекален примерок	ниту А ниту Б	N	6	8	0
		%	100%	0%	0,0%
	А + Б	N	0	61	0
		%	0,0%	88,4%	0,0%
	Б	N	0	0	5
		%	0,0%	0,0%	100%

* сигнификантно за $p < 0,05$

Согледано беше совпаѓање на докажаните токсини од примерок и култура во 90% од случаите и тоа кај 42,9% кај групата во која беа отсутни двата токсини, кај 100% во групата во која беше докажано присуство на двата двата токсина и во 100% од групата со докажан само токсин Б (Табела 6).

Табела 6. Совпаѓање на примерок и култура во класификација на докажани токсини

Cohen's kappa (κ)		Вредност	Bootstrap ^a			
			Bias	Std. Error	95% CI	
					Lower	Upper
Мерка на совпаѓање	Карпа	,693	(,009)	,101	,474	,854
Број на случаи		80	0	0	80	80
Approx. Sig.< 0,05		p=0,00001*				

Анализата укажа дека помеѓу примерокот и културата како критериуми за класификација на докажани токсини на примерокот од 80 изолати постои значајно совпаѓање за $\kappa=0,693$ [95% CI (0,474-0,854)] (Табела 6).

6.2.3. Присуство на токсините на *C. difficile* според пол на пациентите

Направена беше и анализа на докажани токсини од фекален примерок односно од култура на *C. difficile* според полот на пациентите од кои е добиен изолатот (Табела 7 и График 6).

Фекален примерок - во фекалните примероци кај пациентите од машки односно од женски пол најчесто беа детектирани токсините А+Б и тоа консеквентно кај 37 (90,2%) vs. 24 (61,5%). Кај 3 (7,3%) пациенти од машки и кај 11 (28,2%) пациенти од женски пол не беа детектирани двата токсини. Токсинот Б во примерокот на *C. difficile* беше докажан кај 1 (2,4%) од пациентите од машки vs. 4 (10,3%) од пациентите од женски пол.

За $p<0,05$, беше утврдена сигнификантна асоцијација помеѓу полот и докажаниот токсин од примерок (Fisher Freeman Halton exact test: $p=0,0106$). Оваа сигнификантност, согласно дополнителната анализа, се должеше на тоа дека кај мажите во однос на жените, комбинацијата на токсините А+Б беше за 5,653 пати почесто детектирана споредно со нивното истовремено отсуство [OR=5,653 (1,43–22,38) 95% CI]. Анализата за $p>0,05$, не укажа на сигнификантна асоцијација помеѓу полот на испитаниците и докажаните токсини А+Б/ Б (Fisher exact test: $p=0,0769$) како и докажаните ниту А ниту Б/ Б токсини (Fisher exact test: $p=0,9454$).

Табела 7. Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок/ култура според пол на пациентите

Докажани токсини на <i>C. difficile</i>			Пол			P
			Мажи	Жени	Вкупно	
Фекален примерок	ниту А ниту Б	Број	3	11	14	Fisher Freeman Halton exact test: p=0,0106*
		%	7,32%	28,21%	17,50%	
	А + Б	Број	37	24	61	
		%	90,24%	61,54%	76,25%	
	Б	Број	1	4	5	
		%	2,44%	10,26%	6,25%	
Култура	ниту А ниту Б	Број	0	6	6	А + Б/ Б Fisher's exact test: p=0,1654
		%	0%	15,38%	7,50%	
	А + Б	Број	40	29	69	
		%	97,56%	74,36%	86,25%	
	Б	Број	1	4	5	
		%	2,44%	10,26%	6,25%	
ниту А ниту Б/ А+Б =Fisher exact test: p=0,007 *			*сигнификантно за p<0,05			
А и Б/ Б= Fisher exact test: p=0,0769						
ниту А ниту Б/ Б=Fisher exact test: p=0,9454						

Култура -во 6 (15,4%) од културите на *C. difficile* на пациенти со женски пол, и во 0 (0%) од културите на пациенти со машки пол не беше детектиран ниту А ниту Б токсин. Во културата на *C. difficile* кај пациентите од машки односно женски пол најчесто беа детектирани и двата токсина и тоа консеквентно кај 40 (97,6%) vs. 29 (74,4%). Токсинот Б беше докажан кај 1 (2,4%) од пациентите од машки vs. 4 (10,3%) од пациентите од женски пол. За $p > 0,05$, не беше утврдена сигнификантна асоцијација помеѓу полот и докажани токсини од култура (Fisher's exact test: $p = 0,1654$).

Кај мажите односно жените и во фекалниот примерок и во културата на *C. difficile* токсинот Б беше докажан подеднакво (Табела 5). За $p > 0,05$, немаше сигнификантна процентуална разлика помеѓу детекцијата на токсинот А+Б помеѓу: а) машкиот пол во примерок односно во култура (Difference test: Difference 7,32% [(-4,425-20,27) CI 95%]; Chi-square=1,894; df=1; $p = 0,1687$); и б) женскиот пол во примерок односно во култура (Difference test: Difference 12,82% [(-7,74-31,98) CI 95%]; Chi-square=1,453; df=1; $p = 0,2281$).

Сигнификантна процентуална разлика во детекцијата на отсуство на (ниту А ниту Б) токсините, за $p > 0,05$, не беше согледана помеѓу: а) машкиот пол во примерок односно во култура (Difference test: Difference 7,32% [(-2,49-19,43) CI 95%]; Chi-square=3,077; df=1; $p = 0,0794$); и б) женскиот пол во примерок односно во култура (Difference test: Difference 12,83% [(-5,66-30,39) CI 95%]; Chi-square=1,859; df=1; $p = 0,1727$). Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок/ култура според пол на пациентите е дадена на График 6.

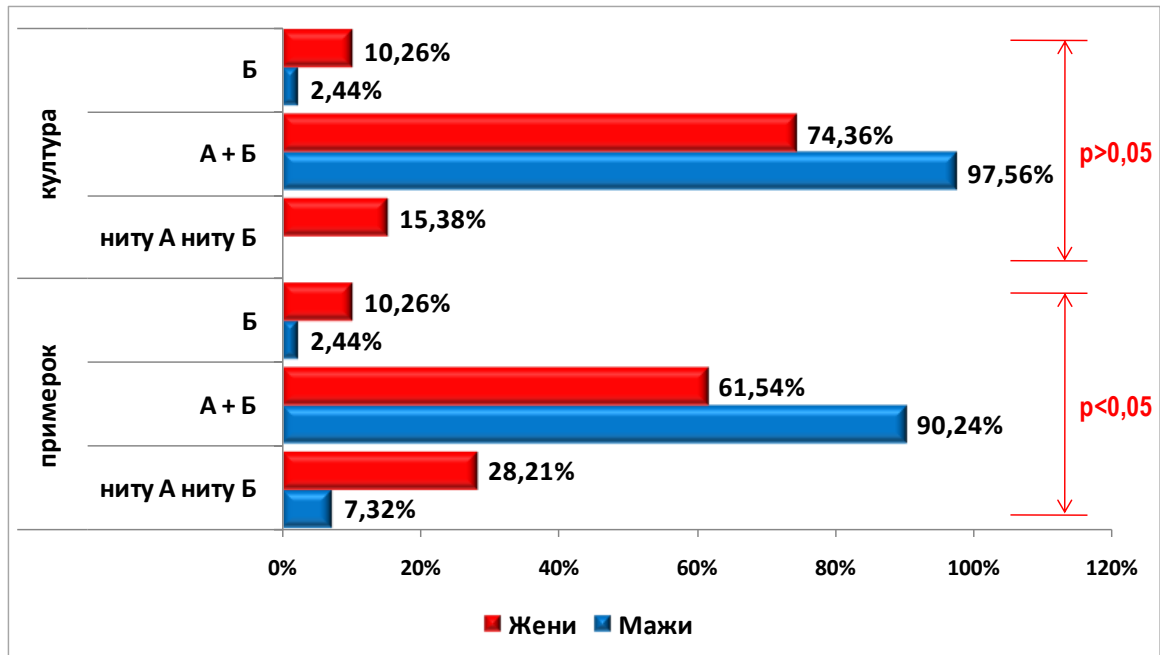


График 6. Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок/ култура според пол на пациентите

6.2.4. Присуство на токсини на *C. difficile* според возраст на пациентите

Анализата на докажаните токсини на *C. difficile* (ниту А ниту Б, А+Б, и Б) според возраст на пациентите од кои се изолирани, укажа дека просечната возраст изнесувала консеквентно за:

а) **фекален примерок** - $51,2 \pm 26,7$ за Median (IQR)=63,5 (33-70) vs. $54,9 \pm 24,2$ за Median (IQR)=63 (45-75) vs. $55,6 \pm 19,3$ за Median (IQR)=62 (53-64). За $p > 0,05$, нема статистички сигнификантна разлика помеѓу докажаните токсини во примерок во однос на возраста на пациентите од кои се изолирани (Kruskal-Wallis H test: Chi-square (2)=0,3332; $p=0,8465$) (Табела 8).

б) **култура** - $47,2 \pm 30,4$ за Median (IQR)=59,5 (15-65) vs. $54,8 \pm 24,2$ за Median (IQR)=64 (44-75) vs. $55,6 \pm 19,3$ за Median (IQR)=62 (53-64). За $p > 0,05$, нема статистички сигнификантна разлика помеѓу докажаните токсини во култура во однос на возраста на пациентите од кои се изолирани (Kruskal-Wallis H test: Chi-square (2)=0,6886; $p=0,7087$) (Табела 8).

Табела 8. Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок односно во култура на *C.difficile* според возраст на пациентите

Доказани токсини на <i>C.difficile</i>	Просек (Mean)	Број (N)	Стандардна девијација (Std. Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Percentiles			
						25th	50th (Median)	75th	
Пример.	ниту А ниту Б	51,21	14	26,69	4	80	33	63,5	70
	А + Б	54,92	61	24,24	2	84	45	63,0	75
	Б	55,60	5	19,32	24	75	53	62,0	64
Kruskal-Wallis H test: Chi-square (2)=0,3332; p=0,8465									
Култура	ниту А ниту Б	47,17	6	30,37	4	80	15	59,5	65
	А + Б	54,84	69	24,18	2	84	44	64,0	75
	Б	55,60	5	19,32	24	75	53	62,0	64
Kruskal-Wallis H test: Chi-square (2)=0,6886; p=0,7087							*сигнификантно за p<0,05		

Графичкиот приказ за присуството на токсините на *C.difficile* во фекален примерок/култура според возраст на пациентите од кои потекнуваат изолатите е даден на График 7.

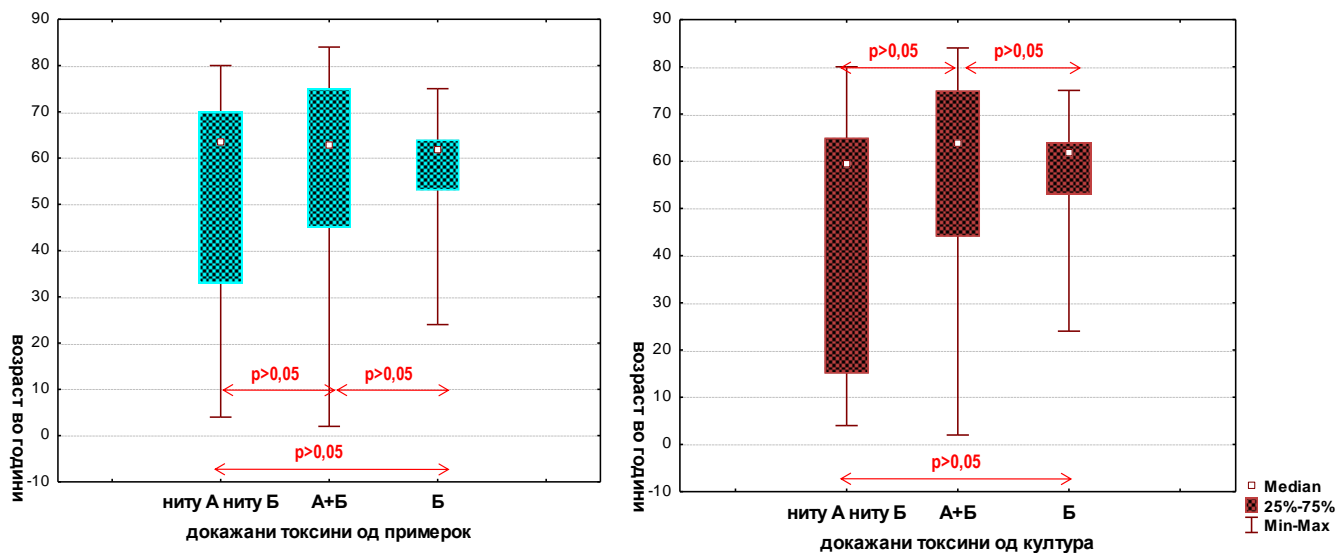


График 7. Присуство на токсини на *C. difficile* во фекален примерок односно во култура на *C.difficile* според возраст на пациентите

Дополнително беше направена споредба помеѓу фекален примерок/ култура во однос на возраста на пациентите од кои се изолирани соодветните токсини на *C.difficile* (Табела 9).

Табела 9. Споредба на фекален примерок/ култура според возраст на пациенти за докажани токсини на *C. difficile*

Difference between means	пример/ култура		
	ниту А ниту Б	А + Б	Б
Difference	-4.040	3,900	0,000
Standard error	13.411	4,254	12,206
95% CI	-32,21 – 24,13	-4,518-12,318	-28,148-28,148
t-statistics	-0.301	0,917	0,000
Df	18	128	8
Significance level	p=0,7667	p=0,3610	p=1,0000

*сигнификантно за p<0,05

За $p>0,05$, анализата не укажа на статистички сигнификантна разлика помеѓу фекалниот примерок/ културата во однос на просечната возраст на пациентите каде се докажани соодветните токсини од изолатите на *C. difficile* (ниту А ниту Б – Mean difference: -4,04% [(-32,21 – 24,13) CI 95%] $p=0,7667$; (А+Б) – Mean difference: 3,90% [-4,518-12,318) CI 95%] $p=0,3610$; и Б - Mean difference: 0% [28,148-28,148) CI 95%] $p=1,0000$) (Табела 9 и График 8).

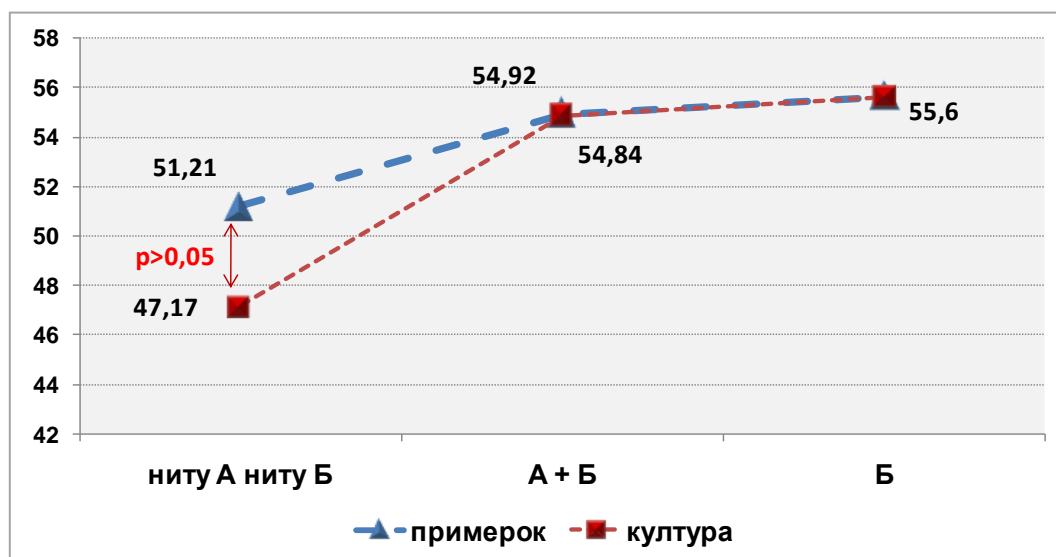


График 8. Споредба на фекален примерок/ култура според просечна возраст на пациенти за докажани токсини на *C. difficile*

6.3.1. Присуство на риботипови на *C. difficile* кај добиените изолати

Во рамките на истражувањето, направена беше PCR риботипизација на изолатите на *C. difficile* со цел за полесна детекција и епидемиолошко следење на овие инфекции. Согледано беше присуство на 20 риботипови и тоа: 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 015, 017, 023, 027, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, и SLO 187 (Табела 10).

Табела 10. Присуство на риботипови на *C. difficile*

Риботипови на <i>C. difficile</i>		Број (N)	%
1	001/072	32	40,00%
2	002	5	6,25%
3	003	1	1,25%
4	005	3	3,75%
5	012	1	1,25%
6	014/020	10	12,50%
7	015	1	1,25%
8	017	5	6,25%
9	023	1	1,25%
10	027	5	6,25%
11	046	1	1,25%
12	070	1	1,25%
13	255/258	3	3,75%
14	SLO 046	3	3,75%
15	SLO 047	3	3,75%
16	SLO 069	1	1,25%
17	SLO 110	1	1,25%
18	SLO 120	1	1,25%
19	SLO 160	1	1,25%
20	SLO 187	1	1,25%
Вкупно		80	100%

Најчест риботип беше 001/072 застапен со 32 (40%) изолати, следено со риботипот 014/020 застапен со 10 (12,5%) изолати и риботиповите 002, 017 и 027 застапени со по 5 (6,2%) изолати. Со по 3 изолати (3,7%) беа застапени риботиповите 005, 255/258, SLO 046 и SLO 047. Сите останати риботипови беа застапени со по 1 (1,2%) изолат (Табела 10).

6.3.2. Анализа на риботиповите на *C. difficile* според пол на пациентите

Направена беше анализа на риботиповите на *C. difficile* според пол на пациентите од кои е добиен изолатот (Табела 11 и График 9). За таа цел беше направена поделба на риботиповите во 5 групи и тоа: а) 001/072; б) 014/020; в) 002; г) 017; д) 027; и ё) други = 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

И кај машкиот и кај женскиот пол најзастепени риботипови се 001/072 и тоа консеквентно кај 17 (41,5%) vs. 15 (38,4%) изолати (Табела 11). На второ место според застапеност кај машкиот пол се риботиповите 014/020 застапени со 6

(14,6%), следено со 002 застапен со 3 изолати (7,3%). Кај женскиот пол, на второ и трето место според застапеност се риботиповите 014/020 и 017 застапени подеднакво со по 4 изолати(10,3%). Најмалку застапен кај машкиот пол е риботипот 017 со 1 (2,4%), додека кај женскиот пол тоа е риботипот 002 застапен со 2 изолати (5,1%). Групата на други риботипови во која ги вбројуваме останатите 15 риботипови (Табела 11) е застапена кај машкиот пол со 12 (29,3%) и кај женскиот пол со 11 изолати (28,2%).

Табела 11. Анализа на добиените риботипови на *C. difficile* според пол на пациентите

<i>C. difficile</i>		Пол			р	
		Мажи	Жени	Вкупно		
Риботипови	001/072	Број	17	15	32	Fisher Freeman Halton exact test: p=0,7430
		%	41,46%	38,46%	40%	
	014/020	Број	6	4	10	
		%	14,63%	10,26%	12,50%	
	002	Број	3	2	5	
		%	7,32%	5,13%	6,25%	
	017	Број	1	4	5	
		%	2,44%	10,26%	6,25%	
	027	Број	2	3	5	
		%	4,88%	7,69%	6,25%	
	1други	Број	12	11	23	
		%	29,27%	28,21%	28,75%	
Вкупно	Број	41	39	80		
	%	51,25%	48,75%	100%		

*сигнификантно за $p < 0,05$
¹други=003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Анализата за $p > 0,05$, не укажа на статистички сигнификантна асоцијација помеѓу полот на испитаниците и добиените риботипови (Fisher exact test: $p = 0,7430$). Следува дека поголемата односно помалата застапеност на одредени риботипови кај машкиот односно женскиот пол е реална но несигнификантна во примерокот на изолати во ова истражување. Графичкиот приказ на анализата на риботиповите во изолати на *C. difficile* според пол е дадена на График 9.

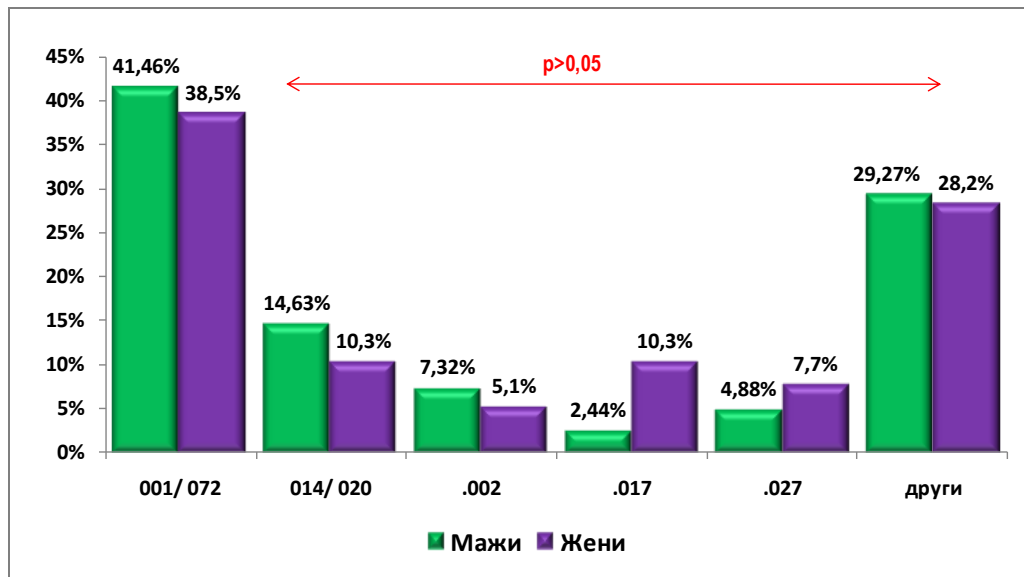


График 9. Риботипови на *C. difficile* според пол на пациентите

6.3.3. Анализа на риботипови на *C. difficile* според возраст на пациентите

Направена беше анализа на риботиповите добиени од изолатите на *C. difficile* според возраста на пациентите од кои беа земени (Табела 12). Согледано беше дека најниска просечна возраст од $38,2 \pm 28,1$ за Median IQR=44 (6-62) години имаа пациентите кај кои беше утврдено присуство на други риботипови. Со највисока просечна возраст од $67,4 \pm 9,6$ за Median IQR=66 (59-71) година беа пациентите во чиј изолат на *C. difficile* беше утврден риботип 027, следено со просечна возраст $65,4 \pm 16,5$ за Median IQR=69(60-75) години на пациентите во чиј изолат беше утврден риботипот 014/020.

Табела 12. Анализа на риботипови во изолати на *C. difficile* според возраст

Риботипови	Просек (Mean)	Број (N)	Стандардна девијација (Std. Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
001/072	59,41	32	20,20	9	82	52,5	64,5	76,5
014/020	65,50	10	16,46	24	81	60,0	69,0	75,0
002	59,20	5	26,14	13	77	66,0	69,0	71,0
017	55,60	5	19,32	24	75	53,0	62,0	64,0
027	67,40	5	9,61	59	82	59,0	66,0	71,0
други	38,17	23	28,15	2	84	6,0	44,0	62,0

Kruskal-Wallis H test: Chi-square (2)=8,733; df=4; p=0,068 *сигнификантно за p<0,05

За $p > 0,05$, не беше согледана сигнификантна разлика помеѓу изолираните риботипови на *C. difficile* во однос на возраста на пациентите од кои беше земен примерок за анализа. Графичкиот приказ на анализата на риботиповите во изолати на *C. difficile* според возраст на пациентите од кои потекнуваат е даден на График 10.

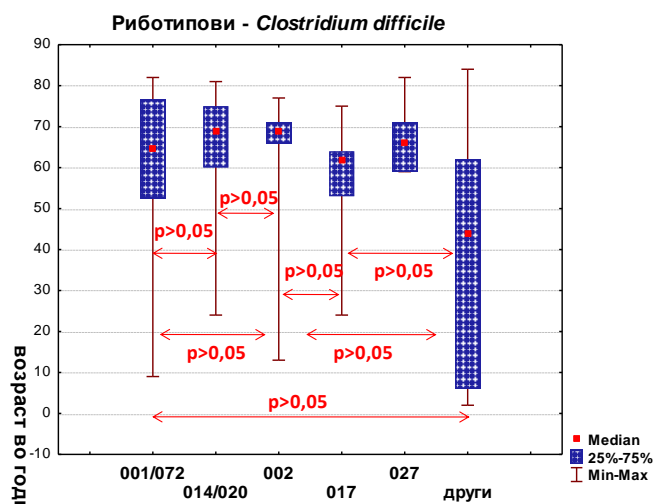


График 10. Анализа на риботипови во изолати на *C. difficile* според возраст на пациентите

6.3.4 Анализа на риботипови на *C. difficile* според докажани токсини

Направена беше анализа на риботиповите добиени од изолатите на *C. difficile* според докажани токсини во фекален примерок и во култура (Табела 13-14).

Табела 13. Риботипови на *C. difficile* според докажани токсини во фекален примерок

<i>C. difficile</i>			Докажани токсини во фекален примерок		
			ниту А ниту Б	А + Б	Б
Риботипови	001/072	Број	1	31	0
		%	3,13%	96,88%	0%
	014/020	Број	1	9	0
		%	10%	90%	0%
	002	Број	2	3	0
		%	40%	60%	0%
	017	Број	0	0	5
		%	0%	0%	100%
	027	Број	0	5	0
		%	0%	100%	0%
	1 други	Број	10	13	0
		%	43,48%	56,52%	0%
1 други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Риботипови на *C. difficile* и докажани токсини во фекален примерок

Анализата покажа дека кај 31 (96,9%) од изолатите на *C. difficile* со риботип 001/072 беа добиени двата токсина, а кај 1 (3,1%) не беше добиен ниту еден токсин во испитуваните фекални примероци. Присуство само на токсинот Б не беше утврдено (Табела 13 и График 11).

Кај 9 (90%) од изолатите на *C. difficile* со риботип 014/020 беа добиени двата токсини, а кај 1 (10%) не беше добиен ниту еден токсин при нивното испитување во фекалните примероци. Присуство само на токсинот Б не беше утврдено (Табела 13 и График 11).

Кај 3 (60%) од изолатите на *C. difficile* со риботип 002 беа детектирани двата токсина, а кај 2 (40%) не беше детектиран ниту еден токсин, при нивното

испитување во фекалните примероци. Присуство само на токсинот Б не беше утврдено (Табела 13 и График 11).

Кај 5 (100%) од изолатите на *C. difficile* со риботип 017 беше детектиран само токсинот Б во фекалните примероци (Табела 13 и График 11).

Кај 5 (100%) од изолатите на *C. difficile* со риботип 027 беа детектирани двата токсина во фекалните примероци (Табела 13 и График 11).

Кај 13 (56,5%) од изолатите на *C. difficile* од групата на други риботипови (003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187) беа детектирани двата токсина, а кај 10 (43,5) не беше детектиран ниту еден токсин во испитуваните фекални примероци (Табела 13 и График 11).

Впечатливо е дека во сите анализирани риботипови, само токсинот Б не беше докажан од фекален примерок, со исклучок на риботипот 017 каде само токсинот Б беше докажан кај сите 5 (100%) случаи.

Табела 14. Риботипови во изолатите на *C. difficile* според докажани токсини од култура

<i>C. difficile</i>			Докажани токсини во култура			
			ниту А ниту Б	А + Б	Б	
Риботипови	001/072	Број	0	32	0	
		%	0%	100%	0%	
	014/020	Број	0	10	0	
		%	0%	100%	0%	
	002	Број	0	5	0	
		%	0%	100%	0%	
	017	Број	0	0	5	
		%	0%	0%	100%	
	027	Број	0	5	0	
		%	0%	100%	0%	
	¹ други	Број	6	17	0	
		%	26,09%	73,91%	0%	
	¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Риботипови на *C. difficile* и докажани токсини од културата

Во рамките на изолатите од риботипот 001/072 кај сите 32 (100%) со користење на културата беа докажани двата токсина (А+Б). Присуство само на токсинот Б како и отсуство на токсините А и Б не беше утврдено (Табела 14 и График 11).

Во рамките на изолатите од риботиповите 014/020, 002 и 027 од кои со користење на културата беа докажани двата токсина (А+Б), беа застапени со консеквентно 10 (100%) vs. 5 (100%) vs. 5 (100%) изолати. Присуство само на токсинот Б, како и отсуство на токсините А и В не беше утврдено со користењето на културата кај изолатите од овие риботипови (Табела 14 и График 11).

Во рамките на изолатите од риботипот 017 кај сите 5 (100%) беше докажан само токсинот Б од културата. Присуство на двата токсина (А+В), како и отсуство на токсините А и Б не беше утврдено во рамките на овој риботип, со користење на култура (Табела 14 и График 11).

Анализата укажа дека во групата на изолати од други риботипови (003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187), двата токсина беа докажани со користење на култура кај 17 (73,9%), а отсуство на двата токсина (ниту А ниту Б) кај 6 (26,1%) изолати. Присуство само на токсинот Б не беше утврдено во оваа група (Табела 14 и График 11).

Впечатливо е дека во сите анализирани групи риботипови со користење на културата не се покажа отсуство на токсините А и Б, со исклучок на групата на други риботипови каде тие беа отсутни во 6 (26,1%) случаи.

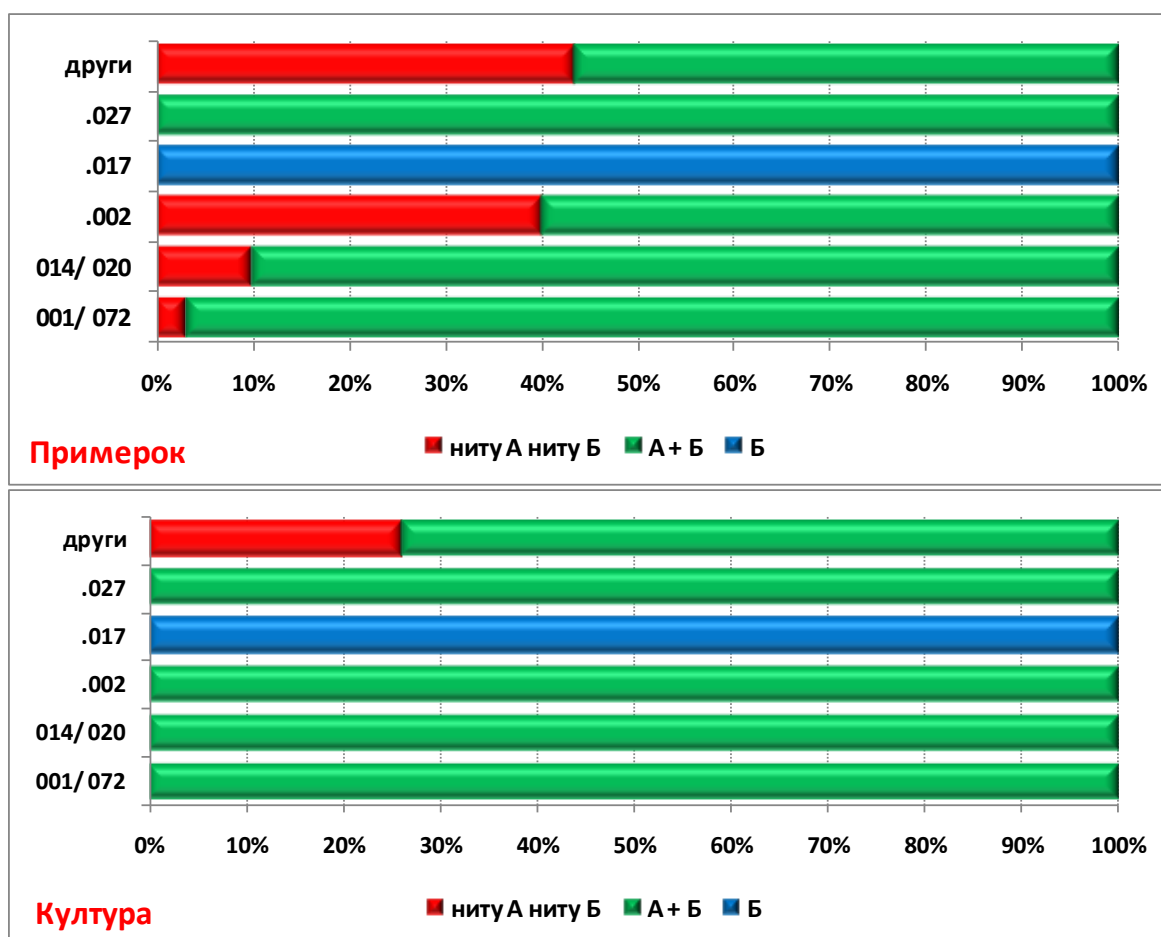


График 11. Риботипови на *C. difficile* според докажани токсини во примерок и во култура

Споредба на риботипови на *C. difficile* и докажани токсини во фекален примерок и култура

Споредбата на фекалниот примерок и култура на *C. difficile* укажа на потполно совпаѓање на наодите во однос на токсинот Б во случајот на сите шест анализирани групи риботипови (Табела 15).

Табела 15. Споредба на фекален примерок/ култура според риботипови и докажани токсини на *C. difficile*

Риботипови	Докажани токсини					
	ниту А ниту Б		А + Б		Б	
	примерок	култура	примерок	култура	примерок	култура
001/072	3,13%	0%	96,88%	100%	0%	0%
014/020	10%	0%	90%	100%	0%	0%
002	40%	0%	60%	100%	0%	0%
017	0%	0%	0%	0%	100%	100%
027	0%	0%	100%	100%	0%	0%
¹ други	43,48%	26,09%	56,52%	73,91%	0%	0%
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187						

Кај риботиповите 017 и 027 беше детектирано потполно совпаѓање помеѓу фекалните примероци и културата на *C.difficile* во однос на отсуството на двата токсина, како и во однос на нивното истовремено присуство. Во случаите на риботиповите 001/072, 014/020, и 002 во фекалниот примерок не беше детектирано присуство на двата токсина за 3,1% vs. 10% vs. 40% споредено со културата.

Дополнителната анализа укажа дека оваа разлика за $p>0,05$, не беше статистички сигнификантна за консеквентно (Difference test: Difference 3,13% [(-7,89-15,75) CI 95%]; Chi-square=1,002; df=1; $p=0,3169$) vs. (Difference test: Difference 10% [(-18,94-40,41) CI 95%]; Chi-square=1,000; df=1; $p=0,3173$) vs. (Difference test: Difference 40% [(-11,82-76,93) CI 95%]; Chi-square=2,250; df=1; $p=0,1336$).

Споредбата на фекален примерок и култура на *C. difficile* во однос на докажаните токсини во другите риботипови укажа на совпаѓање само за токсинот В. За отсуството на двата токсина, како и за нивното истовремено присуство беа согледани разлики но истите за $p>0,05$ беа несигнификантни (Difference test: Difference 17,39% [(-9,70-41,30) CI 95%]; Chi-square=1,500; df=1; $p=0,2207$).

Споредбата на фекалниот примерокот и културата на *C. difficile* според две групи на риботипови и тоа: доминантен риботип (001/072) и останати риботипови (014/020, 002, 017, 027, и други) е прикажан на График 12.

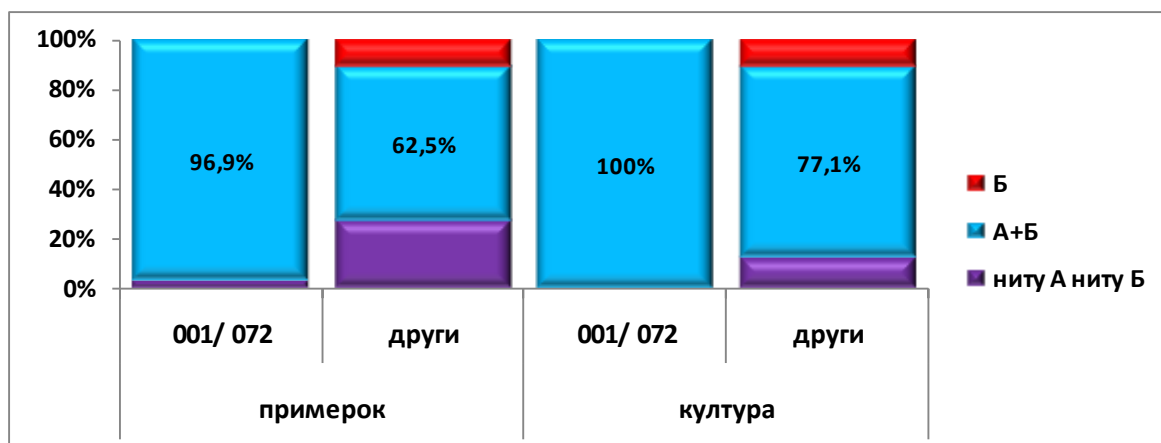


График 12. Споредба на фекален примерок и култура според риботипови 001/072 и други и докажани токсини на *C. difficile*

6.3.5. Анализа на риботиповите на *C. difficile* според местото на земање на фекалниот примерок

Направена беше анализа на риботиповите на *C. difficile* според местото на земање на фекалниот примерок (Табела 16 и График 13). При тоа беа земени во предвид веќе споменатите пет места од каде беа испратени примероците како и шесте детектирани групи риботипови на *C. difficile*.

Табела 16. Риботипови на изолати на *C. difficile* според местото на земање на фекалниот примерок

Место на земање на фекалниот примерок		Риботипови					
		001/072	014/020	002	017	027	¹ други
Хируршки клиники	Број	16	2	0	2	0	2
	%	50%	20%	0%	40%	0%	8,70%
Интерни клиники	Број	13	1	4	2	4	7
	%	40,63%	10%	80%	40%	80%	30,43%
Клиника за детски болести	Број	1	0	1	0	0	5
	%	3,13%	0%	20%	0%	0%	21,74%
Клиника за инфективни болести и фебрилни состојби	Број	2	5	0	0	0	3
	%	6,25%	50%	0%	0%	0%	13,04%
ПЗУ и останати	Број	0	2	0	1	1	6
	%	0%	20%	0%	20%	20%	26,09%
Вкупно	Број	32	10	5	5	5	23
	%	40%	12,50%	6,25%	6,25%	6,25%	28,75%

¹други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Согласно Табела 16 и График 13, анализата на дистрибуцијата на детектираните риботипови на *C. difficile* покажа дека:

- **риботип 001/072** - половина од случаите или 16 (50%) потекнуваат од примероците добиени од хируршките клиники, следено со 13 (40,6%) примероци добиени од интерните клиники. Вкупно 3 (9,4%) од бројот на

детектирани риботипови 001/072 или 1 (3,1%) vs. 2 (6,2%) потекнуваат консеквентно од Клиниката за детски болести односно Инфективната клиника. Во ниеден од примероците испратени од ПЗУ не беше детектиран овој риботип.

- **риботип 014/020** –вкупно 5 (50%) од детектираните случаи со овој риботип потекнуваат од примероци испратени од Инфективната клиника, следено со 2 (20%) од Хируршките клиници, и 1 (10%) од Интерните клиници. Впечатливо е дека 2 (20%) од изолатите на овој риботип се најдени во примероци испратени од ПЗУ и останатите места.
- **риботип 002** – три четвртини од детектираните случаи со овој риботип или 4 (80%) се во примероци пратени од Интерните клиници, следено со 1 (20%) од Клиниката за детски болести. Во примероците од останатите места на испраќање не беше детектиран овој риботип.
- **риботип 017** –подеднакво или по 2 (40%) од случаите со овој риботип потекнуваат од примероци испратени од Хируршките односно Интерните клиници. Анализата укажа дека 1 (20%) од случаите на овој риботип се најдени и во примероци испратени од ПЗУ и останатите места.
- **риботип 027**–најголемиот број или 4 (80%) од детектираните случаи со овој риботип потекнуваат од примероци испратени од Интерните клиници. Согледано беше дека 1 (20%) од случаите на овој риботип се најдени во примероци испратени од ПЗУ и останати места.
- **други риботипови** – анализата укажа дека другите риботипови (003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187) беа детектирани во примероци испратени од сите места. Најмногу односно 7 (30,4%) беа детектирани во примероци од Интерни клиници, следено со 6 (26,1%) од ПЗУ и останати, 5 (21,7%) од Клиника за детски болести, 3 (13%) од Клиниката за инфективни болести и најмалку 2 (8,7%) од Хируршките клиници.

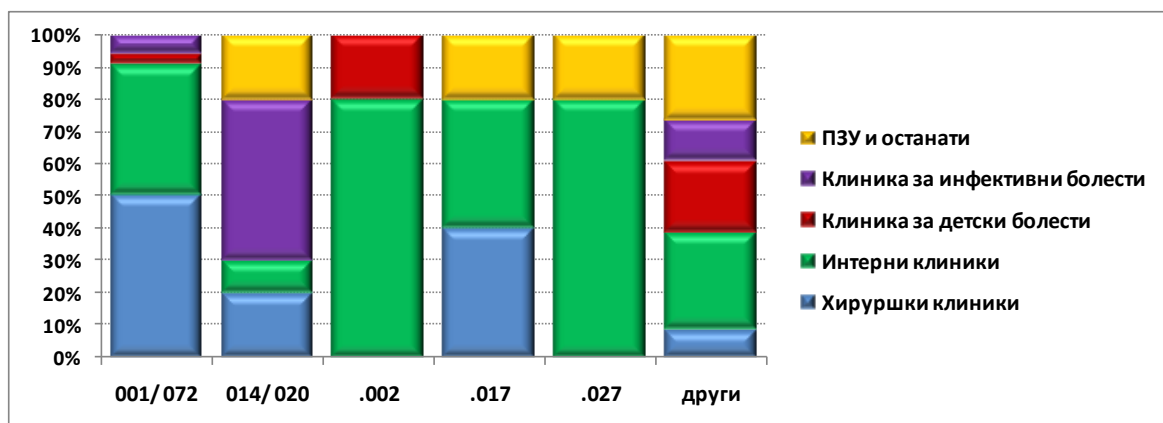


График 13. Риботипови на *C. difficile* според местото на земање на фекалниот примерок

Во интерес на анализата, детектираните риботипови на *C. difficile* беа поделени во две групи и тоа: а) доминантен во кои беше вклучен 001/072 и б) останати риботипови (014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187 (Табела 17 и График 14). Анализата за $p < 0,05$, укажа на статистички сигнификантна асоцијација меѓу местото каде е земен примерокот и детекцијата на 001/072 односно останати риботипови во изолатите на *C. difficile* (Pearson Chi-square test=12,0979; df=2; $p=0,0071$). При тестирањето беа исклучени ПЗУ и останатите поради нула вредност за еден од анализираните риботипови.

Табела 17. Анализа на риботип 001/072 и останати риботипови на *C. difficile* со место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на фекален примерок		Риботипови		P
		001/072	² останати	
Хируршки клиники	Број	16	6	Pearson Chi-square test=12,0979; df=2; $p=0,0071^*$
	%	50%	12,50%	
Интерни клиники	Број	13	18	
	%	40,63%	37,50%	
Клиника за детски болести	Број	1	6	
	%	3,13%	12,50%	
Клиника за инфективни болести и фебрилни состојби	Број	2	8	
	%	6,25%	16,67%	
ПЗУ и останати	Број	0	10	
	%	0%	20,83%	
Вкупно	Број	16	6	
	%	50%	12,50%	

²сигнификантно за $p < 0,05$

²останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

За утврдување на причината за согледаната сигнификантна асоцијација беа направени дополнителни анализи. Анализата укажа дека детекцијата на

риботипот 001/072 на Хируршките клиники е за: а) 3,692 пати почеста споредено со Интерните клиники [OR=3,692 (1,14–12,01) 95% CI]; б) 16,011 пати почеста споредено со Клиниката за детски болести [OR=16,00 (1,58–162,10) 95% CI]; и в) 10,667 пати почесто споредено со Клиниката за инфективни болести [OR=10,667 (1,74–65,27) 95% CI];

За $p > 0,05$, нема сигнификантна асоцијација помеѓу потеклото на изолатите на *C.difficile* од Интерна клиника односно Детска клиника и детектираниот риботип 001/072 односно детектирањето на останатите риботипови (Pearson Chi-square test=1,8762; df=1; $p=0,1708$). Исто така, за $p > 0,05$, нема сигнификантна асоцијација помеѓу потеклото на изолатите од Интерна односно Инфективна клиника и детектираниот риботип 001/072 односно детектирањето на останатите риботипови (Pearson Chi-square test=1,5681; df=1; $p=0,2105$).

Нема сигнификантна асоцијација, за $p > 0,05$, помеѓу потеклото на изолатите на *C.difficile* од Инфективна клиника односно Детска клиника и детектираниот риботип 001/072 односно детектирањето на останатите риботипови (Pearson Chi-square test=0,0925; df=1; $p=0,7610$).

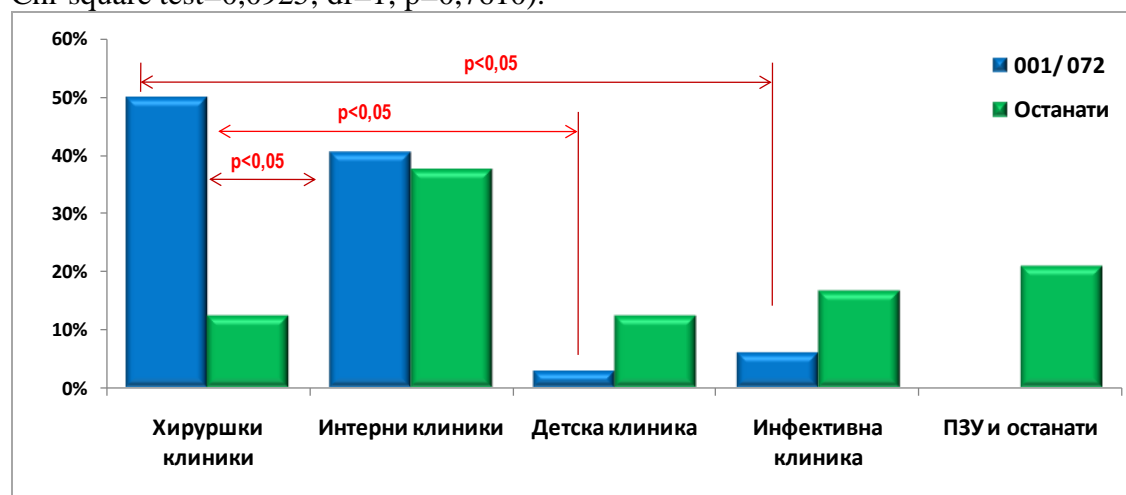


График 14. Анализа на риботип 001/072 и останати риботипови на *C. difficile* со местото на земање на фекалниот примерок

6.4.1. Антибиотска осетливост на изолати на *C. difficile*

Во истражувањето беше испитувана осетливоста на изолатите на *C.difficile* кон клинички најзначајните антимикуробни средства, ванкомицин и метронидазол, како и кон неколку антибиотици кои се сметаат за главен ризик фактор за развој на *C.difficile* инфекција: клиндамицин, цiproфлоксацин, моксифлоксацин, еритромицин, тетрациклин и имипенем. Осетливоста беше анализирана како: а) осетлив; б) резистентен; и в) интермедиерна осетливост.

Осетливост на ванкомицин –анализата на риботипови (001/072, 014/020, 002, 017, 027, и други - прецизирани во Табела 18) на *C. difficile* покажа дека осетливоста на ванкомицин на сите шест изнесуваше 100%. Резистентност или интермедиерна осетливост на ванкомицин не беше регистрирана кај ниеден од испитуваните риботипови (Табела 18).

Табела 18. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на ванкомицин

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	интермедиерен	
Ванкомицин					
Риботипови	001/072	Број	32	-	-
		%	100%	-	-
	014/020	Број	10	-	-
		%	100%	-	-
	002	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	017	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	027	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	¹ други	Број	23	-	-
		%	100%	-	-
Вкупно	Број	80	-	-	
	%	100%	-	-	
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Осетливост на метронидазол–анализата на шестте риботипови (001/072, 014/020, 002, 017, 027, и други - прецизирани во Табела 19) на *C.difficile* укажа дека осетливоста на метронидазол на сите шест изнесува 100%. Резистентност односно интермедиерна осетливост на метронидазол не беше регистрирана кај ниеден од испитуваните риботипови (Табела 19).

Табела 19. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на метронидазол

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	интермедиерен	
Метронидазол					
Риботипови	001/072	Број	32	-	-
		%	100%	-	-
	014/020	Број	10	-	-
		%	100%	-	-
	002	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	017	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	027	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	¹ други	Број	23	-	-
		%	100%	-	-
Вкупно	Број	80	-	-	
	%	100%	-	-	
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Осетливост на тетрациклин – анализата на шестте риботипови на *C. difficile*, укажа дека осетливоста на тетрациклин кај 4 од нив (001/072, 014/020, 002, 017) изнесуваше 100%. Кај риботипот 017, осетливост беше утврдена кај 40%, а интермедиерна осетливост кај 60% од изолатите на *C. difficile*. Во групата на други риботипови регистрирана беше 95,6% осетливост и 4,4% резистентност на тетрациклин (Табела 20).

Табела 20. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на тетрациклин

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	интермедиерен	
Тетрациклин					
Риботипови	001/072	Број	32	-	-
		%	100%	-	-
	014/020	Број	10	-	-
		%	100%	-	-
	002	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	017	Број	2	-	3
		%	40%	-	60%
	027	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	¹ други	Број	22	1	-
		%	95,65%	4,35%	-
Вкупно	Број	76	1	3	
	%	95%	1,25%	3,75%	
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Табела 21. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на клиндамицин

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	интермедиерен	
Клиндамицин					
Риботипови	001/072	Број	2	28	2
		%	6,25%	87,50%	6,25%
	014/020	Број	1	1	8
		%	10%	10%	80%
	002	Број	3	-	2
		%	60%	-	40%
	017	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	027	Број	1	-	4
		%	20%	-	80%
	¹ други	Број	13	5	5
		%	56,52%	21,74%	21,74%
Вкупно	Број	20	39	21	
	%	25%	48,75%	26,25%	
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Осетливост на клиндамицин – од анализираните риботипови на *C.difficile*, најголема осетливост на клиндамицин имаше риботипот 002 (60%) следено со групата други риботипови со осетливост од 56,5%. Мала осетливост од 20% односно 10% имаа консеквентно риботиповите 027 и 014/020. Риботипот 017 покажа резистентност кон клиндамицин во 100%, следено со риботипот 001/072 каде резистентноста беше 87,5%. Интермедиерна осетливост од 80% имаа риботиповите 014/020 и 027. Во групата на други риботипови согледано беше дека по 21,7% имаа интермедиерна осетливост односно резистентност на клиндамицин (Табела 21).

Осетливост на еритромицин – кај риботипот 002 анализата покажа на 100% осетливост кон еритромицин, следено со риботипот 014/020 со осетливост од 90% и групата на други риботипови со осетливост од 76,3%. Резистентност од 100% кон еритромицин беше согледана кај риботиповите 017 и 027, а резистентност од 87,5% беше детектирана кај риботипот 001/072. Резистенција кон еритромицин од 10% имаше кај риботипот 014/020 и кај 21,7% од групата други риботипови. Интермедиерна осетливост не беше регистрирана кај ниеден од анализираните риботипови од изолатите на *C. difficile* во нашето истражување (Табела 22).

Табела 22. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на еритромицин

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	интермедиерен	
Еритромицин					
Риботипови	001/072	Број	4	28	-
		%	12,50%	87,50%	-
	014/020	Број	9	1	-
		%	90%	10%	-
	002	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	017	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	027	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	¹други	Број	18	5	-
		%	78,26%	21,74%	-
	Вкупно	Број	36	44	-
		%	45%	55%	-
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Осетливост на имипенем – анализата покажа дека само три од анализираниите риботипови на *C. difficile* покажаа осетливост на имипенем. Во групата на други риботипови осетливоста беше 47,8% следено со 40% кај риботипот 014/020 и 18,7% кај риботипот 001/072. Резистенција на имипенем од 100% покажа риботипот 017. Резистенција од 80% vs. 60% и интермедиерна осетливост од 20% vs. 40% беше согледана консеквентно кај риботипот 027 vs. 002 (Табела 23).

Табела 23. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на имипенем

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	интермедиерен	
Импенем					
Риботипови	001/072	Број	6	23	3
		%	18,75%	71,88%	9,38%
	014/020	Број	4	3	3
		%	40%	30%	30%
	002	Број	-	3	2
		%	-	60%	40%
	017	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	027	Број	-	4	1
		%	-	80%	20%
	¹ други	Број	11	8	4
		%	47,83%	34,78%	17,39%
	Вкупно	Број	21	46	13
		%	26,25%	57,5%	16,25%
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Табела 24. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на ципрофлоксацин

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	Интермедиерен	
Ципрофлоксацин					
Риботипови	001/072	Број	-	32	-
		%	-	100%	-
	014/020	Број	-	10	-
		%	-	100%	-
	002	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	017	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	027	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	¹ други	Број	-	23	-
		%	-	100%	-
	Вкупно	Број	-	80	-
		%	-	100%	-
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Осетливост на ципрофлоксацин – сите анализирани риботипови на *C.difficile*, покажаа резистентност на ципрофлоксацин. (Табела 24).

Табела 25. Осетливост на риботиповите на *C. difficile* на моксифлоксацин

<i>C. difficile</i>		Осетливост			
		осетлив	резистентен	Интермедиерен	
Моксифлоксацин					
Риботипови	001/072	Број	6	26	-
		%	18,75%	81,25%	-
	014/020	Број	9	1	-
		%	90%	10%	-
	002	Број	4	-	1
		%	80%	-	20%
	017	Број	1	4	-
		%	20%	80%	-
	027	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	¹ други	Број	23	-	-
		%	100%	-	-
Вкупно	Број	43	36	1	
	%	53,75%	45%	1,25%	
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Осетливост на моксифлоксацин – забележлива осетливост на моксифлоксацин покажа групата на други риботипови и тоа од 100%. Риботипот 014/020 беше со осетливост од 90% и резистентност од 10% додека риботипот 002 беше со осетливост од 80% и интермедиерна осетливост од 20%. Резистенција на моксифлоксацин од 100% покажа риботипот 027, следено со резистенција од 81,2% кај риботипот 001/072 и од 80% кај риботипот 017 (Табела 25).

6.4.2 Индивидуална антибиотска осетливост на селектирани риботипови на *C. difficile*

Во рамките на истражувањето беше направена анализа на индивидуалната антибиотска осетливост на секој од селектираните шест риботипови на *C. difficile*.

Табела 26. Антибиотска осетливост на риботипот 001/072 на *C. difficile*

<i>C. difficile</i>			Осетливост		
			Осетлив	резистентен	интермедиерен
Риботип - 001/072	Ванкомицин	Број	32	-	-
		%	100%	-	-
	Метронидазол	Број	32	-	-
		%	100%	-	-
	Тетрациклин	Број	32	-	-
		%	100%	-	-
	Клиндамицин	Број	2	28	2
		%	6,25%	87,50%	6,25%
	Еритромицин	Број	4	28	-
		%	12,50%	87,50%	-
	Имипенем	Број	6	23	3
		%	18,75%	71,88%	9,38%
	Ципрофлоксацин	Број	-	32	-
		%	-	100%	-
	Моксифлоксацин	Број	6	26	-
		%	18,75%	81,25%	-

Риботипот 001/072 покажа 100% осетливост на ванкомицин, метронидазол и тетрациклин, додека кон останатите антибиотици постоеше резистентност која се движеше од 71,9% на имипенем, 81,2% на моксифлоксацин, по 87,5% на клиндамицин и еритромицин. Резистентност на риботипот 001/0072 од 100% беше регистрирана кон ципрофлоксацин (Табела 26 и График 15).

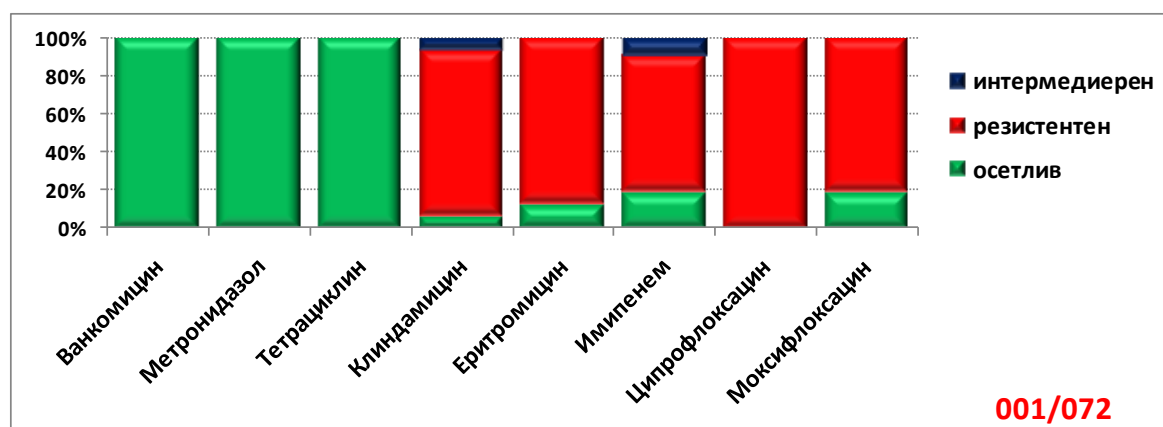


График 15. Антибиотска осетливост на риботипот 001/072 на *C. difficile*

Риботипот 014/020 на *C. difficile*, покажа осетливост на ванкомицин, метронидазол и тетрациклин од 100%, и на еритромицин и моксифлоксацин од 90%. Значајна резистентност постоеше само кон ципрофлоксацин 100%. За

имипенем постоеше осетливост од 40% со резистенцијата односно интермедиерната осетливост со по 30%. Кај клиндамицинот беше регистрирана висока интермедиерна осетливост од 80% (Табела 27 и График 16).

Табела 27. Антибиотска осетливост на риботипот 014/020 на *C. difficile*

<i>C. difficile</i>			Осетливост		
			осетлив	резистентен	интермедиерен
Риботип – 014/020	Ванкомицин	Број	10	-	-
		%	100%	-	-
	Метронидазол	Број	10	-	-
		%	100%	-	-
	Тетрациклин	Број	10	-	-
		%	100%	-	-
	Клиндамицин	Број	1	1	8
		%	10%	10%	80%
	Еритромицин	Број	9	1	-
		%	90%	10%	-
	Имипенем	Број	4	3	3
		%	40%	30%	30%
	Ципрофлоксацин	Број	-	10	-
		%	-	100%	-
Моксифлоксацин	Број	9	1	-	
	%	90%	10%	-	

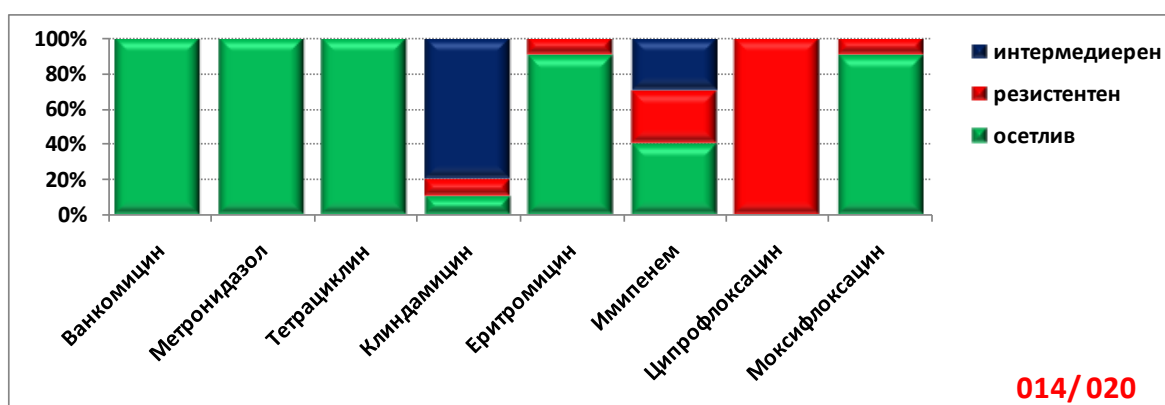


График 16. Антибиотска осетливост на риботипот 014/020 на *C. difficile*

Риботипот 002 на *C. difficile*, покажа 100% осетливост на ванкомицин, метронидазол, тетрациклин и еритромицин. Осетливоста кон моксифлоксацин и клиндамицин изнесуваше консеквентно 80% vs. 60%, со соодветна интермедиерна осетливост 20% vs. 40%. Резистентност кон риботипот 002, беше регистрирана кон ципрофлоксацинот од 100% и имипенем од 60%. Интермедиерна осетливост од по 40% беше регистрирана кон клиндамицин и имипенем (Табела 28 и График 17).

Табела 28. Антибиотска осетливост на риботипот 002 на *C. difficile*

<i>C. difficile</i>			Осетливост		
			осетлив	резистентен	интермедиерен
Риботип – 002	Ванкомицин	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Метронидазол	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Тетрациклин	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Клиндамицин	Број	3	-	2
		%	60%	-	40%
	Еритромицин	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Имипенем	Број	-	3	2
		%	-	60%	40%
	Ципрофлоксацин	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	Моксифлоксацин	Број	4	-	1
		%	80%	-	20%

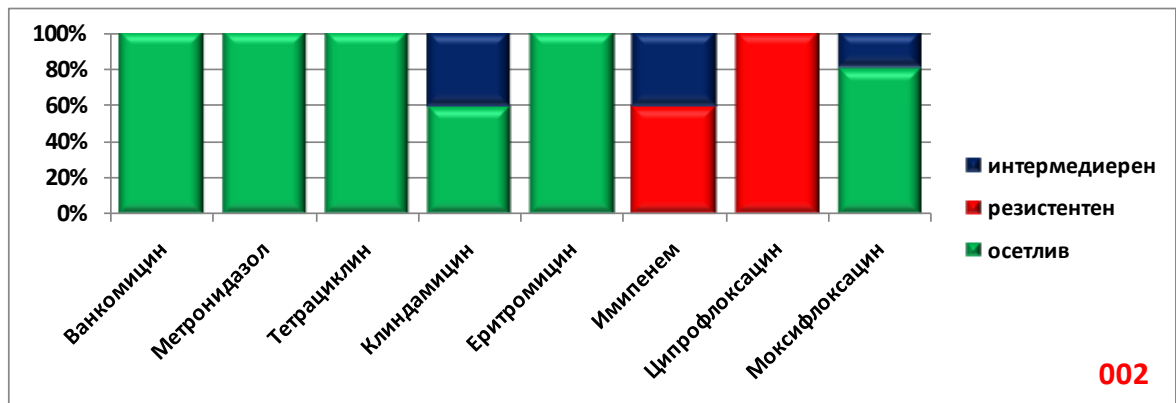


График 17. Антибиотска осетливост на риботипот 002 на *C. difficile*

Риботипот 017 на *C. difficile*, покажа осетливост на ванкомицин и метронидазол од 100%. Осетливост од 40% во комбинација со интермедиерна осетливост од 60% беше утврдена кон тетрациклинот. Анализата на антибиотската осетливост на риботипот 017 покажа 100% резистентност на 4 од испитуваните антибиотици и тоа клиндамицин, еритромицин, имипенем, и ципрофлоксацин. За моксифлоксацин резистенцијата изнесуваше 80%, со осетливост од 20% (Табела 29 и График 18).

Табела 29. Антибиотска осетливост на риботипот 017 на *C. difficile*

<i>C. difficile</i>			Осетливост		
			осетлив	резистентен	интермедиерен
Риботип – 017	Ванкомицин	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Метронидазол	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Тетрациклин	Број	2	-	3
		%	40%	-	60%
	Клиндамицин	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	Еритромицин	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	Имипенем	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	Ципрофлоксацин	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	Моксифлоксацин	Број	1	4	-
		%	20%	80%	-

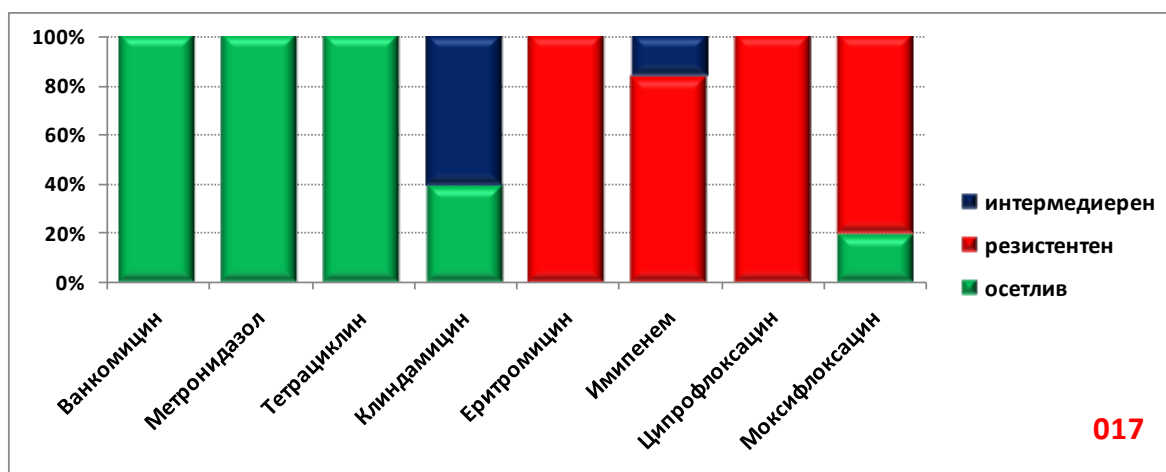


График 18. Антибиотска осетливост на риботипот 017 на *C. difficile*

Риботипот 027 на *C. difficile*, покажа 100% осетливост на ванкомицин, метронидазол, и тетрациклин. Осетливоста на риботипот 027 кон клиндамицин беше 20%, со 80% на интермедиерна осетливост. Резистентност од 100% беше регистрирана кон еритромицин, ципрофлоксацин и моксифлоксацин. Кај имипенемот резистенцијата беше 80% со 20% на интермедиерна осетливост (Табела 30 и График 19).

Табела 30. Антибиотска осетливост на риботипот 027 на *C. difficile*

<i>C. difficile</i>			Осетливост		
			осетлив	резистентен	интермедиерен
Риботип – 027	Ванкомицин	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Метронидазол	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Тетрациклин	Број	5	-	-
		%	100%	-	-
	Клиндамицин	Број	1	-	4
		%	20%	-	80%
	Еритромицин	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
	Имипенем	Број	-	4	1
		%	-	80%	20%
	Ципрофлоксацин	Број	-	5	-
		%	-	100%	-
Моксифлоксацин	Број	-	5	-	
	%	-	100%	-	

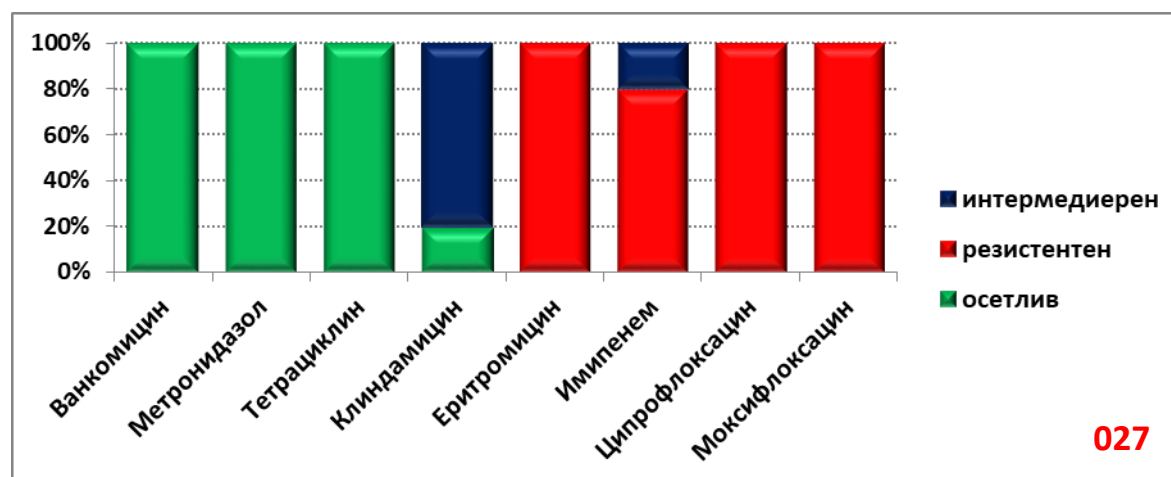


График 19. Антибиотска осетливост на риботипот 027 на *C. difficile*

Групата на други риботипови на *C. difficile*, покажа 100% осетливост на ванкомицин, метронидазол и моксифлоксацин. Нешто помала осетливост и тоа 95,6% беше регистрирана на тетрациклин и од 78,3% на еритромицин. Резистентност од 100% беше регистрирана само кон ципрофлоксацин (Табела 31 и График 20).

Табела 31. Антибиотска осетливост на групата на “други“ риботипови на *C. difficile*

<i>C. difficile</i>			Осетливост		
			осетлив	резистентен	интермедиерен
Риботип – ¹ други	Ванкомицин	Број	23	-	-
		%	100%	-	-
	Метронидазол	Број	23	-	-
		%	100%	-	-
	Тетрациклин	Број	22	1	-
		%	95,65%	4,35%	-
	Клиндамицин	Број	13	5	5
		%	56,52%	21,74%	21,74%
	Еритромицин	Број	18	5	-
		%	78,26%	21,74%	-
	Импипенем	Број	11	8	4
		%	47,83%	34,78%	17,39%
	Ципрофлоксацин	Број	-	23	-
		%	-	100%	-
	Моксифлоксацин	Број	23	-	-
		%	100%	-	-
¹ други= 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187					

Графичкиот приказ на антибиотската осетливост на групата “други“ риботипови на *C. difficile*, кон осумте анализирани антибиотици е даден на График 20.

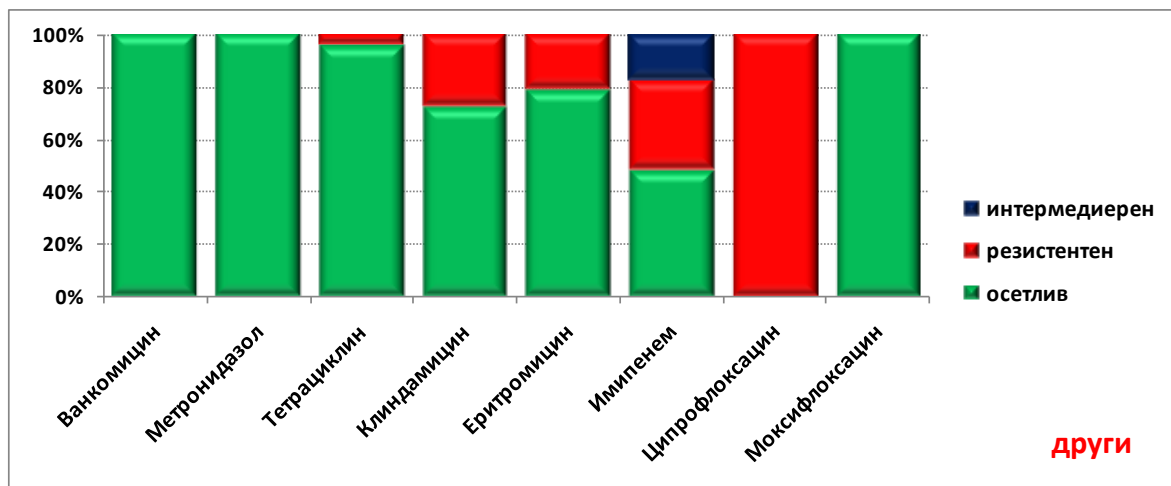


График 20. Антибиотска осетливост на групата “други“ риботипови на *C. difficile*

6.4.3 Антибиотска осетливост на селектирани риботипови на *C. difficile* според место на земање на фекалниот примерок

Во рамките на истражувањето беше направено групирање на шестте риботипови на *C. difficile* во две групи и тоа: а) доминантни во кои беше вклучен 001/072 и б) останати риботипови (014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187 (Табела 32-39). Како места на земање на примероците беа

обработени веќе споменатите 5 места и тоа четирите клиници (хируршки, интерни, детска и инфективна) и ПЗУ и останатите.

Ванкомицин и метронидазол

Анализата покажа дека и риботипот 001/072 и групата на останати риботипови имаат максимална осетливост од 100% на ванкомицин и на метронидазол на сите места од каде се земено фекалниот примерок (Табела 32-33).

Табела 32. Анализа на осетливост на риботип 001/ 072 на *C. difficile* на ванкомицин според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Ванкомицин					
		001/ 072			1Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	16	-	-	6	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Интерни клиници	Број	13	-	-	18	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Клиника за детски болести	Број	1	-	-	6	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Инфективна клиника	Број	2	-	-	8	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	10	-	-
	%	-	-	-	100%	-	-
Вкупно	Број	32	-	-	48	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Табела 33. Анализа на осетливост на *C.difficile* риботип 001/ 072 на метронидазол според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Метронидазол					
		001/ 072			1Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	16	-	-	6	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Интерни клиници	Број	13	-	-	18	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Клиника за детски болести	Број	1	-	-	6	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Инфективна клиника	Број	2	-	-	8	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	10	-	-
	%	-	-	-	100%	-	-
Вкупно	Број	32	-	-	48	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Тетрациклин

Во однос на осетливоста на тетрациклин, **риботипот 001/072** покажа осетливост од 100% независно од клиниката од која е испратен примерокот (хируршки, интерни, инфективна и детска). Овој риботип не беше детектиран во ниеден од изолатите на *C. difficile* од ПЗУ и останатите места (Табела 35).

Анализата на осетливоста на групата на **останати риботипови** на тетрациклин, според местото од каде се земени фекалните примероци, покажа дека осетливоста е 100% на клиниката за детски болести и инфективната клиника, следено со интерните клиника каде осетливоста изнесуваше 94,4% и ПЗУ и останатите каде осетливоста беше 90% (Табела 34). Резистентност на тетрациклин од 16,1% беше утврдена во изолатите на *C. difficile* добиени од примероци од хируршките клиници.

Табела 34. Анализа на осетливост на *C. difficile* риботип 001/ 072 на тетрациклин според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Тетрациклин					
		001/ 072			¹ Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	16	-	-	4	1	1
	%	100%	-	-	66,7%	16,1%	16,1%
Интерни клиници	Број	13	-	-	17	-	1
	%	100%	-	-	94,4%	-	5,6%
Клиника за детски болести	Број	1	-	-	6	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
Инфективна клиника	Број	2	-	-	8	-	-
	%	100%	-	-	100%	-	-
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	9	-	1
	%	-	-	-	90%	-	10%
Вкупно	Број	32	-	-	44	1	3
	%	100%	-	-	91,7%	2,1%	6,2%

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Клиндамицин

Генерално не беше согледана осетливост на **риботипот 001/072** кон клиндамицин освен минимална од 12,5% кај изолатите на *C.difficile* добиени од хируршките клиници (Табела 35). Резистентност од 100% беше регистрирана кај изолатите од примероците од детската и инфективната клиника, следено со 92,3% кај тие од интерните клиници и 81,2% на изолатите од хируршките клиници. Застапеноста на интермедиерната осетливост беше незначителна.

Анализата на осетливоста на групата на **останати риботипови** на *C.difficile* на клиндамицин, според местото од каде се земени фекалните примероци, покажа дека максималната регистрирана осетливост беше 66,7% и тоа кај изолатите

пратени од детската клиника, следено со осетливост од 50% кај ПЗУ и 44,4% кај изолатите од инфективната клиника (Табела 35). Најголема резистенција на групата на останати риботипови на клиндамицин беше регистрирана во изолатите од хируршките клиници и тоа од 66,7%. Впечатлив е висок процент на интермедиерна осетливост на оваа група на риботипови кој изнесува 87,5% кај изолатите пратени од инфективната клиника следено со 30% vs. 33,3% vs. 33,3% во изолатите од консеквентно ПЗУ vs. клиника за детски болести vs. интерни клиници.

Табела 35. Анализа на осетливост на *C. difficile* риботип 001/ 072 на клиндамицин според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Клиндамицин					
		001/ 072			¹ Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	2	13	1	1	4	1
	%	12,5%	81,2%	6,2%	16,7%	66,7%	16,7%
Интерни клиници	Број	-	12	1	8	4	6
	%	-	92,3%	7,7%	44,4%	22,2%	33,3%
Клиника за детски болести	Број	-	1	-	4	-	2
	%	-	100%	-	66,7%	-	33,3%
Инфективна клиника	Број	-	2	-	-	1	7
	%	-	100%	-	-	12,5%	87,5%
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	5	2	3
	%	-	-	-	50%	20%	30%
Вкупно	Број	2	28	2	18	11	19
	%	6,2%	87,5%	6,2%	37,5%	22,9%	39,6%

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Еритромицин

Анализата покажа минимална осетливост на **риботипот 001/072** кон еритромицинот од 18,8% кај изолатите добиени од хируршките клиници (Табела 36). Резистентност од 100% на овој риботип кон еритромицинот беше добиена кај примероците од детската и инфективната клиника, следено со 92,3% кај изолатите од интерните клиници и 81,2% на изолатите на *C. difficile* од хируршките клиници. Интермедиерна осетливост не беше регистрирана.

Осетливоста на еритромицин на групата на **останати риботипови**, според местото од каде се зема фекалниот примерок покажа дека таа изнесуваше 100% кај изолатите добиени од детската клиника, следено со осетливост од 87,5% кај тие од инфективната клиника, 70% кај тие од ПЗУ и 55,6% кај изолатите добиени од интерните клиници (Табела 36). Најголема резистенција на групата на останати риботипови на еритромицин беше регистрирана во изолатите од хируршките клиници и тоа 66,7%, следено со 44,4% кај тие од интерните клиници и 30% кај тие со потекло од ПЗУ. Во групата на останати риботипови не беше регистрирана интермедиерна осетливост на еритромицин.

Табела 36. Анализа на осетливост на *C. difficile* риботип 001/ 072 на еритромицин според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Еритромицин					
		001/ 072			Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	3	13	-	2	4	-
	%	18,8%	81,2%	-	33,3%	66,7%	-
Интерни клиници	Број	1	12	-	10	8	-
	%	7,7%	92,3%	-	55,6%	44,4%	-
Клиника за детски болести	Број	-	1	-	6	-	-
	%	-	100%	-	100%	-	-
Инфективна клиника	Број	-	2	-	7	1	-
	%	-	100%	-	87,5%	12,5%	-
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	7	3	-
	%	-	-	-	70%	30%	-
Вкупно	Број	4	28	-	32	16	-
	%	12,5%	87,5%	-	66,7%	33,3%	-

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Импипенем

Во однос на осетливоста на имипенем, **риботипот 001/072** покажа резистентност од 100% кај изолатите на *C.difficile* добиени од детската клиника, следено со 81,2% кај тие со потекло од хируршките клиници, 61,5% кај тие од интерните клиници и 50% кај тие од инфективната клиника. Најголема осетливост на имипенем, риботипот 001/072 покажа кај изолатите добиени од инфективната клиника. Интермедиерната осетливост на овој риботип на имипенем е незначителна (Табела 37).

Анализата на осетливоста на групата на **останати риботипови** на имипенем, според местото од каде се земени фекалните примероци, покажа дека максималната осетливост изнесуваше 62,5% на клиниката за инфективни болести, следено со 50% кај ПЗУ и останатите (Табела 37). Резистентност на имипенем од 100% беше утврдена во изолатите на *C. difficile* добиени од примероци од хируршките клиници, следено со 50,6% кај изолатите од интерните клиници и 40% кај ПЗУ и останати. Интермедиерна осетливост од 50% беше согледана во изолатите добиени од детската клиника, додека кај инфективната и интерните клиници утврдената интермедиерна осетливост изнесуваше консеквентно 25% vs. 22,2%.

Табела 37. Анализа на осетливост на *C. difficile* риботип 001/ 072 на имипенем според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Импенем					
		001/ 072			¹Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	2	13	1	-	6	-
	%	12,5%	81,2%	6,2%	-	100%	-
Интерни клиници	Број	3	8	2	4	10	4
	%	23,1%	61,5%	15,4%	22,2%	55,6%	22,2%
Клиника за детски болести	Број	-	1	-	1	2	3
	%	-	100%	-	16,7%	33,3%	50%
Инфективна клиника	Број	1	1	-	5	1	2
	%	50%	50%	-	62,5%	12,5%	25%
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	5	4	1
	%	-	-	-	50,0%	40%	10%
Вкупно	Број	6	23	3	15	23	10
	%	18,8%	71,9%	9,4%	31,2%	47,9%	20,8%

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Ципрофлоксацин

Анализата покажа дека и риботипот 001/072 и групата на останати риботипови имаат максимална резистентност од 100% на ципрофлоксацин на сите места од каде се земени примероците (Табела 38).

Табела 38. Анализа на осетливост на *C. difficile* риботип 001/ 072 на ципрофлоксацин според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Ципрофлоксацин					
		001/ 072			¹Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	-	16	-	-	6	-
	%	-	100%	-	-	100%	-
Интерни клиници	Број	-	13	-	-	18	-
	%	-	100%	-	-	100%	-
Клиника за детски болести	Број	-	1	-	-	6	-
	%	-	100%	-	-	100%	-
Инфективна клиника	Број	-	2	-	-	8	-
	%	-	100%	-	-	100%	-
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	-	10	-
	%	-	-	-	-	100%	-
Вкупно	Број	-	32	-	-	48	-
	%	-	100%	-	-	100%	-

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

Моксифлоксацин

Во однос на осетливоста на моксифлоксацин, **риботипот 001/072** покажа резистентност од 100% во изолатите со потекло од детската и инфективната клиника, следено со 81,2% кај тие од хируршките клиници и 76,9% кај тие од интерните клиници. Осетливоста на риботипот 001/072 на моксифлоксацин е незначителна и споредбено помеѓу сите клиници таа е најголема кај изолатите од интерните клиници и изнесува 23,1%. Анализата не покажа постоење на интермедиерна осетливост на овој риботип кон моксифлоксацин (Табела 39).

Осетливоста на моксифлоксацин на групата на **останати риботипови**, според местото од каде се земени фекалните примероци, покажа дека таа изнесуваше 100% кај изолатите добиени од детската и инфективната клиника, следено со осетливост од 90% кај тие од ПЗУ, 66,7% кај тие од хируршките клиници и 55,6% кај изолатите од интерните клиници (Табела 39). Најголема резистенција на групата на останати риботипови на моксифлоксацин беше регистрирана во изолатите од интерните и хируршките клиници за консеквентно 38,9% vs. 33,3%. Во групата на останати риботипови беше регистрирана незначителна интермедиерна осетливост на еритромицин.

Табела 39. Анализа на осетливост на *C.difficile* риботип 001/ 072 на моксифлоксацин според место на земање на фекалниот примерок

Место на земање на примерокот		Моксифлоксацин					
		001/ 072			¹Останати		
		осетлив	резистентен	интермеди.	осетлив	резистентен	интермеди.
Хируршки клиници	Број	3	13	-	4	2	-
	%	18,8%	81,2%	-	66,7%	33,3%	-
Интерни клиници	Број	3	10	-	10	7	1
	%	23,1%	76,9%	-	55,6%	38,9%	5,6%
Клиника за детски болести	Број	-	1	-	6	-	-
	%	-	100%	-	100%	-	-
Инфективна клиника	Број	-	2	-	8	-	-
	%	-	100%	-	100%	-	-
ПЗУ и останати	Број	-	-	-	9	1	-
	%	-	-	-	90%	10%	-
Вкупно	Број	6	26	-	37	10	1
	%	18,8%	81,2%	-	77,1%	20,8%	2,1%

¹останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187

6.4.4. Поврзаност на селектирани риботипови од изолатите на *C. difficile* со нивната антибиотска осетливост

Во овој дел беше анализирана поврзаноста (непараметарска корелација) помеѓу две групи на риботипови детектирани во изолатите на *C. difficile* и нивната антибиотска осетливост кон осум антибиотици (Табела 40). Поделбата на риботиповите беше во две групи и тоа: а) доминантни во кои беше вклучен 001/072 и б) останати риботипови (014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015,

023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187).

Анализата укажа на постоење на сигнификантна јака негативна линеарна корелација помеѓу групата на која и припаѓа риботипот и антибиотската осетливост кон еритромицин односно моксифлоксацин за консеквентно Spearman Rank Order Correlations: $R=-0,5334$; $p=0,000001$ vs. Spearman Rank Order Correlations : $R=-0,5554$; $p=0,000001$ (Табела 40 и График 22). Осетливоста на еритромицин односно моксифлоксацин сигнификантно се зголемува со припадноста на риботипот во групата на други риботипови т.е. таа се намалува во изолатите каде е детектиран риботипот 001/072.

Табела 40. Непараметарска корелација помеѓу риботипови и антибиотска осетливост

Sperman Rank Order Correlation				
Риботип	Вид на антибиотик	Број (N)	Sperman R	P
001/072 и група 1останати	ванкомицин	80	-	-
	метронидазол	80	-	-
	тетравиклин	80	0,187271	0,096234
	клиндамицин	80	0,017971	0,874282
	еритромицин	80	-0,533396	0,000001*
	имипенем	80	-0,019298	0,865085
	ципрофлоксацин	80	-	-
	моксифлоксацин	80	-0,553641	0,000001*
*сигнификантно за $p<0,05$ 1останати=014/020, 002, 017, 027, 003, 005, 012, 015, 023, 046, 070, 255/258, SLO 046, SLO 047, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187				

Корелацијата помеѓу групата на која и припаѓа риботипот и антибиотската осетливост кон 3 антибиотици (ванкомицин, метронидазол и ципрофлоксацин) не се прикажани. Ова е поради тоа што осетливоста кон ванкомицин и метронидазол на двата риботипа е 100%, додека кон ципрофлоксацинот двете групи на риботипови покажуваат 100% резистентност (Табела 40 и График 21).

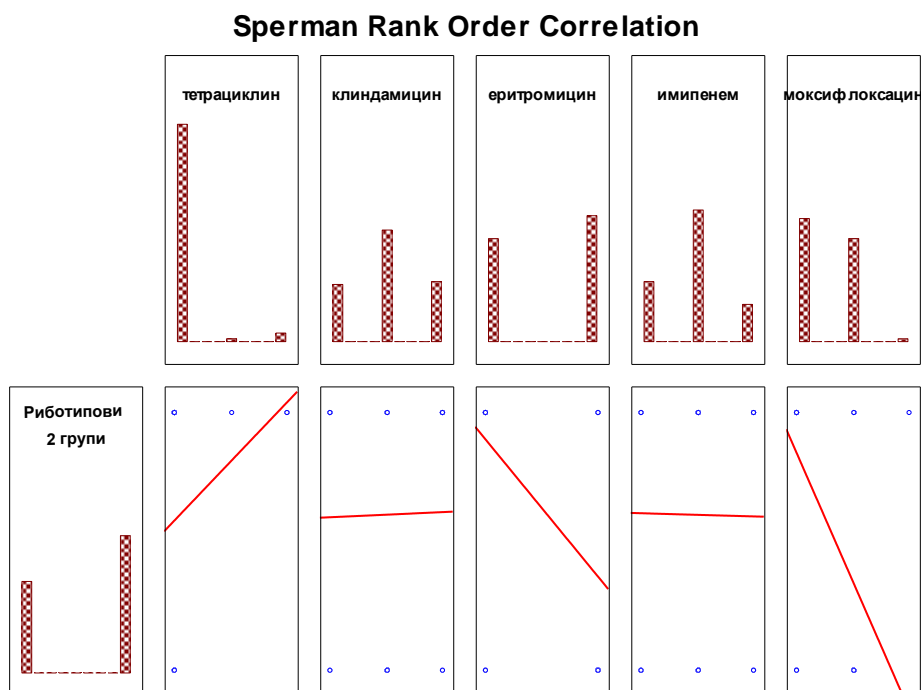


График 21. Непараметарска корелација помеѓу риботипови и антибиотска осетливост

За $p > 0,05$, утврдена беше незначителна позитивна корелација помеѓу двете групи риботипови и осетливоста кон тетрациклин односно клиндамицин. Со припадноста на риботипот во групата на други риботипови несигнификантно се намалува осетливоста кон тетрациклин и клиндамицин (Табела 40 и График 21).

За $p > 0,05$, утврдена беше незначителна негативна корелација помеѓу двете групи риботипови и осетливоста кон имипенем. Со припадноста на риботипот во групата на други риботипови несигнификантно се зголемува осетливоста кон имипенем (Табела 40 и График 21).

6.4.5. Поврзаност на возраста со антибиотската осетливост

Во овој дел беше анализирана поврзаноста (непараметарска корелацијата) помеѓу возраста на пациентите од кои се добиени изолатите на *C. difficile* и антибиотската осетливост кон осум антибиотици (Табела 41).

Анализата укажа на постоење на несигнификантна слаба позитивна линеарна корелација помеѓу возраста на пациентот и антибиотската осетливост кон пет селектирани антибиотици и тоа:

- а) тетрациклин - Spearman Rank Order Correlations: $R=0,5294$; $p=0,6409$;
- б) клиндамицин - Spearman Rank Order Correlations: $R=0,1532$; $p=0,1748$;
- в) еритромицин - Spearman Rank Order Correlations: $R=0,1807$; $p=0,1087$;
- г) имипенем - Spearman Rank Order Correlations: $R=0,1124$; $p=0,3208$;
- д) моксифлоксацин - Spearman Rank Order Correlations: $R=0,1797$; $p=0,1108$.

Со зголемување на возраста на пациентите несигнификантно се намалува осетливоста кон антибиотиците.

Табела 41. Непараметарска корелација помеѓу возраста и антибиотската осетливост

Sperman Rank Order Correlation				
Возраст	Вид на антибиотик	Број (N)	Sperman R	P
Години	ванкомицин	80	-	-
	метронидазол	80	-	-
	тетрациклин	80	0,052943	0,640921
	клиндамицин	80	0,153215	0,174826
	еритромицин	80	0,180696	0,108716
	имипенем	80	0,112408	0,320839
	ципрофлоксацин	80	-	-
	моксифлоксацин	80	0,179659	0,110794

*сигнификантно за $p < 0,05$

Корелацијата помеѓу возраста на пациентите и антибиотската осетливост кон 3 антибиотици (ванкомицин, метронидазол и ципрофлоксацин) не се прикажани. Ова е поради тоа што осетливоста кон ванкомицин и метронидазол е 100%, додека кон ципрофлоксацинот утврдена беше резистентност од 100% (Табела 41 и График 22).

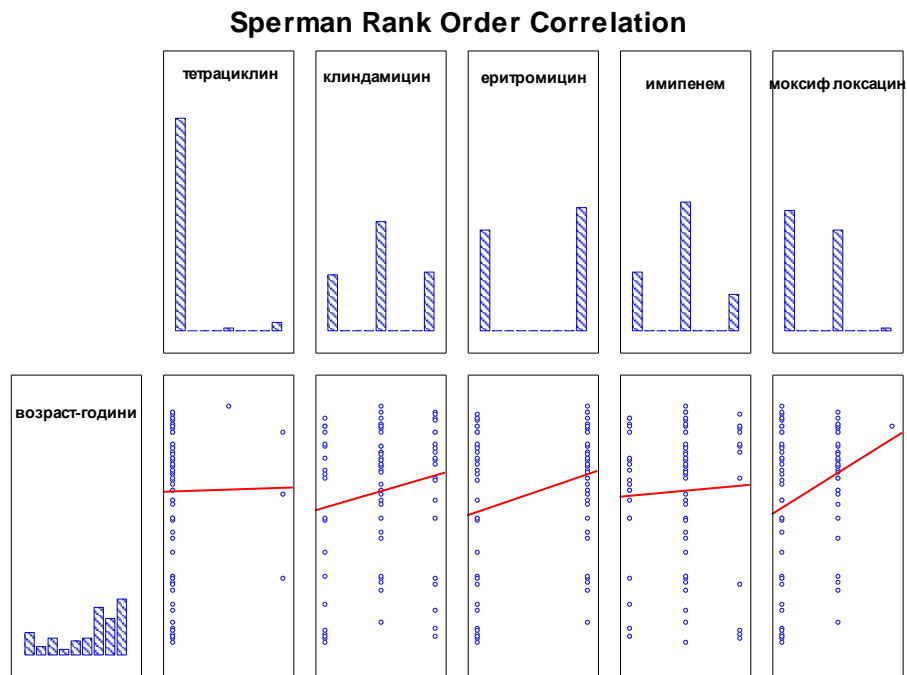


График 22. Непараметарска корелација помеѓу возраста и антибиотската осетливост

7. Дискусија

7.1 Застапеност

Clostridioides difficile е еден од најзначајните интрахоспитални патогени и инфекциите предизвикани од него се во постојан пораст. Во многу студии од понов датум се посочени и случаи на инфекции со *C. difficile* во општата популација (346). Оваа бактерија сепак честопати може да се изолира и од здрави луѓе како колонизатор. Од многу оддамна постои дискусија околу критериумите кои одредуваат кога *C. difficile* е колонизатор, а кога предизвикувач на инфекцијата, како и најоптималниот начин тоа лабораториски да се докаже (345).

Она што најпрво може да се согледа во нашата студија е дека процентот на застапеност на *C. difficile* во испитаните примероци е 13% и е нешто повеќе од очекуваните 8/9 % проценти кои беа добиени во претходни студии работени на истата популација (340). Со оглед на тоа што токсините на *C. difficile* беа докажани во 12,1% од истите примероци, може да се каже дека тоа е процентот на застапеност на CDI. Ова не може да се протолкува како зголемување на застапеноста на CDI во нашата земја во однос на претходните пет години (340) од едноставна причина што во многу студии (341) како главна причина за недијагностицирање на епизода на CDI е недоволната свесност кај клиничарите за развојот на оваа инфекција што резултира со нејзино субдијагностицирање.

Во оваа студија не е застапен пропорционален сооднос помеѓу бројот на испратени примероци од суспектни пациенти за CDI, со бројот на добиени изолати кои го сочинуваат примерокот за анализа во однос на тоа од која од петте дефинирани групи на клиници и амбуланти потекнуваат. Причината за ова може да биде и фактот што на тие клиници (Клиниката за инфективни болести и фебрилни состојби и Клиниката за детски болести) од кои потекнуваат најголем дел од примероците (но не и изолатите) се значително почести дијареални синдроми со поинаква етиологија и во такви услови клиничарите се принудени да праќаат примерок со цел исклучување на CDI. Сепак големата разлика во процентите на изолација на *C. difficile* од испратените примероци од Клиниката за инфективни болести (2,3%) и од Клиниката за детски болести (1,7%), наспроти Клиниките за хируршки болести (31,4%) укажува на одредена селективност при испраќање примероци и недоволна свесност за постоење на CDI, што резултира со субдијагностицирање на оваа инфекција.

Во Европските протоколи за дијагноза на CDI се препорачува тестирање за CDI на сите неоформени (течни) примероци фецес кои пристигнуваат во лабораториите (341) со цел лабораториски да се дијагностицираат што поголем број случаи на CDI, кои инаку би можеле да се пропуштат. Во однос на бројот на примероци кои треба да се обработат за да се потврди или отфрли CDI, се смета дека еден примерок (доколку е соодветно обработен) е доволен како за потврда, така и за исклучување на инфекција со оваа бактерија. Кај пациентите со потврдена CDI, по нивното клиничко подобрување не е потребно испраќање повторно примерок со цел да се провери дали се излекувани. Ваквата пракса не се препорачува од едноставна причина што овие пациенти може да исфрлаат спори, па дури и токсини подолг период по престанокот на дијареата, односно по излекувањето (342,345). Излекувањето се проценува клинички. Во ова испитување, согласно претходно дефинираните критериуми, од ваквите пациенти беше земаан само еден изолат.

Најголем број од изолатите на *C. difficile* потекнуваат од пациенти на клиниките за интерни болести, следени од пациентите на хируршките клиници. Со оглед на тоа што главни ризик фактори за CDI се: антибиотската терапија, подолгиот престој во болница и поодминатата возраст, овој резултат не е изненадување, од причина што сите три

фактори на ризик се присутни многу често токму на наведените клиници. Најмал број изолати потекнуваат од клиниката за детски болести. И покрај тоа што кај децата под три години во многу трудови е докажана колонизација како со токсични, така и со нетоксични соеви на *C.difficile*, се смета дека оваа возрасна група исклучително ретко развива CDI (343, 344). Во ова испитување не беше изолиран ниту еден сој на *C. difficile* од новороденчиња. Според најновите препораки на ESCMID (345), возрасната група под 3 години е исклучена од протоколите за тестирање на сите течни фекални примероци за CDI кои пристигнуваат во лабораториите. Ова тестирање кај оваа група на пациенти се препорачува да се изведува само по барање на клиничар.

Во однос на другите возрасни групи како што и се очекуваше најголем број изолати потекнуваат од возрасната група меѓу 61 и 70 год (23) и од возрасната група над 70 години (22). Според ова, 45/80 (56,25%) од тие пациенти беа на возраст над 60 години. Сепак мислењето дека инфекцијата со *C. difficile* е единствено болест на постарите е погрешен. Во некои студии (346) се посочува дека посебно кај помлади и нехоспитализирани пациенти голем број епизоди на CDI остануваат недијагностицирани единствено поради отсуство на сомневање за болеста. Во однос на полот на пациентите од кои потекнуваат изолатите на *C.difficile* не беше најдена статистичка сигнификантност, што значи дека припадноста кон одреден пол не е ризик фактор за колонизација или инфекција со оваа бактерија.

7.2 Токсичност

Иако статистичката анализа укажа на висок коефициент на совпаѓање ($\kappa=0,693$) во однос на тоа дали се користи примерокот фецес за докажување на токсините А и Б или тие се докажуваат од културата и разликата во резултатите не беше статистички сигнификантна ($p=0,1578$), се забележува дека процентот на докажани токсини од културата е поголем отколку процентот на докажани токсини директно во фекалните примероци од кои потекнуваат изолатите. Ова ја наметнува дилемата колку култивирањето во рутинската дијагностичка пракса е неопходно за докажување на CDI и избегнување лажно негативни резултати. Оваа дилема дополнително ја зголемува и тоа што во голем број студии како референтни тестови за докажување на токсините се наведуваат два теста: одредување /неутрализација на цитотоксичност на клеточна култура (Cell cytotoxicity neutralization assay -CCNA) и токсикогена култура (toxigenic culture -TC)(345).

Со првиот тест (CCNA) се испитува присуство на слободен токсин Б. За таа цел филтрат од фецесот се инокуира на еднослојна клеточна култура, која потоа се обсервира со цел да се забележи цитопатогениот ефект (заоблување на клетките). Цитопатогениот ефект се евалуира на 24 и 48 часа. Најчесто користени се Vero, HeLa и Нер-2 клеточни култури. Потоа се прави неутрализација на цитопатогениот ефект со користење на антитоксин со цел докажување на специфичноста на овој ефект. Најчесто овој тест не се користи во повеќето дијагностички лаборатории. Токсикогена култура е всушност докажување на бактеријата која е способна да продуцира токсини ин витро. По добивањето на културата, таа се користи како примерок за изведба на тестот одредување /неутрализација на цитотоксичност на клеточна култура или за имуноензимски тест за докажување на токсините А и Б или пак во неа се докажуваат гените за овие токсини со некој молекуларен тест.

Од самиот опис на овие два референтни теста може да се види дека тие се разликуваат по нивната цел, исто како и двата теста во нашата студија (имунохроматографско докажување на токсините од фецес и од култура). Едните одредуваат продукција на токсин ин vivo (CCNA, имунохроматографско одредување на токсините од примерок), додека другите (ТС, имунохроматографско одредување на токсините од култура) одредуваат присуство на токсикоген сој на *C. difficile*.

Сеуште постои дебата околу тоа кој од овие тестови е најдобро да се користи како потврда за случаите на CDI. Според една студија (347) она што вистински колерира со клиничкиот исход односно CDI е присуството на слободен токсин, односно позитивен имунохроматографски тест од примерок, а не од култура. Според тоа, сите вакви случаи би биле вистински случаи на CDI. Проблем настанува кога треба да се интерпретираат случаите со позитивен токсин докажан со имунохроматографски тест од култура, но истовремено со истата метода токсинот бил негативен од фекалниот примерок. Една опција е дека овие случаи потекнуваат од пациенти кои се носители на токсикоген сој од оваа бактерија, но во моментот не е продуциран токсин, или пак постои CDI, но нивото на токсин е под прагот на детекција.

Најголем број на дијагностички лаборатории во рутинската работа, го користат само методот на одредување на двата (или само токсинот Б) токсини директно во примерок со помош на имуноензимски или имунохроматографски тест. Голема предност тука е секако финансиската заштеда, но и брзината на добивање на резултатот од само неколку минути, што мора да се признае дека е извонредно важно кај пациенти во тешка состојба, каде што одложување на давањето на терапија од 48 часа (или пак непотребно давање на антибиотик) сигурно би ја влошило состојбата. Култивирањето секако е незаменливо во ситуација кога треба да се типизира сојот, како и да се одреди неговата антибиотска осетливост, нешто што би требало да стане задолжително во иднина со оглед на појавата на резистенција во светот на двата антибиотика кои кај нас единствено се користат како терапија на пациентите со CDI.

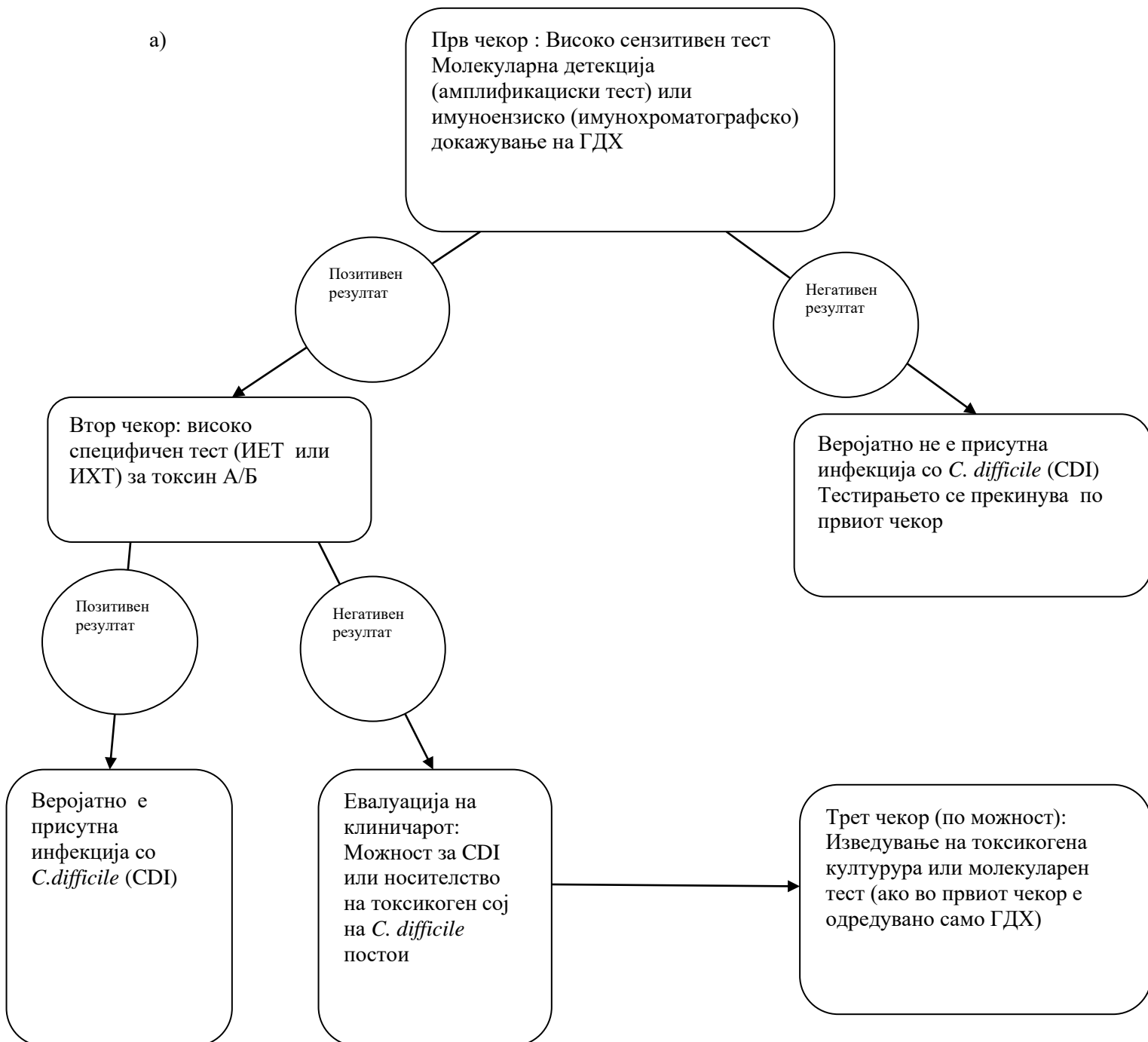
Се поставува прашањето која е всушност оптималната лабораториска процедура за дијагноза на CDI? Доколку се користи брз имунохроматографски тест, секако дека резултатот може многу полесно да се поврзе со инфекција кај пациентот, но постои реална опасност од лажно негативен резултат. Секако една од главните причини за ова е непостојаноста на токсинот во примерокот на собна температура. Докажано е дека може да настапи деградација на токсините со тек на време, и веќе по два часа дури и доколку биле присутни во примерокот, можно е да не може да се детектираат. Според една студија (348) оние фекални примероци кои не можеле веднаш да се обработат (најдобра опција), би требало да се чуваат на +4°C, односно во фрижидер. Чување на примероците во замрзнувач исто така не се препорачува, со оглед на тоа што исто така е докажана значителна деградација на токсините, посебно кај течните примероци. Во секој случај, за најголем број примероци кои доаѓаат од клиниките не се знае точно времето на земање и според тоа дури и најпрописна обработка или чување на овие примероци не би можела да го исклучи добивањето на лажно негативни резултати.

Без разлика на видот на тестот кој се користи, единечен тест за дијагноза не се препорачува. Доколку се користат поединечно молекуларни тестови или имуноензимски (имунохроматографски) тестови за детекција на ГДХ, во тој случај не е можно да се разграничи носителство на *C. difficile* (дури и ако станува збор за токсикоген сој) од CDI. Неправилно би било носење заклучоци дали станува збор за носителство на оваа бактерија или инфекција со истата врз основа на следењето на клиничката состојба на пациентот, како на пример присуство на дијареа. Кај овие пациенти постои можност дијареата да е со поинаква етиологија, и не постои таков специфичен симптом со кој со сигурност би се заклучило присуство на CDI.

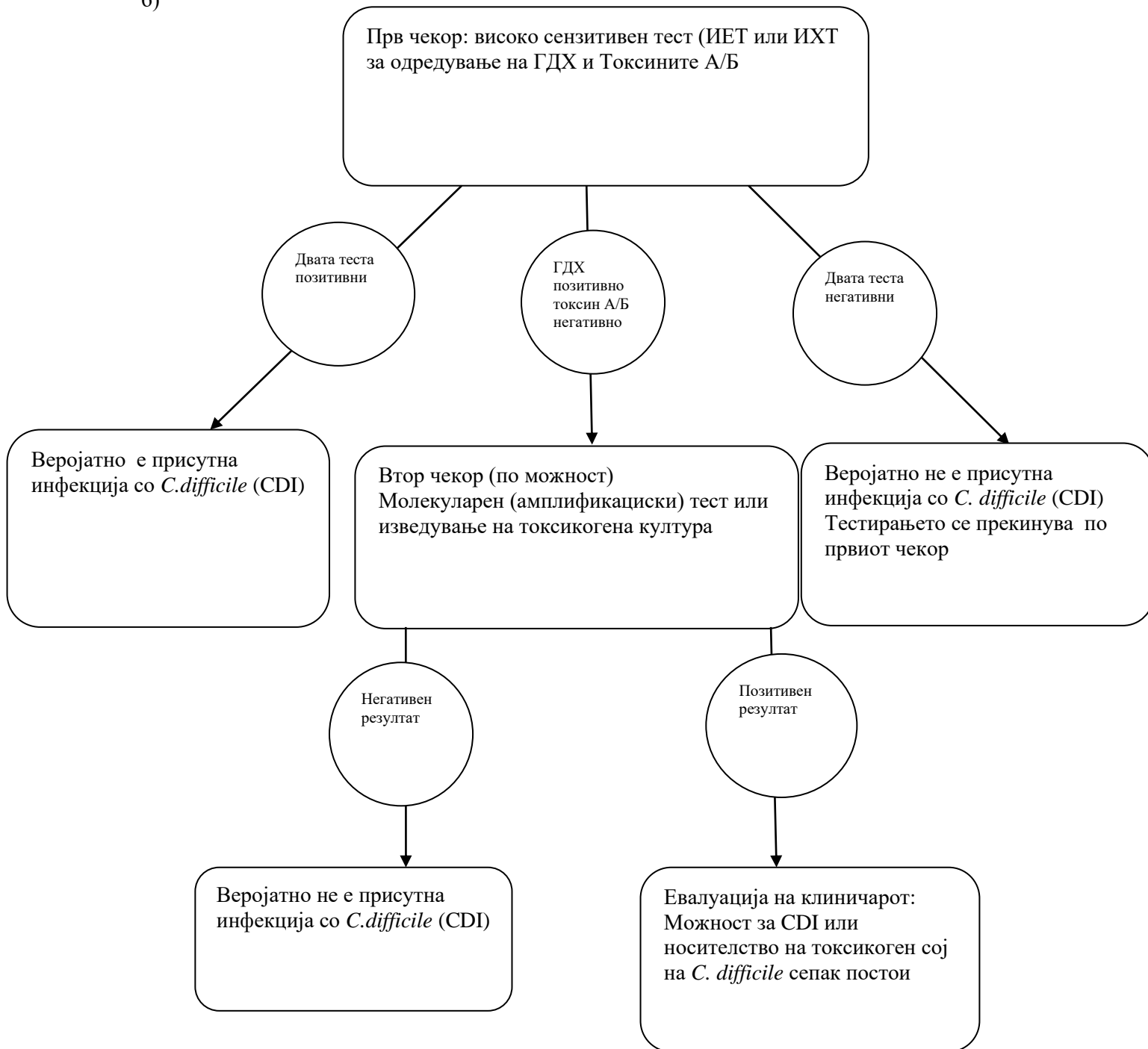
Според најновите препораки од ESCMID (345) во однос на дијагнозата на CDI, потребно е користење на неколку тестови во комбинација. Ова претставува основа за формирање на некој вид алгоритам односно дијаграм (сл.7.1). Во таквиот алгоритам тестовите се комбинираат на таков начин што најпрво примерокот се тестира со некој високо сензитивен тест, во нашиот случај тоа е детекцијата на ГДХ имунохроматографски (Mascia Brunelli, Италија, сензитивност над 99%). Исто така како примарен тест може да се користи и некој молекуларен метод (амплификација на нуклеински киселини). Изборот тука е на самата лабораторија. Негативните примероци со првиот тест исклучуваат CDI и не подлежат на тестирање со втор тест. Како втор тест (кај сите позитивни примероци со првиот тест) се користи некој

високоспецифичен тест. Во нашиот случај тоа е имунохроматографското одредување на двата токсина (А и Б) на *C. difficile* (Mascia Brunelli, Италија). За сите пациенти чии примероци се позитивни со вториот тест може да се каже дека веројатно имаат CDI. Најтешка е интерпретацијата кога вториот тест е негативен. Во нашата студија тоа е случај кај 10 % од примероците од кои потекнуваат изолатите кои се собрани за понатамошно испитување. За таквите случаи се препорачува клиничка евалуација. Некои од можностите за ваквиот исход би биле : инфекција со *C. difficile*, но количината на токсини во примерокот е под прагот на детекција (во нашата студија тој праг за токсинот А е 2 ng/mL, а за токсинот Б е 0.63 ng/mL), лажно негативен резултат на вториот тест (веројатно пролонгирано доставување на примерокот во лабораторија), или само носителство односно колонизација со *C. difficile*. Иако претпоставката е дека ваквите соеви се нетоксикогени, во нашиот случај сепак се покажа дека кај најголем број од овие случаи се изолираа културелно токсикогени соеви.

a)



б)



Слика 7.1 Препорачан алгоритам според ESCMID за тестирање за докажување на CDI

Според сликата 7.1 под б) се забележува дека постои алтернативна можност за дијагностицирање на CDI со истовремено тестирање за присуство на ГДХ и

токсините А и Б. Во нашево испитување е постапувано на тој начин заради целите на студијата, но претпоставката е дека за поголем број дијагностички лаборатории поприфатлива би била првата можност (сл.7.1 под а). Во ситуација кога тестот за докажување на токсините е позитивен, а оној за ГДХ е негативен, потребно е повторување на испитувањето или доколку е поминато повеќе време, потребно е да се побара нов примерок.

Во однос на засадувањето(култивирањето) на примероците може да се забележи дека таа постапка не е задолжителна според алгоритмот и без неа во најголем дел случаи може да се исклучи или потврди CDI. Во четиринаесетте случаи каде што не се докажани токсини во примерокот, сепак култивирањето односно изведбата на токсикогена култура беше од големо значење (опционален чекор во алгоритмот) за исклучување на колонизација со токсикоген сој, а со тоа и исклучување на CDI. Оваа опција се сметаше како најверојатна, но сепак во оваа студија се покажа дека поголем број од тие соеви се сепак токсикогени (8 од 14). Во таков случај инфекција со *C.difficile* е сеуште можна и потребна е внимателна клиничка евалуација на ваквите случаи. Интересно би било да истакнеме дека овие изолати припаѓаат на следните риботипови: 005, 014/020, 046, 023, 002(два изолати), 001 и SLO 110. Забележливо е отсуство на хипервирулентните риботипови 027 и 017, кај кои во многу наврати претходно е докажувано зголемено лачење на токсини, со што можноста дека тука се работи за ниска концентрација на токсини во примерокот (под прагот на детекција на тестот користен во овој случај) е веројатна. Секако тоа во овој случај не е можно да се докаже.

Директно култивирање на примероците со цел да се изолира бактеријата, без претходно користење на примерокот за докажување на ГДХ или токсините А и Б не се препорачува. На овој начин не само што би се изгубило премногу време и пари, туку и не би можеле да добиеме вистински одговор на прашањето дали станува збор за инфекција или колонизација. Она што секако е најважно во однос на култивирањето е секако можноста за понатамошна типизација на сојот, како и одредување на неговата антибиотска осетливост, нешто за што ќе стане збор понатака.

7.3 Молекуларна типизација на *C. difficile*

Во поново време типизацијата на изолатите на *C. difficile* речиси исклучиво се прави со молекуларни методи. Фенотипските методи се напуштени со исклучок на некои како на пример резистотипизацијата, каде што примарната цел е согледување на оптимални терапевтски опции и детектирање на резистентни соеви. Примарната цел на типизацијата е следење на движењето на соевите, во прв ред епидемиските, во одредена средина. Тоа може да биде одредена група пациенти во некоја болница, може да биде и на многу поголема група како на пример целата популација во одредена држава или регион, но исто така се поактуелно е и следење на генотипови на оваа бактерија на ниво на одредени животински видови.

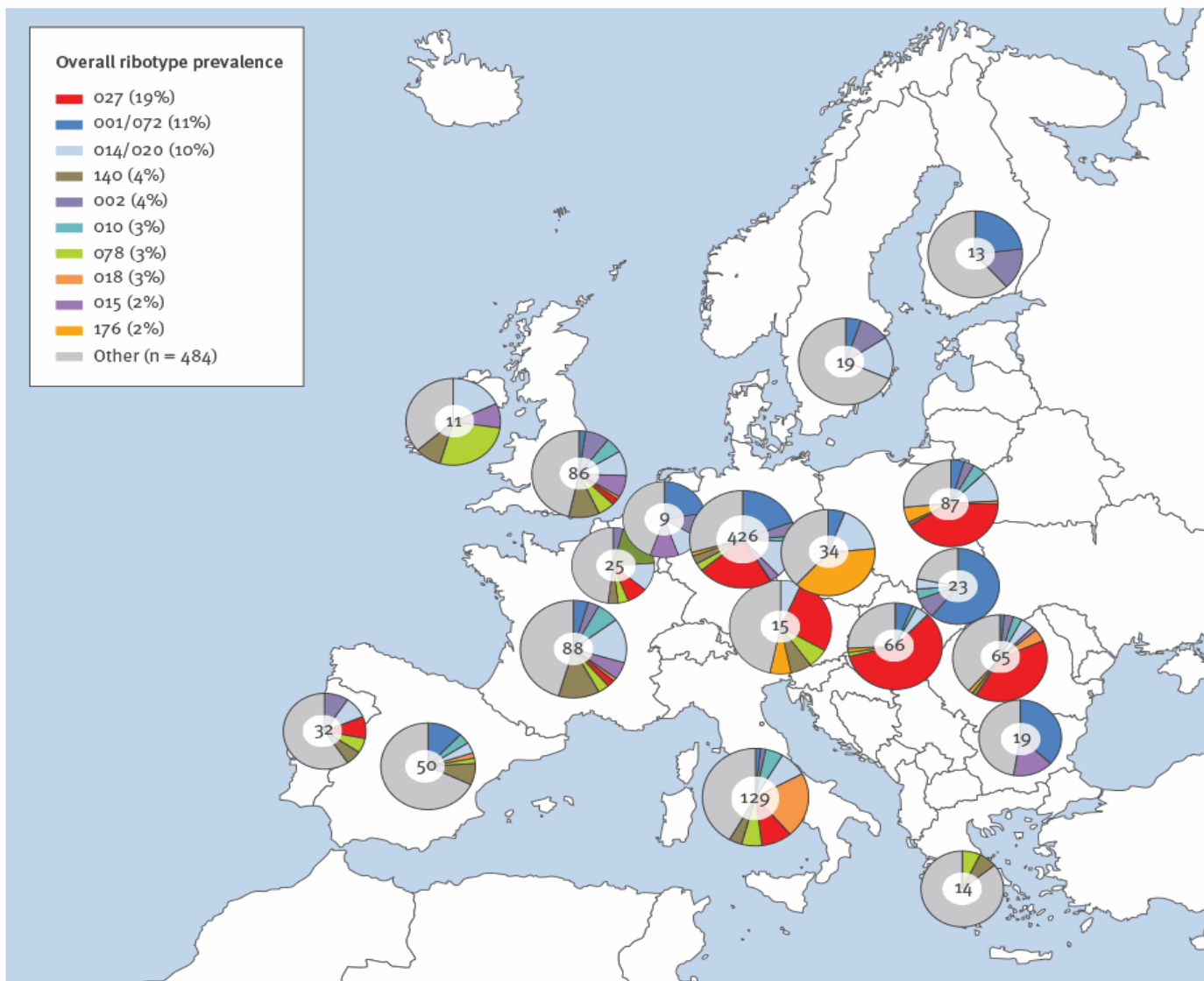
Постојат повеќе методи на молекуларна типизација на *C. difficile* кои се воведени во последните дваесеттина години и сите тие се разликуваат по својата дискриминирачка моќ. Една голема студија (307) пред неколку години компарираше седум молекуларни типизирачки методи во однос на дискриминирачката способност кон соевите на *C. difficile*. Најдобри резултати покажаа Мултилокусната анализа на варијабилен број повторувани тандеми (MLVA) и Анализата со рестриktivни ендонуклеази (REA). Методот што е користен во нашево испитување ПБР риботипизацијата беше на петто место. Молекуларната типизација на соевите на овој патоген доживеа „процут“ со појавата на хипервирулентните епидемиски соеви, од кои секако најпознат е сојот означен како VI/NAP- 1/027. За овој назив искористени се резултатите од трите најчести типизирачки методи во тој момент (REA, PFGE и ПБР риботипизацијата) со цел да се избегнат забуни.

ПБР риботипизацијата сепак важи за стандардна и убедливо најупотребувана типизирачка метода во Европа. Со оглед на местоположбата на нашата држава и

потребата за следење на дистрибуцијата и движењето на соевите не само во рамки на нашата држава, туку и во рамки на поширокиот регион, изборот на овој метод за нашево истражување беше неминовен. Со тоа во иднина нашата земја би можела да фигурира на картата на Европа за дистрибуција на риботиповите на *C. difficile*, на која досега отсутуваше со податоци (сл. 7.2.).

Со цел да се подобри меѓулабораториската репродуцибилност на овој метод, се користат сетови на референтни соеви, кои потекнуваат од најфреквентните риботипови. Доколку се одреди дека некој нов изолат не одговара на ниеден од риботиповите на референтните соеви, во тој случај таквиот риботип се именува со внатрешна номенклатура. Во нашиот случај таквите риботипови ја имаат ознаката SLO. Ова во суштина е еден од недостатоците на овој метод.

Риботипизацијата на сите 80 изолати на *C. difficile* изолирани на Институтот за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет во Скопје, во периодот од јануари 2015 до јануари 2019 покажа дека во овој период низ нашата држава циркулирале најмалку 20 риботипови. Она што најпрво може да се забележи е дека доминантен риботип е 001/072. Со оглед на тоа што во минатото, поточно во периодот 2013-2014 за првпат беа риботипизирани изолати на оваа бактерија од нашата држава (349) на кои добивме слични резултати (кај 5 од 9 изолати беше детектиран риботипот 001/072) може да се каже дека ова не е неочекувано односно дека овој риботип доминирал и пред нашата студија.



Сл.7.2 Географска дистрибуција на риботиповите на *C.difficile* во одредени земји од Европа кои учествуваа во студијата на EUCLID 2012/2013 (n=1196). На сликата е прикажана пропорција на најчестите риботипови, а бројката во средина покажува колку изолати се типизирани. Изолатите се добиени од преку 6000 примероци од пациенти испратени во два дена (еден ден во зима и еден во лето) (350).

Она што може да се забележи од сликата погоре е дека риботипот 001/072 воопшто не е редок низ Европа, односно е втор по застапеност меѓу изолатите во големата паневропска студија (350) со 11%. Освен во Македонија, овој риботип е доминантен и во соседна Бугарија што укажува на можна географска поврзаност на соевите, но и во поодалечени земји на сосем спротивни marginи на Европа како Шпанија, Финска и Словачка (каде повеќе од половината изолати припаднаа на риботипот 001/072).

Иако прилично распространет, овој риботип не се споменува во групата на таканаречени хипервирулентни риботипови, но сепак во некои студии се посочува како

епидемски сој (351). Во нашиов случај убедливо најголем број изолати од овој риботип потекнуваа од пациенти хоспитализирани на хируршките и интерните клиници (90%), со 16 и 13 изолати соодветно. Ниту еден изолат од овој риботип не потекнуваше од пациенти дојдени надвор од клиничкиот комплекс „Мајка Тереза“ (амбулантски пациенти упатени од ПЗУ или пациенти од некои приватни болници или општи болници). Овој податок и фактот што во подолг период од 5 години овој риботип е најзастапен, укажува дека е можно да се работи за ендемски сој на *C. difficile* во клиничкиот комплекс „Мајка Тереза“ во Скопје, но за вакво тврдење се потребни поопсежни проспективни студии. Она што би можело да ја зацврсти (или отфрли) ваквата хипотеза би било евентуално риботипизирање на изолатите на оваа бактерија од нежива средина во овој клинички комплекс во иднина.

Во однос на полот и возраста на пациентите од кои е изолиран риботипот 001/072 не беше најдена статистичка сигнификантност. Сепак се покажа дека просечната возраст на овие пациенти е нешто пониска во однос на оние пациенти од кои е изолиран хипервирулентниот риботип 027, а повисока од просечната возраст на пациентите од кои потекнуваа риботиповите од групата „останати“ (во која ги вброивме и шестте нетоксикогени изолати). Статистички, утврдена беше сигнификантна процентуална разлика во детекцијата на најчестиот риботип 001/072 споредено со вториот по застапеност 014/020 ($p=0,0001$).

Вториот најчест риботип од изолатите во ова испитување е 014/020 застапен со десет изолати (12,5%). Овој риботип во горенаведената паневропска студија е на трето место, со десет посто од изолатите. Во однос на посебните држави во истото испитување, најзастапен риботип е во Франција и Шведска.

Половината од изолатите од риботипот (014/020) во нашето испитување беа со потекло од пациентите на инфективната клиника. За разлика од најзастапениот риботип 001/072, овој риботип беше изолиран и кај пациенти надвор од клиничкиот комплекс „Мајка Тереза“ и тоа во 20% од случаите.

Хипервирулентниот риботип 027, кој е доминантен во Европа со 19% од изолатите во последната голема паневропска студија, во нашето истражување беше застапен со 5 изолати односно 6,25%. Овој риботип по големите епидемии кои ги предизвика во САД и Канада, кога беше и темелно проучен, беше забележан само во некои западноевропски земји (350). Во последните години неговото тежиште е префрлено во Централна и Источна Европа. Најзастапен риботип е во Германија, Австрија, Унгарија, Романија и Полска. Во една друга студија (349) резултатите покажаа дека кај нашиот сосед Србија, во периодот 2011-2015, од преку 100 испитувани соеви, риботипот 027 бил детектиран во преку 90 % од истите. За среќа кај нас овој процент е значително помал.

Една од причините за тоа зошто овој риботип се означува како хипервирулентен е зголемената продукција на токсините А и Б. Во сите случаи кога стануваше збор за овој риботип, токсините беа докажувани директно од фекалните примероци. Ова го наметнува заклучокот дека колонизација без инфекција со овој риботип е многу помалку веројатна отколку со поголемиот дел од останатите риботипови. Просечната возраст на пациентите од кои беше изолиран риботипот 027 беше повисока отколку истата кај било кој друг риботип. Ова секако придонесува кон повисоката стапка на морталитет кај пациентите инфицирани со вакви соеви која се посочува во многу претходни студии, но во ова истражување текот на болеста кај овие пациенти не беше следен, што оневозможува донесување на такви заклучоци.

Во однос на потеклото на изолатите од риботипот 027, 4 односно 80% беа од пациенти на Интерните клиници, а еден изолат потекнуваше од амбулантски пациент упатен од ПЗУ.

Риботипот 017 се посочува во некои студии како доминантен риботип во Азија (352). Во паневропската студија од 2013 (350) не е наведен како еден од позастапените риботипови, иако во поединечни трудови (353) се споменува и како доминантен, како што е примерот со соседна Бугарија. Во нашево испитување 5 (6,25%) од изолатите припаднаа на овој риботип. Четири од изолатите беа со потекло од клиничкиот

комплекс „Мајка Тереза“ (по 2 од хируршките и интерните клиници), но и еден од амбулантски пациент (ПЗУ). Кај сите изолати од риботипот 017 беше докажан само токсинот Б (и од примерок и од култура). Всушност овој риботип служел како природен модел за испитување на независното дејство на токсинот Б. Тежината на болеста предизвикана од овој риботип може да биде идентична и со онаа предизвикана од 027. Нефункционалноста на токсинот А кај овој риботип се должи на делеција на повторувачкиот регион во *tcdA* генот (352).

Единствено уште риботипот 002 во ова испитување беше застапен со минимум 5 изолати. Она што е посебно воочливо е дека кај 2 од овие 5 изолати не беше докажан слободен токсин во фецесот, што дава можност за претпоставка дека се работи за риботип со намалена способност за секреција на токсини. Ова секако не може да се докаже со оглед на малиот број изолати од овој риботип. Во некои студии се укажува на поголемата спорулациска способност на овој риботип во однос на збирната група од сите останати риботипови во студијата (354). Во нашиот случај 4 (80%) изолати кои припаѓаа на риботипот 002 потекнуваа од пациенти на интерните клиници, а еден беше со потекло од детската клиника. Во однос на пошироката регионална дистрибуција на овој риботип гледаме дека е еден од позастапените во Европа (сл.7.2.), но сепак не е доминантен во ниту една држава.

Сите останати риботипови кои беа детектирани во ова испитување, беа застапени со помалку од 5 изолати. Тука би ги вброиле и шестте нетоксикогени изолати (по 3 од риботиповите SLO 046 и SLO 047. Од оваа група од 23 изолати, најголем дел (30%), потекнуваа од интерните клиници, а дури 26% од ПЗУ (надвор од клиничкиот центар), процент кој е поголем од тој на другите риботипови. Доколку се земат во предвид само нетоксикогените изолати, овој процент расте до 80 %.

Може да се забележи отсуство на риботипот 078 кој се посочува како хипервирулентен во некои студии и е најчест риботип кој е изолиран од некои домашни животни и од месо од малопродажба (96,97,98). Исто така овој риботип е еден од најзастапените риботипови кај нашиот јужен сосед (350).

7.4 Антибиотска резистенција

Во однос на терапијата на инфекциите предизвикани со *C. difficile*, ванкомицин или метронидазол се сеуште првата опција за третман. Во многу дијагностички лаборатории не се изведува рутинско тестирање на антибиотската осетливост кон овие антибиотици и тие практично се даваат во терапија емпириски. Но, искуствата низ светот покажуваат дека има простор за загриженост.

Метронидазол се дава како прв избор кај полесните форми на CDI (355). Веќе се објавуваат студии каде се посочува на резистентни соеви кон овој антибиотик. Во една студија од Израел се посочува на голем број изолати од риботипот 027, со намалена осетливост кон метронидазол кои предизвикале тешки инфекции и голема епидемија во Ерусалим (356). Како еден од механизмите на резистенција во овој случај (и многу други) се наведува хетерорезистенцијата. Во тој случај дел од бактериската популација се здобива со способност за раст во присуство на антибиотик (357). Многу анализи покажуваат дека користење субинхибиторни концентрации на метронидазол имаат улога во селекција на дел од популацијата со зголемени МИК вредности (357). Со оглед на тоа што просечната концентрација на метронидазол во фецесот на пациентите се движи од 0.8 до 24.2 mg/g, се претпоставува дека концентрациите кои се постигнуваат во цревата се недоволни за третман на CDI, поради овие соеви со покачени МИК вредности. Во случајот со овој антибиотик проблем може да биде и тоа што при лабораториска манипулација со соевите можно е намалување на МИК вредноста на истите (358), па затоа како метод за одредување МИК се препорачува агар дилуциониот. Секако дополнително ситуацијата ја компликува и фактот што граничните вредности со кои се дефинира резистенцијата кон метронидазол, според EUCAST и CLSI значително се разликуваат (>2 mg/l и ≥ 32 mg/l).

Иако самиот механизам на резистенција кон метронидазол не е до крај разјаснет, се

смета дека претставува комбинација од неколку фактори, меѓу кои промена на некои метаболни патишта како активноста на нитроредуктазите, користењето на железото и способноста за обнова на ДНК како и продукцијата на биофилм (359).

Во нашево испитување беше користен Е тестот како метод за одредување МИК , а за интерпретација на осетливоста на соевите кон метронидазол беа користени граничните точки по EUCAST. Кај ниту еден од 80те изолирани соеви на *C. difficile* не беше најдена резистенција кон метронидазол.

Резистенција на *C. difficile* кон ванкомицин исто така не е реткост. Според една студија во Израел е откриен процент од дури 87% на резистентност кон ванкомицин според EUCAST граничните вредности, на група изолати од оваа бактерија меѓу кои и 56 од риботипот 027 (356). Нешто пониски проценти на резистенција од 18% според истите гранични вредности се добиени и прикажани во една студија од САД (360). Во Европа тој процент е доста понизок (1-2%), но сепак резистенција постои (351). Претпоставката е дека механизмот на резистенција кон ванкомицин е резултат на промена на аминокиселинскиот состав на протеините одговорни за биосинтеза на пептидогликан, како на пример MurG (361). За главен фактор кој може да индуцира вакви промени се смета селекцискиот притисок кој постои при изложеност на антибиотик во средината. Продукцијата на биофилм исто така е еден од начините на кој бактеријата стекнува отпорност кон овој антибиотик (362). Со оглед на тоа што концентрацијата на ванкомицин во цревата е доста висока (520 -2200 mg/l), клиничкото значење на намалената осетливост кон ванкомицин треба дополнително да се утврди (363).

Сите 80 изолати во ова испитување покажаа осетливост кон ванкомицин. Ова за среќа донекаде може да го оправда емпириското давање во нашата средина, но сепак очекувањата се дека резистентни соеви може да се појават многу скоро. Потребата за рутинско тестирање на сите изолати од *C. difficile* барем кон двата антибиотика што се користат за терапија кај нас сепак постои. На тој начин не само што појавата на резистенција навреме ќе биде пресретната (со тоа и евентуален тераписки неуспех кај пациентите од кои ќе бидат изолирани вакви соеви), туку и би поттикнало воведување на нови лекови за третман на ваквите животозагрозувачки инфекции, кои за жал кај нас сеуште во најголем дел се недостапни.

Во однос на резистенцијата на *C. difficile* кон тетрациклин во литературата се сретнуваат доста различни податоци според кои таа варира од земја до земја и има прилично широк дијапазон од 2,4 до 41% (364). Се смета дека резистенцијата кон тетрациклини се должи на транспозоните Tn5397, Tn916 и Tn6164. Овие елементи имаат способност да ги пренесат гените од tet класата, како на пример tet(M), tet(44) и tet(W) (365). Кај *C. difficile* tet(M) класата се смета за доминантна во однос на резистенцијата кон тетрациклин и главно потекнува од Tn5397 или Tn916 транспозоните (363). Начинот на кој бактеријата се стекнува со tet(M) генот е нејасен. Една од претпоставките е дека тој потекнува од генетски трансфер од други патогени бактерии кои исто така го поседуваат, како на пример *Bifidobacterium longum*. Генот tet(W) (вториот по распространетост) и tet(M), се најдени заедно во изолати на *C. difficile* од луѓе и прасиња кои биле резистентни на тетрациклин (366). Генот tet(44) и покрај тоа што е поредок, има улога во резистенцијата кон тетрациклини. За овој ген е докажано дека преку Tn6164 е вметнат во некои изолати од риботипот 078 и е еден од факторите за високата вируленција на изолатите од овој риботип (363).

Во нашево испитување беше изолиран само еден резистентен изолат на тетрациклин (1,25%) кој припаѓаше на единствениот изолат од риботипот 012. Кај 60 % од изолатите од риботипот 017 беше детектирана интермедиерна резистенција. Може да се каже дека во нашата средина терапијата со тетрациклини не е значаен ризик фактор за појава на CDI. Во некои трудови тетрациклиниот дури и се посочува како алтернативна опција за третман на овие инфекции (367).

Во седумдесеттите години од минатиот век, клиндамицинот беше сметан како најризичен антибиотик за појава на CDI (368), и во тој период беа опишани доста епидемии со резистентни соеви на *C. difficile* кон клиндамицин (369). Поучени од тие

искуства, клиничарите многу повнимателно почнаа да го користат овој антибиотик кај ризичните групи пациенти, што секако даде резултат и веќе во наредните декади тежиштето се префрли на цефалоспорините како антибиотици со најголем ризик за CDI (370). Секако, клиндамицинот сеуште се смета за ризик фактор. Според податоците од литературата во последните десетина години, резистенцијата на изолатите кон овој антибиотик е варијабилна во однос на локацијата и се движи од 8% во САД (371) до 100% во Полска(372), но просечно се движи околу 50% (363).

Механизмите на резистенција кон клиндамицин обично се опишуваат како дел од оние кои важат за групата антибиотици под кратенката (MLS_B – макролиди, линкозамиди, стрептограмин Б). Оваа резистенција е посредувана од неколку транспозони, меѓу кои Tn5398, Tn6194 и Tn6215. Транспозоните посредуваат и во трансверот на egmB генот, кој кодира 23S RNA метилаза, која понатака индуцира резистенција на оваа група антибиотици во која спаѓаат клиндамицинот и еритромицинот (365).

Tn5398 и Tn6215 може да се интегрираат во геномот преку размена на геномски фрагменти. Tn5398 може да се интегрира во хромозомот на реципиентот преку хомологна рекомбинација или со рекомбинација на одредени строго специфични локации. За овој транспозон е докажано дека може да се пренесува од *C. difficile* во *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Tn6215 може да биде пренесен по пат на коњугација во реципиентот или пак преку трансдукција со фагот phiC2. Tn6194 се интегрира во геномот на *C. difficile* на различни места и може да се пренесува меѓу различни соеви на оваа бактерија, но и од *C. difficile* кон *Enterococcus faecalis* (373).

Резистенцијата на изолатите кон клиндамицин во ова испитување беше околу 49%. Во однос на резистенцијата во рамките на риботиповте, најголем процент беше утврден кај риботипот 017 (100%) и кај доминантниот риботип 001/072 (87,5%). Кај риботипот 002 не беше забележана резистенција кон клиндамицин. Во однос на тоа од каде потекнуваат изолатите, највисок процент на резистенција кон клиндамицин од 70% беше најден кај изолатите од Хируршките клиници, следено со 52% кај тие од Интерните клиници, а најнизок процент кај изолатите од Клиниката за детски болести (14%). Согледуваме дека резистенцијата на *C. difficile* кон клиндамицин кај нас се движи во рамките на светскиот просек и користењето на овој антибиотик сеуште е значаен ризик фактор за појава на CDI.

Вкупната резистенција на изолатите кон еритромицин е 55%. Резистенција од 100% на изолатите кон еритромицин имаше во рамките на риботиповите 017 и 027, додека кај доминантниот риботип 001/072 таа изнесуваше 87,5%. Кај другите риботипови, резистенцијата кон еритромицин беше значително пониска, а сите 5 изолати од риботипот 002 беа осетливи кон овој антибиотик. Изолатите со потекло од Хируршките клиници и тука во најголем процент беа резистентни на еритромицин (77%), следено со 48% кај тие од Клиниките за интерни болести, а најнизок процент резистенција имаа изолатите со потекло од пациентите на Клиниката за детски болести (14%). Според објавената литература, резистенцијата на *C. difficile* кон еритромицин варира од земја до земја исто како и кај клиндамицинот, но просечно е околу 50% (363). Според тоа, во нашата средина користењето на еритромицин е речиси идентичен ризик фактор за CDI како и користењето на клиндамицин, што веројатно се должи на сличните механизми на резистенција на бактеријата кон овие антибиотици.

Податоците за резистенција на изолатите на *C. difficile* кон имипенем во Европа се доста дивергентни (351). Процентот на резистенција се движи од 0 во неколку земји па до 60% во Грција и 76% во Унгарија. Механизмот на резистенција кон имипенем се должи на мутациите во *pbp1* и *pbp3*, поради што доаѓа до продукција на PBP1 и PBP3 со намален афинитет за врзување на имипенем (374).

Од осумдесетте изолати во ова испитување 57% беа резистентни на имипенем, што укажува дека во оваа категорија за жал сме високо над европскиот просек. Сите изолати од риботипот 017 беа резистентни на имипенем. Висок процент (72%) резистенција беше најден и кај доминантниот риботип 001/072. И во овој случај

највисок процент на резистенција(86%), во овој случај кон имипенем, беше најден кај изолатите со потекло од хируршките клиници. Можно е екстензивното аплицирање на овој антибиотик (честопати како последна линија на одбрана од грам негативните бактерии) на нашите клиници да довело до селекција на резистенти соеви кај доминантните риботипови. Овие податоци упатуваат на голема внимателност во иднина при апликација на имипенем (веројатно и останатите карбапенеми) од страна на нашите клиничари, со оглед на тоа што во постарата литература не се спомнува овој антибиотик како ризик фактор за инфекции со *C. difficile*.

Како клучен момент во еволуцијата на она што денес се означува како хипервирулентен риботип 027 се смета стекнувањето на резистенција кон флуорокинолоните. Практично се смета дека сите соеви од риботипот 027 што би покажале осетливост на флуорокинолони доколку би се изолирале денес, би биле тн. историски соеви (66). Механизмот на резистенција во овие случаи најчесто е промена на аминокиселинскиот состав во подединиците на ДНК гиразата, GyrA и GyrB. Најчеста таква промена кај речиси сите изолати резистентни на флуорокинолони е Thr82Ile во GyrA (375). Во многу ин витро експерименти е покажано дека кај претходно осетливи соеви, изложеноста кон моксифлоксацин и левофлоксацин индуцира високо ниво на селекција на резистентни мутанти (376). Исто така во еден неодамнешен труд се покажа дека супституцијата Thr82Ile во GyrA нема негативни последици по тн. бактериски фитнес кај *C. difficile*, што значи дека оваа супституција може да се одржува во бактериската популација и без селективниот притисок од страна на антибиотикот (377).

Според литературните податоци од последните години во светот резистенцијата на *C. difficile* кон ципрофлоксацин е извонредно висока (99%), додека таа кон моксифлоксацин е пониска, но сепак просечно се движи околу 34% (363). Во ова испитување резистенцијата на ципрофлоксацин беше 100%, што укажува на тоа дека ризикот од CDI кај нас е поголем при користење на овој антибиотик во споредба со било кој друг испитуван тука вклучително и клиндамицин. Резистенцијата кон моксифлоксацин беше 45 %. Висока резистенција кон моксифлоксацин покажаа риботиповите 027(100%), 001/072 (81%) и 017 (80%). Кај другите риботипови резистенцијата кон моксифлоксацин е извонредно ретка. Како и кај сите останати антибиотици испитувани во овој случај, процентот на резистенција кон моксифлоксацин беше највисок кај изолатите кои потекнуваа од пациенти хоспитализирани на хируршките клиници.

Нашите испитувања укажуваат на постоење поврзаност помеѓу риботиповите и антибиотската резистенција кај *C. difficile*. Стекнувањето на резистенција кон антибиотици е еден од главните фактори за дистрибуцијата и движењето на риботиповите, пред се во болничката средина, но и за појавата на нови типови. Следењето на овие генотипски и фенотипски карактеристики на изолатите може да биде од големо епидемиолошко значење.

8. Заклучоци

1. Анализата на вкупно 1380 фекални примероци кои беа добиени на Институтот за микробиологија и паразитологија во периодот јануари 2015 – јануари 2019 година од суспектни пациенти за *C. difficile* инфекција (CDI) покажа застапеност на бактеријата во 13% од примероците, додека пак лабораториска дијагноза за CDI беше поставена кај 12,1% од примероците.
2. Бројот на испратените фекални примероци од различни клиници и амбуланти со барање за лабораториска дијагноза на CDI не соодветствуваше со бројот на позитивните наоди, што укажува на тоа дека на некои од клиниките постои селективност во однос на испраќањето на примероци за лабораториска дијагноза на CDI, што резултира со субдијагностицирање на оваа инфекција. Најголемо несовапање беше детектирано на хируршките клиници.
3. За да се добијат пореални резултати за постоење на CDI кај пациентите од нашата популација, односно за да се подобри лабораториската дијагноза на оваа инфекција, потребно е да се испитуваат сите примени течни фекални примероци (освен од деца под три години), а не само кога тоа го бара клиничарот.
4. Процентуалната разлика во однос на изолирањето на *C. difficile* помеѓу половите во целиот примерок за истражување не беше статистички сигнификантна.
5. Просечната возраст на пациентите од кои потекнуваа изолатите во студијата беше 54 години. 56,25% од пациентите беа на возраст над 60 години. Ниту еден изолат на *C. difficile* не потекнуваше од новороденчиња и доенчиња (помали од 1 година).
6. Лабораториското дијагностицирање на CDI треба да се заснова на дводелниот алгоритам кој вклучува детекција на ГДХ и на токсините А и Б на *C. difficile*, директно во фекалните примероци. Дополнителното испитување на токсините од културата на *C. difficile* незначително го намалува бројот (%) на лажно-негативните резултати.
6. Кај 93% од токсогените изолати беа докажани и двата токсина (А и Б), а кај 7% само токсинот Б. Присуство на токсин А, без присуство на токсин Б не беше докажано кај ниту еден изолат.
8. Риботипизацијата на сите 80 изолати на *C. difficile* покажа дека тие припаѓаат на 20 различни риботипови.
9. Доминантен риботип беше 001/072, на кој припаднаа 32 (40%) од изолатите.
10. Најголем број од изолатите од риботипот 001/072 потекнуваа од

пациенти кои беа хоспитализирани на хируршките клиници. Присуството на риботипот 001/072 на хируршките клиници беше за 3,69, 16 и 10,6 пати поголемо во однос на Интерните клиници, Клиниката за детски болести и на Клиниката за инфективни болести.

11. Риботипот 014/020 беше застапен со 10 изолати (12,5%). Риботипови застапени со по 5 (6,25%) изолати беа: 002, 017 и 027. Со по 3 изолати (3,7%) беа застапени риботиповите 005, 255/258, SLO 046 и SLO 047. Риботиповите 003, 012, 015, 023, 046, 070, SLO 069, SLO 110, SLO 120, SLO 160, SLO 187 беа застапени со по еден изолат.
12. Двата токсина (А и Б) беа докажани кај сите изолати од сите риботипови, со исклучок на сите изолати од риботипот 017 каде беше докажан само токсинот Б и сите изолати од риботиповите SLO 046 и SLO 047 кои беа нетоксогени.
13. Сите осумдесет изолати на *C.difficile* во оваа студија покажаа добра осетливост кон ванкомицин и метронидазол, што значи дека овие антибиотици би требало да останат прва опција за терапија на CDI.
14. Процентите на резистенција на изолатите на *C.difficile* кон тетрациклин, клиндамицин, еритромицин, имипенем, ципрофлоксацин и моксифлоксацин беа: 1,25%, 49%, 55%, 57 %, 100% и 45% соодветно. Ова укажува дека терапијата со овие антибиотици (со исклучок на тетрациклиноот) може да се смета за ризик фактор за добивање на CDI. Посебно висок ризик има кај пациентите кои примаат ципрофлоксацин.
15. Највисок процент на резистенција кон испитуваните антибиотици е забележан кај изолатите на *C.difficile* со потекло од пациентите хоспитализирани на хируршките клиници.
16. Највисоки проценти на резистенција кон испитуваните антибиотици се забележани кај изолатите кои му припаѓаат на доминантниот риботип 001/072 и кај хипервирулентните риботипови 017 и 027.
17. Горенаведените заклучоци укажуваат на постоење поврзаност помеѓу риботиповите и антибиотската резистенција кај *C. difficile*. Стекнувањето на резистенција кон антибиотици е еден од главните фактори за дистрибуцијата и движењето на риботиповите, пред се во болничката средина, но и за појавата на нови типови. Следењето на овие генотипски и фенотипски карактеристики на изолатите може да биде од големо епидемиолошко значење.

9. Референци

1. Washington, C. W., Allen, S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., Procop, G. & Baker Woods, G. (2005) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott Williams and Wilkins.
2. Dupuy, B., Raffestin, S., Matamouros, S., Mani, N., Popoff, M. R. & Sonenshein, A. L. (2006). Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. *Mol Microbiol*, 60: 1044-57.
3. Johnson, E. A. (1999). Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu Rev Microbiol*, 53: 551-75.
4. Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*, 3: 66-98.
5. Levett, P. N. (1984). Detection of *Clostridium difficile* in faeces by direct gas liquid chromatography. *J Clin Pathol*, 37: 117-9.
6. Hall, I. C. & O' Toole, E. (1935). Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Amer J Dis Child*, 49: 390-402.
7. Larson, H. E. & Price, A. B. (1977). Pseudomembranous colitis: Presence of clostridial toxin. *Lancet*, 2: 1312-4.
8. Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B. (1978). Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 298: 531-4.
9. George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R., Alexander-Williams, J. & Burdon, D. W. (1978). Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J*, 1: 695.
10. Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P. & Borriello, S. P. (1978). *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*, 1: 1063-6.
11. Tasteyre, A., Barc, M. C., Karjalainen, T., Dodson, P., Hyde, S., Bourlioux, P. & Borriello, P. (2000). A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. *Microbiology*, 146 (Pt 4): 957-66.
12. Davies, H. A. & Borriello, S. P. (1990). Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. *Microb Pathog*, 9: 141-6.
13. Ausiello, C. M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Frezza, S. & Mastrantonio, P. (2006). Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes Infect*, 8: 2640-6.
14. Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A. D. & Fairweather, N. F. (2002). Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun*, 70: 5770-8.
15. Hennequin, C., Janoir, C., Barc, M. C., Collignon, A. & Karjalainen, T. (2003). Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 149: 2779-87.
16. Waligora, A. J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A. & Karjalainen, T. (2001). Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile*

with adhesive properties. *Infect Immun*, 69: 2144-53.

17. Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P. & Karjalainen, T. (2001b). GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology*, 147: 87-96.

18. Pechine, S., Gleizes, A., Janoir, C., Gorges-Kergot, R., Barc, M. C., Delmee, M. & Collignon, A. (2005). Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*, 54: 193-6.

19. Kelly, C. P., Pothoulakis, C. & Lamont, J. T. (1994). *Clostridium difficile* colitis. *N Engl JMed*, 330: 257-62.

20. Savidge, T. C., Pan, W. H., Newman, P., O'brien, M., Anton, P. M. & Pothoulakis, C.(2003). *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology*, 125: 413-20.

21. Pothoulakis, C. & Lamont, J. T. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: G178-83.

22. Hundesberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M. & Von Eichel-Streiber, C. (1997). Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem*, 244: 735-42.

23. Tan, K. S., Wee, B. Y. & Song, K. P. (2001). Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*, 50: 613-9.

24. Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A. & Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol*, 57: 685-9.

25. Taylor, N. S., Thorne, G. M. & Bartlett, J. G. (1981). Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect Immun*, 34: 1036-43.

26. Lyerly, D. M., Saum, K. E., Macdonald, D. K. & Wilkins, T. D. (1985). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun*, 47: 349-52.

27. Mitchell, T. J., Ketley, J. M., Haslam, S. C., Stephen, J., Burdon, D. W., Candy, D. C. & Daniel, R. (1986). Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut*, 27: 78-85.

28. Torres, J., Jennische, E., Lange, S. & Lonroth, I. (1990). Enterotoxins from *Clostridium difficile*; diarrhoeogenic potency and morphological effects in the rat intestine. *Gut*, 31: 781-5.

29. Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'brien, M. J. & Lamont, J. T. (1987). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology*, 93:273-9.

30. Pothoulakis, C., Barone, L. M., Ely, R., Faris, B., Clark, M. E., Franzblau, C. & Lamont, J.T. (1986). Purification and properties of *Clostridium difficile* cytotoxin B. *J BiolChem*, 261: 1316-21.

31. Hecht, G., Koutsouris, A., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. & Madara, J. L. (1992). *Clostridium difficile* toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology*, 102: 416-23.

32. Voth, D. E. & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 18: 247-63.

33. Drudy, D., Harnedy, N., Fanning, S., Hannan, M. & Kyne, L. (2007). Emergence

and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol, 28: 932-40.

34. Lyras, D., O'connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D. N. & Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature, 458: 1176-9.

35. Lima, A. A., Lyrly, D. M., Wilkins, T. D., Innes, D. J. & Guerrant, R. L. (1988). Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. Infect Immun, 56: 582-8.

36. Lyrly, D. M., Saum, K. E., Macdonald, D. K. & Wilkins, T. D. (1985). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect Immun, 47: 349-52.

37. Von Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Sartingen, S., Schulze, J. & Sauerborn, M. (1992). Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. Mol Gen Genet, 233: 260-8.

38. Voth, D. E. & Ballard, J. D. (2005). Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev, 18: 247-63.

39. Borriello, S. P. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother, 41 Suppl C: 13-9.

40. Savidge, T. C., Pan, W. H., Newman, P., O'brien, M., Anton, P. M. & Pothoulakis, C. (2003). *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. Gastroenterology, 125: 413-20.

41. Jank, T., Giesemann, T. & Aktories, K. (2007). Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. Glycobiology, 17: 15R-22R.

42. Tucker, K. D. & Wilkins, T. D. (1991). Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. Infect Immun, 59: 73-8.

43. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature, 420: 629-35.

44. Giesemann, T., Egerer, M., Jank, T. & Aktories, K. (2008). Processing of *Clostridium difficile* toxins. J Med Microbiol, 57: 690-6.

45. Poxton, I. R., Mccoubrey, J. & Blair, G. (2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect, 7: 421-7.

46. Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M. & Boquet, P. (1988). Actin-specific ADP ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun, 56: 2299-306.

47. Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G. & Popoff, M. R. (1997). Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. Infect Immun, 65: 1402-7.

48. Carter, G. P., Lyras, D., Allen, D. L., Mackin, K. E., Howarth, P. M., O'connor, J. R. & Rood, J. I. (2007). Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. J Bacteriol, 189: 7290-301.

49. Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B. & Popoff, M. (2000). Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett, 186: 307-12.

50. Geric, B., Carman, R. J., Rupnik, M., Genheimer, C. W., Sambol, S. P., Lyerly, D. M., Gerding, D. N. & Johnson, S. (2006). Binary toxin-producing, large clostridial toxin negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis*, 193: 1143-50.
51. Geric, B., Johnson, S., Gerding, D. N., Grabnar, M. & Rupnik, M. (2003). Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. *J Clin Microbiol*, 41: 5227-32.
52. Popoff, M. R. & Dodin, A. (1985). Survey of neuraminidase production by *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, and *Clostridium difficile* strains from clinical and nonclinical sources. *J Clin Microbiol*, 22: 873-6.
53. Seddon, S. V. & Borriello, S. P. (1992). Proteolytic activity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*, 36: 307-11.
54. Seddon, S. V., Hemingway, I. & Borriello, S. P. (1990). Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *J Med Microbiol*, 31: 169-74.
55. Hafiz, S. & Oakley, C. L. (1976). *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *J Med Microbiol*, 9: 129-36.
56. Steffen, E. K. & Hentges, D. J. (1981). Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. *J Clin Microbiol*, 14: 153-6.
57. Cookson, B. (2007). Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*. *Postgrad Med J*, 83: 291-5.
58. Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M. & Boquet, P. (1988). Actin-specific ADPribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun*, 56: 2299-306.
59. Van Steenberghe, J., Debast, S., Van Kregten, E., Van Den Berg, R., Notermans, D. & Kuijper, E. (2005). Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Euro Surveill*, 10:E050714 1.
60. Hensgens, M. P., Goorhuis, A., Notermans, D. W., Van Benthem, B. H. & Kuijper, E. J. (2009). Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. *Euro Surveill*, 14.
61. Riley, T. V., Thean, S., Hool, G. & Golledge, C. L. (2009). First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Med J Aust*, 190: 706-8.
62. Tae, C. H., Jung, S. A., Song, H. J., Kim, S. E., Choi, H. J., Lee, M., Hwang, Y., Kim, H. & Lee, K. (2009). The first case of antibiotic-associated colitis by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Korea. *J Korean Med Sci*, 24: 520-4.
63. Kato, H., Ito, Y., Van Den Berg, R. J., Kuijper, E. J. & Arakawa, Y. (2007). First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill*, 12: E070111 3.
64. Cheng, V. C., Yam, W. C., Chan, J. F., To, K. K., Ho, P. L. & Yuen, K. Y. (2009). *Clostridium difficile* ribotype 027 arrives in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents*, 34:492-3.
65. Akerlund, T., Persson, I., Unemo, M., Noren, T., Svenungsson, B., Wullt, M. & Burman, L.G. (2008). Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. *J Clin Microbiol*, 46: 1530-3.

66. McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Owens, R. C., Jr., Kazakova, S. V., Sambol, S. P., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2005). An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 353: 2433-41.
67. Verdoorn, B. P., Orenstein, R., Rosenblatt, J. E., Sloan, L. M., Schleck, C. D., Harmsen, W.S., Nyre, L. M. & Patel, R. (2010). High prevalence of *tcdC* deletion-carrying *Clostridium difficile* and lack of association with disease severity. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66: 24-8.
68. Matamouros, S., England, P. & Dupuy, B. (2007). *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol*, 64: 1274-88.
69. Spigaglia, P. & Mastrantonio, P. (2002). Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 40: 3470-5.
70. Maccannell, D. R., Louie, T. J., Gregson, D. B., Laverdiere, M., Labbe, A. C., Laing, F. & Henwick, S. (2006). Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *J Clin Microbiol*, 44: 2147-52.
71. Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T. D., Sebahia, M., Quail, M. A., Rose, G., Gerding, D. N., Gibert, M., Popoff, M. R., Parkhill, J., Dougan, G. & Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol*, 10: R102
72. Dawson, L. F., Valiente, E. & Wren, B. W. (2009). *Clostridium difficile*--a continually evolving and problematic pathogen. *Infect Genet Evol*, 9: 1410-7.
73. Goorhuis, A., Debast, S. B., Van Leengoed, L. A., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A. & Kuijper, E. J. (2008). *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *J Clin Microbiol*, 46: 1157; author reply 1158.
74. Underwood, S., Guan, S., Vijayasubhash, V., Baines, S. D., Graham, L., Lewis, R. J., Wilcox, M. H. & Stephenson, K. (2009). Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *J Bacteriol*, 191:7296-305.
75. Lawley, T. D., Croucher, N. J., Yu, L., Clare, S., Sebahia, M., Goulding, D., Pickard, D. J., Parkhill, J., Choudhary, J. & Dougan, G. (2009). Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *J Bacteriol*, 191: 5377-86.
76. Jump, R. L., Pultz, M. J. & Donskey, C. J. (2007). Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 2883-7.
77. Sorg, J. A. & Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol*, 190: 2505-12.
78. Wilson, K. H. (1983). Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J Clin Microbiol*, 18: 1017-9.
79. Wheeldon, L. J., Worthington, T., Hilton, A. C., Elliott, T. S. & Lambert, P. A. (2008). Physical and chemical factors influencing the germination of *Clostridium*

- difficile* spores. J Appl Microbiol, 105: 2223-30.
80. Wheeldon, L. J., Worthington, T., Lambert, P. A., Hilton, A. C., Lowden, C. J. & Elliott, T.S. (2008). Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. J Antimicrob Chemother, 62:522-5
 81. Kaatz, G. W., Gitlin, S. D., Schaberg, D. R., Wilson, K. H., Kauffman, C. A., Seo, S. M. & Fekety, R. (1988). Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am J Epidemiol, 127: 1289-94.
 82. Rutala, W. A. & Weber, D. J. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clin Microbiol Rev, 10: 597-610.
 83. Tang-Feldman, Y., Mayo, S., Silva Jr, J., Jr. & Cohen, S. H. (2003). Molecular analysis of *Clostridium difficile* strains isolated from 18 cases of recurrent *clostridium difficile* associated diarrhea. J Clin Microbiol, 41: 3413-4.
 84. Bacci, S., St-Martin, G., Olesen, B., Bruun, B., Olsen, K. E., Nielsen, E. M. & Molbak, K. (2009). Outbreak of *Clostridium difficile* 027 in North Zealand, Denmark, 2008-2009. Euro Surveill, 14.
 85. Bartlett, J. G. (1994). *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin Infect Dis, 18 Suppl 4: S265-72.
 86. Giannasca, P. J. & Warny, M. (2004). Active and passive immunization against *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. Vaccine, 22: 848-56.
 87. Barbut, F. & Petit, J. C. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect, 7: 405-10.
 88. Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T. D., Sebahia, M., Quail, M. A., Rose, G., Gerding, D. N., Gibert, M., Popoff, M. R., Parkhill, J., Dougan, G. & Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. Genome Biol, 10: R102.
 89. Klein, E. J., Boster, D. R., Stapp, J. R., Wells, J. G., Qin, X., Clausen, C. R., Swerdlow, D.L., Braden, C. R. & Tarr, P. I. (2006). Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency Department: a prospective cohort study. Clin Infect Dis, 43: 807-13.
 90. Roupael, N. G., O'donnell, J. A., Bhatnagar, J., Lewis, F., Polgreen, P. M., Beekmann, S., Guarner, J., Killgore, G. E., Coffman, B., Campbell, J., Zaki, S. R. & McDonald, L.C. (2008). *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. Am J Obstet Gynecol, 198: 635 e1-6.
 91. Kuijper, E. J. & Van Dissel, J. T. (2008). Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. Cmaj, 179: 747-8.
 92. HPA (2009b). *Clostridium difficile* ribotyping network of England & Northern Ireland 2008/2009 Report. http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebfile/HPAweb_C/1258560554236.
 93. HPA (2008). Antimicrobial resistance and prescribing in England, Wales & Northern Ireland.

http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebfile/HPAweb_C/1216798080469.

94. Kuijper, E. J., Barbut, F., Brazier, J. S., Kleinkauf, N., Eckmanns, T., Lambert, M L., Drudy, D., Fitzpatrick, F., Wiuff, C., Brown, D. J., Coia, J. E., Pituch, H., Reichert, P., Even, J., Mossong, J., Widmer, A. F., Olsen, K. E., Allerberger, F., Notermans, D.W., Delmee, M., Coignard, B., Wilcox, M., Patel, B., Frei, R., Nagy, E., Bouza, E., Marin, M., Akerlund, T., Virolainen-Julkunen, A., Lyytikäinen, O., Kotila, S., Ingebretsen, A., Smyth, B., Rooney, P., Poxton, I. R. & Monnet, D. L. (2008). Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. EuroSurveill, 13.
95. Brazier, J. S., Raybould, R., Patel, B., Duckworth, G., Pearson, A., Charlett, A. & Duerden, B. I. (2008). Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. Euro Surveill, 13.
96. Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S. & Songer, J. G. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. J Clin Microbiol, 45: 1963-4.
97. Goorhuis, A., Debast, S. B., Van Leengoed, L. A., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A. & Kuijper, E. J. (2008). *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? J Clin Microbiol, 46: 1157; author reply 1158.
98. Rupnik, M., Widmer, A., Zimmermann, O., Eckert, C. & Barbut, F. (2008). *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. J Clin Microbiol, 46: 2146.
99. Broda, D. M., Delacy, K. M., Bell, R. G., Braggins, T. J. & Cook, R. L. (1996). Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. Int J Food Microbiol, 29: 335-52.
100. Weese, J. S., Rousseau, J. & Arroyo, L. (2005). Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. Can Vet J, 46: 513-6.
101. Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H. R., Duffield, T. & Weese, J. S. (2007). *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerg Infect Dis, 13: 485-7.
102. Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., McDonald, L. C. & Limbago, B. M. (2009). *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. Emerg Infect Dis, 15: 819-21.
103. Weese, J. S., Avery, B. P., Rousseau, J. & Reid-Smith, R. J. (2009). Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. Appl Environ Microbiol, 75: 5009-11.
104. Simango, C. & Mwakurudza, S. (2008). *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int J Food Microbiol, 124: 268-70.
105. Al Saif, N. & Brazier, J. S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol, 45: 133-7.
106. Bakri, M. M., Brown, D. J., Butcher, J. P. & Sutherland, A. D. (2009). *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Emerg Infect Dis, 15: 817-8.
107. Weese, J. S. (2010). *Clostridium difficile* in food--innocent bystander or serious

threat? Clin Microbiol Infect, 16: 3-10.

108. Rupnik, M. (2007). Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? Clin Microbiol Infect, 13: 457-9.

109. Debast, S. B., Van Leengoed, L. A., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E. J. & Bergwerff, A. A. (2009). *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. Environ Microbiol, 11:505-11.

110. Mulligan, M. E., George, W. L., Rolfe, R. D. & Finegold, S. M. (1980). Epidemiological aspects of *Clostridium difficile*-induced diarrhea and colitis. Am J Clin Nutr, 33:2533-8.

111. Sethi, A. K., Al-Nassir, W. N., Nerandzic, M. M., Bobulsky, G. S. & Donskey, C. J. (2010). Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. Infect Control Hosp Epidemiol, 31:21-7.

112. Malamou-Ladas, H., O'farrell, S., Nash, J. Q. & Tabaqchali, S. (1983). Isolation of *Clostridium difficile* from patients and the environment of hospital wards. J Clin Pathol, 36: 88-92.

113. Fawley, W. N. & Wilcox, M. H. (2001). Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection. Epidemiol Infect, 126: 343-50.

114. Samore, M. H., Venkataraman, L., Degirolami, P. C., Arbeit, R. D. & Karchmer, A. W. (1996). Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. Am J Med, 100: 32-40.

115. Kim, K. H., Fekety, R., Batts, D. H., Brown, D., Cudmore, M., Silva, J., Jr. & Waters, D. (1981). Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J Infect Dis, 143: 42-50.

116. Fekety, R., Kim, K. H., Brown, D., Batts, D. H., Cudmore, M. & Silva, J., Jr. (1981). Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am J Med, 70: 906-8.

117. Cohen, S. H., Tang, Y. J., Muenzer, J., Gumerlock, P. H. & Silva, J., Jr. (1997). Isolation of various genotypes of *Clostridium difficile* from patients and the environment in an oncology ward. Clin Infect Dis, 24: 889-93.

118. Titov, L., Lebedkova, N., Shabanov, A., Tang, Y. J., Cohen, S. H. & Silva, J., Jr. (2000). Isolation and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from patients and the hospital environment in Belarus. J Clin Microbiol, 38: 1200-2.

119. Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. Nature, 406: 762-7.

120. Dumford, D. M., 3rd, Nerandzic, M. M., Eckstein, B. C. & Donskey, C. J. (2009). What is on that keyboard? Detecting hidden environmental reservoirs of *Clostridium difficile* during an outbreak associated with North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 strains. Am J Infect Control, 37: 15-9.

121. Walker, N., Gupta, R. & Cheesbrough, J. (2006). Blood pressure cuffs: friend or foe? J Hosp Infect, 63: 167-9.

122. Barnett, J., Thomlinson, D., Perry, C., Marshall, R. & Macgowan, A. P. (1999). An audit of the use of manual handling equipment and their microbiological flora—implications for infection control. J Hosp Infect, 43: 309-13.

123. Roberts, K., Smith, C. F., Snelling, A. M., Kerr, K. G., Banfield, K. R., Sleight, P. A. & Beggs, C. B. (2008). Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. BMC Infect Dis, 8: 7.
124. Fekety, R., Kim, K. H., Brown, D., Batts, D. H., Cudmore, M. & Silva, J., Jr. (1981). Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am J Med, 70: 906-8.
125. McFarland, L. V., Mulligan, M. E., Kwok, R. Y. & Stamm, W. E. (1989). Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med, 320: 204-10.
126. Perry, C., Marshall, R. & Jones, E. (2001). Bacterial contamination of uniforms. J Hosp Infect, 48: 238-41.
127. HPA (2009a). *Clostridium difficile* infection: How to deal with the problem. http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebfile/HPA_C/1232006607827.
128. Dial, S., Delaney, J. A., Schneider, V. & Suissa, S. (2006). Proton pump inhibitor use and risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease defined by prescription for oral vancomycin therapy. Cmaj, 175: 745-8.
129. Wilcox, M. H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C. D. & Fawley, W. N. (2008). A casecontrol study of community-associated *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother, 62: 388-96.
130. Bauer, M. P., Goorhuis, A., Koster, T., Numan-Ruberg, S. C., Hagen, E. C., Debast, S. B., Kuijper, E. J. & Van Dissel, J. T. (2008). Community-onset *Clostridium difficile* associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. Neth J Med, 66: 207-11.
131. Paltansing, S., Van Den Berg, R. J., Guseinova, R. A., Visser, C. E., Van Der Vorm, E. R. & Kuijper, E. J. (2007). Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease in The Netherlands, 2005. Clin Microbiol Infect, 13: 1058-64.
132. Wullt, M., Odenholt, I. & Walder, M. (2003c). Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. Infect Control Hosp Epidemiol, 24: 765-8.
133. Fawley, W. N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S. D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R. C., Jr. & Wilcox, M. H. (2007). Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. Infect Control Hosp Epidemiol, 28: 920-5.
134. Wheeldon, L. J., Worthington, T., Hilton, A. C., Lambert, P. A. & Elliott, T. S. (2008b). Sporocidal activity of two disinfectants against *Clostridium difficile* spores. Br J Nurs, 17: 316-20.
135. Weaver, L., Michels, H. T. & Keevil, C. W. (2008). Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. J Hosp Infect, 68: 145-51.
136. Wheeldon, L. J., Worthington, T., Lambert, P. A., Hilton, A. C., Lowden, C. J. & Elliott, T. S. (2008c). Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. J Antimicrob Chemother, 62: 522-5.

137. Brooks, S. E., Veal, R. O., Kramer, M., Dore, L., Schupf, N. & Adachi, M. (1992). Reduction in the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an acute care hospital and a skilled nursing facility following replacement of electronic thermometers with single-use disposables. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 13: 98-103.
138. Jernigan, J. A., Siegman-Igra, Y., Guerrant, R. C. & Farr, B. M. (1998). A randomized crossover study of disposable thermometers for prevention of *Clostridium difficile* and other nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 19: 494-9.
139. Roberts, K., Smith, C. F., Snelling, A. M., Kerr, K. G., Banfield, K. R., Sleigh, P. A. & Beggs, C. B. (2008). Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infect Dis*, 8: 7.
140. Barbut, F., Menuet, D., Verachten, M. & Girou, E. (2009). Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide dry-mist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of *Clostridium difficile* spores. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30: 507-14
141. Shapey, S., Machin, K., Levi, K. & Boswell, T. C. (2008). Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against environmental *Clostridium difficile* contamination in elderly care wards. *J Hosp Infect*, 70: 136-41.
142. Boyce, J. M., Havill, N. L., Otter, J. A., McDonald, L. C., Adams, N. M., Cooper, T., Thompson, A., Wiggs, L., Killgore, G., Tauman, A. & Noble-Wang, J. (2008). Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental contamination and transmission in a healthcare setting. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29: 723-9.
143. McFarland, L. V., Mulligan, M. E., Kwok, R. Y. & Stamm, W. E. (1989). Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*, 320: 204-10.
144. Fekety, R., Kim, K. H., Brown, D., Batts, D. H., Cudmore, M. & Silva, J., Jr. (1981). Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med*, 70: 906-8.
145. Fekety, R. (1997). Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*, 92: 739-50.
146. Thomas, C. & Riley, T. V. (2003). Restriction of third generation cephalosporin use reduces the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in hospitalised patients. *Commun Dis Intell*, 27 Suppl: S28-31.
147. Kallen, A. J., Thompson, A., Ristaino, P., Chapman, L., Nicholson, A., Sim, B. T., Lessa, F., Sharapov, U., Fadden, E., Boehler, R., Gould, C., Limbago, B., Blythe, D. & McDonald, L. C. (2009). Complete restriction of fluoroquinolone use to control an outbreak of *Clostridium difficile* infection at a community hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30: 264-72.
148. Brown, E., Talbot, G. H., Axelrod, P., Provencher, M. & Hoegg, C. (1990). Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 11:283-90.
149. Pear, S. M., Williamson, T. H., Bettin, K. M., Gerding, D. N. & Galgiani, J. N. (1994). Decrease in nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea by restricting clindamycin use. *Ann Intern Med*, 120: 272-7.

150. Gaynes, R., Rimland, D., Killum, E., Lowery, H. K., Johnson, T. M., Killgore, G. & Tenover, F. C. (2004). Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use. *Clin Infect Dis*, 38: 640-5.
151. McNulty, C., Logan, M., Donald, I. P., Ennis, D., Taylor, D., Baldwin, R. N., Bannerjee, M. & Cartwright, K. A. (1997). Successful control of *Clostridium difficile* infection in an elderly care unit through use of a restrictive antibiotic policy. *J Antimicrob Chemother*, 40: 707-11.
152. Khan, R. & Cheesbrough, J. (2003). Impact of changes in antibiotic policy on *Clostridium difficile*-associated diarrhoea (CDAD) over a five-year period in a district general hospital. *J Hosp Infect*, 54: 104-8.
153. Valiquette, L., Cossette, B., Garant, M. P., Diab, H. & Pepin, J. (2007). Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain. *Clin Infect Dis*, 45 Suppl 2: S112-21.
154. Carling, P., Fung, T., Killion, A., Terrin, N. & Barza, M. (2003). Favorable impact of a multidisciplinary antibiotic management program conducted during 7 years. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24: 699-706.
155. Riggs, M. M., Sethi, A. K., Zabarsky, T. F., Eckstein, E. C., Jump, R. L. & Donskey, C. J. (2007). Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis*, 45: 992-8.
156. Delmee, M., Van Broeck, J., Simon, A., Janssens, M. & Avesani, V. (2005). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol*, 54: 187-91.
157. Wilson, K. H. (1993). The microecology of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 16 Suppl 4: S214-8.
158. Eglow, R., Pothoulakis, C., Itzkowitz, S., Israel, E. J., O'keane, C. J., Gong, D., Gao, N., Xu, Y. L., Walker, W. A. & Lamont, J. T. (1992). Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest*, 90: 822-9.
159. Fekety, R., McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Elmer, G. W. & Mulligan, M. E. (1997). Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis*, 24: 324-33.
160. Bignardi, G. E. (1998). Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect*, 40: 1-15.
161. Hogenauer, C., Hammer, H. F., Krejs, G. J. & Reisinger, E. C. (1998). Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*, 27: 702-10.
162. Finney (1986). Classic articles in colonic and rectal surgery. John Miller Turpin Finney 1863-1942. Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Dis Colon Rectum*, 29: 218-21.
163. Tedesco, F. J., Barton, R. W. & Alpers, D. H. (1974). Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med*, 81: 429-33.

164. Mcfarland, L. V. (1998). Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis*, 16: 292-307.
165. Surawicz, C. M. & Mcfarland, L. V. (1999). Pseudomembranous colitis: causes and cures. *Digestion*, 60: 91-100.
166. Kawamoto, S., Horton, K. M. & Fishman, E. K. (1999). Pseudomembranous colitis:spectrum of imaging findings with clinical and pathologic correlation. *Radiographics*,19: 887-97.
167. Barbut, F., Richard, A., Hamadi, K., Chomette, V., Burghoffer, B. & Petit, J. C. (2000).Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, 38: 2386-8.
168. Tabaqchali, S. & Jumaa, P. (1995). Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. *Bmj*, 310: 1375-80.
169. Gerding, D. N., Johnson, S., Peterson, L. R., Mulligan, M. E. & Silva, J., Jr. (1995). *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol*,16: 459-77.
170. Mcfarland, L. V. (2005). Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? *J Med Microbiol*, 54: 101-11.
171. Wilcox, M. H., Fawley, W. N., Settle, C. D. & Davidson, A. (1998). Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection--relapse or reinfection? *J Hosp Infect*, 38:93-100.
172. Alonso, R., Gros, S., Pelaez, T., Garcia-De-Viedma, D., Rodriguez-Creixems, M. & Bouza,E. (2001). Molecular analysis of relapse vs re-infection in HIV-positive patients suffering from recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Hosp Infect*, 48:86-92.
173. O'Neill, G. L., Beaman, M. H. & Riley, T. V. (1991). Relapse versus reinfection with *Clostridium difficile*. *Epidemiol Infect*, 107: 627-35.
174. Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Ueno, K., Sakata, Y. & Fujita, K. (1996). Relapses or reinfections: analysis of a case of *Clostridium difficile*-associated colitis by two typing systems. *Curr Microbiol*, 33: 220-3.
175. Asha, N. J., Tompkins, D. & Wilcox, M. H. (2006). Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 44: 2785-91.
176. Wolf, L. E., Gorbach, S. L. & Granowitz, E. V. (1998). Extraintestinal *Clostridium difficile*:10 years' experience at a tertiary-care hospital. *Mayo Clin Proc*, 73: 943-7.
177. Jacobs, A., Barnard, K., Fishel, R. & Gradon, J. D. (2001). Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections. Presentation of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 80: 88-101.
178. Feldman, R. J., Kallich, M. & Weinstein, M. P. (1995). Bacteremia due to *Clostridium difficile*: case report and review of extraintestinal *C. difficile* infections. *Clin Infect Dis*, 20: 1560-2.
179. Rampling, A., Warren, R. E., Bevan, P. C., Hoggarth, C. E., Swirsky, D. & Hayhoe, F. G.(1985). *Clostridium difficile* in haematological malignancy. *J Clin Pathol*,

38: 445-51.

180. Cid, A., Juncal, A. R., Aguilera, A., Regueiro, B. J. & Gonzalez, V. (1998). *Clostridium difficile* bacteremia in an immunocompetent child. J Clin Microbiol, 36: 1167-8.
181. Chatila, W. & Manthous, C. A. (1995). *Clostridium difficile* causing sepsis and an acute abdomen in critically ill patients. Crit Care Med, 23: 1146-50.
182. Byl, B., Jacobs, F., Struelens, M. J. & Thys, J. P. (1996). Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. Clin Infect Dis, 22: 712.
183. Gerard, M., Defresne, N., Van Der Auwera, P. & Meunier, F. (1989). Polymicrobial septicemia with *Clostridium difficile* in acute diverticulitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 8: 300-2.
184. Simpson, A. J., Das, S. S. & Tabaqchali, S. (1996). Nosocomial empyema caused by *Clostridium difficile*. J Clin Pathol, 49: 172-3.
185. Spencer, R. C., Courtney, S. P. & Nicol, C. D. (1984). Polymicrobial septicaemia due to *Clostridium difficile* and *Bacteroides fragilis*. Br Med J (Clin Res Ed), 289: 531-2.
186. Saginur, R., Fogel, R., Begin, L., Cohen, B. & Mendelson, J. (1983). Splenic abscess due to *Clostridium difficile*. J Infect Dis, 147: 1105.
187. Bhargava, A., Sen, P., Swaminathan, A., Ogbolu, C., Chechko, S. & Stone, F. (2000). Rapidly progressive necrotizing fasciitis and gangrene due to *Clostridium difficile*: case report. Clin Infect Dis, 30: 954-5.
188. Incavo, S. J., Muller, D. L., Krag, M. H. & Gump, D. (1988). Vertebral osteomyelitis caused by *Clostridium difficile*. A case report and review of the literature. Spine (Phila Pa1976), 13: 111-3.
189. McCarthy, J. & Stingemore, N. (1999). *Clostridium difficile* infection of a prosthetic joint presenting 12 months after antibiotic-associated diarrhoea. J Infect, 39: 94-6.
190. Brown, T. A., Rajappannair, L., Dalton, A. B., Bandi, R., Myers, J. P. & Kefalas, C. H. (2007). Acute appendicitis in the setting of *Clostridium difficile* colitis: case report and review of the literature. Clin Gastroenterol Hepatol, 5: 969-71.
191. Stieglbauer, K. T., Gruber, S. A. & Johnson, S. (1995). Elevated serum antibody response to toxin A following splenic abscess due to *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis, 20:160-2.
192. Studemeister, A. E., Beilke, M. A. & Kirmani, N. (1987). Splenic abscess due to *Clostridium difficile* and *Pseudomonas paucimobilis*. Am J Gastroenterol, 82: 389-90.
193. Pron, B., Merckx, J., Touzet, P., Ferroni, A., Poyart, C., Berche, P. & Gaillard, J. L. (1995). Chronic septic arthritis and osteomyelitis in a prosthetic knee joint due to *Clostridium difficile*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 14: 599-601.
194. Gravisse, J., Barnaud, G., Hanau-Bercot, B., Raskine, L., Riahi, J., Gaillard, J. L. & Sanson-Le-Pors, M. J. (2003). *Clostridium difficile* brain empyema after prolonged intestinal carriage. J Clin Microbiol, 41: 509-11.
195. Kikkawa, H., Miyamoto, K., Takiguchi, N., Kondo, T. & Hitomi, S. (2008). Surgical-site infection with toxin A-nonproducing and toxin B-producing *Clostridium difficile*. J Infect Chemother, 14: 59-61.

196. Deptula, A., Kruszynska, E., Mikucka, A., Gospodarek, E., Olszewski, K., Kruczynski, J. & Matewski, D. (2009). Toxin A-producing *Clostridium difficile* as an aetiological factor of post-traumatic wound infection. *J Med Microbiol*, 58: 963-4.
197. Urban, E., Terhes, G., Markotics, A., Soki, J. & Nagy, E. (2009). Rare extraintestinal infection caused by toxin-producing *Clostridium difficile*. *Anaerobe*.
198. Garcia-Lechuz, J. M., Hernangomez, S., Juan, R. S., Pelaez, T., Alcalá, L. & Bouza, E. (2001). Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 7: 453-7.
199. Bartlett, J. G. (2006). Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med*, 145: 758-64.
200. Honda, T., Hernandez, I., Katoh, T. & Miwatani, T. (1983). Stimulation of enterotoxin production of *Clostridium difficile* with antibiotics. *Lancet*, 1: 655.
201. Onderdonk, A. B., Lowe, B. R. & Bartlett, J. G. (1979). Effect of environmental stress on *Clostridium difficile* toxin levels during continuous cultivation. *Appl Environ Microbiol*, 38: 637-41.
202. Adams, D. A., Riggs, M. M. & Donskey, C. J. (2007). Effect of fluoroquinolone treatment on growth of and toxin production by epidemic and nonepidemic *clostridium difficile* strains in the cecal contents of mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 2674-8.
203. Nakamura, S., Mikawa, M., Tanabe, N., Yamakawa, K. & Nishida, S. (1982). Effect of clindamycin on cytotoxin production by *Clostridium difficile*. *Microbiol Immunol*, 26: 985-92.
204. Pultz, N. J. & Donskey, C. J. (2005). Effect of antibiotic treatment on growth of and toxin production by *Clostridium difficile* in the cecal contents of mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3529-32.
205. Saxton, K., Baines, S. D., Freeman, J., O'connor, R. & Wilcox, M. H. (2009). Effects of exposure of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 to fluoroquinolones in a human gut model. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 412-20.
206. Hennequin, C., Collignon, A. & Karjalainen, T. (2001a). Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. *Microb Pathog*, 31: 255-60.
207. Deneve, C., Delomenie, C., Barc, M. C., Collignon, A. & Janoir, C. (2008). Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *J Med Microbiol*, 57: 732-8.
208. Cunningham, R., Dale, B., Undy, B. & Gaunt, N. (2003). Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect*, 54: 243-5.
209. Jackson, S., Calos, M., Myers, A. & Self, W. T. (2006). Analysis of proline reduction in the nosocomial pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*, 188: 8487-95.
210. Dalton, B. R., Lye-Maccannell, T., Henderson, E. A., Maccannell, D. R. & Louie, T. J. (2009). Proton pump inhibitors increase significantly the risk of *Clostridium difficile* infection in a low-endemicity, non-outbreak hospital setting. *Aliment Pharmacol Ther*, 29: 626-34.
211. Nerandzic, M. M., Pultz, M. J. & Donskey, C. J. (2009). Examination of potential mechanisms to explain the association between proton pump inhibitors and *Clostridium*

- difficile* infection. Antimicrob Agents Chemother, 53: 4133-7.
212. Ackermann, G., Degner, A., Cohen, S. H., Silva, J., Jr. & Rodloff, A. C. (2003). Prevalence and association of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS(B)) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother, 51: 599-603.
213. Al-Tureihi, F. I., Hassoun, A., Wolf-Klein, G. & Isenberg, H. (2005). Albumin, length of stay, and proton pump inhibitors: key factors in *Clostridium difficile*-associated disease in nursing home patients. J Am Med Dir Assoc, 6: 105-8.
214. Dial, S., Alrasadi, K., Manoukian, C., Huang, A. & Menzies, D. (2004). Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. Cmaj, 171: 33-8.
215. Dial, S., Delaney, J. A., Barkun, A. N. & Suissa, S. (2005). Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. Jama, 294: 2989-95.
216. Dial, S., Delaney, J. A., Schneider, V. & Suissa, S. (2006). Proton pump inhibitor use and risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease defined by prescription for oral vancomycin therapy. Cmaj, 175: 745-8.
217. Kazakova, S. V., Ware, K., Baughman, B., Bilukha, O., Paradis, A., Sears, S., Thompson, A., Jensen, B., Wiggs, L., Bessette, J., Martin, J., Clukey, J., Gensheimer, K., Killgore, G. & McDonald, L. C. (2006). A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemic strain of *Clostridium difficile*. Arch Intern Med, 166: 2518-24.
218. Kuijper, E. J., Coignard, B. & Tull, P. (2006a). Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect, 12 Suppl 6:2-18.
219. Kelly, C. P. (2007). Playing host to the difficult *Clostridium*. Clin Gastroenterol Hepatol, 5: 912-4.
220. Kelly, C. P., Pothoulakis, C., Orellana, J. & Lamont, J. T. (1992). Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. Gastroenterology, 102: 35-40.
221. Kyne, L., Warny, M., Qamar, A. & Kelly, C. P. (2000). Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. N Engl J Med, 342: 390-7.
222. Kyne, L., Warny, M., Qamar, A. & Kelly, C. P. (2001). Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet, 357: 189-93.
223. Aronsson, B., Granstrom, M., Mollby, R. & Nord, C. E. (1985). Serum antibody response to *Clostridium difficile* toxins in patients with *Clostridium difficile* diarrhoea. Infection, 13: 97-101.
224. Aronsson, B., Granstrom, M., Mollby, R. & Nord, C. E. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to *Clostridium difficile* toxins in patients with pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea. J Immunol Methods, 60: 341-50.
225. Bacon, A. E., 3rd & Fekety, R. (1994). Immunoglobulin G directed against toxins A and B of *Clostridium difficile* in the general population and patients with

- antibiotic-associated diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 18: 205-9.
226. Leung, D. Y., Kelly, C. P., Boguniewicz, M., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. & Flores, A. (1991). Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr*, 118: 633-7.
227. Mulligan, M. E., Miller, S. D., McFarland, L. V., Fung, H. C. & Kwok, R. Y. (1993). Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 16 Suppl 4: S239-44.
228. Warny, M., Vaerman, J. P., Avesani, V. & Delmee, M. (1994). Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun*, 62: 384-9.
229. Salcedo, J., Keates, S., Pothoulakis, C., Warny, M., Castagliuolo, I., Lamont, J. T. & Kelly, C. P. (1997). Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut*, 41: 366-70.
230. Jiang, Z. D., Garey, K. W., Price, M., Graham, G., Okhuysen, P., Dao-Tran, T., Larocco, M. & Dupont, H. L. (2007). Association of interleukin-8 polymorphism and immunoglobulin G anti-toxin A in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5: 964-8.
231. Eltringham, I. J. (2009). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits. *Lancet Infect Dis*, 9: 141-2.
232. Delmee, M., Van Broeck, J., Simon, A., Janssens, M. & Avesani, V. (2005). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol*, 54: 187-91.
233. Van Den Berg, R. J., Vaessen, N., Endtz, H. P., Schulin, T., Van Der Vorm, E. R. & Kuijper, E. J. (2007). Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol*, 56: 36-42.
234. Peterson, L. R., Manson, R. U., Paule, S. M., Hacek, D. M., Robicsek, A., Thomson, R. B., Jr. & Kaul, K. L. (2007). Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*, 45: 1152-60.
235. Stamper, P. D., Alcabasa, R., Aird, D., Babiker, W., Wehrin, J., Ikpeama, I. & Carroll, K. C. (2009). Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 47: 373-8.
236. Belanger, S. D., Boissinot, M., Clairoux, N., Picard, F. J. & Bergeron, M. G. (2003). Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 41: 730-4.
237. Sloan, L. M., Duresko, B. J., Gustafson, D. R. & Rosenblatt, J. E. (2008). Comparison of real-time PCR for detection of the tcdC gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*, 46: 1996-2001.
238. Wroblewski, D., Hannett, G. E., Bopp, D. J., Dumyati, G. K., Halse, T. A., Dumas, N. B. & Musser, K. A. (2009). Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin*

Microbiol, 47:2142-8.

239. Eastwood, K., Else, P., Charlett, A. & Wilcox, M. (2009). Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for C.difficile tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. J Clin Microbiol, 47: 3211-7.
240. Van Den Berg, R. J., Vaessen, N., Endtz, H. P., Schulin, T., Van Der Vorm, E. R. & Kuijper, E. J. (2007). Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. J Med Microbiol, 56: 36-42.
241. Bolton, R. P. & Culshaw, M. A. (1986). Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. Gut, 27: 1169-72.
242. Dion, Y. M., Richards, G. K., Prentis, J. J. & Hinchey, E. J. (1980). The influence of oral versus parenteral preoperative metronidazole on sepsis following colon surgery. Ann Surg, 192: 221-6.
243. Kyne, L. (2010). *Clostridium difficile*--beyond antibiotics. N Engl J Med, 362: 264-5.
244. Wong, S. S., Woo, P. C., Luk, W. K. & Yuen, K. Y. (1999). Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest. Diagn Microbiol Infect Dis, 34: 1-6.
245. Brazier, J. S., Fawley, W., Freeman, J. & Wilcox, M. H. (2001). Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. J Antimicrob Chemother, 48: 741-2.
246. Pelaez, T., Alcalá, L., Alonso, R., Rodríguez-Creixems, M., García-Lechuz, J. M. & Bouza, E. (2002). Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. Antimicrob Agents Chemother, 46: 1647-50.
247. Huang, H. & Nord, C. E. (2009). Can Metronidazole Still Be Used for Treatment of *Clostridium difficile* Infections? Curr Infect Dis Rep, 11: 3-6.
248. Poutanen, S. M. & Simor, A. E. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Cmaj, 171: 51-8.
249. Scarpignato, C. & Pelosini, I. (2005). Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. Chemotherapy, 51 Suppl 1: 36-66.
250. Marchese, A., Salerno, A., Pesce, A., Debbia, E. A. & Schito, G. C. (2000). In vitro activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile* and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. Chemotherapy, 46: 253-66.
251. Johnson, S., Schriever, C., Patel, U., Patel, T., Hecht, D. W. & Gerding, D. N. (2009). Rifaximin Redux: treatment of recurrent *Clostridium difficile* infections with rifaximin immediately post-vancomycin treatment. Anaerobe, 15: 290-1.
252. Hecht, D. W., Galang, M. A., Sambol, S. P., Osmolski, J. R., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2007). In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. Antimicrob Agents Chemother, 51: 2716-9.

253. O'connor, J. R., Galang, M. A., Sambol, S. P., Hecht, D. W., Vedantam, G., Gerding, D. N. & Johnson, S. (2008). Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 2813-7.
254. Curry, S. R., Marsh, J. W., Shutt, K. A., Muto, C. A., O'leary, M. M., Saul, M. I., Pasculle, A. W. & Harrison, L. H. (2009). High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. *Clin Infect Dis*, 48: 425-9.
255. Musher, D. M., Logan, N., Hamill, R. J., Dupont, H. L., Lentnek, A., Gupta, A. & Rossignol, J. F. (2006). Nitazoxanide for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Clin Infect Dis*, 43: 421-7.
256. Mcvay, C. S. & Rolfe, R. D. (2000). In vitro and in vivo activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2254-8.
257. Musher, D. M., Logan, N., Bressler, A. M., Johnson, D. P. & Rossignol, J. F. (2009). Nitazoxanide versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection: a randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis*, 48: e41-6.
258. Yangco, B. G., Sher, G. & Bardin, M. C. (2009). Nitazoxanide and probiotics for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection in a peritoneal dialysis patient. *South Med J*, 102: 746-7.
259. Sullivan, K. M. & Spooner, L. M. (2010). Fidaxomicin: a macrocyclic antibiotic for the management of *Clostridium difficile* infection. *Ann Pharmacother*, 44: 352-9.
260. Citron, D. M., Babakhani, F., Goldstein, E. J., Nagaro, K., Sambol, S., Sears, P., Shue, Y. K. & Gerding, D. N. (2009). Typing and susceptibility of bacterial isolates from the fidaxomicin (OPT-80) phase II study for *C. difficile* infection. *Anaerobe*, 15: 234-6.
261. Louie, T., Miller, M., Donskey, C., Mullane, K. & Goldstein, E. J. (2009). Clinical outcomes, safety, and pharmacokinetics of OPT-80 in a phase 2 trial with patients with *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 223-8.
262. Wenisch, C., Parschalk, B., Hasenhundl, M., Hirschl, A. M. & Graninger, W. (1996). Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*, 22: 813-8.
263. Wullt, M. & Odenholt, I. (2004). A double-blind randomized controlled trial of fusidic acid and metronidazole for treatment of an initial episode of *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Antimicrob Chemother*, 54: 211-6.
264. Noren, T., Wullt, M., Akerlund, T., Back, E., Odenholt, I. & Burman, L. G. (2006). Frequent emergence of resistance in *Clostridium difficile* during treatment of *C. difficile* associated diarrhea with fusidic acid. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 3028-32.
265. Noren, T., Aliksson, I., Akerlund, T., Burman, L. G. & Unemo, M. (2009). In vitro susceptibility to 17 antimicrobials among clinical *Clostridium difficile* isolates collected 1993 - 2007 in Sweden. *Clin Microbiol Infect*.
266. Baines, S. D., Saxton, K., Freeman, J. & Wilcox, M. H. (2006). Tigecycline does not induce proliferation or cytotoxin production by epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *J Antimicrob Chemother*, 58: 1062-5.
267. Herpers, B. L., Vlamincx, B., Burkhardt, O., Blom, H., Biemond-Moeniralam, H.

- S., Hornef, M., Welte, T. & Kuijper, E. J. (2009). Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, 48: 1732-5.
268. McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekety, R., Elmer, G. W., Moyer, K.A., Melcher, S. A., Bowen, K. E., Cox, J. L., Noorani, Z. & Et Al. (1994). A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *Jama*, 271: 1913-8.
269. Lawrence, S. J., Korzenik, J. R. & Mundy, L. M. (2005). Probiotics for recurrent *Clostridium difficile* disease. *J Med Microbiol*, 54: 905-6.
270. Surawicz, C. M., McFarland, L. V., Greenberg, R. N., Rubin, M., Fekety, R., Mulligan, M.E., Garcia, R. J., Brandmarker, S., Bowen, K., Borjal, D. & Elmer, G. W. (2000). The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of highdose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis*, 31: 1012-7.
271. Wullt, M., Hagslatt, M. L. & Odenholt, I. (2003b). *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. *Scand J Infect Dis*, 35: 365-7.
272. Pillai, A. & Nelson, R. (2008). Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004611.
273. Munoz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J. M., Perez, M. J., Sanchez-Somolinos, M., Rincon, C., Hortal, J. & Pelaez, T. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*, 40: 1625-34.
274. Kotloff, K. L., Wasserman, S. S., Losonsky, G. A., Thomas, W., Jr., Nichols, R., Edelman, R., Bridwell, M. & Monath, T. P. (2001). Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. *Infect Immun*, 69: 988-95.
275. McPherson, S., Rees, C. J., Ellis, R., Soo, S. & Panter, S. J. (2006). Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. *Dis Colon Rectum*, 49: 640-5.
276. Murphy, C., Vernon, M. & Cullen, M. (2006). Intravenous immunoglobulin for resistant *Clostridium difficile* infection. *Age Ageing*, 35: 85-6.
277. Wilcox, M. H. (2004). Descriptive study of intravenous immunoglobulin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Antimicrob Chemother*, 53: 882-4.
278. Beales, I. L. (2002). Intravenous immunoglobulin for recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Gut*, 51: 456.
279. Hassoun, A. & Ibrahim, F. (2007). Use of intravenous immunoglobulin for the treatment of severe *Clostridium difficile* colitis. *Am J Geriatr Pharmacother*, 5: 48-51.
280. Koulaouzidis, A., Tatham, R., Moschos, J. & Tan, C. W. (2008). Successful treatment of *Clostridium difficile* colitis with intravenous immunoglobulin. *J Gastrointest Liver Dis*, 17: 353-5.
281. Juang, P., Skledar, S. J., Zgheib, N. K., Paterson, D. L., Vergis, E. N., Shannon, W. D., Ansani, N. T. & Branch, R. A. (2007). Clinical outcomes of intravenous immune globulin in severe *clostridium difficile*-associated diarrhea. *Am J Infect Control*,

35:131-7.

282. Van Nood, E., Speelman, P., Kuijper, E. J. & Keller, J. J. (2009). Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: is donor faeces the solution? Euro Surveill, 14.

283. Braunlin, W., Xu, Q., Hook, P., Fitzpatrick, R., Klinger, J. D., Burrier, R. & Kurtz, C. B.(2004). Toxin binding of tolevamer, a polyanionic drug that protects against antibiotic-associated diarrhea. Biophys J, 87: 534-9.

284. Baines, S. D., Freeman, J. & Wilcox, M. H. (2009). Tolevamer is not efficacious in the neutralization of cytotoxin in a human gut model of *Clostridium difficile* infection. Antimicrob Agents Chemother, 53: 2202-4.

285. Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R., Thomson, N. R., Roberts, A. P., Cerdeno-Tarraga, A. M., Wang, H., Holden, M. T., Wright, A., Churcher, C., Quail, M. A., Baker, S., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Cronin, A., Davis, P., Dowd, L., Fraser, A., Feltwell, T., Hance, Z., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Price, C., Rabbinowitsch, E., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Unwin, L., Whithead, S., Dupuy, B., Dougan, G., Barrell, B. & Parkhill, J. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. Nat Genet, 38: 779-86.

286. Nakamura, S., Serikawa, T., Mikawa, M., Nakashio, S., Yamakawa, K. & Nishida, S.(1981). Agglutination, toxigenicity and sorbitol fermentation of *Clostridium difficile*. Microbiol Immunol, 25: 863-70.

287. Wust, J., Sullivan, N. M., Hardegger, U. & Wilkins, T. D. (1982). Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J Clin Microbiol, 16: 1096-101.

288. Poxton, I. R., Aronsson, B., Mollby, R., Nord, C. E. & Collee, J. G. (1984). Immunochemical fingerprinting of *Clostridium difficile* strains isolated from an outbreak of antibiotic-associated colitis and diarrhoea. J Med Microbiol, 17: 317-24.

289. Delmee, M., Homel, M. & Wauters, G. (1985). Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. J Clin Microbiol, 21: 323-7.

290. Rupnik, M., Avesani, V., Janc, M., Von Eichel-Streiber, C. & Delmee, M. (1998). A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. J Clin Microbiol, 36: 2240-7.

291. Mccoubrey, J. & Poxton, I. R. (2001). Variation in the surface layer proteins of *Clostridium difficile*. FEMS Immunol Med Microbiol, 31: 131-5.

292. Drudy, D., Calabi, E., Kyne, L., Sougioultzis, S., Kelly, E., Fairweather, N. & Kelly, C. P.(2004). Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. FEMS Immunol Med Microbiol, 41: 237-42.

293. O'brien, J. B., McCabe, M. S., Athie-Morales, V., McDonald, G. S., Ni Eidhin, D. B. & Kelleher, D. P. (2005). Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins. FEMS Microbiol Lett, 246: 199-205.

294. Ausiello, C. M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Frezza, S. & Mastrantonio, P. (2006). Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells.

Microbes Infect, 8: 2640-6.

295. Loo, V. G., Poirier, L., Miller, M. A., Oughton, M., Libman, M. D., Michaud, S., Bourgault, A. M., Nguyen, T., Frenette, C., Kelly, M., Vibien, A., Brassard, P., Fenn, S., Dewar, K., Hudson, T. J., Horn, R., Rene, P., Monczak, Y. & Dascal, A. (2005). A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*, 353: 2442-9.
296. Drudy, D., Goorhuis, B., Bakker, D., Kyne, L., Van Den Berg, R., Fenelon, L., Fanning, S. & Kuijper, E. J. (2008). Clindamycin-resistant clone of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14: 1485-7.
297. Kuijper, E. J., Van Den Berg, R. J., Debast, S., Visser, C. E., Veenendaal, D., Troelstra, A., Van Der Kooi, T., Van Den Hof, S. & Notermans, D. W. (2006b). *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 12: 827-30.
298. Rupnik, M., Brazier, J. S., Duerden, B. I., Grabnar, M. & Stubbs, S. L. (2001). Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology*, 147: 439-47.
299. Martin, H., Abbott, L., Low, D., Willey, B., Mulvey, M. & Weese, J. S. (2008). Genotypic investigation of *Clostridium difficile* in Prince Edward Island. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 19: 409-412.
300. Hawkins, C. C., Buggy, B. P., Fekety, R. & Schaberg, D. R. (1984). Epidemiology of colitis induced by *Clostridium difficile* in hamsters: application of a bacteriophage and bacteriocin typing system. *J Infect Dis*, 149: 775-80.
301. Sell, T. L., Schaberg, D. R. & Fekety, F. R. (1983). Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 17: 1148-52.
302. Camorlinga-Ponce, M., Gamboa, M., Barragan, J. J., Munoz, O., Fekety, F. R. & Torres, J.F. (1987). Epidemiological aspects of *Clostridium difficile* in a pediatric hospital and its role in diarrheal disease. *Eur J Clin Microbiol*, 6: 542-6.
303. Kaatz, G. W., Gitlin, S. D., Schaberg, D. R., Wilson, K. H., Kauffman, C. A., Seo, S. M. & Fekety, R. (1988). Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Epidemiol*, 127: 1289-94.
304. Pitt, T. L. & Gaston, M. A. (1995b). Bacteriophage typing. *Methods Mol Biol*, 46: 15-26.
305. Pitt, T. L. & Gaston, M. A. (1995a). Bacteriocin typing. *Methods Mol Biol*, 46: 5-14.
306. Devlin, H. R., Au, W., Foux, L. & Bradbury, W. C. (1987). Restriction endonuclease analysis of nosocomial isolates of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 25: 2168-72.
307. Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., Frost, E. H., Savelkoul, P., Nicholson, B., Van Den Berg, R. J., Kato, H., Sambol, S. P., Zuckowski, W., Woods, C., Limbago, B., Gerding, D. N. & McDonald, L. C. (2008). Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene

- sequence typing. J Clin Microbiol, 46: 431-7.
308. Marsh, J. W., O'leary, M. M., Shutt, K. A., Pasculle, A. W., Johnson, S., Gerding, D. N., Muto, C. A. & Harrison, L. H. (2006). Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. J Clin Microbiol, 44: 2558-66.
309. Bidet, P., Lalande, V., Salauze, B., Burghoffer, B., Avesani, V., Delmee, M., Rossier, A., Barbut, F. & Petit, J. C. (2000). Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 38: 2484-7.
310. Wullt, M., Burman, L. G., Laurell, M. H. & Akerlund, T. (2003a). Comparison of AP-PCR typing and PCR-ribotyping for estimation of nosocomial transmission of *Clostridium difficile*. J Hosp Infect, 55: 124-30.
311. Rademaker, J. L. W., & De Bruijn, F. J. (1997) Characterisation and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis., John Wiley.
312. Spigaglia, P. & Mastrantonio, P. (2003). Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 41:2454-7.
313. Rahmati, A., Gal, M., Northey, G. & Brazier, J. S. (2005). Subtyping of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction (PCR) ribotype 001 by repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting. J Hosp Infect, 60: 56-60.
314. Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 3140-5.
315. Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J. F. & Pons, J. L. (2004). Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. J Clin Microbiol, 42: 2609-17.
316. Marsh, J. W., O'leary, M. M., Shutt, K. A., Sambol, S. P., Johnson, S., Gerding, D. N. & Harrison, L. H. (2009). Multilocus variable number tandem repeat analysis and multilocus sequence typing reveal genetic relationships among *Clostridium difficile* isolates genotyped by restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol.
317. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Et Al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 23: 4407-14.
318. Klaassen, C. H., Van Haren, H. A. & Horrevorts, A. M. (2002). Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. J Clin Microbiol, 40: 101-4.
319. Van Den Berg, R. J., Claas, E. C., Oyib, D. H., Klaassen, C. H., Dijkshoorn, L., Brazier, J. S. & Kuijper, E. J. (2004). Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. J Clin Microbiol, 42: 1035-41.
320. Karjalainen, T., Saumier, N., Barc, M. C., Delmee, M. & Collignon, A. (2002).

- Clostridium difficile* genotyping based on *slpA* variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. *J Clin Microbiol*, 40: 2452-8
321. Kato, H., Yokoyama, T. & Arakawa, Y. (2005). Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *J Med Microbiol*, 54: 167-71.
322. Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75.
323. Kristjansson, M., Samore, M. H., Gerding, D. N., Degirolami, P. C., Bettin, K. M., Karchmer, A. W. & Arbeit, R. D. (1994). Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol*, 32: 1963-9.
324. Alonso, R., Martin, A., Pelaez, T., Marin, M., Rodriguez-Creixems, M. & Bouza, E. (2005). An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*, 54: 155-7.
325. Stubbs, S. L., Brazier, J. S., O'Neill, G. L. & Duerden, B. I. (1999). PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol*, 37: 461-3.
326. O'Neill G.L., Ogunsola F.T., Brazier J.S., Duerden B.I. (1996). [Modification of a PCR Ribotyping Method for Application as a Routine Typing Scheme for *Clostridium difficile*](#). *Anaerobe*, 4: 195-261
327. Fawley, W. N., Freeman, J., Smith, C., Harmanus, C., Van Den Berg, R. J., Kuijper, E. J. & Wilcox, M. H. (2008). Use of highly discriminatory fingerprinting to analyze clusters of *Clostridium difficile* infection cases due to epidemic ribotype 027 strains. *J Clin Microbiol*, 46: 954-60.
328. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013.
329. Cohen, S., Gerding, D., Johnson, S., Kelly, C., Loo, V., McDonald, L., Wilcox, M. (2010). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(5), 431-455.
330. Gurtler, V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16s-23s rDNA spacer regions *Journal of General Microbiology* (1993), 139, 3089-3097.
331. Cartwright, C. P., Stock, F., Beekmann, S. E., Williams, E. C., & Gill, V. J. (1995). PCR amplification of rRNA intergenic spacer regions as a method for epidemiologic typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 184-187.
332. O'Neill, G.L. Ogunsola, F.T. Brazier, J.S. Duerden, B.I. Modification of a PCR Ribotyping Method for Application as a Routine Typing Scheme for *Clostridium difficile*, *Anaerobe*, Vol 2, Issue 4, 1996, 205-209
333. [Bidet P](#), [Barbut F](#), [Lalande V](#), [Burghoffer B](#), [Petit JC](#). Development of a new

- PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. [FEMS Microbiol Lett.](#) 1999;175(2):261-6
334. Stubbs, S. L. J., Brazier, J. S., O'Neill, G. L., & Duerden, B. I. (1999). PCR Targeted to the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region of *Clostridium difficile* and Construction of a Library Consisting of 116 Different PCR Ribotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), 461–463.
335. [Indra A](#), [Huhulescu S](#), [Schneeweis M](#), [Hasenberger P](#), [Kernbichler S](#), [Fiedler A](#), [Wewalka G](#), [Allerberger F](#), [Kuijper EJ](#). Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. [J Med Microbiol.](#) 2008 Nov;57(Pt 11):1377-82
336. Killgore, G. E. & Kato, H. (1994). Use of arbitrary primer PCR to type *Clostridium difficile* and comparison of results with those by immunoblot typing. *J Clin Microbiol*, 32:1591-3.
337. Spigaglia, P. & Mastrantonio, P. (2003). Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 41:2454-7.
338. Johnson, S., Sambol, S. P., Brazier, J. S., Delmée, M., Avesani, V., Merrigan, M. M., & Gerding, D. N. (2003). International Typing Study of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium difficile* Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1543–1547.
339. [Lawson PA](#), [Citron DM](#), [Tyrrell KL](#), [Finegold SM](#). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. [Anaerobe.](#) 2016 Aug;40:95-9.
340. Trajkovska Dokic E., et al. Increasing awareness for *Clostridium difficile* infection at the UC's "Mother Teresa", *Microbiologia Balkanika*, 2015
341. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis* 2014;14: 1208e19.
342. Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Donskey CJ. Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:21e7.
343. Bryant K, McDonald LC. *Clostridium difficile* infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:145e6.
344. Wendt JM, Cohen JA, Mu Y, Dumyati GK, Dunn JR, Holzbauer SM, et al. *Clostridium difficile* infection among children across diverse US geographic locations. *Pediatrics* 2014;133:651e8.
345. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Aug;22 Suppl 4:S63-81
346. Alcalá L, Martín A, Marin M, Sanchez-Somolinos M, Catalan P, Pelaez T, et al. The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation: where is the problem? *Clin Microbiol Infect* 2012;18:E204e13.
347. Planche TD, Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA, et al.

Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. *Lancet Infect Dis* 2013;13:936e45.

348. Freeman J, Wilcox M. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *J Clin Pathol* 2003;56:126–128

349. Rupnik M., Tambic Andrasevic A., Trajkovska Dokic E., Matas I., Jovanovic M., Pasic S., Kocuvan A., Janezic S.(2016) Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes and high proportion of 027 and 176 in some hospitals in four South Eastern European countries;*Anaerobe*, 42: 142-144

350. Davies K. A, Ashwin H, Longshaw C. M, Burns A, Davis L, Wilcox H. on behalf of the EUCLID study group. 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):pii=30294.

351. Freeman J., Vernon K., Morris S, Nicholson S., Todhunter C., Longshaw, Wilcox M. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 248.e9–248.e16

352. Imwattana K, Knight D, Kullin B, Collins D, Putsathit P, Kiratisin P,& Riley T.(2019) *Clostridium difficile* ribotype 017 – characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia, *Emerging Microbes & Infections*, 8:1, 796-807

353. Ivanova K, Petrov P, Asseva G et al. Prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Bulgaria 2008–2010 *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 64, No 7, 2011

354. Cheng V, Wing-Cheong O, Tse E et al.(2011). *Clostridium difficile* isolates with increased sporulation: Emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 30. 1371-81

355. Debast, S., Bauer, M. and Kuijper, E. (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20: 126.

356. Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, Block C, Mendelson B, Parizade M, Paitan Y, Schwartz D, Peled N, Carmeli Y. 2015. 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. *Diagn Microbiol Infect Dis* 83:21–24.

357. Pelaez, T., Cercenado, E., Alcalá, L., Marín, M., Martín-Lopez, A., Martínez-Alarcon, J. et al. (2008) Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol* 46: 30283032

358. Lynch, T., Chong, P., Zhang, J., Hizon, R., Du, T., Graham, M. et al. (2013) Characterization of a stable, metronidazole-resistant *Clostridium difficile* clinical isolate. *PLoS One* 8: e53757.

359. Chong, P., Lynch, T., McCorrister, S., Kibsey, P., Miller, M., Gravel, D. et al. (2014) Proteomic analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* clinical isolate resistant to metronidazole. *PLoS One* 9: e82622.

360. Snyderman D, McDermott L, Jacobus N, Thorpe C, Stone S, Jenkins S, Goldstein E, Patel R, Forbes B, Mirrett S, Johnson S, Gerding DN. 2015. U.S.-based national sentinel surveillance study for the epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrheal isolates and their susceptibility to fidaxomicin. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6437–6443.
361. Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Barnes SW, Ruzin A. 2013. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 69:41–44.
362. Papa T, Leuzzi R, Baban ST, Ng YK, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M. 2013. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 195:545–555.
363. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis* (2016) 3(1) 23-42
364. Dong, D., Zhang, L., Chen, X., Jiang, C., Yu, B., Wang, X. and Peng, Y. (2013) Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of clinical *Clostridium difficile* from a Chinese tertiary hospital. *Int J Antimicrob Agents* 41: 80_84.
365. Tsutsumi LS, Owusu YB, Hurdle JG, Sun D. 2014. Progress in the discovery of treatments for *C. difficile* infection: a clinical and medicinal chemistry review. *Cur Top Med Chem* 14:152–175.
366. Fry PR, Thakur S, Gebreyes W. 2012. Antimicrobial resistance, toxinotype and genotypic profiling of *Clostridium difficile* of swine origin. *J Clin Microbiol* 50:2366–2372.
367. Peng Z, Jin D, Kim HB, Stratton CW, Wu B, Tang Y-W, Sun X. 2017. Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 55:1998–2008.
368. Bartlett, J., Onderdonk, A., Cisneros, R. and Kasper, D. (1977) Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis* 136: 701_705.
369. Johnson, S., Samore, M., Farrow, K., Killgore, G., Tenover, F., Lyras, D. et al. (1999) Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 341: 1645_1651.
370. Bignardi, G. (1998) Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 40: 1_15.
371. Zhou, Y., Burnham, C., Hink, T., Chen, L., Shaikh, N., Wollam, A. et al. (2014) Phenotypic and genotypic analysis of *Clostridium difficile* isolates: a single-center study. *J Clin Microbiol* 52: 4260_4266.
372. Obuch-Woszczatynski, P., Lachowicz, D., Schneider, A., Mol, A., Pawlowska, J., Ozdenska-Milke, E. et al. (2014) Occurrence of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 and its closely related PCR-ribotype 176 in hospitals in Poland in 2008_2010. *Anaerobe* 28: 13_17.
373. Wasels F, Monot M, Spigaglia P, Barbanti F, Ma L, Bouchier C, Dupuy B, Mastrantonio P. 2014. Inter- and intraspecies transfer of a *Clostridium difficile*

- conjugative transposon conferring resistance to MLSB. *Microb Drug Resist* 20:555–560.
374. Isidro J, Santos A, Nunes A, Borges V, Silva C et al. Imipenem Resistance in *Clostridium difficile* Ribotype 017, Portugal. [Emerg Infect Dis](#). 2018 Apr;24(4):741-745.
375. Ackermann, G., Tang, Y., Kueper, R., Heisig, P., Rodloff, A., Silva, J. et al. (2001) Resistance to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in gyrA. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2348_2353.
376. Spigaglia, P., Barbanti, F., Louie, T., Barbut, F. and Mastrantonio, P. (2009) Molecular analysis of the gyrA and gyrB quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* mutants selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2463_2468.
377. Wasels, F., Kuehne, S., Cartman, S., Spigaglia, P., Barbanti, F., Minton, N. et al. (2015a) Fluoroquinolone resistance does not impose a cost on the fitness of *Clostridium difficile* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 1794_1796.
378. Lessa F, Mu Y, Bamberg W et al. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372:825-834

