

Received: 2014.07.08
Accepted: 2015.02.19
Published: 2015.05.05

Wybrane aspekty zakażeń *Clostridium difficile*

Selected aspects of *Clostridium difficile* infection

Agnieszka Mehlich¹, Sabina Górská¹, Andrzej Gamian¹, Andrzej Myc^{1,2,3}

¹Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

²University of Michigan, Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences

³Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytet Zielonogórski

Streszczenie

Clostridium difficile jest przyczyną jednego z najczęstszych zakażeń szpitalnych, czyli biegunki poantybiotykowej, która może się rozwinąć w rzekomobłoniaste zapalenie jelit i rozdęcie okrężnicy, co w wielu przypadkach prowadzi do śmierci pacjenta. Zakażenie bakterią *C. difficile* (CDI – *Clostridium difficile* infection) jest szczególnie niebezpieczne dla ludzi starszych, u których powoduje największą śmiertelność. Infekcja zwykle jest wywoływana w wyniku kuracji antybiotykowej, która zaburza skład naturalnej mikroflory jelitowej człowieka, a to stwarza dogodne warunki do kolonizacji jelit. *C. difficile* dysponuje wieloma czynnikami wirulencji, przez co jest patogenem trudnym do zwalczania. Do elementów składających się na dużą zjadliwość *C. difficile* zalicza się: wydzielane do światła jelit toksyny A, B i binarną CDT, wić, białka warstwy S (najbardziej zewnętrzna powierzchnia *C. difficile*), białko Cwp66 i GroEL, proteazę Cwp84, białko wiążące fibronektynę oraz zdolność do tworzenia biofilmu i sporulacji. Wiele grup badawczych pracuje nad nowymi sposobami zwalczania CDI będącymi alternatywą dla antybiotyków. Nie wprowadzono jeszcze do sprzedaży szczepionki zapobiegającej CDI. Jednym z badanych rozwiązań jest wykorzystanie immunogennych właściwości białek wchodzących w skład warstwy powierzchniowej patogenu, jako składników szczepionki. W pracy opisano przebieg choroby z uwzględnieniem czynników ryzyka oraz czynników wirulencji bakterii. Przedstawiono najnowsze dane epidemiologiczne i osiągnięcia w leczeniu i zapobieganiu CDI.

Słowa kluczowe:

antybiotyki • mikroflora jelitowa • biegunka poantybiotykowa • CDI • rzekomobłoniaste zapalenie jelit • adhezyny • wić • toksyna A • toksyna B • CDT

Summary

Clostridium difficile pathogen is a cause of the most frequent nosocomial infection, which is antibiotic-associated diarrhea. Antibiotic treatment causes disruption of the microbiome balance, which makes the gut a friendly environment for the pathogen. It leads to pseudomembranous colitis, toxic megacolon and even death. *Clostridium difficile* infection (CDI) is particularly dangerous to elderly patients, leading to the highest mortality rate. *C. difficile* is equipped with many virulence factors such as toxin A and B, binary toxin CDT, flagellum, S-layer proteins, Cwp66 and GroEL proteins, protease Cwp84, fibronectin-binding protein and the ability to form biofilm and spores. Problems with anti-CDI therapy prompt researchers and clinicians to seek alternative ways of therapy. Identification of immunological epitopes in outer layer proteins and the use of them as antigens for anti-CDI vaccines would be a rational approach to prevent the disease, but unfortunately such vaccines are not available yet. In this article we review the course of the disease, virulence and risk factors. We summarize briefly epidemiological data and the latest achievements in CDI treatment.

Keywords:

antibiotics • gut microbiota • antibiotic-associated diarrhea • CDI • pseudomembranous colitis • adhesins • flagellum • toxin A • toxin B • CDT

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1151340>

Word count: 5749

Tables: –

Figures: 2

References: 121

Adres autorki: mgr Agnieszka Mehlich, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: mehlich.agnieszka@gmail.com

WPROWADZENIE

Clostridium difficile należy do grupy oportunistycznych bakterii anaerobowych wywołujących schorzenia układu pokarmowego ludzi i zwierząt. Są to Gram-dodatnie laseczki wytwarzające groźne dla zdrowia toksyny (A i B) oraz spory odporne na wysokie temperatury i powszechnie stosowane środki utrzymania czystości [40]. Bakterię opisano po raz pierwszy w 1935 r. jako *Bacillus difficilis* (z łac. *difficilis* – trudny; nazwa związana z trudnościami w hodowli bakterii) [47]. Początkowo uważano, że jest jednym ze składników zdrowej mikroflory człowieka. Dopiero po czterdziestu latach potwierdzono, że jest odpowiedzialna za rozwój rzekomobłoniastego zapalenia jelit (PMC – pseudomembranous colitis) i uznano ją za bakterię patogenną [7]. Obecnie wiadomo, że *C. difficile* jest odpowiedzialna za zapalenie jelita grubego, występowanie biegunki o ostrym przebiegu, która może zagrażać życiu hospitalizowanych starszych osób oraz pacjentów po przebytej kuracji antybiotykowej. Narastająca liczba przypadków występowania szczepów hiperwirulentnych i opornych na działanie antybiotyków powoduje, że zakażenia szpitalne *C. difficile* są poważnym problemem i wymagają opracowania nowej profilaktyki i leczenia.

W pracy omówiono wybrane aspekty dotyczące zakażeń bakterią *Clostridium difficile*, w tym mechanizm patogenyzy, przebieg choroby, odpowiedź układu odpornościowego gospodarza oraz najnowsze osiągnięcia dotyczące możliwości zapobiegania i leczenia tego typu zakażeń.

Bakterie z rodzaju *C. difficile* to patogenne mikroorganizmy powodujące zakażenia szpitalne, które są przyczyną najczęściej występującej biegunki poantybiotykowej (AAD – antibiotic-associated diarrhea) oraz poantybiotykowego zapalenia okrężnicy (AAC – antibiotic-associated colitis) [7]. Do najcięższych powikłań powstałych w wyniku zakażenia zalicza się rozdęcie okrężnicy (toxic mega colon), które występuje prawie u 10% pacjentów cierpiących na CDI i czasami doprowadza do perforacji jelit i zgonu. Rozdęcie okrężnicy występuje częściej u osób zakażonych przez szczepy hiperwirulentne [76]. Choroba objawia się biegunką, silnymi bólami brzucha, złym samopoczuciem, mdłościami, wymiotami, gorączką

i odwodnieniem organizmu. Czynniki mające wpływ na przebieg choroby to poziom zjadliwości danego szczepu bakterii wynikający z ilości produkowanych toksyn oraz czynniki związane ze stanem układu odpornościowego pacjenta (stan zdrowia pacjenta, skład jego mikroflory, powinowactwo toksyn do komórek nabłonka, odpowiedź gospodarza na infekcję). Najczęstszą przyczyną rozwoju zakażenia bakterią *C. difficile* jest kuracja antybiotykowa, która zaburza skład jakościowy i ilościowy mikroflory (dysbioza) jelita grubego. Antybiotyki, które podwyższają ryzyko zakażenia to: klindamycyna, cefalosporyny, penicylina i fluorochinolony [61]. Pierwsze objawy choroby pojawiają się w ciągu tygodnia od rozpoczęcia terapii antybiotykowej. Niekiedy choroba pojawia się po zakończonej kuracji, co utrudnia postawienie trafnej diagnozy. Do czynników znacznie podwyższających ryzyko zakażenia zalicza się: podeszły wiek, osłabiony układ odpornościowy, choroby współistniejące, hospitalizacja oraz zabiegi operacyjne [105]. Dodatkowe czynniki podwyższające ryzyko zakażenia to niedobór witaminy D, choroba Leśniowskiego-Crohna, zespoły drażliwego jelita, leki immunosupresyjne oraz chemioterapia [81]. Utrudnieniem w walce ze schorzeniem są częste nawroty choroby, na które cierpi około 30% wyleczonych pacjentów [14], a mogą być spowodowane tym samym szczepem albo innym [5].

CZYNNIKI WIRULENCJI *C. DIFFICILE*

Liczba opisanych czynników wirulencji *C. difficile* stale rośnie wraz z postępem badań. Do grupy tej zalicza się: toksyny A, B i binarną CDT, wić (flagellum), białka warstwy S, białko Cwp66 i GroEL, proteazę Cwp84, białko wiążące fibronektynę (Fbp68) oraz zdolność do tworzenia biofilmu i sporulacji.

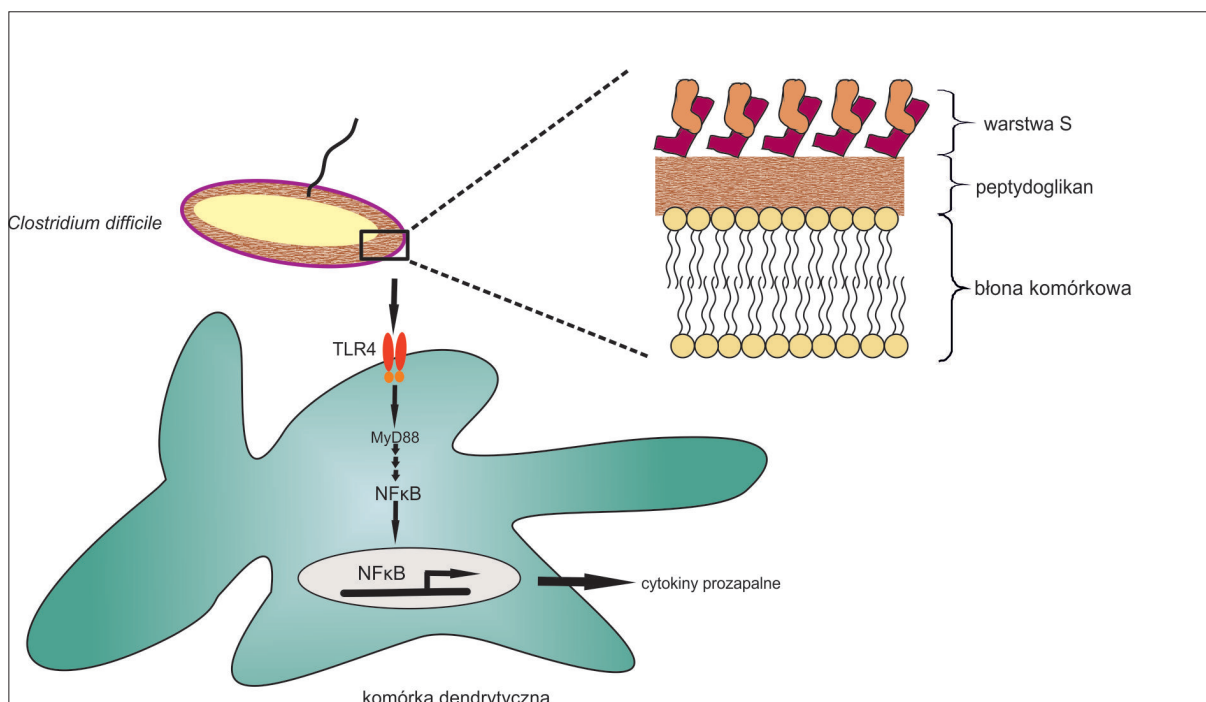
C. difficile wytwarza dwa główne rodzaje toksyn A (TcdA) i B (TcdB), a wybrane szczepy wydzielają dodatkowo toksynę binarną CDT (*Clostridium difficile* transferase). Szczepy, które nie wytwarzają toksyn, nie wywołują choroby. Toksyny A i B odpowiadają za nadmierne wydzielanie wody i elektrolitów do światła jelit, apoptozę kolonocytów oraz za wywołanie ostrego zapalenia jelit. Oba białka mają aktywność glukozylotransferazy [22,91]. Działanie toksyn prowadzi do inaktywacji bia-

łek rodziny Rho (białka zaangażowane m.in. w przekazywanie sygnałów w komórce, reorganizację cytoszkieletu, regulację transkrypcji), co powoduje dezintegrację włókien aktynowych, zerwanie połączeń międzykomórkowych, a nawet śmierć komórki [54]. U ludzi, jak dotąd, nie zidentyfikowano ich receptorów. Sugeruje się, że jest to glikoproteina zawierająca cukrowy antygen I, X lub Y [113]. Zidentyfikowano natomiast receptor toksyny A u królików [90]. Jest to enzym, sacharaza-izomaltaza, umiejscowiony w rąbku szczoteczkowym. Każda z toksyn składa się z czterech domen: domena N-końcowa – enzymatyczna, proteaza cysteinowa, domena translokacyjna i domena C-końcowa – receptorowa. Po wejściu do wnętrza komórki toksyna ulega autokatalitycznemu cięciu, po którym aktywna pozostaje tylko N-końcowa część enzymatyczna. Następnie dochodzi do glikozylacji GTPaz Rho (m.in. RhoA, Rac1, Cdc42) i do zatrzymania kaskady przekazywania sygnałów w atakowanej komórce, co zaburza podstawowe czynności komórki, takie jak transkrypcja genów, czy cykl komórkowy [99]. Toksyna B prawdopodobnie ma większe znaczenie w przebiegu choroby [74], jednak pełne objawy chorobowe może wywołać każda z tych toksyn [65]. Podwójna mutacja wprowadzona w genomie wirulentnej bakterii, która doprowadziła do zaniku wytwarzania toksyn A i B, spowodowała utratę zjadliwości patogenu. Toksyna A jest enterotoksyną o działaniu cytotoksycznym. Natomiast toksyna B jest prawie 1000 razy bardziej cytotoksyczna niż toksyna A [73]. Toksyna binarna (CDT) należy do grupy binarnych ADP-rybozylujących toksyn. CDT składa się z dwóch komponentów, biologicznie aktywnego o aktywności ADP-rybozylotransferazy i odpowiedzialnego za wiązanie się do komórek gospodarza i wnikanie do cytosolu komórki. Strukturę toksyny poznano dzięki rentgenografii strukturalnej [108]. Jest to jedyna toksyna *C. difficile*, dla której zidentyfikowano receptor obecny na ludzkich komórkach [83]. Tym receptorem jest lipoproteinowy receptor stymulowany lipolizą (LSR – lipolysis-stimulated lipoprotein receptor), który występuje na powierzchni jelita cienkiego i grubego oraz na powierzchni innych komórek, takich jak: komórki wątroby, budujące płuca, nerki, nadnercza, jądra i jajniki. Toksyna CDT po przedostaniu się do wnętrza komórki modyfikuje aktywność przez ADP-rybozylację [46], a to niszczy cytoszkielet aktynowy. Toksyna CDT jest wydzielana przez szczepy o zwiększonej patogenności [76]. W ostatnich latach pojawiły się szczepy hiperwirulentne np. 027/BI/NAP1, które wykazują 10-20 razy większe wytwarzanie toksyn A i B, wydzielają toksynę binarną oraz znacznie większą liczbę spor [79].

Wszystkie, jak dotąd zbadane, szczepy zawierają gen kodujący wić [110]. Badania z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu transmisyjnego wykazały dużą zmienność w liczbie wici u poszczególnych szczepów. Szczep 630 Δ erm ma wiele wici na powierzchni, szczep R20291 tylko jedną wić [2], a niektóre szczepy nie wytwarzają wici, mimo obecności odpowiednich genów. Wić umożliwia bakterii poruszanie się w gęstej war-

stwie śluzu pokrywającego powierzchnię błony śluzowej jelit i dotarcie do komórek nabłonkowych jelit, które są miejscem docelowym bakterii. Wici *C. difficile* są filogenetycznie konserwatywne, a jednocześnie silnie wzbudzają humoralną odpowiedź odpornościową gospodarza skierowaną przeciw białkom FliC (monomer budujący wić) i FliD (białko czapeczki) [87]. Mutacje w genach *fliC* i *fliD* bakterii uniemożliwiają poruszanie się, ale wzmagają adhezję patogenu [33]. Przywieranie do komórek gospodarza jest krytycznym elementem procesu infekcji. Adhezja komórek *C. difficile* wzmagają się w warunkach stresowych wywołanych podwyższoną temperaturą i kwasowością otoczenia, szokiem osmotycznym oraz brakiem jonów żelaza [116]. W badaniach *in vitro* wykazano wiązanie się komórek *C. difficile* do ludzkich linii komórkowych, takich jak Caco2 i HT29-MTX [38]. W procesie przywierania uczestniczą białka adhezyjne, takie jak białko szoku cieplnego GroEL czy białko powierzchniowe Cwp66 [52,117]. Białko GroEL wykazuje zwiększoną ekspresję nie tylko w odpowiedzi na podwyższenie temperatury, lecz także w chwili zetknięcia się bakterii z komórkami nabłonkowymi. Do czynników wirulencji należą również składniki zewnętrznej powierzchni bakterii, czyli białka warstwy S (SLP, S-layer proteins), które składają się głównie z dwóch białek – o małej masie cząsteczkowej (LMW – low molecular weight) oraz o dużej masie cząsteczkowej (HMW – high molecular weight) (ryc. 1).

Oba białka są kodowane przez jeden gen (*slpA*), którego białkowy produkt jest następnie cięty enzymatycznie na dwa mniejsze białka. LMW wykazuje dużo większe zróżnicowanie w składzie aminokwasowym między szczepami niż HMW [20]. Białka łączą się ze sobą niekwalencyjnymi wiązaniami i tworzą ścisłą powłokę na powierzchni bakterii [39]. Między LMW i HMW występują w mniejszej ilości również inne białka. Składniki warstwy S odpowiadają za przywieranie bakterii do ścian jelit [37]. Białka stymulują humoralny układ odpornościowy gospodarza, co potwierdza obecność przeciwciał skierowanych przeciw białku LMW we krwi zakażonych osób [82]. Do białek wchodzących w skład warstwy powierzchniowej bakterii zalicza się adhezynę – białko Cwp66 [117]. Jest to białko wykazujące bardzo dużą zmienność w składzie aminokwasowym między poszczególnymi izolatami klinicznymi, ale zmienność ta nie koreluje ze zwiększoną zjadliwością bakterii, czy trudniejszym przebiegiem choroby. Do czynników wirulencji zalicza się także proteazę Cwp84 – białko niekwalencyjnie związane z warstwą S, które bierze udział w budowaniu warstwy S [63]. Wykazano silną stymulację układu odpornościowego przez proteazę, co sugeruje udział tego białka w patofizjologii zakażeń *C. difficile* [85]. Jest to białko wysoce konserwatywne, niemal identyczna sekwencja aminokwasowa występuje u wielu izolatów klinicznych *C. difficile*. Białko Cwp84 ulega przycięciu w komórce, z tego powodu powstaje wiele jego typów, prawdopodobnie o różnej aktywności proteolitycznej. Proteaza może trawić składniki macierzy zewnątrzko-



Ryc. 1. Rozpoznawanie bakterii *Clostridium difficile* przez układ odpornościowy. Komórki dendrytyczne gospodarza mają na swojej powierzchni receptory TLR4, które rozpoznając białka warstwy S bakterii przekazują sygnał do wnętrza komórki i włączają ekspresję cytokin prozapalnych

mórkowej gospodarza, przez co narusza integralność komórek nabłonka [55]. *C. difficile* wiąże się do składników macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak: fibronektyna, fibrynogen, kolagen i witronektyna [24] za pomocą białka wiążącego fibronektynę Fbp68 (fibronectin binding protein) [51]. Wiązanie fibronektyny umożliwia przywieranie patogenu bezpośrednio do komórek nabłonka, zakłóca to proces prawidłowego rozpoznawania patogenu przez komórki układu odpornościowego gospodarza. Białko zablokowane swoistymi przeciwciałami powodowało jedynie częściową utratę możliwości przylegania *C. difficile* do komórek Vero, co wskazuje, że w procesie tym biorą udział także inne białka.

Sugeruje się udział biofilmu bakteryjnego w procesie nawrotu choroby. Komórki *C. difficile* wytwarzają biofilm, w którym tworzą się spory oraz następuje zahamowanie ich kiełkowania [102]. Wytwarzany przez bakterie biofilm jest stosunkowo gruby (30-45 μm) i wielowarstwowy, może wpływać na lekooporność [30]. Bakterie wykazywały większą oporność na tę samą dawkę wancomycyny, kiedy rosły w biofilmie, niż w całej objętości próbki. Zdolność do wytwarzania biofilmu jest zależna od szczepu bakterii i od składników odżywczych obecnych w środowisku. Bakterie tworzą macierz biofilmu wydzielając białka, DNA i polisacharydy, dzięki czemu oddzielają komórki mikroorganizmu od środowiska zewnętrznego. Zjawisko to udokumentowano za pomocą przeciwciał nakierowanych na *C. difficile* – przeciwciała dotarły tylko do nielicznych komórek bakteryjnych. Dodatek proteiny K oraz DN-azy I powodował zaburzenie makrokolonii. Do tego typu wzrostu jest nie-

zbędna prawidłowo wytworzona warstwa S. Mutanty pozbawione enzymu zaangażowanego w dojrzewanie warstwy S nie były zdolne do wzrostu w biofilmie. Wici prawdopodobnie są niezbędne w początkowej fazie tworzenia się makrokolonii. Mutacja wprowadzona w gen wici powodowała znaczne zmniejszenie przyrostu biofilmu, jednak dopiero w piątym dniu wzrostu, co oznacza, że ten element bierze udział w późniejszym etapie tworzenia makrokolonii.

ZWIERZĘCE MODELE CDI

Liczne modele zwierzęce są wykorzystywane w badaniach nad *C. difficile*. Jednym z najczęściej wykorzystywanych jest chomik syryjski, ponieważ przebieg infekcji *C. difficile* u tych zwierząt w dużym stopniu przypomina zakażenie u ludzi. W modelu chomiczym choroba jest indukowana przez podanie antybiotyku, który zaburza naturalną mikroflorę jelita, a następnie zakażenie zwierzęcia sporami. Objawy oraz przebieg choroby są podobne jak u człowieka, z tym wyjątkiem, że zakażenie u chomików kończy się śmiercią już po kilku dniach od infekcji, uniemożliwiając dłuższą obserwację przebiegu choroby. Pracę z tym modelem utrudnia również brak odpowiednich odczynników do badań immunologicznych (przeciwciał do pracy z materiałem uzyskanym od chomika). Jako mysie modele CDI wykorzystuje się myszy mające naturalną mikroflorę, pozbawione mikroflory, monokolonizowane oraz myszy o składzie mikroflory przybliżonym do ludzkiej. Za pomocą mysich modeli choroby badano mechanizm zakażenia, wytwarzanie toksyn przez bakterię, przenoszenie i nawrót

choroby oraz wpływ środowiska zewnętrznego na infekcję. Zdrowe myszy są odporne na zakażenie, w tym przypadku do wywołania CDI jest niezbędna uprzednia kuracja antybiotykowa. Stosowanie antybiotyków jest zbędne u myszy od urodzenia pozbawionych mikroflory jelitowej, jednak jest to model rzadziej używany. Myszy od urodzenia pozbawione mikroflory nie odwzorowują sytuacji jaka zachodzi u pacjentów. U zakażonych myszy rzadko rozwija się choroba o gwałtownym przebiegu. Oprócz myszy w badaniach wykorzystuje się również szczury, świnki morskie, zające, króliki, świnię i inne gatunki zwierząt [29,112,121].

POTENCJALNE ANTYGENY SZCZEPIONKOWE

Jedną z metod prewencji zakażeń *C. difficile* mogą być swoiste przeciwciała skierowane przeciwko cząsteczkom zaangażowanym w proces adhezji, ponieważ zablokowanie miejsc wiążących na powierzchni bakterii uniemożliwiłoby przyleganie patogenu do komórek nabłonkowych pacjenta i tym samym nie dochodziłoby do rozwinięcia się stanu zapalnego. Wykazywane działanie immunomodulacyjne składników powierzchni *C. difficile* stwarza możliwość wykorzystania ich w szczepionkach. Za wykorzystaniem tych białek w szczepionkach przemawia również to, że część z nich ma regiony konserwatywne. Przeprowadzono eksperymenty mające na celu wzbudzenie odporności na toksyny oraz białka powierzchniowe *C. difficile* [42,43,84,86]. Skuteczność antygenów zbadano na chomikach syryjskich i myszach pozbawionych flory bakteryjnej. Do zbadania ich skuteczności wykorzystano testy ochronne polegające na zakażeniu ściśle określoną liczbą komórek bakteryjnych myszy lub chomika po jego wcześniejszej immunizacji.

Trwają jeszcze badania kliniczne III fazy nad szczepionką opartą na najlepiej poznanych składnikach wirulencji *C. difficile*, czyli toksynach. Fragmenty toksyn A i B podane jako antygeny wzbudzają odpowiedź systemową, która neutralizuje działanie toksyn, jednak indukcja odpowiedzi miejscowej w jelicie jest bardzo słaba [118]. Udowodniono działanie ochronne szczepionek opartych na toksynach A i B [42,111]. Na zdrowych ochotnikach wykazano, że szczepionki są bezpieczne i immunogenne oraz że zapobiegają nawrotom choroby u osób cierpiących na nawracającą CDI [64]. Istnieją jednak doniesienia o dużej zmienności wytwarzanych przez bakterię toksyn, zwłaszcza w rejonie najsilniej wzbudzonego odpowiedzi odpornościową C-końca tych białek [96]. Nie wiadomo, czy wytworzenie aktywnych przeciwciał skierowanych na toksyny wyeliminuje nosicielstwo oraz przenoszenie zakażenia przez spory między pacjentami.

Badacze poszukują wciąż nowych antygenów do użycia w szczepionkach. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla białek Cwp66, Cwp84, FliC i FliD oraz Fbp68 [85,87,120]. Przeprowadzono eksperymenty na zwierzętach, w których wykazano właściwości immunogenne białek Cwp84 i FliD [84,86]. Uzyskano istotną statystycznie różnicę w liczbie chomików, które przeżyły zakażenie

C. difficile, między grupą zaszczepioną białkiem Cwp84 a grupą kontrolną [84]. Wykazano zmniejszoną kolonizację jelit przez *C. difficile* w przypadku myszy zaszczepionych białkami FliD i Cwp84. Zbadano odpowiedź układu odpornościowego ludzi chorych i zdrowych względem toksyny A i B oraz białek powierzchniowych *C. difficile*: FliD, FliC, końca N- i C- białka Cwp66 i białka Fbp68 [85]. Stężenie przeciwciał u tych osób zmierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA). W grupie chorej na CDI stężenie przeciwciał było najwyższe względem C-końca białka Cwp66 i spadało dla Fbp68, FliD, toksyny B i A, N-końca białka Cwp66 i FliC. Stężenie przeciwciał nakierowanych na N-koniec białka Cwp66, FliC, FliD i Fbp68 było wyższe w grupie kontrolnej od tego w grupie chorych. Stężenie przeciwciał swoistych dla toksyn nie różniło się istotnie statystycznie między obiema grupami. Badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych 17 klinicznych szczepów *C. difficile* wykazało duże podobieństwo sekwencji białek FliD i FliC między poszczególnymi izolatami [87]. Oba białka były rozpoznawane przez przeciwciała zawarte w surowicach pobranych od pacjentów. Wymienione antygeny, a zwłaszcza FliD, FliC i Cwp84, ze względu na wywołaną silną odpowiedź układu odpornościowego oraz konserwatywny charakter, są dobrymi kandydatami do zastosowania w szczepionkach w połączeniu z odpowiednimi adiuwantami.

DANE EPIDEMIOLOGICZNE

C. difficile zasiedla układ pokarmowy prawie u 3% zdrowych dorosłych oraz do 80% zdrowych noworodków, nie dając żadnych objawów chorobowych [6]. Nosicielstwo *C. difficile* zwiększa się o 16-35% u osób leczonych w szpitalach i wzrasta proporcjonalnie do długości pobytu w szpitalu oraz w czasie kuracji antybiotykowej [1]. Prawie 30% zakażonych pacjentów wykazuje objawy chorobowe. Chorzy zakażają się od siebie sporami, które wydalać pacjenci z CDI. Wydalane spory znajdują się na urządzeniach szpitalnych np. basenach, toaletach, pościeli. Są odporne na wysychanie, wysokie temperatury i wiele środków odkażających [40]. Właściwości spor różnią się między poszczególnymi szczepami klinicznymi, np. zdolnością do przywierania do metalowych powierzchni [59]. W razie pozytywnej diagnozy standardowym działaniem jest kuracja antybiotykowa pacjenta, jeżeli nie ma przeciwwskazań. Na ogół towarzyszy temu natychmiastowa izolacja pacjenta, zastosowanie dodatkowych reżimów higienicznych oraz szkolenie personelu szpitala dotyczące opieki nad zakażonym pacjentem [40]. Stwierdza się obecność bakterii w próbkach stolca po zakończonej kuracji antybiotykowej u 10-40% osób cierpiących na CDI [77].

Częstość występowania chorób związanych z zakażeniem *C. difficile* u mieszkańców USA w ciągu 9 lat uległa prawie potrojeniu (z 31/100 000 do 84/100000) [94]. W skali roku jest to około 300 000 przypadków. W szczycie epidemii w 2008 r. 93% chorych to byli ludzie powyżej 65 roku życia, co stawia zakażenia *C. difficile* na 18 miej-

scu wśród głównych przyczyn śmiertelności w tej grupie wiekowej [71]. Epidemie zakażeń wywołanych przez *C. difficile* są również obecne w Europie, Azji, Australii i Ameryce Środkowej [27,66]. W Polsce częstość zakażeń bakterią *C. difficile* wynosi 76 przypadków na 10 000 szpitalnych przyjęć, gdzie średnia dla szpitali w zachodnich krajach Europy wynosi 23 na 10000 przyjęć [9]. Poziom śmiertelności u chorych na CDI, u których stwierdzono rzekomobłoniaste zapalenie jelit, wynosi 6-30% i utrzymuje się również na wysokim poziomie u pacjentów, u których nie zdiagnozowano wcześniej rzekomobłoniastego zapalenia jelit [1,6]. W Stanach Zjednoczonych koszty leczenia jednego pacjenta zakażonego *C. difficile* wynoszą 2 000-72 000 \$ [34,41], a walka z biegunkami wywołanymi zakażeniem *C. difficile* wynosi rocznie około 1,1 miliarda dolarów [67]. Warto odnotować, że coraz więcej chorych zakaża się poza jednostkami opieki medycznej.

PRZEBIEG INFEKCI *C. DIFFICILE*

Spory, które dostały się do organizmu pacjenta w sposób fekalno-oralny, kielkują w chwili wystąpienia dysbiozy przewodu pokarmowego u pacjentów leczonych antybiotykami i zaczynają się masowo namnażać w jelitach. Komórki bakterii po przejściu w stan wegetatywny i osiągnięciu fazy stacjonarnej wytwarzają toksyny, które powodują nadmierne wydzielanie wody i elektrolitów do światła jelit, apoptozę kolonocytów, co doprowadza do ostrego zapalenia jelit [35]. Głównym elementem w aktywacji odpowiedzi odpornościowej jest rozpoznanie przez receptory TLR (Toll-like receptors) gospodarza bakterii i aktywacja odpowiedzi odpornościowej przez szlak sygnałowy z udziałem białka MyD88 (ryc. 1). Myszy pozbawione białka adaptorowego wykazywały zwiększoną podatność na ostre zakażenia bakterią *C. difficile* [69]. W doświadczeniach z wykorzystaniem linii komórkowych wykazano, że toksyny A i B aktywują wytwarzanie prozapalnego czynnika NF- κ B [62,98], w wyniku czego neutrofile przemieszczają się do miejsca zakażenia i wywołują stan zapalny, który może uszkadzać powierzchnię jelit. Odpowiedź odpornościowa u pacjentów może przybierać różne postaci. W osoczu krwi większości chorych znajdują się przeciwciała skierowane przeciw *C. difficile* typu IgA, prawdopodobnie są to ślady po kontakcie z bakterią we wczesnych latach życia. W krwi leczących się osób krążą przeciwciała IgA i IgG. Pacjenci cierpiący na nawracające zakażenia *C. difficile* nie wykazują skutecznej odpowiedzi przeciwciałami, prawdopodobnie z powodu zbyt małego stężenia swoistych przeciwciał IgG [42]. W razie zakażenia, pierwszą linią obrony jest warstwa śluzu, przez którą bakterie muszą się przedostać, aby móc się związać do komórek nabłonka jelit. *C. difficile* oprócz wici, która umożliwia jej poruszanie się w śluzie, potrafi również obniżyć stężenie wydzielanego śluzu [16]. Na powierzchni komórek nabłonka jelit znajdują się receptory rozpoznające wzorce (PRR – pattern recognition receptors), do których należą receptory Toll-podobne (TLR) oraz NOD-podobne (NLR, NOD-like receptors) [68]. Receptory

powierzchniowe gospodarza rozpoznają mikroorganizmy po konserwatywnych molekularnych wzorcach mikroorganizmów (MAMPs – microbe associated molecular patterns) [32]. Przyłączenie się wzorca (ligandu) do receptora indukuje odpowiedź odpornościową w postaci wydzielania cytokin, defensyn, substancji o działaniu antibakteryjnym, cząsteczek sygnałowych i mucyn [72]. Mechanizmem zapobiegającym nadmiernej aktywacji receptorów jest słaba konstytutywna oraz selektywna ekspresja. W 2011 r. pojawiły się pierwsze doniesienia na temat rozpoznawania komórek *C. difficile* przez gospodarza z użyciem swoistych receptorów. Badania przeprowadzone pod kierownictwem Hasegawy sugerują udział w tym procesie białka NOD1 [49]. NOD1 jest to wewnątrzkomórkowa cząsteczka, która rozpoznaje związki peptydoglikanu. Następstwem stymulacji NOD1 jest wzmożone wytwarzanie CXCL1 – chemokiny przyciągającej neutrofile w miejsce zakażenia. Na temat rozpoznania *C. difficile* przez organizm gospodarza pisali również Ryan i wsp. Sugerują, że bakteria jest identyfikowana za pomocą TLR4, który reaguje na obecność bakteryjnych struktur SLP [97]. Białka warstwy S powodują dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz wywołują odpowiedź limfocytów Th1 i Th17 przez interakcje z TLR4.

W 90% przypadków objawy zakażenia *C. difficile* pojawiają się między pierwszym a ósmym tygodniem po rozpoczęciu kuracji antybiotykowej. Choroba objawia się wodnistą biegunką w połączeniu ze skurczami mięśni brzucha. U starszych osób pojawia się niemożność utrzymania kału. U pacjentów z ciężką postacią choroby lub z gwałtownym jej przebiegiem, może dojść do niedrożności jelit, objawów otrzewnowych (silny ból, obrona mięśniowa, brak szmerów perystaltycznych) lub wystąpienia objawów wstrząsu septycznego. Zakażenie może mieć czasem przebieg inwazyjny i może spowodować reaktywne zapalenie stawów, zakażenie skóry, krwi lub kości. Obraz kliniczny jest nieswoisty i obejmuje stany podgorączkowe, rozlaną tkliwość jamy brzusznej i odwodnienie [53]. Diagnostyka opiera się na teście wykrywającym dehydrogenazę glutaminianową (GDH) oraz teście na obecność toksyn A i B. W przypadku obu wyników dodatnich pacjenta uznaje się za zakażonego toksynotwórczą bakterią *C. difficile*. W przypadku dodatniego testu GDH i ujemnego testu na obecność toksyn przeprowadza się dodatkowe badanie w postaci testu amplifikacji kwasów nukleinowych (metoda PCR) lub posiewu bakterii *C. difficile* z oznaczeniem toksynotworzenia. Oba testy potwierdzają obecność lub brak toksynotwórczego szczepu [53].

LECZENIE – METODY STANDARDOWE

W przypadku stwierdzenia obecności toksynotwórczego szczepu *C. difficile* u pacjenta należy odstawić antybiotyki, które spowodowały dysbiozę, a następnie nadmierną kolonizację jelita bakterią *C. difficile*. Zwykle takie działanie wystarcza u 23% pacjentów. Lekiem pierwszego rzutu jest podawany doustnie metronidazol lub wankomycyna [28], czasem stosuje się teikoplaninę,

rifaksyminę. Niestety, kuracja najczęściej stosowanym metronidazolem nie jest skuteczna w przypadku 16-38% chorych [88]. Obecnie wprowadza się również fidak-somycynę, lek bardziej skuteczny niż dotychczas stosowane przeciwko *C. difficile*, o mniejszym wpływie na mikroflorę jelit oraz osiągający wysokie stężenie w jeli-tach przy jednocześnie niskiej absorpcji [57]. W najcięż-szych przypadkach jednak niezbędne jest chirurgiczne usuwanie powikłań (kolektomia). Wzrastająca oporność bakterii na antybiotyki zmusza do poszukiwania alter-natywnych terapii. Potrzebne są szybsze i skuteczniej-sze sposoby walki z zakażeniami wywoływanymi przez *C. difficile*.

LECZENIE – METODY ALTERNATYWNE

Przeszczep flory bakteryjnej (FMT – fecal microbiome transplantation) to metoda znana od wielu lat i z powo-dzeniem stosowana w zakażeniach wywołanych *C. dif-ficile* i innych schorzeniach, takich jak zapalenie jelit, zespół jelita drażliwego, zatwardzenia, a nawet niektóry-ch schorzeń układu nerwowego [12]. Polega na pobra-niu próbek zawartości jelita grubego od zdrowego dawcy i przeniesieniu ich do jelit biorcy za pomocą lewatywy. Donorami zwykle są osoby z rodziny, ponieważ podobieństwo pod względem genetycznym odzwierciedla się również w składzie mikroflory jelitowej. W literaturze opisano około 100 przypadków nawracającego CDI leczonych za pomocą FMT w latach 1958-2008, a skuteczność terapii oszacowano na 89% [4]. W 2012 r. przeprowa-dzono pierwsze, randomizowane badanie skuteczności terapii FMT w leczeniu nawracającego CDI [115]. Porów-nano trzy grupy: pacjenci leczeni podawaną doustnie wankomycyną, a następnie przechodzący płukanie jelit i FMT, pacjenci leczeni tylko doustnie wankomycyną, pacjenci leczeni doustnie wankomycyną, a następnie płukaniem jelit. W grupie pierwszej 93% pacjentów zostało wyleczonych, w grupie drugiej 30,7%, a trzeciej jedynie 23% ($P < 0,001$). Niski koszt, skuteczność metody oraz łatwość przeprowadzenia procedury powodują, że FMT może się stać dobrą alternatywą dla antybiotyków. Metoda ma również wady, istnieje duże prawdopodobieństwo przeniesienia patogenów dawcy flory bakteryjnej do biorcy, nie ma możliwości weryfikacji metody, bo za każdym razem przeszczepiana flora będzie mieć inny skład. Zdarza się też, że pacjenci nie akceptują takiej terapii.

Inną metodą leczenia CDI jest wykorzystanie probioty-ków. Nie wiadomo jednak w jaki sposób probiotyki wpły-wają na mikroflorę jelitową oraz jak modulują odpowiedź układu odpornościowego na zakażenia. Szczepy probio-tyczne muszą być dostosowane do warunków panują-cych w układzie pokarmowym oraz odporne na substancje bakteriobójcze wydzielane przez inne składniki mikro-flory. Probiotyki mogą modulować odpowiedź komórek układu odpornościowego i tym samym wpływać na sku-teczność leczenia zakażeń *C. difficile*. Część z już znanych mikroorganizmów ma te właściwości, są to np. bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* CL1285,

Lactobacillus casei LBC80R) oraz *Saccharomyces boulardii* [58]. Użycie probiotyków w celach prewencyjnych, jak i w połączeniu z antybiotykami uznano za jeden z możli-wych sposobów walki z CDI. Najlepiej przebadanym pod względem możliwości stosowania w leczeniu pacjentów z CDI jest *S. boulardii*. Jest to mikroorganizm, który przy-wiera do ścian jelit, natychmiast po podaniu kolonizuje je, a po 5 dniach od zaprzestania podania znika z układu pokarmowego. Zapobiega działaniu toksyny A bakterii *C. difficile* przez wydzielanie proteazy trawiącej toksynę A i ograniczającą wiązanie się toksyny do jej receptorów znajdujących się na powierzchni jelita cienkiego szczu-rów [23]. *L. acidophilus* LA-5 podany myszom pozbawio-nym komensali znacznie zmniejszył nasilone objawy CDI [60], obniżył m.in. stężenie toksyn i polepszył obraz histopatologiczny. Inkubacja *C. difficile* z supernatantem hodowli *Lactococcus lactis* SL3 znacznie obniżała żywot-ność patogenu. Inne probiotyki, takie jak: *Lactobacillus rhamnosus* LR5, *Bifidobacterium breve* BR3, *Bifidobacterium lactis* BL3 dały bardzo zbliżone wyniki, jak *L. lactis* SL3 [70]. *Saccharomyces cerevisiae* szczep 905 chronił ślepe myszy pozbawionych mikroflory przed patolo-gicznymi zmianami wywołanymi przez *C. difficile* [75]. Przeprowadzona wnikliwa analiza wyników badań doty-czących stosowania probiotyków w leczeniu biegunki poantybiotykowej wykazała działanie następujących szczepów: *Lactobacillus* GG, *Saccharomyces boulardii*, *Lac-tobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Strepto-coccus thermophilus*. W tej samej analizie wzięto również po uwagę następujące szczepy: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobac-terium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium lon-gum* PL03, *Lactobacillus plantarum* PL02, które jednak nie wykazały tak skutecznego działania jak: *Lactobacillus* GG, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobac-terium lactis* Bb12, *Streptococcus thermophilus* [109]. Takie analizy na dużą skalę mają jednak swoje ograniczenia biorąc pod uwagę eksperymenty różniące się sposobem przeprowadzenia i opisem. Nie we wszystkich badaniach są podane wszystkie potrzebne dane, a przyjęte defini-cje różnią się, np. biegunki. Poza tym, badacze posługują się grupami kontrolnymi różnej wielkości, a wiek bada-nych różni się diametralnie między badanymi grupami. Niektóre artykuły przeglądowe wskazują na problem z jednoznacznym potwierdzeniem skuteczności probio-tyków w leczeniu schorzeń związanych z zakażeniem bakterią *C. difficile*. Zaproponowano probiotyki jako śro-dek prewencyjny CDI, ale tylko u osób zdrowych oraz u osób z podwyższonym ryzykiem zachorowania na CDI. Ograniczenia te wynikają z pojedynczych przypadków grzybic wśród pacjentów, wynikających z nadmiernej kolonizacji przez *S. boulardii* [21]. Mimo wielu pozytywn-ych przesłanek literaturowych nie zarekomendowano probiotyków do rutynowego stosowania w leczeniu CDI.

Uzupełnieniem terapii z wykorzystaniem probiotyków mógłby być dodatek specjalnie wyselekcjonowanych bakterii probiotycznych wytwarzających bakteriocyny, małe peptydy antybakteryjne. Wykazano *in vitro* działa-nie przeciwbakteryjne bakteriocyn laktocyn 3147 oraz

nizyny wytwarzanych przez *Lactococcus lactis*, przeciwko *C. difficile*. Niestety oba peptydy mają szeroki zakres działania, szczególnie przeciw bakteriom Gram-dodatnim [8,92]. Innym peptydem antybakteryjnym jest LFF571, który wykazuje hamujące działanie na wzrost *C. difficile*, a jednocześnie mniejsze działanie hamujące na szczepy *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [26]. Inną bakteriocyną jest półsyntetyczna pochodna aktagardyny A o wąskim zakresie działania i aktywna względem *C. difficile* [11].

Wśród bakterii, które zamieszkują ludzkie jelito, odnaleziono *Bacillus thuringiensis*, który wydziela substancję o nazwie thuricin CD o minimalnym stężeniu hamującym względem *C. difficile* porównywalnym do metronidazolu i wankomycyny [93]. Peptyd ten nie wykazuje toksycznego działania na resztę mikroflory.

Interesujących rozwiązań w walce z *C. difficile* może dostarczyć nowa dyscyplina naukowa – patobiotechnologia, która zajmuje się wykorzystaniem właściwości patogenów w przemyśle spożywczym i medycynie. Jedną z idei jest zastosowanie bakterii, które na powierzchni zawierają receptory podobne do tych na powierzchni komórek jelit gospodarza. Mogą to być receptory toksyn wytwarzanych przez patogeny lub dla samych patogenów, których wiązanie spowoduje ich inaktywację. Prowadzone są badania nad rozwiązaniami, w których bakterie probiotyczne otrzymują geny odpowiedzialne za przetrwanie warunków stresowych wywołanych przez bakterie patogenne, dzięki czemu stają się bardziej odporne. W taki sposób udało się zmienić *Lactobacillus salivarius* UCC118 [103], bakterię o właściwościach probiotycznych, na mniej wrażliwą na niekorzystne warunki środowiska. Naukowcom udało się wprowadzić do *L. salivarius* gen *BetL* pochodzący z *Listeria monocytogenes* odpowiedzialny za wytwarzanie białek, które uodparniają patogen na zasolenie, niską temperaturę [119] i umożliwiają przeżywanie w niektórych przetworzonych pokarmach [106]. Taką samą modyfikację przeprowadzono z *Bifidobacterium breve* UCC2003 [104]. Badania z wykorzystaniem modelu zwierzęcego wykazały zwiększoną przeżywalność modyfikowanego szczepu bakteryjnego podawanego do jamy ustnej po przejściu przez układ pokarmowy myszy w porównaniu do szczepu niemodyfikowanego oraz działanie ochronne przed zakażeniem *L. monocytogenes*. Wadą takiego rozwiązania jest to, że są to organizmy modyfikowane genetycznie, przez co muszą spełniać wiele norm bezpieczeństwa, a z ich stosowaniem wiąże się wiele zagrożeń, np. możliwość przeniesienia genów oporności na patogenne bakterie. Dotychczas tylko jedna zmodyfikowana bakteria *Lactococcus lactis* (LL-Thy12) jest testowana w badaniach klinicznych jako potencjalny lek [15].

Innym sposobem walki z bakteriami chorobotwórczymi jest wykorzystanie przeciwciał leczniczych skierowanych na czynniki inwazyjne bakterii np. adhezyny, wić, toksyny. W tym celu wykorzystano przeciwciała wytwarzane w jajach kurzych (IgY) swoiste względem białek FliD, FliC oraz Cwp84 [80]. Chomiki syryjskie zakażano

sporami *C. difficile* po uprzedniej kuracji antybiotykowej, po czym podawano im przeciwciała lecznicze IgY; przeciwciała IgY anti-FliD spowodowało znaczny wzrost ich przeżywalności.

Jedną z obecnie stosowanych terapii w przypadku zakażeń bakteryjnych jest fagoterapia. Fagi atakują ściśle określone bakterie, które dostają się do wnętrza komórki bakteryjnej, przejmują kontrolę nad replikacją DNA i zabijają zainfekowaną bakterię w procesie lizy towarzyszącej uwalnianiu się faga. Bakteriofagi są stosowane do zwalczania infekcji *Pseudomonas* u psów, myszy i ludzi [23,57]. Jest to dość dobrze poznana terapia stosowana, gdy antybiotyki zawodzą. Dotychczas wyizolowane fagi to fagi lizogeniczne, czyli trwale wbudowane w genom bakterii *C. difficile*. Istnieją doniesienia o prawdopodobnej roli profagów w ekspresji genów toksyny A i B *C. difficile* [101]. Udowodniono naturalną indukcję profaga w przebiegu CDI, co prowadziło do zabijania komórki bakteryjnej [78]. Niestety w tego typu zakażeniach, jak dotąd nie ma opracowanych terapii z wykorzystaniem fagów przeznaczonych do szerokiego zastosowania.

ANTYBIOTYKI I ZABURZENIA MIKROFLORY A *C. DIFFICILE*

Badania prowadzone nad składem mikroflory jelit wykazały obecność tysięcy mikroorganizmów różnych gatunków, należących głównie do typów *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. W jelicie znajdują się również mniejsze grupy bakterii należące do typów *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* [36]. Mikroorganizmy tworzące mikroflorę przewodu pokarmowego spełniają wiele pożytecznych ról, wytwarzają witaminy K i B, metabolizują cholesterol, wytwarzają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, takie jak maślan, rozkładają polisacharydy z pożywienia, które nie byłyby dostępne człowiekowi [3]. Pobudzają układ odpornościowy do obrony przed patogenami, konkurują z organizmami patogennymi o miejsca wiążące na powierzchni jelit, wytwarzają substancje zwane bakteriocynami, które zabijają bakterie chorobotwórcze [95]. Mikroflora jelitowa działa również niekorzystnie. Nadmierne pobudzenie układu odpornościowego przez antygeny bakterii komensalnych może prowadzić do przewlekłego zapalenia jelit (IBD – inflammatory bowel disease) i do rozwinięcia się choroby Leśniowskiego-Crohna [13].

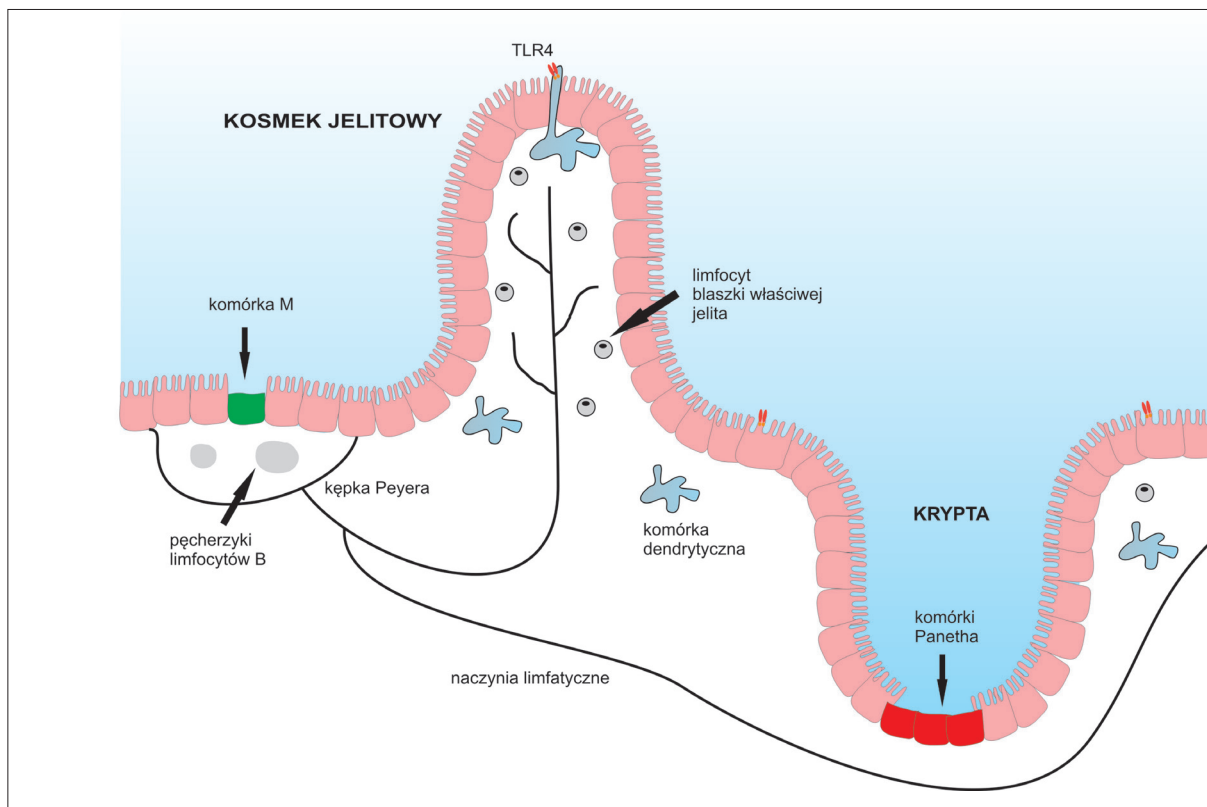
Układ odpornościowy związany z układem pokarmowym ma za zadanie walkę z patogenami z jednoczesną tolerancją spożywanego pokarmu oraz zasiedlających światło jelit organizmów komensalnych. Spełnia to zadanie, wykorzystując wiele swoistych oraz nieswoistych mechanizmów. Do mechanizmów nieswoistych, które tworzą pierwszą linię obrony, należy powierzchnia jelit pokryta ściśle przylegającymi do siebie komórkami nabłonkowymi wydzielającymi śluz, który jest rezerwuarem substancji o działaniu przeciwbakteryjnym w postaci peptydów o działaniu bakteriobójczym i immunoglobulin wydzielonych przez wyspecjalizowane do walki z patogenami komórki układu odpor-

nościowego. System tkanki limfatycznej związanej ze śluzówką jelit nazywa się GALT (gut-associated lymphoid tissue). Do elementów budujących ten układ należą struktury limfatyczne, kreskowe węzły chłonne, kępki Peyera, grudki chłonne oraz inne struktury związane ze śluzówką jelit (ryc. 2). Szacuje się, że 80% immunoglobulin wytwarzanych w ludzkim organizmie powstaje właśnie w GALT [10].

Nabłonek jelit jest miejscem, gdzie komórki gospodarza „testują” zawartość światła jelit na obecność patogenych mikroorganizmów i wywołują odpowiedź odpornościową przez wydzielenie cząsteczek sygnałowych, takich jak cytokiny i chemokiny lub też wydzielają substancje o działaniu przeciwbakteryjnym. Następnie do miejsca kontaktu z obcym mikroorganizmem napływają leukocyty (limfocyty T i B) [107]. Mimo ciągłego kontaktu śluzówki z organizmami komensalnymi układ reaguje jedynie niewielkim zapaleniem w odpowiedzi na ich lipopolisacharyd (LPS), lipoproteiny lub peptydoglikan. Organizm gospodarza może odróżnić niegroźne bakterie od patogennych za pomocą systemów rozpoznających antygeny. Do takich systemów należą wcześniej wspomniane receptory TLR, NOD2 i NOD1, np. TLR4 jest receptorem LPS [89], ligandem dla TLR5 jest flagelina i bakterie zaopatrzone w nią [50]. Zidentyfikowano ligandy receptorów NOD: dla NOD2 jest to swoisty dla

peptydoglikanu (PGN) motywu dipeptyd muramyłowy (MDP) [45], dla NOD1 jest to pochodna PGN u bakterii Gram-ujemnych [44]. Związanie receptorów z ligandem zmienia ekspresję genów komórki wchodzącej w skład układu odpornościowego śluzówki jelit oraz aktywację lub hamowanie odpowiedzi odpornościowej.

Odkrycie antybiotyków w 1928 r. przez Alexandra Fleminga było kamieniem milowym w walce z patogenami. Mimo iż jest to jedno z największych odkryć XX w., jego niewłaściwe wykorzystanie, a nawet nadużycie ma pewne negatywne skutki. Podanie pacjentowi antybiotyku zaburza mikroflorę jelitową i wpływa na odporność organizmu. Badania przeprowadzone na zdrowych osobnikach, którzy przyjmowali przez 5 dni doustnie ciprofloksacynę wykazały zubożenie składu mikroflory w czasie kuracji [31]. Różnorodność bakterii spadła u badanych pacjentów o 1/3. Wprawdzie mikroflora powróciła do stanu równowagi po czterech tygodniach od kuracji, to jednak w jej składzie nie wykryto kilku szczepów, co oznacza, że nawet kilkudniowe leczenie może powodować nieodwracalne zmiany w jej składzie. Inne badania dotyczące składu flory bakteryjnej kału wykazały, że po 7-dniowej kuracji klindamycyną zmniejszyła się różnorodność rodzaju *Bacteroides* i dochodziło do wzmożonej kolonizacji szczepami opornymi na antybiotyki. Skład bakterii z rodzaju *Bactero-*



Ryc. 2. Schemat budowy błony śluzowej jelit z zaznaczoną lokalizacją receptorów TLR4. Powierzchnia jelita składa się z gęsto upakowanych komórek nabłonkowych jelita, komórek Panetha wydzielających lizozym, komórek M odpowiedzialnych za transport cząsteczek i mikroorganizmów do głębszych warstw nabłonka. Ponad komórkami nabłonkowymi znajduje się gęsta warstwa śluzu. Pod powierzchnią nabłonka znajdują się elementy układu GALT, takie jak naczynia limfatyczne, kępki Peyera, limfocyty i komórki dendrytyczne

ides nie powrócił do normy sprzed kuracji nawet po dwóch latach od zaprzestania kuracji antybiotykiem [56]. Szczepy mikroflory są od siebie zależne, oddziałują na siebie i dlatego zastosowanie antybiotyku powoduje nie tylko utratę pojedynczej klasy mikroorganizmów, ale zaburza całą równowagę. W doświadczeniu przeprowadzonym na myszach, którym podano wankomycynę – swoisty antybiotyk względem bakterii Gram-dodatnich – obserwowano w jelitach również zmniejszenie liczby Gram-ujemnych bakterii typu *Bacteroidetes* [100]. Inne badanie składu bakteryjnego jelit wykazało zwiększoną liczbę bakterii rodzaju *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp. i rodziny *Enterobacteriaceae* [114].

Zagadnienie antybiotykooporności ma ścisły związek z CDI, polega na nabyciu przez bakterię zdolności do inaktywacji lub unikania działania antybiotyku. *C. difficile* jest odporne na działanie wielu antybiotyków, w przeciwieństwie do bakterii Gram-ujemnych wchodzących w skład mikroflory, które w czasie leczenia w dużej części zostają zabite. Występowanie infekcji *C. difficile* jest związane z długotrwałym przyjmowaniem klindamycyny, cefalosporyny lub fluorochinolonów. Klindamycyna powoduje, m.in. znaczny spadek liczby bakterii beztlenowych, pojawienie się opornych na antybiotyki enterokoków i enterobakterii. Cefalosporyny powodują przerost grzybów z rodzaju *Candida* oraz zaburzają równowagę między liczbą bakterii tlenowych i beztlenowych w jelitach. Antybiotyki z grupy penicylin powodują oporność na antybiotyki enterobakterii, wzrost liczby bakterii tlenowych Gram-dodatnich oraz bakterii beztlenowych. Najsilniejszy wpływ na skład mikroflory mają fluorochinolony, które znacznie obniżają liczbę bakterii beztlenowych, enterobakterii, tlenowych ziarniaków Gram-dodatnich, powodują pojawienie się opornych na antybiotyki *Bacteroides* oraz przerost grzybów z rodzaju *Candida*. Mikroflora chorych na CDI ma zmniejszoną różnorodność szczepów [25]. Obserwowano, że już pojedyncza dawka klindamycyny powodowała długotrwałe zmiany w mikroflorze jelita cienkiego i grubego u myszy z około 90% utratą różnorodności zasiedlających je szczepów [18]. Zdrowe myszy po zakażeniu sporam *Clostridium* zostają bezobjawowymi nosicielami przez długi czas. Zakażenie myszy bakterią *C. difficile* po stosowaniu klindamycyny spowodowało natychmiastową kolonizację, obniżenie różnorodności składu mikroflory oraz przeniesienie choroby z jednego osobnika na drugi. Zaprzestanie kuracji antybiotykowej nie przynosiło pozytywnych wyników u części leczonych myszy [69]. O rozwinięciu

zakażenia decyduje w dużej mierze stan fizjologiczny mikroflory (jej ilościowy i jakościowy skład), a także czynniki związane z układem odpornościowym (poziom pobudzenia układu, poziom wytwarzanych przeciwciał, liczbę odpowiednich receptorów na powierzchni komórek nabłonka).

Szybki wzrost liczby zakażeń bakterią *Clostridium difficile*, rosnąca liczba przypadków śmiertelnych wśród osób starszych, pojawianie się szczepów hiperwirulentnych oraz coraz liczniejsze przypadki zakażeń poza placówkami służby zdrowia powodują, że ten patogen staje się poważnym zagrożeniem dla zdrowia i życia pacjentów i jest jednym z głównych tematów badań dotyczących zakażeń szpitalnych. Brakuje bezpiecznych i szybkich sposobów leczenia. Obecnie na całym świecie odchodzi się od szerokiego stosowania antybiotyków, ze względu na oporność bakterii i powodowane trwałe zaburzenia mikroflory jelitowej pacjenta. Z wielu pomysłów, jak radzić sobie z problemem zakażeń bakteryjnych, na szczególną uwagę zasługują szczepionki oraz przeciwciała lecznicze nakierowane na elementy bakteryjne niezbędne w procesie kolonizacji gospodarza. W ten sposób nie dopuszcza się do rozwinięcia zakażenia. Mimo wielu potencjalnych antygenów, które mogą znaleźć zastosowanie w szczepionkach przeciw *C. difficile* wciąż istnieje uzasadniona potrzeba prowadzenia dalszych badań w tej dziedzinie. Oprócz mechanizmu kolonizacji należałoby również dokładnie poznać odpowiedź układu odpornościowego zakażonych pacjentów, jak i mechanizm bezobjawowego nosicielstwa w celu poznania czynników, które działają ochronnie i nie pozwalają na rozwinięcie stanu chorobowego. Obecnie najskuteczniejszą terapią alternatywną jest przeszczep flory bakteryjnej od zdrowego dawcy, jednak z wielu powodów nie jest to terapia powszechnie stosowana. Do potencjalnych narzędzi profilaktycznych należy zaliczyć, oprócz będących w fazie badań klinicznych szczepionek opartych na toksynach, zastosowanie preparatów probiotycznych u osób z grupy ryzyka. Należy nieustannie szkolić pracowników szpitali i innych placówek opieki medycznej o niebezpieczeństwie, jakie wiąże się z CDI i na temat dużej oporności bakterii oraz łatwości jej przenoszenia między pacjentami. Jak dotąd najlepiej rozwinięta jest diagnostyka zakażeń *C. difficile*. Dostępne są szybkie i pewne metody oznaczania patogenu z jednoczesnym określeniem, czy jest to szczep toksynotwórczy. Dzięki diagnostyce pacjent może zostać natychmiast odizolowany od innych chorych i poddany odpowiedniemu leczeniu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aslam S., Hamill R.J., Musher D.M.: Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect. Dis.*, 2005; 5: 549-557
- [2] Baban S.T., Kuehne S.A., Barketi-Klai A., Cartman S.T., Kelly M.L., Hardie K.R., Kansau I., Collignon A., Minton N.P.: The role of flagella

in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS One*, 2013; 8: e73026

- [3] Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I.: Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005; 307: 1915-1920

- [4] Bakken J.S.: Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 2009; 15: 285-289
- [5] Barbut F., Richard A., Hamadi K., Chomette V., Burghoffer B., Petit J.C.: Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 2386-2388
- [6] Bartlett J.G.: Antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 346: 334-339
- [7] Bartlett J.G., Chang T.W., Moon N., Onderdonk A.B.: Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing clostridia. *Am. J. Vet. Res.*, 1978; 39: 1525-1530
- [8] Bartoloni A., Mantella A., Goldstein B.P., Dei R., Benedetti M., Sbaragli S., Paradisi F.: *In-vitro* activity of nisin against clinical isolates of *Clostridium difficile*. *J. Chemother.*, 2004; 16: 119-121
- [9] Bauer M.P., Notermans D.W., van Benthem B.H., Brazier J.S., Wilcox M.H., Rupnik M., Monnet D.L., van Dissel J.T., Kuijper E.J., ECDIS Study Group: *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*, 2011; 377: 63-73
- [10] Bengmark S.: Modulation by enteral nutrition of the acute phase response and immune functions. *Nutr. Hosp.*, 2003; 18: 1-5
- [11] Boakes S., Ayala T., Herman M., Appleyard A.N., Dawson M.J., Cortés J.: Generation of an actagardine A variant library through saturation mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012; 95: 1509-1517
- [12] Borody T.J., Khoruts A.: Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011; 9: 88-96
- [13] Bouma G., Strober W.: The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003; 3: 521-533
- [14] Bouza E., Munoz P., Alonso R.: Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005; 11 (Suppl. 4): 57-64
- [15] Braat H., Rottiers P., Hommes D.W., Huyghebaert N., Remaut E., Remon J.P., van Deventer S.J., Neiryck S., Peppelenbosch M.P., Steidler L.: A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006; 4: 754-759
- [16] Branka J.E., Vallette G., Jarry A., Bou-Hanna C., Lemarre P., Van P.N., Laboisse C.L.: Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology*, 1997; 112: 1887-1894
- [17] Braun M., Stuber K., Schlatter Y., Wahli T., Kuhnert P., Frey J.: Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AeXT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 1851-1858
- [18] Buffie C.G., Jarchum I., Equinda M., Lipuma L., Gouberne A., Viale A., Ubeda C., Xavier J., Pamer E.G.: Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 62-73
- [19] Burrows B., Harper D.R., Anderson J., McConville M., Enright M.C.: Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2011; 9: 775-785
- [20] Calabi E., Fairweather N.: Patterns of sequence conservation in the S-layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 3886-3897
- [21] Cassone M., Serra P., Mondello F., Girolamo A., Scafetti S., Pistella E., Venditti M.: Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41: 5340-5343
- [22] Castagliuolo I., Kelly C.P., Qiu B.S., Nikulasson S.T., LaMont J.T., Pothoulakis C.: IL-11 inhibits *Clostridium difficile* toxin A enterotoxicity in rat ileum. *Am. J. Physiol.*, 1997; 273: G333-G341
- [23] Castagliuolo I., LaMont J.T., Nikulasson S.T., Pothoulakis C.: *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 5225-5232
- [24] Cerquetti M., Serafino A., Sebastianelli A., Mastrantonio P.: Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2002; 32: 211-218
- [25] Chang J.Y., Antonopoulos D.A., Kalra A., Tonelli A., Khalife W.T., Schmidt T.M., Young V.B.: Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Infect. Dis.*, 2008; 197: 435-438
- [26] Citron D.M., Tyrrell K.L., Merriam C.V., Goldstein E.J.: Comparative *in vitro* activities of LFF571 against *Clostridium difficile* and 630 other intestinal strains of aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012; 56: 2493-2503
- [27] Clements A.C., Magalhães R.J., Tatem A.J., Paterson D.L., Riley T.V.: *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect. Dis.*, 2010; 10: 395-404
- [28] Cohen S.H., Gerding D.N., Johnson S., Kelly C.P., Loo V.G., McDonald L.C., Pepin J., Wilcox M.H.: 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). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2010; 31: 431-455
- [29] Dabard J., Dubos F., Martinet L., Ducluzeau R.: Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infect. Immun.*, 1979; 24: 7-11
- [30] Đapa T., Leuzzi R., Ng Y.K., Baban S.T., Adamo R., Kuehne S.A., Scarselli M., Minton N.P., Serruto D., Unnikrishnan M.: Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.*, 2013; 195: 545-555
- [31] Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A.: The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.*, 2008; 6: e280
- [32] Didierlaurent A., Sirard J.C., Kraehenbuhl J.P., Neutra M.R.: How the gut senses its content. *Cell. Microbiol.*, 2002; 4: 61-72
- [33] Dingle T.C., Mulvey G.L., Armstrong G.D.: Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect. Immun.*, 2011; 79: 4061-4067
- [34] Dubberke E.R., Wertheimer A.L.: Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2009; 30: 57-66
- [35] Dupuy B., Sonenshein A.L.: Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.*, 1998; 27: 107-120
- [36] Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005; 308: 1635-1638
- [37] Eidin D.N., Ryan A.W., Doyle R.M., Walsh J.B., Kelleher D.: Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, slpA, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.*, 2006; 55: 69-83
- [38] Eveillard M., Fourel V., Barc M.C., Kerneis S., Coconnier M.H., Karjalainen T., Bourlioux P., Servin A.L.: Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT29 cells in culture. *Mol. Microbiol.*, 1993; 7: 371-381
- [39] Fagan R.P., Albesa-Jové D., Qazi O., Svergun D.I., Brown K.A., Fairweather N.F.: Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Mol. Microbiol.*, 2009; 71: 1308-1322
- [40] Gerding D.N., Johnson S., Peterson L.R., Mulligan M.E., Silva J.Jr.:

Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 1995; 16: 459-477

[41] Ghantouji S.S., Sail K., Lairson D.R., DuPont H.L., Garey K.W.: Economic healthcare costs of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. J. Hosp. Infect., 2010; 74: 309-318

[42] Giannasca P.J., Warny M.: Active and passive immunization against *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. Vaccine, 2004; 22: 848-856

[43] Giannasca P.J., Zhang Z.X., Lei W.D., Boden J.A., Giel M.A., Monath T.P., Thomas W.D.Jr.: Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. Infect. Immun., 1999; 67: 527-538

[44] Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanno M., Viala J., Tedin K., Taha M.K., Labigne A., Zähringer U., Coyle A.J., DiStefano P.S., Bertin J., Sansonetti P.J., Philpott D.J.: Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science, 2003; 300: 1584-1587

[45] Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J.: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J. Biol. Chem., 2003; 278: 8869-8872

[46] Gülke I., Pfeifer G., Liese J., Fritz M., Hofmann F., Aktories K., Barth H.: Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. Infect. Immun., 2001; 69: 6004-6011

[47] Hall I.C., O'Toole E.: Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus diffiicilis*. Am. J. Dis. Child., 1935; 49: 390-402

[48] Harper D.R., Anderson J., Enright M.C.: Phage therapy: delivering on the promise. Ther. Deliv., 2011; 2: 935-947

[49] Hasegawa M., Yamazaki T., Kamada N., Tawaratsumida K., Kim Y.G., Nunez G., Inohara N.: Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. J. Immunol., 2011; 186: 4872-4880

[50] Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A.: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, 2001; 410: 1099-1103

[51] Hennequin C., Janoir C., Barc M.C., Collignon A., Karjalainen T.: Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. Microbiology, 2003; 149: 2779-2787

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

[53] Hryniewicz W., Martirosian G., Ozorowski T.: Zakażenia *Clostridium difficile*: diagnostyka, terapia, profilaktyka. Narodowy Instytut Leków, Warszawa 2011

[54] Jank T., Aktories K.: Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol., 2008; 16: 222-229

[55] Janoir C., Pechine S., Grosdidier C., Collignon A.: Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. J. Bacteriol., 2007; 189: 7174-7180

[56] Jernberg C., Löfmark S., Edlund C., Jansson J.K.: Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. ISME J., 2007; 1: 56-66

[57] Johnson A.P.: Drug evaluation: OPT-80, a narrow-spectrum macrocyclic antibiotic. Curr. Opin. Investig. Drugs, 2007; 8: 168-173

[58] Johnson S., Maziade P.J., McFarland L.V., Trick W., Donskey C., Currie B., Low D.E., Goldstein E.J.: Is primary prevention of *Clostridium difficile* infection possible with specific probiotics? Int. J. Infect. Dis., 2012; 16: e786-e792

[59] Joshi L.T., Phillips D.S., Williams C.F., Alyousef A., Baillie L.: Contribution of spores to the ability of *Clostridium difficile* to adhere to surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 2012; 78: 7671-7679

[60] Kaur S., Vaishnavi C., Prasad K.K., Ray P., Kochhar R.: Effect of *Lactobacillus acidophilus* & epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection. Indian J. Med. Res., 2011; 133: 434-441

[61] Kelly C.P.: Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? Clin. Microbiol. Infect., 2012; 18 (Suppl. 6): 21-27

[62] Kim J.M., Lee J.Y., Yoon Y.M., Oh Y.K., Youn J., Kim Y.J.: NF- κ B activation pathway is essential for the chemokine expression in intestinal epithelial cells stimulated with *Clostridium difficile* toxin A. Scand. J. Immunol., 2006; 63: 453-460

[63] Kirby J.M., Ahern H., Roberts A.K., Kumar V., Freeman Z., Acharya K.R., Shone C.C.: Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. J. Biol. Chem., 2009; 284: 34666-34673

[64] Kotloff K.L., Wasserman S.S., Losonsky G.A., Thomas W.Jr., Nichols R., Edelman R., Bridwell M., Monath T.P.: Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. Infect. Immun., 2001; 69: 988-995

[65] Kuehne S.A., Cartman S.T., Heap J.T., Kelly M.L., Cockayne A., Minton N.P.: The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature, 2010; 467: 711-713

[66] Kuijper E.J., Coignard B., Tull P., the ESCMID Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD), EU Member States and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin. Microbiol. Infect., 2006; 12 (Suppl. 6): 2-18

[67] Kyne L., Hamel M.B., Polavaram R., Kelly C.P.: Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. Clin. Infect. Dis., 2002; 34: 346-353

[68] Lavelle E.C., Murphy C., O'Neill L.A., Creagh E.M.: The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. Mucosal Immunol., 2010; 3: 17-28

[69] Lawley T.D., Clare S., Walker A.W., Goluding D., Stabler R.A., Croucher N., Mastroeni P., Scott P., Raisen C., Mottram L., Fairweather N.F., Wren B.W., Parkhill J., Dougan G.: Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. Infect. Immun., 2009; 77: 3661-3669

[70] Lee J.S., Chung M.J., Seo J.G.: *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Clostridium difficile*. Toxicol. Res., 2013; 29: 99-106

[71] Lessa F.C., Gould C.V., McDonald L.C.: Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. Clin. Infect. Dis., 2012; 55 (Suppl. 2): S65-S70

[72] Lievin-Le Moal V., Servin A.L.: The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. Clin. Microbiol. Rev., 2006; 19: 315-337

[73] Lyerly D.M., Lockwood D.E., Richardson S.H., Wilkins T.D.: Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. Infect. Immun., 1982; 35: 1147-1150

[74] 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.: Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature, 2009; 458: 1176-1179

[75] Martins F.S., Nardi R.M., Arantes R.M., Rosa C.A., Neves M.J., Nicoli J.R.: Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. J. Gen. Appl. Microbiol., 2005; 51: 83-92

- [76] McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., Owens R.C.Jr., Kazakova S.V., Sambol S.P., Johnson S., Gerding D.N.: An Epidemic, Toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 2433-2441
- [77] McFarland L.V., Mulligan M.E., Kwok R.Y., Stamm W.E.: Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 320: 204-210
- [78] Meessen-Pinard M., Sekulovic O., Fortier L.C.: Evidence of *in vivo* prophage induction during *Clostridium difficile* infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; 78: 7662-7670
- [79] Merrigan M., Venugopal A., Mallozzi M., Roxas B., Viswanathan V.K., Johnson S., Gerding D.N., Vedantam G.: Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *J. Bacteriol.*, 2010; 192: 4904-4911
- [80] Mulvey G.L., Dingle T.C., Fang L., Strecker J., Armstrong G.D.: Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.*, 2011; 60: 1181-1187
- [81] Navaneethan U., Mukewar S., Venkatesh P.G., Lopez R., Shen B.: *Clostridium difficile* infection is associated with worse long term outcome in patients with ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis*, 2012; 6: 330-336
- [82] Pantosti A., Cerquetti M., Viti F., Ortisi G., Mastrantonio P.: Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 1989; 27: 2594-2597
- [83] Papatheodorou P., Carette J.E., Bell G.W., Schwan C., Guttenberg G., Brummelkamp T.R., Aktories K.: Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 16422-16427
- [84] Pechine S., Deneuve C., Le Monnier A., Hoys S., Janoir C., Collignon A.: Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011; 63: 73-81
- [85] Pechine S., Gleizes A., Janoir C., Gorges-Kergot R., Barc M.C., Delmée M., Collignon A.: Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.*, 2005; 54: 193-196
- [86] Pechine S., Janoir C., Boureau H., Gleizes A., Tsapis N., Hoys S., Fattal E., Collignon A.: Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. *Vaccine*, 2007; 25: 3946-3954
- [87] Pechine S., Janoir C., Collignon A.: Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 5018-5025
- [88] Pepin J., Alary M.E., Valiquette L., Raiche E., Ruel J., Fulop K., Godin D., Bourassa C.: Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin. Infect. Dis.*, 2005; 40: 1591-1597
- [89] Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998; 282: 2085-2088
- [90] Pothoulakis C., Gilbert R.J., Cladaras C., Castagliuolo I., Semenza G., Hitti Y., Montcrief J.S., Linevsky J., Kelly C.P., Nikulasson S., Desai H.P., Wilkins T.D., LaMont J.T.: Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 641-649
- [91] Pothoulakis C., LaMont J.T.: *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 1993; 22: 623-637
- [92] Rea M.C., Clayton E., O'Connor P.M., Shanahan F., Kiely B., Ross R.P., Hill C.: Antimicrobial activity of lactacin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *J. Med. Microbiol.*, 2007; 56: 940-946
- [93] Rea M.C., Sit C.S., Clayton E., O'Connor P.M., Whittall R.M., Zheng J., Vederas J.C., Ross R.P., Hill C.: Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 9352-9357
- [94] Redelings M.D., Sorvillo F., Mascola L.: Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007; 13: 1417-1419
- [95] Riley M.A., Wertz J.E.: Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2002; 56: 117-137
- [96] Rupnik M.: How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2001; 7: 417-420
- [97] Ryan A., Lynch M., Smith S.M., Amu S., Nel H.J., McCoy C.E., Dowling J.K., Draper E., O'Reilly V., McCarthy C., O'Brien J., Ní Eidhin D., O'Connell M.J., Keogh B., Morton C.O. i wsp.: A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathog.*, 2011; 7: e1002076
- [98] Savidge T.C., Pan W.H., Newman P., O'Brien M., Anton P.M., Pothoulakis C.: *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology*, 2003; 125: 413-420
- [99] Sehr P., Joseph G., Genth H., Just I., Pick E., Aktories K.: Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry*, 1998; 37: 5296-5304
- [100] Sekirov I., Tam N.M., Jogova M., Robertson M.L., Li Y., Lupp C., Finlay B.B.: Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect. Immun.*, 2008; 76: 4726-4736
- [101] Sekulovic O., Meessen-Pinard M., Fortier L.C.: Prophage-stimulated toxin production in *Clostridium difficile* NAP1/027 lysogens. *J. Bacteriol.*, 2011; 193: 2726-2734
- [102] Semenyuk E.G., Laning M.L., Foley J., Johnston P.F., Knight K.L., Gerding D.N., Driks A.: Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS One*, 2014; 9: e87757
- [103] Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C.: Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006; 72: 2170-2177
- [104] Sheehan V.M., Sleator R.D., Hill C., Fitzgerald G.F.: Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology*, 2007; 153: 3563-3571
- [105] Simor A.E., Bradley S.F., Strausbaugh L.J., Crossley K., Nicolle L.E., SHEA Long-Term-Care Committee: *Clostridium difficile* in long-term-care facilities for the elderly. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2002; 23: 696-703
- [106] Sleator R.D., Francis G.A., O'Beirne D., Gahan C.G., Hill C.: Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *J. Appl. Microbiol.*, 2003; 95: 839-846
- [107] Strobel S., Mowat A.M.: Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today*, 1998; 19: 173-181
- [108] Sundriyal A., Roberts A.K., Shone C.C., Acharya K.R.: Structural basis for substrate recognition in the enzymatic component of ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 28713-28719
- [109] Szajewska H., Rusczyński M., Radzikowski A.: Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.*, 2006; 149: 367-372
- [110] Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmee M., Collignon A., Bourlioux P., Barc M.C.: Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (flic) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 3179-3186

- [111] Torres J.F., Lyerly D.M., Hill J.E., Monath T.P.: Evaluation of formalin-inactivated *Clostridium difficile* vaccines administered by parenteral and mucosal routes of immunization in hamsters. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 4619-4627
- [112] Triadafilopoulos G., Pothoulakis C., O'Brien M.J., LaMont J.T.: Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology*, 1987; 93: 273-279
- [113] Tucker K.D., Wilkins T.D.: Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.*, 1991; 59: 73-78
- [114] Ubeda C., Taur Y., Jenq R.R., Equinda M.J., Son T., Samstein M., Viale A., Succi N.D., van den Brink M.R., Kamboj M., Pamer E.G.: Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 4332-4341
- [115] van Nood E., Vrieze A., Nieuwdorp M., Fuentes S., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Visser C.E., Kuijper E.J., Bartelsman J.F., Tijssen J.G., Speelman P., Dijkgraaf M.G., Keller J.J.: Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 368: 407-415
- [116] Waligora A.J., Barc M.C., Bourlioux P., Collignon A., Karjalainen T.: *Clostridium difficile* cell attachment is modified by environmental factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65: 4234-4238
- [117] Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A., Karjalainen T.: Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 2144-2153
- [118] Ward S.J., Douce G., Dougan G., Wren B.W.: Local and systemic neutralizing antibody responses induced by intranasal immunization with the nontoxic binding domain of toxin A from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 5124-5132
- [119] Wemekamp-Kamphuis H.H., Sleator R.D., Wouters J.A., Hill C., Abee T.: Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004; 70: 2912-2918
- [120] Wright A., Drudy D., Kyne L., Brown K., Fairweather N.F.: Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *J. Med. Microbiol.*, 2008; 57: 750-756
- [121] Xia Y., Hu H.Z., Liu S., Pothoulakis C., Wood J.D.: *Clostridium difficile* toxin A excites enteric neurones and suppresses sympathetic neurotransmission in the guinea pig. *Gut*, 2000; 46: 481-486

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.