

# Антибиотикассоциированная диарея, связанная с *Clostridium difficile*

Продолжение. Начало в № 10

В 2004 г. в США было проведено исследование, в котором приняли участие инфекционисты различных регионов страны. Врачей просили сообщить о случаях инфекций, вызванных *C. difficile*, с которыми они столкнулись в последние 6 мес. В общей сложности 210 респондентов сообщили о 3292 подобных случаях. Более трети (38%) врачей-инфекционистов отметили увеличение частоты, а 39% – увеличение тяжести заболеваний, вызванных *C. difficile* (Warny et al., 2005). Актуальной является данная проблема и для других стран, в частности Канады, Великобритании и Нидерландов. В 2002 г. в больницах г. Монреаля и юга Квебека начались вспышки тяжелых заболеваний, вызванных *C. difficile*, что обусловило возникновение предположения о наличии у возбудителя повышенной вирулентности. Были собраны штаммы *C. difficile* в Канаде, США и Великобритании и проведено их токсино- и риботипирование с использованием ПЦР, изучение с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле, а также выявление гена двойного токсина и делеции в предполагаемом гене отрицательной регуляции продукции токсинов А и В (*tcdC*). Исследована *in vitro* продукция токсинов А и В эпидемическим штаммом и другими штаммами (Warny et al., 2005).

Оказалось, что штамм *C. difficile* с повышенной вирулентностью, идентифицированный как North American pulsed-field type 1 (NAP1) риботип 027, вызывал 67% случаев внутрибольничных и 37% случаев внебольничных инфекций (Warny et al., 2005). Этот штамм способен вырабатывать в 16 раз больше токсина А и в 23 раза больше токсина В по сравнению с контрольным штаммом, также штамм NAP1/027 продуцирует дополнительный бинарный токсин. Данный штамм имеет делецию в гене *tcdC*, вовлеченном в отрицательную регуляцию токсинообразования. Кроме перечисленных факторов вирулентности, штамм также характеризуется повышенной резистентностью к антибактериальным препаратам (в частности, к фторхинолонам), что дает ему возможность распространяться в лечебных учреждениях (Warny et al., 2005).

По сравнению с пациентами, инфицированными другими типами *C. difficile*, больные, у которых был выявлен штамм NAP1/027, чаще получали терапию фторхинолонами (29,4 против 19,8%; относительный риск 2,17). Штаммы NAP1/027 содержали гены токсинов А и В, бинарный токсин и ген, регулирующий выработку токсина (*tcdC*), утративший 39 пар оснований, а также точечную мутацию в позиции 184, приводящей к остановке трансляции полипептидной цепи, так называемый стоп-кодон (Goorhuis et al., 2008).

Существует предположение, что вирулентный штамм может распространяться во внебольничных условиях среди людей, не обращающихся за медицинской помощью, хотя для подтверждения этого требуются дальнейшие исследования. В связи с этим Warny и соавт. (2005) считают, что целесообразно проводить в лечебных учреждениях мониторинг инфекций, вызываемых *C. difficile*, путем учета положительных результатов лабораторных исследований на наличие *C. difficile* и тестов на токсинообразование. Для предотвращения и ликвидации потенциальных вспышек должны строго соблюдаться меры по инфекционному контролю.

По данным Центра по контролю и предупреждению заболеваний США (CDC, 2008), штамм NAP1/027, вызывающий наиболее тяжелые *C. difficile*-ассоциированные заболевания, встречается у здоровых людей в штате Коннектикут с частотой 7,6 случая на 100 тыс. населения.

Для развития диареи, обусловленной *C. difficile*, необходимо наличие так называемых предрасполагающих факторов. Таким фактором в подавляющем большинстве случаев служит применение антибиотиков, прежде всего линкомицина и клиндамицина (табл. 2). По данным CDC (2008), 68% больных с *C. difficile*-ассоциированными заболеваниями получали антибиотики в течение 3 мес, предшествующих возникновению заболевания, в том числе 16% больных принимали клиндамицин, 35% – фторхинолоны, 45% – антибактериальные препараты других групп (цефалоспорины, тетрациклин, макролиды и др.).

Роль антибиотиков в патогенезе диареи сводится к подавлению нормальной микрофлоры кишечника, в частности к резкому снижению количества нетоксигенных клостридий, и созданию условий для размножения условно-патогенных штаммов *C. difficile*. Сообщалось, что даже однократный прием антибиотика может послужить пусковым фактором к развитию этого заболевания.

Однако диарея, обусловленная инфекцией *C. difficile*, может развиваться и в отсутствие антибиотикотерапии, при других условиях, сопровождающихся нарушением нормального микробиоценоза кишечника. В частности, предрасполагающими факторами могут быть уремия, врожденные и приобретенные иммунодефициты (в том числе на фоне гематологических заболеваний, применения цитостатических препаратов и иммунодепрессантов), кишечная непроходимость, хронические воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона), ишемический колит, сердечная недостаточность, нарушения кровоснабжения кишечника, стафилококковая инфекция (CDC, 2008).

Группой риска по развитию тяжелых форм нозокомиальной *C. difficile*-инфекции являются дети раннего возраста (ослабленные), а также пациенты, длительно находящиеся в стационаре. К факторам риска также относят повторные очистительные клизмы, длительное



В.Г. Майданник

использование назогастрального зонда, перенесенные оперативные вмешательства на органах желудочно-кишечного тракта и др. Особенно велика вероятность развития псевдомембранозного колита после операций на органах брюшной полости. Сообщалось о развитии этого заболевания на фоне активного применения слабительных средств.

В то же время установлено, что диарея и колит, обусловленные *C. difficile*, могут развиваться не только в стационаре, но и в амбулаторных условиях при использовании антибиотиков широкого спектра действия, особенно у ослабленных пациентов и детей раннего возраста.

## Патогенез

Согласно современным представлениям ключевыми звеньями патогенеза *C. difficile*-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита являются нарушение микроэкологии кишечника в результате использования антибиотиков или других препаратов, обладающих противомикробной активностью, колонизация кишечника токсигенными штаммами *C. difficile*, продукция возбудителем токсинов А и/или В и, как следствие, повреждение слизистой оболочки кишечника и развитие воспалительного процесса. Клинически манифестные формы *C. difficile*-инфекции реализуются только при наличии всех основных патогенетических факторов. Для развития болезни недостаточно только колонизации кишечника *C. difficile*, равно как и нарушение нормального состава кишечной микрофлоры не приведет к развитию псевдомембранозного колита без участия токсигенных штаммов *C. difficile*.

Патогенез инфекции *C. difficile* складывается из нескольких звеньев (рис. 6).

Как известно, нормальная кишечная микрофлора способна эффективно подавлять рост *C. difficile*. Это явление получило название колонизационной резистентности. Изменение микробной популяции кишечника под действием антибиотиков приводит к снижению колонизационной резистентности, изменению содержания аминокислот и нарушению метаболизма углеводов и желчных кислот, осуществляемого резидентными анаэробами.

Нарушение колонизационной резистентности, в свою очередь, значительно повышает чувствительность кишечника к различным микроорганизмам, которые устойчивы к действию повреждающего фактора. К ним, в частности, относится *C. difficile*. Колонизация кишечника

Таблица 2. Антибактериальные препараты, предрасполагающие к *C. difficile*-ассоциированной диарее (Kelly, Lamont, 2006)

Высокий риск	Средний риск	Низкий риск
Ампициллин Амоксициллин Клиндамицин	Тетрациклины Сульфонамиды Макролиды (включая эритромицин) Хлорамфеникол Триметоприм Фторхинолоны	Аминогликозиды (парентерально) Метронидазол Бацитрацин
Цефалоспорины (II и III поколения) Линкомицин		Ванкомицин

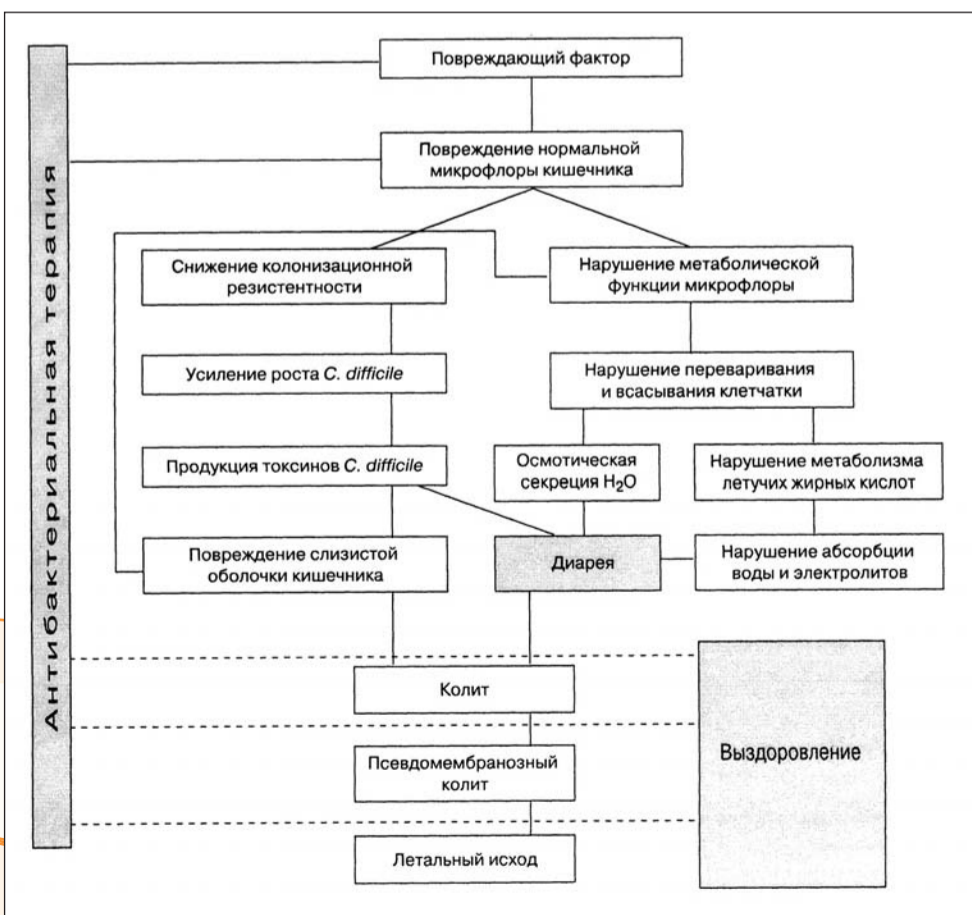


Рис. 6. Схема патогенеза инфекции, ассоциированной с *C. difficile* (Ю.В. Лобзин и соавт., 2002)

Продолжение на стр. 42.

# Антибиотикассоциированная диарея, связанная с *Clostridium difficile*

Продолжение. Начало на стр. 41.

данном возбудителем или активация эндогенного резервуара *C. difficile* на этом фоне запускает каскад процессов, приводящих при сочетанном действии определенных факторов к развитию клинически манифестных форм инфекции (рис. 6).

В создавшихся благоприятных условиях на фоне сниженной колонизационной резистентности начинается прогрессирующее размножение возбудителя.

У пациентов с клинически манифестными формами болезни плотность колонизации кишечника *C. difficile* составляет, как правило,  $>10^8$  КОЕ/мл. Vegetативные формы возбудителя размножаются непосредственно в просвете толстой кишки.

После достижения микроорганизмом поздней логарифмической и ранней стабильной фаз размножения в толстой кишке начинаются продукция и выделение *C. difficile* экзотоксинов, что в конечном итоге приводит к развитию

диареи и колита. Большинство штаммов продуцируют оба токсина (А и В). Однако заболевание может вызываться и штаммами, образующими только один токсин. Их энтеро- и цитотоксическое действие приводит к повреждению клеток кишечника, усилению секреции жидкости в полость кишечника и развитию воспаления слизистой оболочки толстой кишки.

Токсины А и В связываются с рецепторами на поверхности клеток (рис. 7). Токсин А на С-конце белковой молекулы имеет участок, состоящий из повторяющихся аминокислотных последовательностей, с помощью которого он *in vivo* связывается со специфическими рецепторами, содержащими галактозо- $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозамин, который входит в состав полисахаридных антигенов, обнаруживаемых на эпителиальных клетках кишечника человека (Bartlett, 2006; Jank et al., 2007). Кроме того, у человека эта структура имеется в составе гликопептидных антигенов I, X и Y (система Льюис), расположенных на поверхности клеток кишечного эпителия. Это и обеспечивает прикрепление к ним токсина *C. difficile*. В большом количестве антиген X также представлен на поверхности нейтрофилов. В связи с этим активация хемотаксиса как результат действия токсина А может быть обусловлена связыванием токсина с гликопептидными антигенами на поверхности лейкоцитов. После прикрепления к клетке токсин проникает в нее посредством эндоцитоза подобно дифтерийному и коклюшному токсинам. Для токсина В рецепторы пока не идентифицированы (Bartlett, 2006; Jank et al., 2007).

После связывания с рецепторами клеток токсин подвергается эндоцитозу (рис. 7). В эндосомах происходит окисление токсинов и высвобождение гидрофобных участков белков, с помощью которых они встраиваются в мембрану. Это возможно в условиях низкого значения pH (в пределах 5,2-6,0). Полагают, что при низком значении pH в эндосомах происходит конформационное изменение белка; при этом высвобождаются гидрофобные области токсинов, которые являются ранее замаскированными в пределах белка (Jank et al., 2007). В последующем токсины формируют в эндосомах поры в виде ионных каналов и их N-терминальный каталитический домен, обладающий глюкозилтрансферазной ферментативной активностью, перемещается в цитозоль (рис. 7).

Как известно, Rho-белки являются низкомолекулярными гуанозинтрифосфатазами (GTPases), которые в клетках управляют многочисленными сигнальными путями и регулируют широкий круг клеточных процессов. В настоящее время описано около 20 Rho GTPases, из них наиболее изученные RhoA, Rac1 и Cdc42 (Jank et al., 2008; Genth et al., 2008; Jank, Aktories, 2008).

Rho-белки обладают липидными модификациями, которые направляют их в клеточные мембраны и могут совершать цикл между гуанозинтрифосфат (GTP) и гуанозиндифосфат (GDP)-связанными состояниями. Связывание с GTP обеспечивается с помощью фактора обмена нуклеотидов гуанина (guanine nucleotide exchange factors – GEF), а гидролиз GTP катализируется GTPase-активирующими

протеинами (GTPase-activating proteins – GAP).

Дополнительный уровень регуляции обеспечивается ингибитором диссоциации нуклеотидов гуанина (guanine nucleotide dissociation inhibitors – GDI), которые секвестрируют GDP-связанные Rho-белки в цитоплазме вдали от GDP-GTP цикла (рис. 8).

Следовательно, Rho-белки совершают цикл между активной GTP-формой, в которой они могут связываться с различными белками-мишенями, и неактивной GDP-формой (Jank et al., 2008; Genth et al., 2008; Jank, Aktories, 2008). Переход из одной формы в другую, в свою очередь, регулируется многочисленными клеточными факторами. Среди таких факторов различают ингибирующие белки, одни из которых инициируют GTP-азную активность GTP-связывающих белков (GAP- GTPase activating proteins) и переводят их в неактивную GDP-форму, а другие – затрудняют в них замещение GDP на GTP (GDI – GDP dissociation inhibitor), а также активирующие белки, которые вызывают обмен GDP на GTP (GEF – GDP/GTP exchange factor), переводя их тем самым в активную GTP-форму (А.А. Минин, А.В. Кулик, 2004).

GTP-связанные Rho-белки взаимодействуют с рядом эффекторных молекул, что модулирует их активность и локализацию. Регуляция этих эффекторных белков обязательно ведет к изменению функциональной активности клеток (рис. 8). В частности, Rho-белки регулируют активный цитоскелет, активацию ферментов (например, протеинкиназ, фосфолипаз); влияют на транскрипцию генов, а также на пролиферацию, подвижность и полярность клеток (Jank et al., 2008; Genth et al., 2008; Jank, Aktories, 2008). Как известно, в норме эпителиальные слои характеризуются клеточной полярностью и хорошо организованным расположением специализированных межклеточных соединений. Повышенный уровень RND3/RhoE, который противодействует функции RhoA, может способствовать потере полярности и многослойности эпителия (Jank et al., 2008; Genth et al., 2008; Jank, Aktories, 2008).

Кроме того, при взаимодействии патогенов с макроорганизмом, а также активными иммунокомпетентными клетками именно Rho-белки являются важными для осуществления эпителием барьерных функций, миграции иммунокомпетентных клеток, процессов адгезии, фагоцитоза, образования супероксидных радикалов, секреции цитокинов и свободной передачи сигналов иммунокомпетентным клеткам (Jank et al., 2008; Genth et al., 2008; Jank, Aktories, 2008).

При *C. difficile*-инфекции токсины А и В оказывают цитотоксический эффект, который они реализуют через инактивацию Rho-белков, регулирующих функции актина цитоскелета клеток и процесс трансдукции клеточных сигналов (рис. 9). Механизм действия токсинов А и В заключается в том, что гликозилированные токсины модифицируют Rho-белки. В частности, кластридиальные токсины изменяют Rho GTPases в треонине 35 или 37, который расположен в switch-I области GTPases. В результате токсины А и В ингибируют взаимодействие эффекторных молекул и блокируют сигнальные пути трансдукции (рис. 9). В частности, токсины блокируют обмен нуклеотидов GEFs и ингибируют GAP-стимулированную

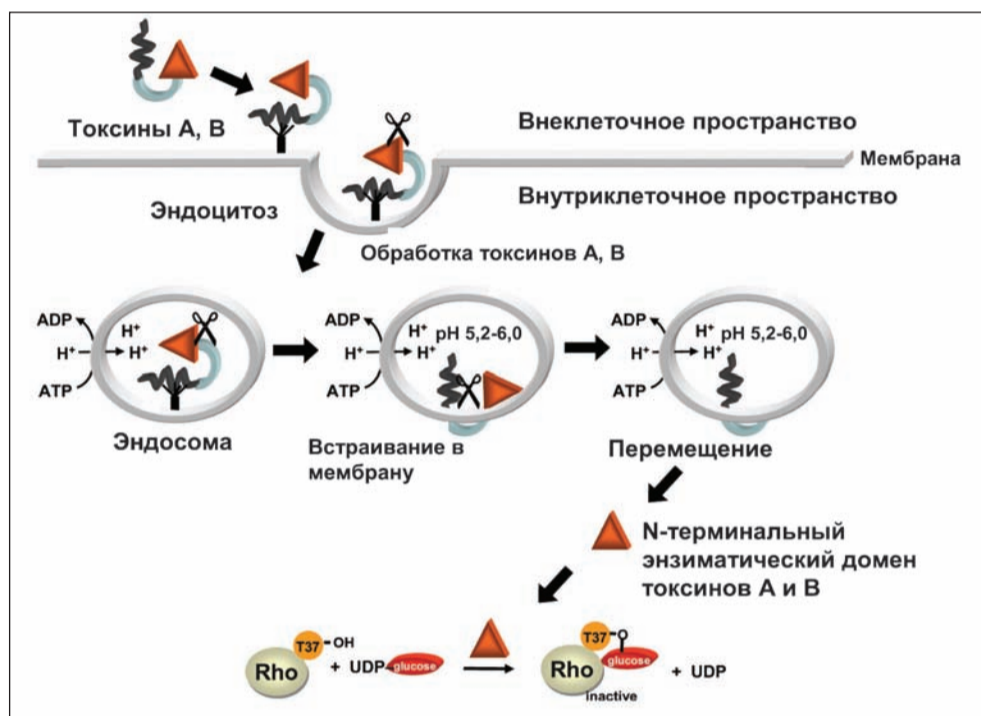


Рис. 7. Схема проникновения токсинов *C. difficile* внутрь клетки (Jank et al., 2007)

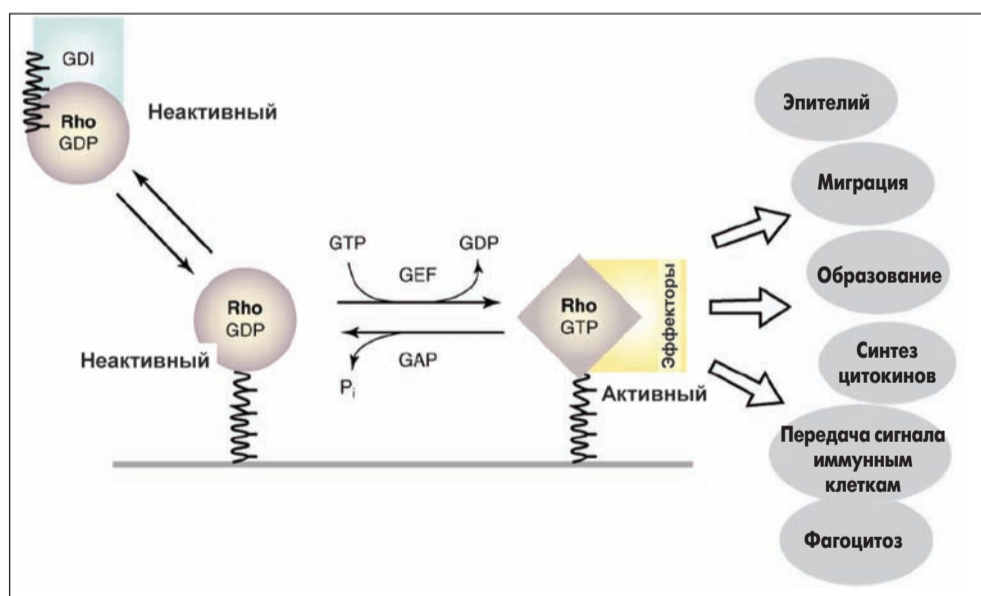


Рис. 8. Физиологическое значение Rho GTPases

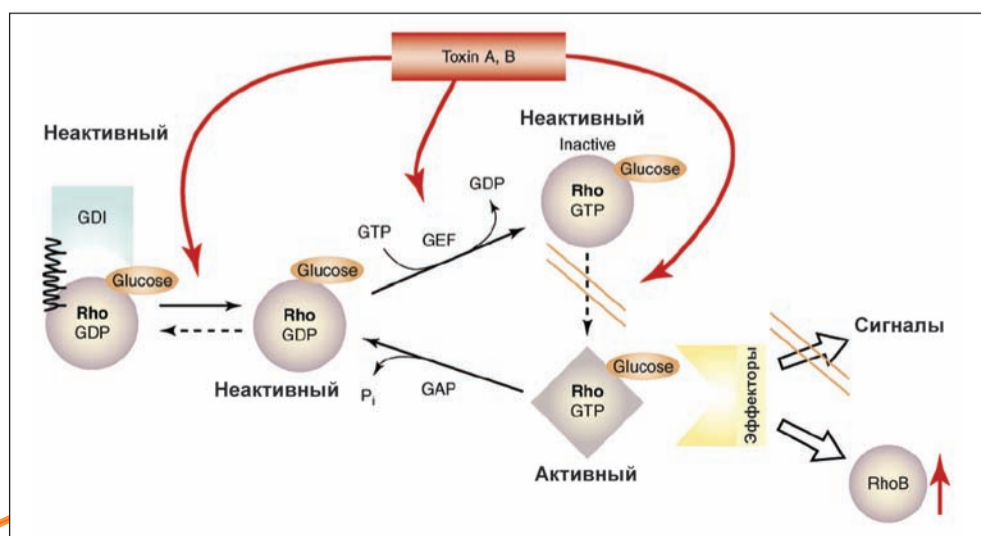


Рис. 9. Схема регуляции Rho GTPases токсинами А и В *C. difficile*

GTPase активність. Гликозилированні Rho-белки більше не в стані взаємодіяти з GDI, тому виявляються в плазматичній мембрані. Як відомо, гликозилювання протворює образуючі активний GTP з допомогою GTPases, тоді як зв'язування з самим GTP можливо. Гликозилированні токсини викликають збільшення експресії RhoB – раннього продукту генів (рис. 9). Деякі RhoB, ймовірно, можуть не піддаватися модифікації токсинами А або В і могли б виконувати важливі сигнальні функції (Genth et al., 2008).

Обумовлена токсинами А і В дисрегуляція Rho-белків призводить до руйнування цитоскелета, округленню кліток, ретракції і апоптозу (Jank et al., 2007). Обидва токсини, маючи синергічний ефект, викликають розвиток запальної реакції в слизовій оболонці товстої кишки (за допомогою активації виробки і секреції моноцитами цитокинів) з секрецією багатого білком ексудату, що містить нейтрофіли, моноцити і ентероцити.

В наступному ентеротоксини А і В грають основну роль в розвитку змінений со сторони кишечника. Токсин В має в 10 разів вищу цитотоксичну активність в молярному еквіваленті порівняно з такою токсина А (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002). В експериментах на інтактних тваринах токсин А підвищує міоелектричну активність епітеліоцитів, пошкоджує слизову оболонку кишечника і викликає розвиток в ній запального процесу, посилює секрецію рідини.

Відзначають пряму і опосередковану пошкодуючі ефекти токсина А на епітелій кишечника. В експериментах на лігированій кишечної петлі миші через 1 год після введення токсина в її просвіт починає накопичуватися рідина, яка через 2 год стає в'язкою, а через 4 год набуває геморагічного характеру. Максимальний секреторний ефект розвивається через 6 год від моменту впливу токсина (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002).

Паралельно з посиленням секреції рідини спостерігається дезепітелізація ворсинок і значне збільшення проникності судин, в результаті чого зростає осмотичний тиск в просвіті кишечника. Пошкодження тканин кишечника в лігированій петлі швидко прогресує і через 6 год призводить до розвитку некрозу слизової оболонки. В результаті впливу токсина А пошкоджуються тільки ворсинки, крипти залишаються інтактними (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002).

Епітеліальні клітки кишечника опосередковано руйнуються за рахунок міграції в очаг запалення великої кількості фагоцитів, «привлечених» гільями нейтрофілів в результаті цитотоксичного впливу токсинів. Вивільняються фагоцитуючими клітками лізосомальні ферменти, як і ферменти, що виділяються при руйнуванні епітеліоцитів, посилюють пошкодження кліток.

Рідина, що накопичується в просвіті кишечника, за своєю властивістю відрізняється від тієї, що секретується під впливом ентеротоксинів, продуцируваних іншими патогенами, наприклад холерним вібрионом. Вона має велику в'язкість і геморагічний характер. Зв'язано це з тим, що рідина накопичується не за рахунок порушення функції іонних насосів, а в зв'язку з руйнуванням епітеліальних кліток, що призводить до порушення не тільки водно-електролітного

обміну кліток, але і проникності епітеліального шару в цілому. Тому передбачається, що саме токсин А є причиною діареї в початковий період хвороби.

Ключовими медіаторами, опосередкованими запальними і секреторними ефектами токсина А, є метаболіти арахідонової кислоти (простагландини, лейкотриєни, фактор активації тромбоцитів), субстанція Р, продуцирувані моноцитами інтерлейкіни (IL-1, IL-6, IL-8) і фактор некрозу опухолі (TNF $\alpha$ ) (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002).

Нейтрофіли, що виявляються в великій кількості в псевдомембранозному коліти і підлягає слизовій оболонці кишечника, грають центральну роль в патогенезі *S. difficile*-асоційованих захворювань. За допомогою білка G токсин А *in vitro* активує гранулоцити людини, що реалізується шляхом тимчасового збільшення концентрації вільного кальцію в цитоплазмі кліток і призводить до активації їх хемотаксису і хемокінезу. На моделі інфекції *S. difficile* у кроликів моноклональні антитіла до поверхневих рецепторів CD11b/18 нейтрофілів інгібували як інфільтрацію і слизової оболонки кишечника, так і секреторний ефект токсина А (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002).

З метою вивчення ролі окремих субпопуляцій нейронів в розвитку пошкодження слизової оболонки кишечника було проведено дослідження на денервованій петлі підшлункової кишки миші. Введення токсина А *S. difficile* в петлю кишки супроводжувалося зменшенням секреції на 75% ( $p < 0,001$ ), мієлопероксидазної активності нейтрофілів – на 92% ( $p < 0,01$ ) і гистологічного пошкодження – на 96% ( $p < 0,001$ ) порівняно з такою в інтактних петлях (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002).

Таким чином, зовнішня хірургічна денервація сприяє захисту підшлункової кишки від впливу токсина А, продуцируваного *S. difficile*, і перешкоджає розвитку ентериту. В зв'язку з цим висказано припущення, що в формуванні пошкодження підшлункової кишки грають роль сенсорні нейрони кишечної стінки (Ю.В. Лобзин і соавт., 2002).

Токсин В має потужний цитотоксичний ефект. Ймовірно, вища токсичність токсина В пов'язана переважно з більш низькою щільністю рецепторів до токсину А на поверхні кліток, ніж з цитотоксичним впливом самого токсина В (Voth, Ballard, 2005; Keel, Songer, 2006; Jank et al., 2007).

Токсин В, який в експерименті вводили в кишку хом'яків, в відсутність токсина А не мав ефекту на інтактну слизову оболонку. Навпаки, в присутності субтоксичних концентрацій токсина А або при пошкодженнях слизової оболонки токсин В може призвести до смерті тварини. Ці дані свідчать про те, що епітеліальні клітки кишечника не мають специфічних рецепторів до токсину В. Він може токсично впливати тільки в тому випадку, якщо токсин А або інші фактори призведуть до пошкодження епітелію, достаточному для проникнення токсина В вглиб слизової оболонки. Крім того, до цього часу не ідентифіковані специфічні рецептори до токсину В у людини (Voth, Ballard, 2005; Keel, Songer, 2006; Jank et al., 2007).

Продолжение следует.

## АНОНС

### К 150-летию Харьковского медицинского общества

#### Научно-практическая конференция

## Медицинская наука и клиническая практика в Харьковском регионе: Вчера, сегодня, завтра

20 октября, г. Харьков

Место проведения:

конференц-зал Института терапии им. Л.Т. Малой НАМН Украины  
(г. Харьков, пр. Пастышева, 2-А).

Если вы по каким-либо причинам не можете принять участие в конференции, узнать о достижениях коллег можно, посмотрев Интернет-трансляцию мероприятия в прямом эфире на медицинском портале «Страна врачей» ([www.medstrana.com](http://www.medstrana.com)).

Начало трансляции в 10:00.

Вы также можете задать вопросы участникам конференции, зарегистрировавшись на портале [www.medstrana.com](http://www.medstrana.com).

Видеозапись мероприятия будет доступна на медицинском портале «Страна врачей».

## АНОНС

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України»  
Кафедра гастроентерології та терапії ФПО Дніпропетровської медичної академії  
Асоціація гастроентерологів України

### Науково-практична конференція

## Сучасні технології в діагностиці та лікуванні гастроентерологічних хворих

3-4 листопада 2011 року,  
м. Дніпропетровськ

Місце проведення:  
Палац студентів (пл. Шевченка, 1).

У рамках заходу розглядатимуться найважливіші аспекти етіології, патогенезу, організації діагностики та лікування патології органів травлення.

Планується проведення 2 пленарних і 2 секційних засідань.  
За результатами роботи конференції буде видано збірник «Гастроентерологія».