

В.Г. Майданник, академик НАМН України, д.м.н., професор, заведуючий кафедрою педіатрії № 4 Національного медичного університету ім. А.А. Богомольця, г. Київ

Антибиотикассоциированная диарея, связанная с *Clostridium difficile*

Антибиотикассоциированная (АД) диарея, связанная с *C. difficile* (A04.7), – острое заболевание кишечника, которое возникает как осложнение антибактериальной терапии и обусловлено *C. difficile*.

Эпидемиология

C. difficile часто обнаруживаются в окружающей среде и могут быть изолированы из почвы. Основной механизм передачи инфекции – фекально-оральный. Источником инфекции является человек (чаще – пациенты, получающие антибиотики широкого спектра действия, и дети).

Носительство *C. difficile* особенно распространено у здоровых новорожденных (до 50%), но именно у них наблюдают самый низкий уровень поражений (табл. 1). По мере развития нормальной микрофлоры (6-12 мес) число носителей уменьшается и среди здоровых взрослых лиц не превышает 3-5% (Bartlett, Perl, 2005).

В середине и в конце 1990-х гг. уровень заболеваемости в США был достаточно устойчивым, составляя 30-40 случаев на 100 тыс. населения (McDonald et al., 2006; Kelly, LaMont, 2008). В 2001 г. это число возросло почти до 50, а в 2005 г. – до 84 случаев на 100 тыс. населения, то есть почти в три раза превысило показатель 1996 г. (31 на 100 тыс. населения).

Заслуживает внимания то, что в течение последнего десятилетия наблюдается устойчивое увеличение заболеваемости *C. difficile*-ассоциированными патологиями. Так, по данным McFarland (2008), только в США к 2010 г. прогнозировалось увеличение количества случаев *C. difficile*-ассоциированных заболеваний и частоты лабораторного выделения *C. difficile* в течение года в 3-4 раза, достигая 450-700 тыс. больных в год.

Что касается Украины, то нами (В.Г. Майданник и соавт., 2010) проведено открытое многоцентровое исследование частоты возникновения АД у детей-носителей *C. difficile*. Исследование проводилось на базе педиатрических кафедр

Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца, Запорожского государственного медицинского университета, Львовского национального медицинского университета им. Данила Галицкого, Харьковского национального медицинского университета, Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького. Кроме общеклинического исследования, до и через 3 нед после начала терапии методом иммуноферментного анализа (ELISA) определяли наличие в кале токсинов А и В *C. difficile*.

Результаты проведенных исследований указывают, что до лечения токсины А и В *C. difficile* выявлялись у 12,3% обследованных детей (В.Г. Майданник и соавт., 2010), при этом наиболее часто среди детей первого года жизни (22,7%). С возрастом частота выявления токсинов уменьшалась и составляла 14% – у детей в возрасте от 1 до 3 лет; 8,3% – у детей 3-6 лет; 9,5% – у 7-12-летних и 7,4% – у детей старше 13 лет (рис. 1). При этом не выявлено каких-либо особенностей анамнеза заболевания и жизни, клинической или лабораторной картины у детей с положительным и отрицательным значением теста на наличие токсинов А и В *C. difficile*.

Проведенные исследования показали, что АД возникала у 15,5% детей, находившихся под наблюдением, причем среди детей с положительным результатом теста на наличие токсинов А и В *C. difficile* – в 3 раза чаще, чем у детей группы сравнения (соответственно у 36 и 12,4%; $p < 0,05$) (В.Г. Майданник и соавт., 2010).

Наиболее часто АД была отмечена у детей, получавших комбинацию антибиотиков

кларитромицин + амоксициллин (у 8% основной группы и 36,8% контрольной; $p < 0,05$), цефподоксим или цефиксим (25,8%), цефтриаксон или цефтриаксон/сульбактам (23,3%). Несколько реже АД наблюдалась при приеме других антибиотиков цефалоспоринового (цефуроксима, цефотаксима, цефтазида, цефазолина, цефалексина), пенициллинового (амоксициллина, амоксициллина/клавуланата) ряда, макролидов (мидекамицина, азитромицина, спирамицина, кларитромицина) – у 2,6% детей основной и 8,7% – контрольной групп (В.Г. Майданник и соавт., 2010).

В последнее время появились сообщения о спорадических вспышках заболеваний, ассоциированных с *C. difficile*. Так, в провинции Квебек (Канада) в течение 1991-2000 гг. уровень заболеваемости *C. difficile*-ассоциированными инфекциями находился в пределах 22,2-25,2 на 100 тыс. населения. Однако в 2003 г. количество новых случаев заболевания в течение года возросло в 4 раза, достигнув 92,2 случая на 100 тыс. населения (Pepin et al., 2004; Loo et al., 2005), причем повышение заболеваемости наблюдалось во всех возрастных группах населения.

Особое беспокойство вызывает увеличение числа тяжелых и нередко фатальных случаев *C. difficile*-ассоциированной инфекции (Pepin et al., 2004; Loo et al., 2005; Muto et al., 2005). Так, в Англии, например, в 1999 г. *C. difficile*-инфекция стала причиной смерти 499 пациентов, в 2005 г. – 1999, а в 2006 г. – 3393 больных (Kelly, LaMont, 2008).

Повышение уровня заболеваемости *C. difficile*-ассоциированной инфекцией в провинции Квебек в 2003 г. также сопровождалось существенным увеличением тяжести болезни и смертности. В частности, из 1703 больных, находившихся под наблюдением, *C. difficile*-инфекция была указана как причина смерти в 6,9% случаев, а в 7,5% случаев как способствующий фактор (Loo et al., 2005).

Недавно были опубликованы результаты ретроспективного анализа, посвященного оценке наличия токсинов *C. difficile* у 52 772 детей в возрасте до 18 лет, получавших лечение в 22 детских госпиталях США в течение 2001-2006 гг. (Kim et al., 2008). Авторами было идентифицировано 4895 больных с *C. difficile*-ассоциированными заболеваниями. За период наблюдения ежегодная частота *C. difficile*-инфекции у детей возросла с 2,6 до 4,0 случаев на 1000 госпитализаций (на 53%; $p = 0,04$) и с 4,4 до 6,5 случая на 10 тыс. пациенто-дней (на 47%; $p = 0,06$). Средний возраст детей с *C. difficile*-ассоциированными заболеваниями составил 4 года, при этом среди больных было 26% детей первого года жизни. Важно подчеркнуть, что большинство детей (67%) имели различные хронические заболевания (Kim et al., 2008).

В то же время у взрослых, находящихся на лечении в различных стационарах, частота носительства *C. difficile* значительно выше и может достигать 10-20%, а иногда и 40% (Bartlett, Perl, 2005).



В.Г. Майданник

При этом отмечено, что трансмиссия вегетативных форм *C. difficile* от инфицированных (детей, медицинского персонала, лиц, ухаживающих за больными, самих пациентов) к здоровым лицам осуществляется контактно-бытовым путем. Инфицирование новорожденных возможно от ребенка ребенку или от персонала (при пеленании, кормлении и купании). Кроме того, установлена возможность широкой контаминации их различных внутри-госпитальных объектов (постельных принадлежностей, мебели, душевых, туалетов и др.). Возможность передачи их бытовым путем с участием различных факторов создает серьезный риск развития внутрибольничной инфекции, особенно у пациентов, получающих массивную антибактериальную терапию.

Поскольку в детских стационарах *C. difficile* редко вызывают тяжелую диарею, а тестировать их довольно сложно, анализ на выявление *C. difficile* необходимо проводить только детям с длительным и тяжелым течением диареи и абдоминальным болевым синдромом.

Этиология

C. difficile – облигатная анаэробная спорообразующая грамположительная бактерия (рис. 2), открытая американскими микробиологами Hall и O'Toole в 1935 г. при исследовании кишечной микрофлоры новорожденных и первоначально не рассматриваемая как патогенный микроорганизм. Видовое название *difficile* («трудный») подчеркивает трудности выделения данного микроорганизма культуральным методом.

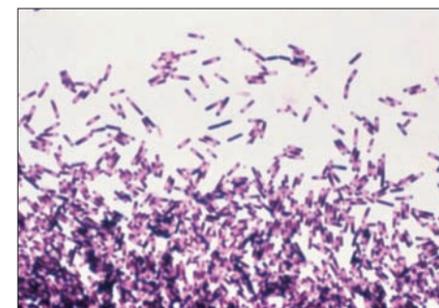


Рис. 2. Микроскопическое изображение бактерий *C. difficile*

Вегетативные формы *C. difficile* обладают способностью продуцировать экзотоксины, среди которых идентифицированы повреждающие кишечную стенку энтеротоксин (токсин А) и цитотоксин (токсин В). АД вызывают только токсигенные штаммы *C. difficile*.

Важно учитывать, что *C. difficile* имеет отношение далеко не ко всем случаям АД и чаще выявляется при тяжелых вариантах

Продолжение на стр. 34.

Таблица 1. Частота выделения *C. difficile* и обнаружения ее токсинов (С.М. Захаренко, 2008; Kelly, LaMont, 1998)

Категории обследованных	Выделение <i>C. difficile</i> , %	Обнаружение токсина, %
Здоровые взрослые	2-3	0,5
Новорожденные (здоровые)	30-70	5-60
Больные с патологией ЖКТ (не получающие антибиотики)	2-3	0-1
Пациенты, получающие антибиотики (без диареи)	10-20	2-8
Антибиотикассоциированная диарея	15-30	15-25
Псевдомембранозный колит	90-100	90-100

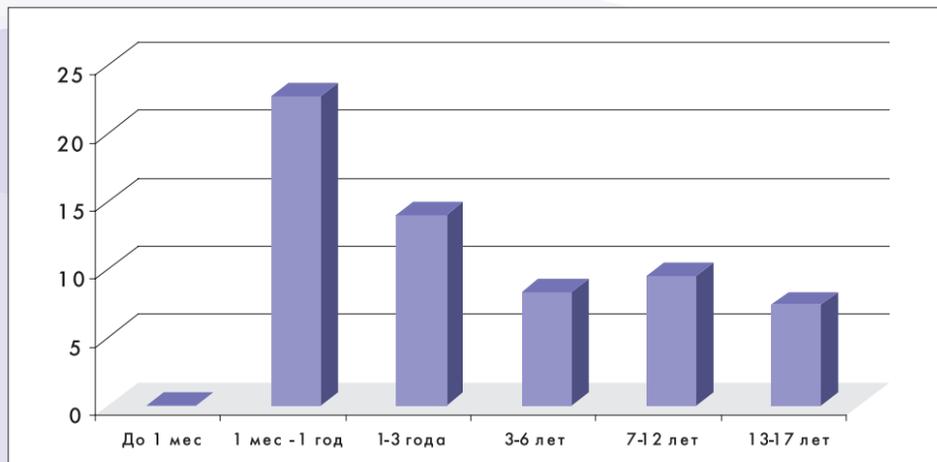


Рис. 1. Частота положительного результата теста на наличие токсинов А и В *C. difficile* у детей, проживающих в Украине

Антибиотикассоциированная диарея, связанная с *Clostridium difficile*

Продолжение. Начало на стр. 33.

заболевания. Так, при антибиотикассоциированном колите и псевдомембранозном колите указанный этиологический фактор обнаруживается у 50-75% и 100% пациентов соответственно. Вместе с тем при ААД данный микроорганизм ответствен за развитие лишь 10-30% случаев болезни.

Большинство штаммов, выделяемых от пациентов с симптомами ААД, продуцируют два токсина (до 75%), хотя в литературе имеются указания на то, что от больных могут быть выделены штаммы, продуцирующие только один токсин. Оба токсина являются крупными белковыми экзотоксинами: токсин А (энтеротоксин) имеет молекулярную массу 308 кДа, токсин В (цитотоксин) – 270 кДа. Они на 45% гомологичны по аминокислотному составу, что определяет некоторую схожесть их биологической активности (Bartlett, 2006; Jank et al., 2007).

Кроме того, в 1988 г. было установлено, что некоторые штаммы *C. difficile* (в среднем 6%) продуцируют также третий токсин, названный двойным (бинарным) (Poroff et al., 1988). Дальнейшие исследования показали, что двойной токсин является АДФ-рибозилтрансферазой, состоящей из двух независимых цепей белка: CDtA – ферментативного компонента (молекулярная масса 48 кДа) и CDtB – связывающего компонента (молекулярная масса 99 кДа) (Goncalves et al., 2004; Varbut et al., 2005; Kelly, LaMont, 2008). В настоящее время установлено, что распространенность среди пациентов штаммов *C. difficile*, продуцирующих двойной (бинарный) токсин, колеблется в пределах от 1,6 до 20,8% (Varbut et al., 2005).

В настоящее время установлено, что синтез токсинов А и В, вырабатываемых *C. difficile*, кодируется генами *tcdA* и *tcdB* (рис. 3). Они расположены в локусе патогенности PaLoc (сокр. от англ. *C. difficile* pathogenicity locus), занимая сегмент в 19,6 kb (Voth, Ballard, 2005; Kelly, LaMont, 2008).

Экспериментальные исследования подтвердили гипотезу о том, что именно локус патогенности PaLoc определяет способность к токсинообразованию у отдельных штаммов *C. difficile*. Нетоксигенные штаммы возбудителя не имеют такого локуса и, следовательно, не могут вызвать манифестные формы заболеваний у человека и животных. В указанном локусе имеются еще 3 дополнительных гена – *tcdD*, *tcdE* и *tcdC*, кодирующих белки, которые выполняют регуляторные и транспортные функции (Nord, 2008; Kelly, LaMont, 2008).

Кроме того, было установлено, что гены *cdtA* и *cdtB*, расположенные на неизвестном расстоянии от PaLoc (рис. 4), кодируют соответственно ферментативный и связывающий компоненты двойного (бинарного) токсина (Kelly, LaMont, 2008).

Данные о структуре генома *C. difficile* свидетельствуют о наличии гена *tcdD*, который локализуется несколько выше группы генов, кодирующих синтез токсинов А и В. Субстанция TcdD, кодируемая геном *tcdD*, необходима для экспрессии *tcdA*- и *tcdB*-генов *in vivo* и активации транскрипции указанных генов *in vitro*. Субстанция TcdD функционирует как альтернативный σ (сигма)-фактор для фермента РНК-полимеразы, которая является промотором синтеза токсинов А и В (Duruu et al., 2008).

Под влиянием определенных факторов, действующих на бактериальную клетку извне (например, уменьшение концентрации в окружающей среде питательных субстратов), усиливается синтез субстанции TcdD, которая активирует транскрипцию генов

tcdA и *tcdB* за счет активации *tox*-промотора. Синтез даже малого количества субстанции TcdD катализирует ее дальнейшее лавинообразное накопление. Напротив, увеличение содержания в окружающей среде микроорганизма глюкозы или других питательных субстратов вызывает ингибирование синтеза субстанции TcdD. Вполне вероятно, что и активность *tox*-промоторов находится под непосредственным регулирующим влиянием определенных факторов внешней среды (Duruu et al., 2008).

Что касается обнаруженного гена *tcdC*, то считают, что он выполняет роль негативного регулятора транскрипции генов, синтезирующих токсины А и В (Duruu et al., 2008). Было установлено, что продуктом этого гена является кислый белок TcdC с молекулярной массой 26 кДа, который связан с мембраной и имеет трансмембранный домен в N-терминальной области белка (Govind et al., 2006). Кроме того, было показано, что TcdC формирует димер, который находится в срединной части белка (Duruu et al., 2008).

Однако выявленные биохимические особенности не позволяли объяснить, каким образом функционирует TcdC. Проведенный анализ его последовательностей показывает, что TcdC не подобен уже известным регулирующим белкам; ДНК-связывающие участки не идентифицированы. Одна из гипотез заключается в том, что TcdC может функционировать как анти- σ -фактор (Duruu et al., 2008). Считают,

что анти- σ -факторы являются трансмембранными белками, которые регулируют экспрессию генов, модулируя активность родственного σ -фактора (Duruu et al., 2008). При этом авторы полагают, что механизм его действия заключается в изоляции родственного σ -фактора и предотвращении таким образом формирования активной РНК-полимеразы.

В локусе патогенности PaLoc *C. difficile* выявлен также ген *tcdE*, который, как полагают, кодирует синтез белка TcdE, играющего очень важную роль в выделении токсина из клетки (Duruu et al., 2008). Считают, что он обеспечивает формирование пор и лизис плазматической мембраны, способствуя тем самым высвобождению токсинов из клетки.

Токсин А представляет собой белок с молекулярной массой 308 кДа и состоит из 2710 аминокислот, токсин В имеет молекулярную массу 270 кДа и состоит из 2366 аминокислот (Voth, Ballard, 2005). Оба токсина имеют N-терминальный домен, состоящий из 546 аминокислот, который обладает глюкозилтрансферазной ферментативной активностью и оказывает цитотоксический эффект (Giesemann et al., 2008).

Токсины А и В в структуре имеют также С-терминальный домен, состоящий соответственно из 862 и 515 аминокислотных остатков (рис. 5) – «объединения повторяющихся олигопептидов» – CROP (Giesemann et al., 2008). Токсин А в С-терминальном домене несет 30 CROP (размерами от 21

до 50 аминокислотных остатков), тогда как токсин В несет только 19 CROP (Kelly, Lamont, 2006). Что касается функциональной значимости, то считают, что указанный домен играет важную роль в распознавании рецепторов различных клеток и прикреплении к ним (Giesemann et al., 2008; Jank, Aktories, 2008). В частности, полагают, токсин А *in vivo* связывается со специфическими рецепторами, содержащими галактозо- β -1,4-N-ацетилглюкозамин. Последний входит в состав полисахаридных антигенов, обнаруживаемых на эпителиальных клетках кишечника человека. Для токсина В рецепторы пока остаются неидентифицированными (Bartlett, 2006; Jank et al., 2007).

Между N- и С-терминальными доменами расположен гидрофобный домен, состоящий из 172 аминокислот (рис. 5). Считается, что он наиболее вероятно ответствен за перемещение токсинов через цитоплазматическую мембрану, вследствие чего его еще называют трансмембранным доменом или «областью перемещения». Проведенные исследования показали, что удаление этой гидрофобной области существенно влияет на токсическую активность (Jank, Aktories, 2008).

Между N-терминальным и гидрофобным доменами расположен небольшой, состоящий из 223 аминокислотных остатков, цистеинпротеазный домен, подобный токсину RTX холерного вибриона (Jank, Aktories, 2008). Полагают, что этот домен вовлечен в обработку и сокращение уровня токсина, которая обусловлена каталитической триадой, состоящей из Asp587, His653 и Cys698 (Jank, Aktories, 2008).

Обсуждение факторов патогенности *C. difficile* было бы неполным, если оставить без внимания доказанную способность возбудителя к адгезии. Исследование факторов адгезии в перспективе позволит ответить на вопрос о механизмах персистенции микроорганизма в кишечнике.

В 1988 г. Vogriello и соавт. высказали предположение о том, что именно адгезия играет основную роль на начальном этапе развития инфекции. Hennequin и соавт. в 2001 г. опубликовали результаты экспериментального исследования, свидетельствующего об участии одного из белков теплового шока (GroEL) в адгезии *C. difficile* к клеткам в культуре тканей. Полученная антисыворотка к этому белку блокировала контакт эпителиальных клеток с возбудителем, что подтверждает вероятную роль GroEL в качестве фактора адгезии.

Первым идентифицированным адгезином, продуцируемым *C. difficile*, стал поверхностный мембранный белок Swp66 (66 кДа), кодируемый геном *swp66*. Несколько позже был обнаружен ген *slpA*, кодирующий белок S-lp у некоторых вирулентных штаммов *C. difficile* (C253 и 79-685). Этот белок имеет на С-конце молекулы последовательность аминокислот, сходную с таковой у адгезина Swp66.

В геноме *C. difficile* также имеется ген *flaD*, кодирующий flagellar cap protein, который, как предполагается, выполняет специфические функции, обеспечивая прикрепление возбудителя к рецепторам эпителиоцитов.

C. difficile проявляет высокую резистентность к антибиотикам широкого спектра действия, что создает предпосылки для обширной колонизации кишечника и секреции больших доз токсинов, вызывающих изменения кишечной стенки; тем не менее *C. difficile* чувствительна к действию ванкомицина.

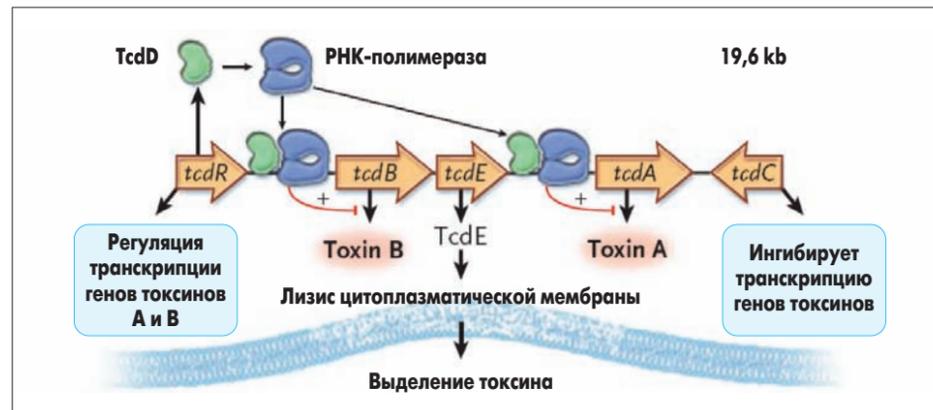


Рис. 3. Схема регуляции синтеза токсинов А и В *C. difficile*

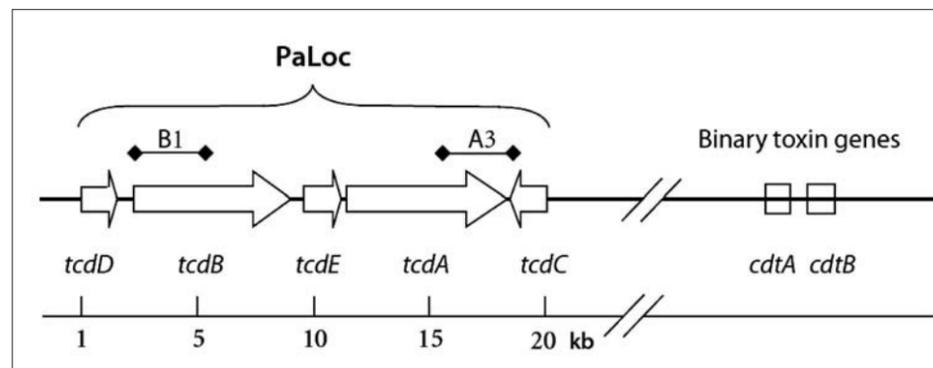


Рис. 4. Схема главных генов в PaLoc *C. difficile*

Примечание. B1 и A3 обозначено местоположение и относительный размер генных фрагментов, которые подверглись амплификации в полимеразной цепной реакции при типировании токсинов.

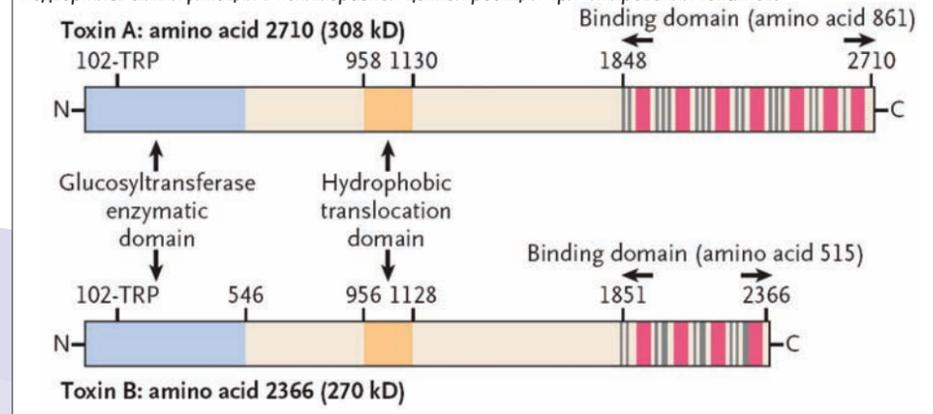


Рис. 5. Структура токсинов *C. difficile*

Продолжение следует