

Epidemiološke i mikrobiološke karakteristike clostridioides (clostridium) difficile infekcija (CDI) dijagnosticiranih u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog cen

...

Lozina, Marijeta

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:406149>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-10-02**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marijeta Lozina

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE
CLOSTRIDIOIDES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE INFEKCIJA
(CDI) DIJAGNOSTICIRANIH U KLINIČKOM ZAVODU ZA
MIKROBIOLOGIJU I PARAZITOLOGIJU KLINIČKOG
BOLNIČKOG CENTRA SPLIT U 2017. GODINI**

Diplomski rad

Akademski godina: 2018./2019.

Mentor:

Doc. prim. dr. sc. Anita Novak, dr. med.

Split, srpanj 2019.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marijeta Lozina

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE
CLOSTRIDIOIDES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE INFEKCIJA
(CDI) DIJAGNOSTICIRANIH U KLINIČKOM ZAVODU ZA
MIKROBIOLOGIJU I PARAZITOLOGIJU KLINIČKOG
BOLNIČKOG CENTRA SPLIT U 2017. GODINI**

Diplomski rad

Akademski godina: 2018./2019.

Mentor:

Doc. prim. dr. sc. Anita Novak, dr. med.

Split, srpanj 2019.

Zahvaljujem se toplo i od sveg srca mojoj obitelji koja me je cijeli život pratila, podupirala, vjerovala u mene i moje snove. Posebno se zahvaljujem mojim predragim roditeljima, voljenom bratu, cijenjenim tetama i bakama bez kojih ovaj studij ne bi bio za mene toliko poseban i drag, inspirirajuć i prožet zadovoljstvom u cijelosti.

Osobito hvala mojoj predivnoj mentorici koja je toliko truda, ljubavi, razumijevanja i suosjećanja uložila u ovaj rad. Tako sam presretna i zahvalna Bogu da sam imala čast dobiti baš nju za mentoricu. Ova suradnja zauvijek će mi značiti i rado ću je se u srcu prisjećati.

SADRŽAJ :

1. UVOD	1
1.1 <i>Clostridioides</i> (<i>Clostridium difficile</i>).....	2
1.1.1.Taksonomija	2
1.2 <i>Clostridioides difficile</i> infekcija (CDI).....	3
1.2.1 Patogeneza	3
1.2.2 Rizični čimbenici za nastanak CDI.....	4
1.2.3 Klinička prezentacija <i>Clostridioides difficile</i> infekcije.....	5
1.2.4 Epidemiologija CDI.....	6
1.2.5 Dijagnostika CDI	7
1.2.6 Liječenje CDI.....	9
1.2.7 Mjere prevencije CDI	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	12
2.1 Cilj istraživanja	13
2.2 Hipoteze.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1 Subjekti istraživanja	15
3.2 Mjesto istraživanja.....	15
3.3 Ustroj istraživanja.....	16
3.4 Opis istraživanja.....	16
3.5 Statistička obrada podataka	16
4. REZULTATI.....	17
4.1 Podatci o zastupljenosti CDI u Kliničkom bolničkom centru Split tijekom 2017. godine..	18
4.2 Demografski podatci.....	20
4.3 Zastupljenost <i>C. difficile</i> pozitivnih uzoraka u bolničkih i izvanbolničkih pacijenata	26
4.4 Raspodjela bolničkih pacijenata po odjelima i klinikama KBC-a Split u 2017. godini	27
4.5 Toksigene i molekularne karakteristike sojeva <i>C. difficile</i>	28
4.6 Dijagnoze pacijenata s <i>C. difficile</i> infekcijom	29
4.7 Antibiotička terapija pacijenata pozitivnih na toksični soj <i>C. difficile</i>	30

5.	RASPRAVA.....	31
6.	ZAKLJUČAK.....	36
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE.....	38
8.	SAŽETAK	45
9.	SUMMARY	47
10.	ŽIVOTOPIS	50

1. UVOD

1.1 *Clostridioides (Clostridium difficile)*

1.1.1 Taksonomija

Clostridioides difficile je gram-pozitivna, sporogena, anaerobna bakterija. Prvi puta je izolirana 1935. godine iz uzoraka stolice zdrave novorođenčadi te je nazvana *Bacillus difficilis* zbog svoje tipične štapičaste morfologije i komplicirane identifikacije (1).

Kasnije je reklasificirana u rod *Clostridium*, na temelju morfologije, gram-bojanja i nekih biokemijskih osobina. U rodu *Clostridium* se našlo dvjestotinjak patogenih i nepatogenih bakterijskih vrsta, vrlo različitih fenotipskih i genotipskih karakteristika (2). Uvođenje modernih molekularnih tehnika omogućilo je pouzdaniju filogenetsku analizu i suvremenu klasifikaciju ovih bakterija (3). Na temelju sekvenciranja 16S rRNK gena, Collins i suradnici su 1994. godine sve poznate vrste klostridija podijelili u 19 grupa i predložili nekoliko novih rodova, unutar drugih porodica (4). Danas su u rodu *Clostridium* ostale samo vrste za koje se smatra da su *Clostridium sensu stricto*, a to su *Clostridium butyricum* i njemu srodne vrste. Za *C. difficile* je predložen potpuno novi naziv, *Peptoclostridium*. Na sreću, taj naziv nije prihvaćen jer bi to unijelo veliku zbrku i nerazumijevanje među kliničarima i imalo negativan utjecaj na kvalitetu zdravstvene skrbi. *Clostridium difficile* je filogenetski daleko od *Clostridium sensu stricto*, a najbliža srodna bakterija, s 94,7% podudarnosti genoma je *Clostridium mungenotii*. Obje bakterijske vrste stvaraju veliku količinu vodika i mješavinu zasićenih i nezasićenih masnih kiselina kada rastu u tekućoj PYG podlozi (engl. *pepton yeast glucose*). Peptidoglikan staničnog zida sadrži mezo-diamino pimelinsku kiselinu. Na osnovu fenotipskih, kemotaksonomskih i filogenetskih analiza, Lawson i Rainey su 2016. godine predložili novi rod unutar porodice *Peptostreptococcaceae*, rod *Clostridioides* („nalik na klostridij“). Na ovaj način istaknuta je razlika *Clostridioides difficile* od roda *Clostridium*, a zadržana je dobro poznata kratica *C. difficile* ili *C. diff* te su izbjegnute moguće zabune i dileme zbog pojave novog naziva bakterije. Za sada su *Clostridioides difficile* i *Clostridioides mungenotii* jedine vrste unutar ovog roda (5).

1.2 *Clostridioides difficile* infekcija (CDI)

1.2.1 Patogeneza

Povezanost toksina *C. difficile* s nastankom postantibiotskih proljeva, dokazali su Larson i suradnici još 1978. godine (6). Međutim, patogeneza *C. difficile* infekcija (CDI) je puno složenija te je za nastanak simptomatske infekcije potrebna kombinacija nekoliko ključnih čimbenika. Prvi korak u nastanku CDI je poremećaj crijevne mikrobiote i nedostatak prirodene otpornosti crijeva na kolonizaciju toksigenim *C. difficile*, što je najčešće posljedica uporabe antibiotika širokog spektra. U takvim uvjetima, spore *C. difficile* germiniraju u vegetativne oblike koji se slobodno razmnožavaju i koloniziraju sluznicu debelog crijeva. Iako infekcija može nastati u bilo kojem dijelu debelog crijeva, najčešća je u distalnom kolonu i rektumu.

Nakon uspješne kemotaksije i adherencije na crijevne stanice, toksigeni sojevi *C. difficile* počinju producirati toksine. Geni za sintezu toksina smješteni su u PaLoc kromosomskoj regiji (engl. *pathogenicity locus*) i ne posjeduju je svi bakterijski sojevi. Naime, sojevi koji ne posjeduju ovu regiju, ne mogu producirati toksine i smatraju se nepatogenima.

C. difficile može stvarati dva različita egzotoksina, toksin-A (TcdA, enterotoksin) i toksin-B (TcdB, citotoksin) koji djeluju sinergistički (7). Otprilike 10% sojeva *C. difficile*, stvara i treći, tzv. binarni toksin, za kojeg se smatra da pojačava učinak toksina A i B (30, 31). Toksini se vežu na površinske receptore stanica debelog crijeva, ulaze u njih, uzrokuju njihovo zaokruživanje, apoptozu i smrt. Kataliziraju glikozilaciju citoplazmatskih Rho-proteina, narušavaju aktinski citoskelet i kidaju međustanične veze. Aktiviraju crijevne makrofage i mastocite, potiču produkciju medijatora upale, povećavaju propusnost sluznice i izlučivanje tekućine te potiču nastanak krvarenja (8).

Konačno, kakav će biti ishod kolonizacije toksigenim sojem *C. difficile* i produkcije toksina, ovisi o interakciji s domaćinom, odnosno o sposobnosti imunološkog sustava da proizvede dovoljnu razinu zaštitnih protutijela i spriječi nastanak simptomatske infekcije.

1.2.2. Rizični čimbenici za nastanak CDI

C. difficile, bilo toksigeni ili netoksigeni soj, može biti dio normalne crijevne mikrobiote. Kolonizira crijeva 3% zdravih odraslih osoba te se smatra oportunističkim patogenom. Iako se često može izolirati iz stolice zdrave djece (80%), sve su češća izvješća o infekcijama djece starije od dvije godine (9, 10). Postotak koloniziranih osoba značajno raste u bolničkim uvjetima, proporcionalno s brojem bolničkih dana i antibiotskim liječenjem kao i nakon izlječenja CDI (11-13).

Najznačajniji rizični faktor za nastanak simptomatske CDI je liječenje antibioticima, osobito ukoliko imaju široki spektar djelovanja, ako se daju u visokim dozama ili imaju produženo djelovanje. Neki antibiotici češće dovode do nastanka CDI od drugih. Cefalosporini treće i četvrte generacije i noviji fluorokinoloni se povezuju s nastankom teške CDI kao i ponavljajućih ili rekurentnih CDI (rCDI) (14). Čak i antibiotici koji se koriste za liječenje CDI, metronidazol i vankomicin, dodatno narušavaju ravnotežu crijevne mikrobiote jer niti jedan od njih nije uskospektralan niti djeluje isključivo na *C. difficile* već i na ostalu crijevnu mikrobiotu.

Osobe starije životne dobi, kao i bolnički pacijenti, češće obolijevaju od CDI i imaju težu kliničku sliku od mlađih i izvanbolničkih pacijenata. Razna druga stanja i intervencije koje narušavaju ravnotežu u probavnom sustavu, bilo da djeluju na promjenu u sastavu i količini probavnih sokova, želučane kiseline i žučnih soli (želučane ili crijevne operacije, kemoterapija, upalne bolesti crijeva neinfektivne etiologije, uporaba nazogastrične sonde, lijekovi koji smanjuju produkciju želučane kiseline) čine osobu podložnom za kolonizaciju *C. difficile* i osjetljivom za nastanak CDI (15, 16).

Brojne kronične bolesti (jetre, bubrega, kardio-vaskularnog i drugih sustava) kao i sva stanja (prirođena ili stečena) narušenog imuniteta i maligne bolesti, dodatni su rizični faktori za nastanak CDI (17).

1.2.3. Klinička prezentacija *Clostridioides difficile* infekcije (CDI)

Kolonizacija *C. difficile* može rezultirati asimptomatskim kliconoštvom ili nastankom proljeva različitog intenziteta. Ponekad se razvijaju teški oblici infekcije kao što su pseudomembranozni kolitis, toksični megakolon, perforacija crijeva i peritonitis, uz sistemske simptome, kao što su leukocitoza i vrućica (18-20).

Najčešća klinička prezentacija CDI su profuzni proljevi (najmanje tri stolice dnevno) koji su praćeni bolnim grčevima i osjećajem nelagode u donjem dijelu trbuha. Stolica je zelenkasta, vodenasta, smrdljiva te može imati primjese sluzi i svježe krvi (21).

CDI je ponekad teško prepoznati na vrijeme jer izostane proljev kao dominantni simptom (zbog razvoja paralitičkog ileusa) ili pacijent istovremeno boluje od neke druge crijevne bolesti (npr. IBD) pa se proljevi protumače kao njena progresija ili reaktivacija (22). Infekcija može otpočeti imati kompliciran tijek i ozbiljnu kliničku prezentaciju (ascites, peritonitis, ileus, pseudomembranski kolitis) sa sistemskim znakovima (vrućica, hemodinamska nestabilnost, leukocitoza, porast serumskog kreatinina, visoke serumske vrijednosti laktata). U pacijenata sa značajnim komorbiditetom, imunokompromitiranih i onih koji se liječe u jedinicama intenzivnog liječenja, najčešće nastaju teški oblici CDI (20).

Najznačajnija komplikacija CDI je ponavljajuća ili rekurentna infekcija (rCDI) koja se javlja u čak 25% slučajeva. Prema smjernicama Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektologiju (engl. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, ESCMID), ponavljajuća CDI je definirana ponovnom pojavom simptoma nakon početnog poboljšanja i dobrog odgovora na terapiju (povećanje učestalosti pražnjenja crijeva u dva uzastopna dana, promjena konzistencije stolice ili pojava novih znakova teškog kolitisa) uz mikrobiološki nalaz toksiogenog soja *C. difficile* u stolici, unutar 8 tjedana od prve epizode (10, 20). Etiološki, može biti uzrokovana istim sojem (relaps) ili sojem različitim od onog koji je uzrokovao prvu epizodu (reinfekcija).

1.2.4. Epidemiologija CDI

U epidemiološkim istraživanjima CDI, bitno je odrediti je li početak infekcije bio u bolničkoj ustanovi ili izvan nje te je li nastanak infekcije povezan s bolničkom liječenjem.

Prema mjestu početka simptoma, CDI dijelimo na bolničke i izvanbolničke, (engl. *healthcare-onset*, HO-CDI i engl. *community-onset*, CO-CDI), a prema povezanosti s bolničkim liječenjem na HA-CDI (engl. *healthcare-associated* CDI) i CA-CDI (engl. *community-associated* CDI, CA-CDI).

Ponekad nije lako sa sigurnošću definirati je li nastanak infekcije povezan s bolničkim liječenjem ili nije. Ako su simptomi nastali u bolnici najmanje 48 sati nakon prijema ili unutar 4 tjedna od otpuštanja iz bolnice, infekciju definiramo kao HA-CDI. Infekcija nije povezana s bolničkim liječenjem (CA-CDI) ukoliko su simptomi nastali izvan bolnice i pacijent nije bio hospitaliziran unatrag 12 tjedana ili su se simptomi pojavili unutar prvih 48 sati bolničkog liječenja. Nedefinirana je situacija kada je pacijent boravio u bolnici 4-12 tjedana prije nastanka simptoma, te ne možemo pouzdano reći je li infekcija povezana s boravkom u bolnici ili nije (10).

Epidemiološka slika Europe i Sjeverne Amerike se značajno promijenila posljednja dva desetljeća u smislu porasta stope incidencije i težine kliničke slike (16, 23). Danas je *C. difficile* najčešći uzročnik bolničkih proljeva (24, 25).

Porast udjela bolničke populacije koja je starija od 65 godina, nesvrshodna primjena antibiotika širokog spektra djelovanja te pojava novih hipervirulentnih genotipova (PCR-ribotipova 027 i 078, engl. *polymerase chain reaction ribotyping*) pridonijeli su povišenju stope incidencije CDI u bolnicama (10, 26-28). Povrh toga incidencija CDI raste i u prije niskorizičnoj populaciji (trudnice, mlađe odrasle osobe bez kroničnih bolesti i izvanbolnička populacija) (29, 30).

1.2.5. Dijagnostika CDI

Clostridioides difficile je bakterija koja je najčešći uzročnik bolničkih proljeva, ali i može biti dio normalne crijevne mikrobiote. Stoga je osnovni kriterij u dijagnostici CDI, odabir prikladnog uzorka, tj. testiranje isključivo proljevaste stolice simptomatskih pacijenata. Brza i točna dijagnostika, preduvjet je optimalne intervencije, odnosno pravovremenog liječenja i prevencije širenja CDI. Koliko god je dijagnostika napredovala zadnja dva desetljeća, još uvijek je pravi izazov i predmet znanstvenih rasprava.

Prve europske smjernice za dijagnostiku CDI, donio je ESCMID prije deset godina. Do tada su postojala dva referentna standarda (citotoksični test i citotoksična kultura) od kojih niti jedan nije bio prikladan za brzo i točno dijagnosticiranje CDI u rutinskom laboratorijskom radu (31). Kako bi se unaprijedila i ubrzala laboratorijska dijagnostika, na tržište su stavljeni brojni testovi koji koriste različite metode (imunoenzimski, imunokromatografski i molekularni testovi) i ispituju postojanje različitih dijelova bakterijske stanice ili njene produkte. Neki od testova dokazuju prisustvo specifičnog bakterijskog antigena GDH (glutamat-dehidrogenazu), a neki produkciju toksina A i/ili B ili postojanje toksigene regije u genomu bakterijskog soja. Ovi testovi imaju različitu osjetljivost, specifičnost, negativnu i pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV i NPV). Već je tada bilo jasno da niti jedan od dostupnih testova nije apsolutno pouzdan u dijagnostici CDI. Stoga je predložen dvostupanjski dijagnostički postupnik koji se može upotpuniti i trećim korakom u slučaju dvojbenih rezultata.

U prvom koraku se koristi probirni test visoke NPV kao što je to brzi, relativno jeftini i osjetljivi imuno-enzimski test (EIA) za GDH antigen. Potom se GDH pozitivni uzorci stolice testiraju potvrdnim imuno-enzimskim (EIA) ili molekularnim testom (engl. *nucleic acid amplification test*, NAAT) za dokaz slobodnih toksina A i/ili B ili toksigene kromosomske regije, s obzirom da postoje i sojevi *C. difficile* koji ne produciraju toksine (16, 31, 32). Ponekad se rade oba testa (dokaz toksigene regije i aktivne produkcije toksina) pa govorimo o trostupanjskom algoritmu.

Nakon dijagnosticiranja CDI i uspješno provedenog liječenja (nestanak simptoma CDI), ne radi se kontrolni test (tzv. test izlječenja) jer pacijenti mogu ostati kolonizirani mjesecima (33).

Od kada je ESCMID predložio korištenje dvostupanjskog dijagnostičkog postupnika, mnogi europski laboratoriji su ga počeli primjenjivati u svojoj rutinskoj praksi, čime se dijagnostika CDI poprilično ujednačila i standardizirala. Međutim, budući da su dostupni brojni testovi, različiti laboratoriji koriste testove različitih osjetljivosti i specifičnosti pa je rezultate ponekad teško usporediti. U cilju optimiziranja CDI dijagnostike, postojeće europske smjernice su ažurirane 2016. godine. Napravljena je meta-analiza svih nanstvenih radova o laboratorijskoj dijagnostici CDI, a u tu svrhu su pretraženi PubMed, Embase, Web of Science, Središnja i Cochrane knjižnica.

I dalje se preporuča korištenje dvostupanjskog dijagnostičkog postupnika, a za simptomatske pacijente u kojih je u uzorku stolice dokazan toksigeni soj bez aktivne produkcije toksina, dijagnoza se postavlja na temelju kliničke procjene (34).

Prošle godine, smjernice su ponovno revidirane. Pregledan je i razmotren svaki ključni korak CDI dijagnostike, uključujući selekcijski kriterij za uzorkovanje stolice, izbor metoda i testova te interpretacija dobivenih rezultata. Zaključeno je da i dalje niti jedan od dostupnih testova ne zadovoljava kriterije visoke specifičnosti i osjetljivosti, brze izvedbe i niske cijene. Tom cilju je najbliži ESCMID-ov dvo ili trostupanjski dijagnostički postupnik, prema kojem se kao probirni test koristi test visoke osjetljivosti, a kao potvrdni test onaj koji dokazuje aktivnu proizvodnju toksina. Prisustvo slobodnih toksina u stolici pacijenata bolje korelira sa simptomatskom CDI i lošim ishodom, dok molekularni testovi mogu otkriti i asimptomatske nositelje koji nemaju simptoma i ne zahtijevaju nikakvu intervenciju ni liječenje (35).

1.2.6. Liječenje CDI

Uspješnog izlječenja od CDI nema bez oporavka crijevnog mikrobioma. Stoga je prva mjera u liječenju, ukidanje antibiotske terapije koja je dovela do crijevne neravnoteže, kada god to zdravstveno stanje i komorbiditet pacijenata dozvoljavaju. Slijedeća mjera je primjena specifične terapije koja djeluje na *C. difficile*.

Prije desetak godina, 2009. i 2010. donesene su europske i američke smjernice za liječenje CDI. Lijek izbora kod prve blage do umjereno teške epizode CDI je peroralni metronidazol, dok se pulsna terapija vankomicinom primjenjuje u slučaju teške kliničke slike i rekurentne infekcije. Budući da vankomicin ne djeluje na spore, pulsnom terapijom se pokušava uništiti vegetativne stanice *C. difficile* koje su se razvile iz spora zaostalnih nakon prethodnog antibiotskog ciklusa (20, 36).

Smjernice su ažurirane 2014. godine kada su predložene nove terapijske mogućnosti, naročito za liječenje ponavljajućih infekcija te infekcija s kompliciranim kliničkim tijekom (37). Tako se za liječenje rekurentnih infekcija, osim vankomicina, predlaže i primjena novog antibiotika, fidaksomicina. To je makrociklički antibiotik, čija je baktericidna aktivnost usmjerena gotovo isključivo na *C. difficile* pa brže dovodi do oporavka crijevnog mikrobioma. Uz to ima i odličnu farmakokinetiku jer se nakon peroralne primjene gotovo uopće ne resorbira, već postiže izrazito visoke koncentracije unutar crijeva (38). Također se za liječenje višestrukih rCDI uvodi i preporuka za primjenu fekalne transplantacije (engl. *faecal microbiota transplantation*, FMT) u slučaju otpornosti na sve druge registrirane i odobrene metode liječenja.

Najveći problem u liječenju CDI je neučinkovit klinički odgovor na liječenje ponavljajućih CDI. Brojni novi lijekovi su u različitim fazama kliničkog istraživanja (novi antibiotici, inaktivatori antibiotika, monoklonalna protutijela, modulatori crijevnog mikrobioma). Na osnovu istraživanja objavljenih u periodu od siječnja 2013. do studenog 2017., ESCMID je krajem 2018. godine objavio nove preporuke za liječenje CDI. Iako je metronidazol još uvijek prvi izbor za liječenje CDI, zbog velikog postotka slučajeva s kliničkim neuspjehom, preporučeno je da dođe do promjena smjernica u smislu da vankomicin bude prvi lijek izbora za liječenje svih oblika primarne CDI, čak i onih s blagom kliničkom slikom. Također, preporuka je da bi prva alternativa vankomicinu trebao biti

fidaksomicin, osobito u pacijenata koji su rizični za nastanak rCDI. Za liječenje višestrukih rCDI i dalje se preporuča kombinacija vankomicina i FMT. Razmatrana je i primjena bezlotoksumaba, monoklonalnih protutijela koja djeluju na toksin B, a učinkovitost treba provjeriti dodatnim istraživanjima (39).

Iste godine, 2018., revidirane su i smjernice američkih društava infektologa (engl. *Infectious Diseases Society of America*, IDSA) i epidemiologa (engl. *Society for Healthcare Epidemiology of America*, SHEA). Vrijednost ovih smjernica je da su one po prvi put uključile i pedijatrijsku populaciju, a osim preporuka za liječenje donose i preporuke za dijagnostiku i prevenciju ovih infekcija (40).

1.2.7. Mjere prevencije CDI

C. difficile je najznačajniji infektivni uzročnik bolničkih proljeva u visoko razvijenim zemljama te ujedno jedan od najvažnijih HA-patogena (engl. *healthcare-associated*) u Europi i SAD-u. Zbog visokog morbiditeta i mortaliteta, uzrokuje značajno ekonomsko opterećenje. Većina komplikacija se može prevenirati ciljanim mjerama za sprječavanje infekcija i racionalnim propisivanjem antibiotika. Europske smjernice za prevenciju su donesene 2008., a dopunjene 2018., kada su revidirane i američke smjernice (40-42).

Što ranije postavljanje dijagnoze, dvo ili trostupanjskim postupnikom te prijavljivanje i praćenje novih slučajeva, prve su mjere sprječavanja širenja CDI. Testiranje stolice na prisutnost toksigenog soja trebalo bi raditi svim simptomatskim pacijentima koji su hospitalizirani dulje od tri dana. Status kliconoštva se ne prati, jer 30-tak % pacijenata ostaju asimptomatski nositelji nakon CDI.

Nakon dijagnosticiranja CDI, provode se mjere kontaktne izolacije (za vrijeme trajanja simptoma i najmanje 48 sati nakon prestanka proljeva), a po potrebi i kohortiranja oboljelih pacijenata. Kad god je moguće, treba koristiti jednokratnu medicinsku opremu (npr. termometre), a u svim ostalim slučajevima, opremu (npr. endoskope, stetoskope i sl.) treba pažljivo očistiti prikladnim dezinfekcijskim sredstvom (npr. 2 %-tna otopina glutaraldehida).

Infekcija se najčešće širi feko-oralnim putem, kontaminiranim rukama zdravstvenih djelatnika i pacijenata. Spore *C. difficile* su otporne na alkohol, ali i na većinu drugih antiseptika za higijensko pranje ruku (klorheksidin, heksaklorofen, iodofor, kloroksilenol i triklosan). Stoga se preporuča nošenje zaštitne odjeće kao što su jednokratne rukavice i pregače, a nakon skidanja rukavica, ruke oprati tekućom vodom i sapunom.

Spore kontaminiraju bolnički okoliš, naročito toalet, krevete i podove. S obzirom na njihovu otpornost prema zagrijavanju, sušenju i dezinficijensima, teško ih je ukloniti sa jako kontaminiranih površina. Često se koriste hipokloritni preparati koncentracije 1000 ppm (engl. *parts per million*).

Kontinuirana edukacija se provodi na svim razinama, od zdravstvenog i nezdravstvenog bolničkog osoblja, preko pacijenata, posjetitelja i članova obitelji.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je prikazati epidemiološke i mikrobiološke karakteristike *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) infekcija (CDI) dijagnosticiranih u KBC-u Split u razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2017. godine.

2.2 Hipoteze

1. *Clostridioides difficile* je najčešći uzročnik proljeva u KBC-u Split.
2. Od *Clostridioides difficile* infekcija (CDI) najčešće oboljevaju pacijenti stariji od 65 godina.
3. Žene oboljevaju učestalije u odnosu na muški spol.
4. Udio bolničkih pacijenata je veći od udjela izvanbolničkih pacijenata.
5. Neki od pacijenata će imati rekurentne *Clostridioides difficile* infekcije (rCDI).
6. Većina toksigenih sojeva *Clostridioides difficile* ima aktivnu produkciju toksina u trenutku postavljanja dijagnoze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici istraživanja

U istraživanje su uključeni svi pacijenti s prvom epizodom CDI kojima je u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split dokazan toksigeni soj *C. difficile* u uzorku stolice, u razdoblju od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2017. godine.

Analizirani su demografski (dob i spol) te epidemiološki podatci (bolnički i izvanbolnički početak simptoma, distribucija pacijenata po odjelima i klinikama KBC-a Split, uputne dijagnoze i antibiotska terapija).

Za postavljanje dijagnoze prve epizode CDI, korišteni su ESCMID-ovi kriteriji (klinička slika kompatibilna s CDI i mikrobiološki dokaz toksigenog soja *C. difficile* u uzorku stolice) (44).

Pobrojani su slučajevi svih ponavljanih CDI (rCDI) u vremenu praćenja. Ponavljajuće CDI su prema ESCMID-ovim smjernicama definirane kao ponovna pojava ili pogoršanje simptoma CDI nakon početnog poboljšanja (44).

Uključeni su svi toksigeni sojevi *C. difficile* dokazani u uzorcima stolice pacijenata s primarnom epizodom CDI, koji su zaprimljeni u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split u razdoblju istraživanja.

Uzorci stolice nisu testirani rutinski na prisustvo *C. difficile* toksina A i B već isključivo na zahtjev kliničara, koji su na osnovi kliničke slike postavili sumnju na CDI. Uzastopni (copy) sojevi *C. difficile* dokazani iz različitih uzoraka stolice (u rekurentnim epizodama CDI) istog bolesnika nisu ponovno analizirani.

3.2 Mjesto istraživanja

Podatci su prikupljeni za bolničke i izvanbolničke pacijente u čijim je uzorcima stolice dokazan toksigeni soj *Clostridioides difficile* u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split.

3.3 Ustroj istraživanja

Provedeno istraživanje je prema svojim odrednicama retrospektivno kohortno, s obzirom da je grupa ispitanika stvorena u određenom periodu u prošlosti i određena za uključivanje u istraživanje zbog dokaza toksigenog soja *Clostridioides difficile* u stolici. Prema podjeli ispitanika u skupine, provedeno istraživanje ima odrednice primarno opazajnog, uzimajući u obzir da su podatci prikupljeni bez utjecaja na ispitanike te bez provedbe intervencija nad njima. Gledajući svrhu provedenog istraživanja, ono je aplikativno te ima praktičnu vrijednost jer se dobiveni podatci mogu primijeniti u svrhu prevencije nastanka i širenja CDI i rCDI unutar populacije.

3.4 Opis istraživanja

U istraživanju su korišteni podatci za ukupno 370 pacijenata pri čemu je njih 54 imalo ponavljajuću infekciju. Samo istraživanje podijeljeno je na prikupljanje podataka o istraživanoj skupini pacijenata, unošenju nađenih stavki u računalo, statističkoj obradi pronađenih podataka, grafičkom prikazu te tumačenju istih.

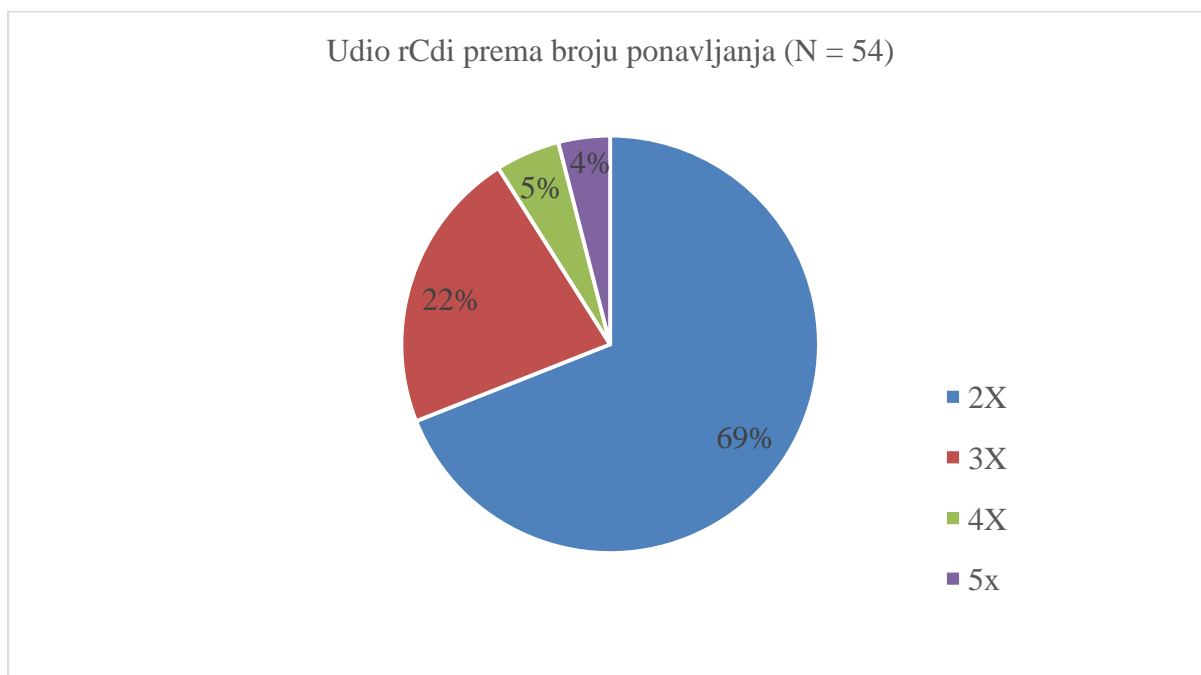
3.5 Statistička obrada podataka

Prikupljeni podatci uneseni su i obrađeni u Microsoft Excel za Windows Version 11.0 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington USA). Za ispitivanje statistički značajne razlike među spolovima, skupinama pacijenata mlađih i starijih od 65 godina (skupno te odvojeno po spolovima), izvanbolničkim i bolničkim pacijentima te toksin pozitivnih i negativnih patogenih sojeva *Clostridioides difficile*, korišten je hi kvadrat test na razini značajnosti $p < 0,05$ u statističkom programu MedCalc za Windows (Medcalc Software, Ostend, Belgija).

4. RESULTATI

4.1 Podatci o zastupljenosti CDI u Kliničkom bolničkom centru Split tijekom 2017. godine

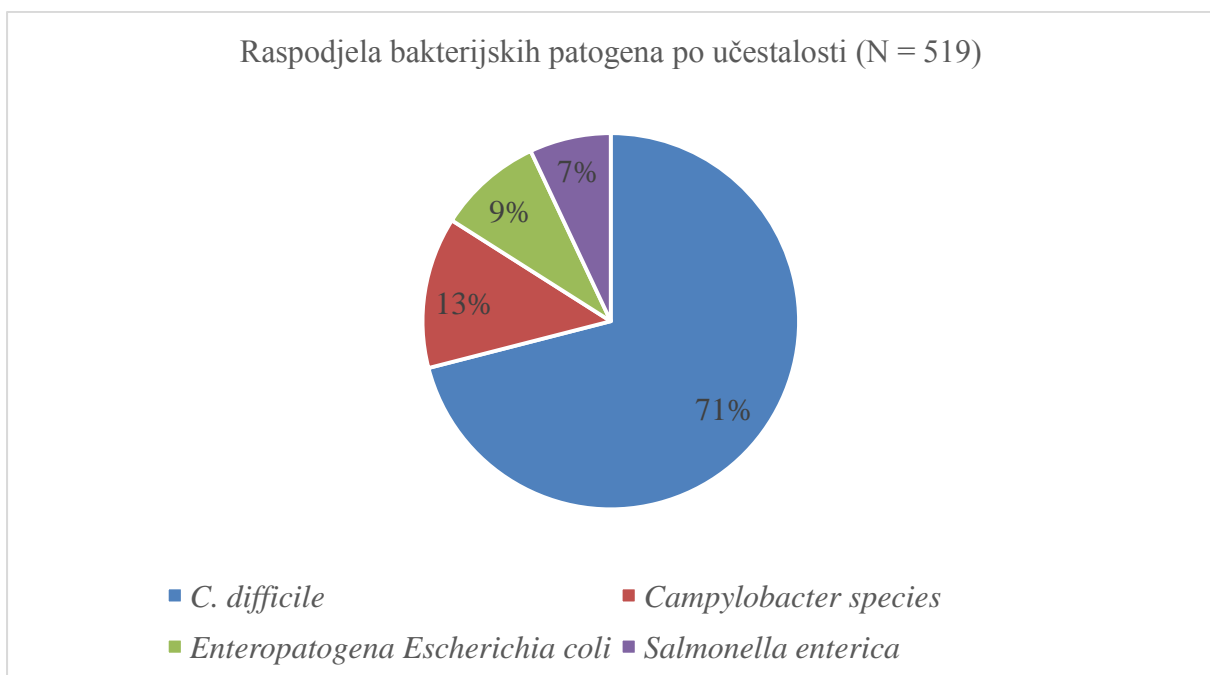
U Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split u 2017. godini pod sumnjom na *C. difficile* infekciju zaprimljeno je 2175 uzoraka stolice. Od toga je 1727 (79%) bilo negativno, a u 448 (21%) uzoraka je dokazan toksigeni soj *C. difficile*. Primarna infekcija je zabilježena u 370 (83%) pacijenata, od kojih je 54 (15%) imalo i neki oblik rekurencije, što je prikazano na Slici 1. Od ukupnog broja pacijenata s ponavljajućom infekcijom (54), njih 37 (69%) je imalo dvije epizode CDI, 12 pacijenata (22%) je imalo tri epizode, 3 pacijenta (5%) su imala četiri epizode dok su 2 pacijenta (4%) imala pet epizoda CDI.



Slika 1. Raspodjela rekurentnih *C. difficile* infekcija s obzirom na broj ponavljanja

Osim uzoraka zaprimljenih sa specifičnim zahtjevom kliničara za detekciju toksigenog soja *C. difficile*, zaprimljen je i 1951 uzorak sa zahtjevom za kultivaciju ostalih bakterijskih uzročnika gastroenteritisa. Pri tome je 1802 (92%) uzorka bilo negativno na bakterijske patogene, a 149 (8%) njih je dalo pozitivan rezultat. Od toga je najzastupljeniji bio *Campylobacter species* sa 65 (44%) pozitivnih kultura stolice, potom enteropatogena *Escherichia coli* (EPEC) s 45 (30%) pozitivnih kultivacija te *Salmonella enterica* koja je bila zastupljena u 39 (26%) kultura.

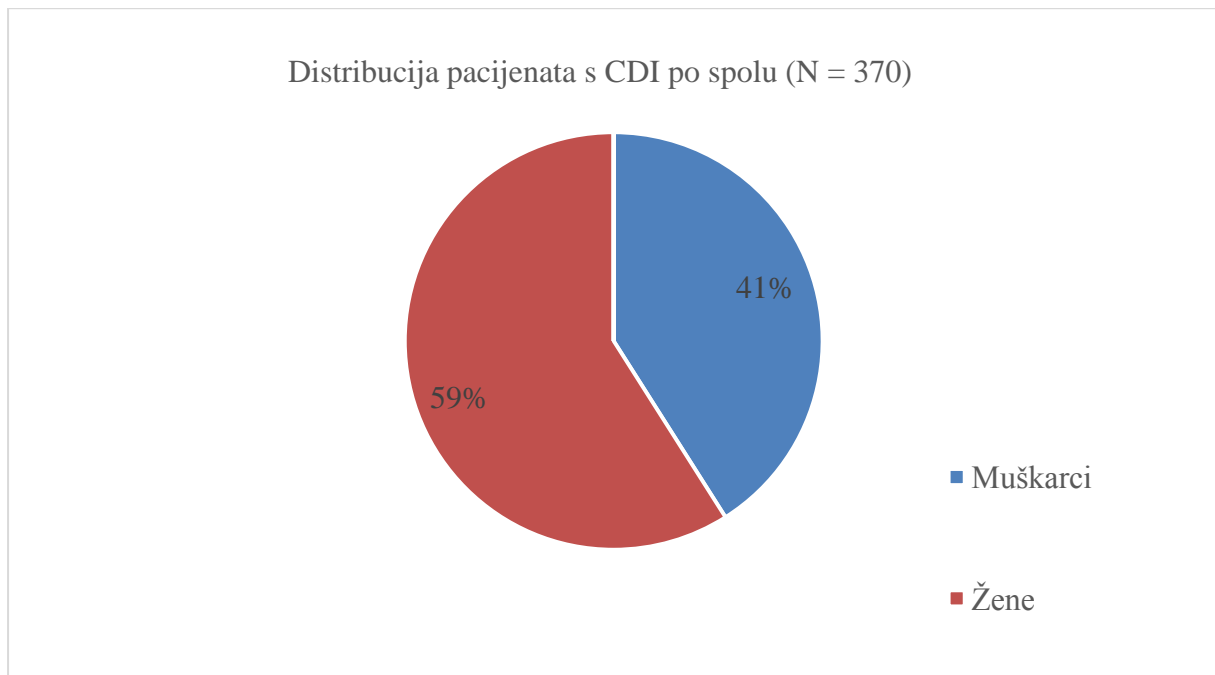
Ukupno dokazanih bakterijskih patogena u stolici tijekom 2017. godine bilo je 519, pri čemu je *C. difficile* bio najzastupljeniji s 370 (71%) pozitivnih uzoraka. Potom ga slijede *Campylobacter species* sa 65 (13%), enteropatogena *Escherichia coli* (EPEC) s 45 (9%) te *Salmonella enterica* s 39 (7%) pozitivnih uzoraka. Slika 2. prikazuje udio pojedinih bakterijskih uzročnika crijevnih infekcija u KBC-u Split.



Slika 2. Udio pojedinih vrsta u ukupnom broju bakterijskih patogena

4.2 Demografski podatci

Od ukupnog broja pacijenata, njih 370, muškaraca je bilo 152 (41%) dok je žena bilo 218 (59%), što je prikazano na Slici 3. Ukupan broj žena je statistički značajno veći u odnosu na broj muškaraca (hi – kvadrat test, $p < 0,001$)



Slika 3. Raspodjela pacijenata po spolu

Tablica 1. prikazuje raspodjelu muškaraca prema dobnim skupinama te njihov udio u ukupnom broju pacijenata muškog spola. Analizi su bili dostupni podatci za 145 od ukupno 152 muškarca.

Tablica 1. Raspodjela muškaraca po dobnim skupinama te njihovi udjeli u ukupnom broju muških pacijenata

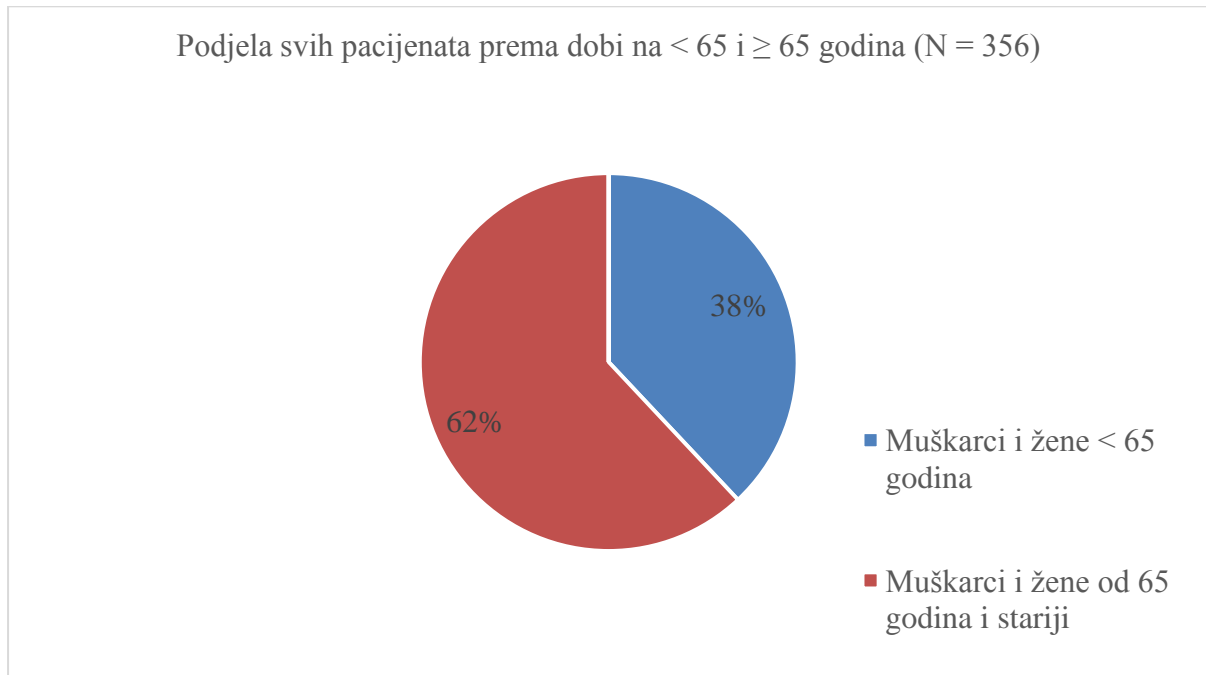
Dob	N (%)
≤ 19	7 (5)
20 -39	12 (8)
40 - 59	23 (16)
60 - 69	35 (24)
70 -79	31 (21)
≥ 80	37 (26)
Sveukupno	145 (100)

Tablica 2. prikazuje raspodjelu žena prema dobnim skupinama te njihov udio u ukupnom broju ženskih pacijenata. Podatci o godini rođenja bili su dostupni za 211 od ukupno 218 žena.

Tablica 2. Raspodjela žena prema dobnim skupinama te njihovi udjeli u ukupnom broju ženskih pacijenata

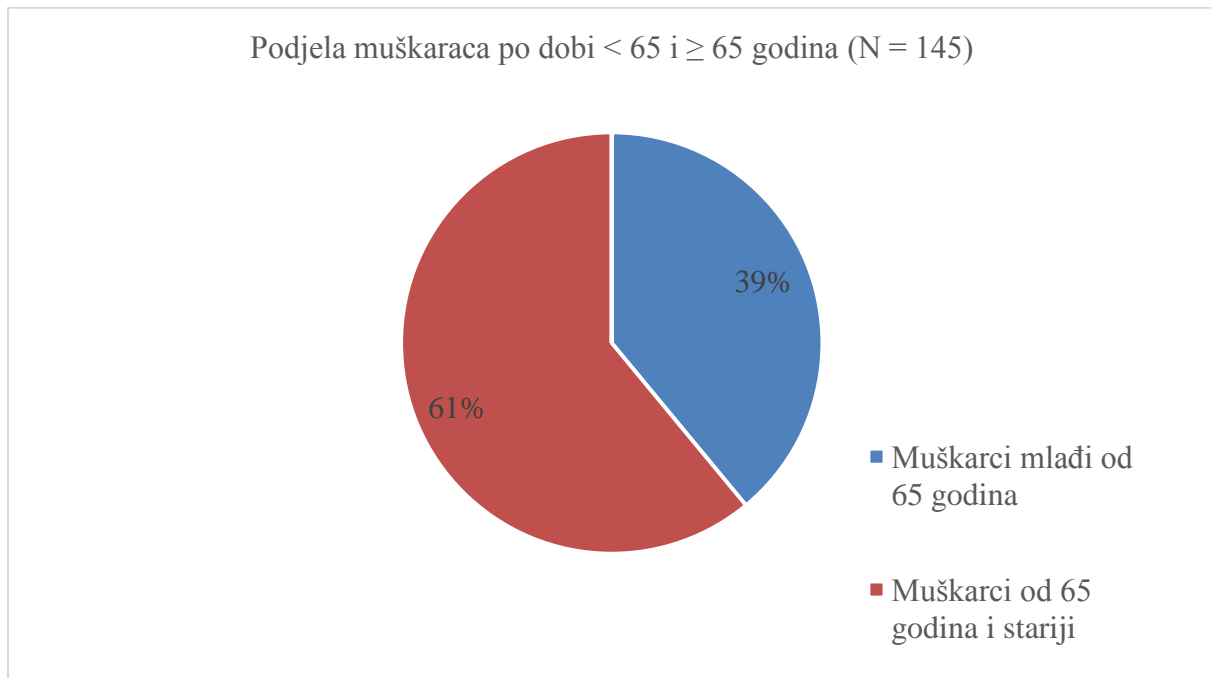
Dob	N (%)
≤ 19	5 (2)
20 -39	32 (15)
40 - 59	29 (14)
60 - 69	30 (14)
70 -79	43 (21)
≥ 80	72 (34)
Sveukupno	211 (100)

Analiziran je broj muškaraca i žena u starosti od 65 godina i više. Ukupno ih je bilo 222 (62%) što je statistički značajno više (hi-kvadrat test, $p < 0,001$) u odnosu na ukupan broj muškaraca i žena u dobi ispod 65 godina ($N = 134$, 38%), što prikazuje Slika 4.



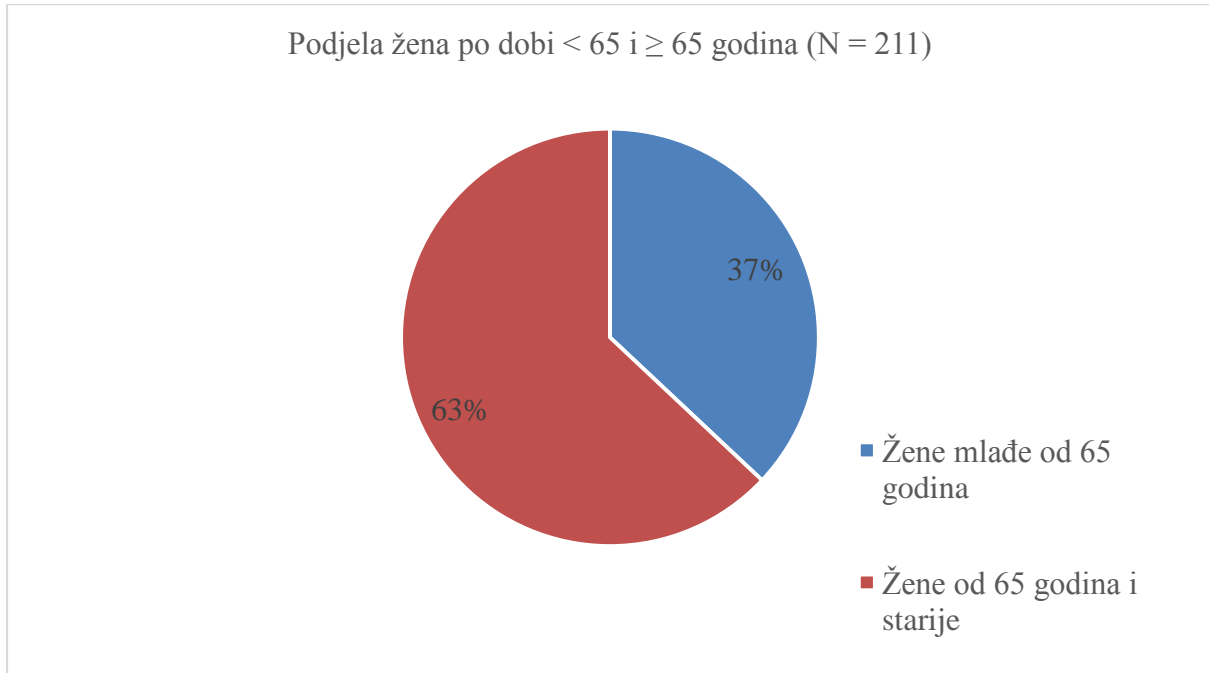
Slika 4. Sveukupan broj muškaraca i žena podijeljen prema dobi na mlađe od 65 godina i na one od 65 godina i starije

Nadalje, analiziran je broj muškaraca u dobi od i iznad 65 godina u odnosu na one mlađe od 65 godina. Sveukupno je bilo 56 (39%) muškaraca mlađih od 65 godina dok je njih 89 (61%) bilo u dobnoj skupini ≥ 65 godina, što prikazuje Slika 5. Udio muškaraca u starosti od 65 godina i više statistički je značajno viši u odnosu na broj muškaraca ispod 65 godina (hi-kvadrat test, $p = 0,006$).



Slika 5. Raspodjela muškaraca po dobi na mlađe od 65 godina i one u dobi od 65 godina i starije

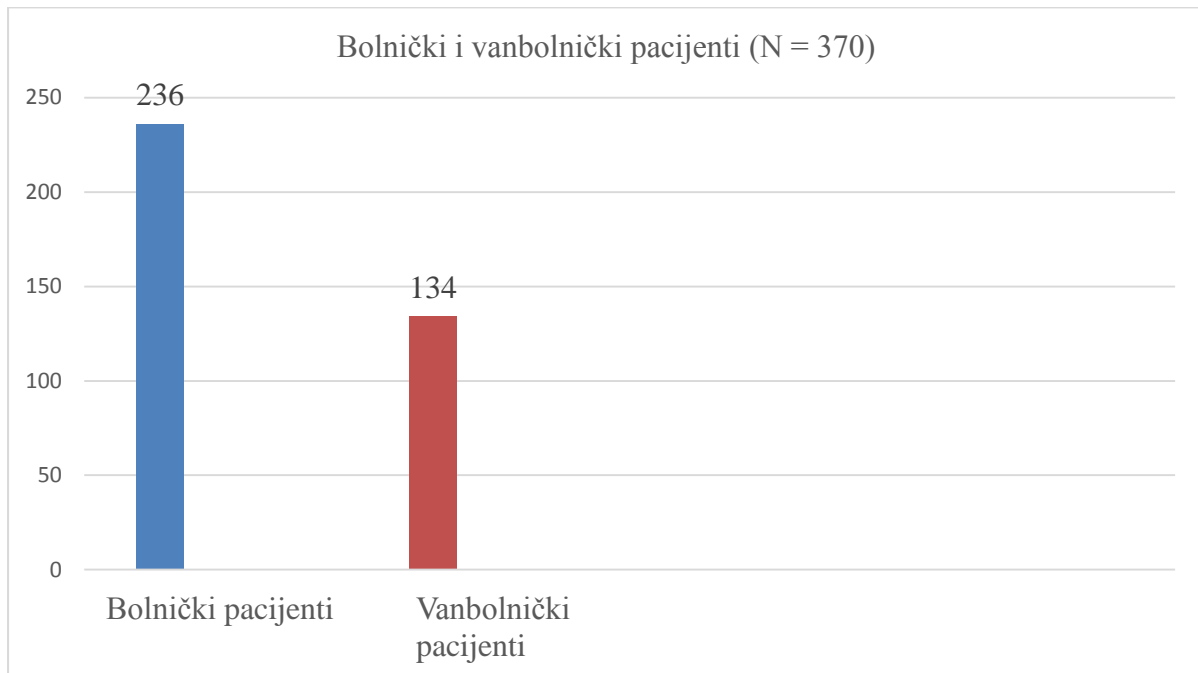
Sveukupan broj žena mlađih od 65 godina bio je 78 (37%) dok je broj žena u dobi ≥ 65 bio 133 (63%), što se vidi na Slici 6. Udio žena starosne dobi od 65 godina i više statistički je značajno viši u odnosu na žene ispod 65 godina (hi-kvadrat test, $p < 0,001$).



Slika 6. Raspodjela žena po dobi na mlađe od 65 godina i one od 65 godine i starije

4.3 Zastupljenost *C. difficile* pozitivnih uzoraka u bolničkih i izvanbolničkih pacijenata

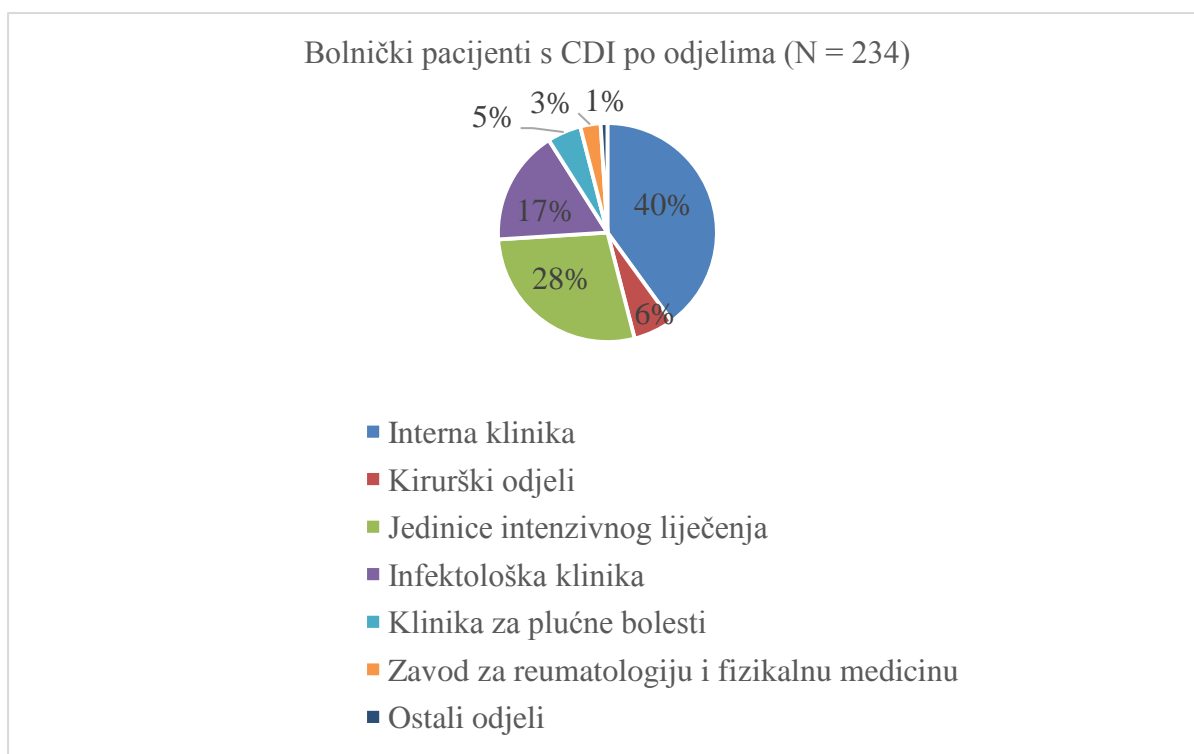
Od ukupno 370 pacijenata s dokazanim toksigenim sojem *C. difficile*, njih 236 (64%) su bili bolnički pacijenti, a 134 (36%) izvanbolnički pacijenti u trenutku dijagnosticiranja CDI. Slika 7. prikazuje tu raspodjelu. Statistički je značajan veći broj bolničkih pacijenata u odnosu na izvanbolničke (hi-kvadrat test, $p < 0,001$).



Slika 7. Raspodjela primarnih CDI prema mjestu početka simptoma na bolničke i izvanbolničke

4.4 Raspodjela bolničkih pacijenata po odjelima i klinikama KBC-a Split u 2017. godini

Od ukupno 236 bolničkih pacijenata s dokazanom primarnom CDI, za njih 234 su bili dostupni podatci o smještaju na pojedine odjele i klinike KBC-a što prikazuje Slika 8. Na Internoj klinici liječena su 94 (40%) pacijenta, na kirurškim odjelima njih ukupno 15 (6%), u jedinicama intenzivnog liječenja 66 (28%) pacijenata, na Infektološkoj klinici 39 (17%), na Klinici za plućne bolesti 11 (5%) te na Zavodu za reumatologiju i fizikalnu medicinu 6 (3%) pacijenata. Na ostalim odjelima (Klinika za dječje bolesti i Klinika za onkologiju i radioterapiju) bilo je ukupno 3 (1%) pacijenta s CDI.

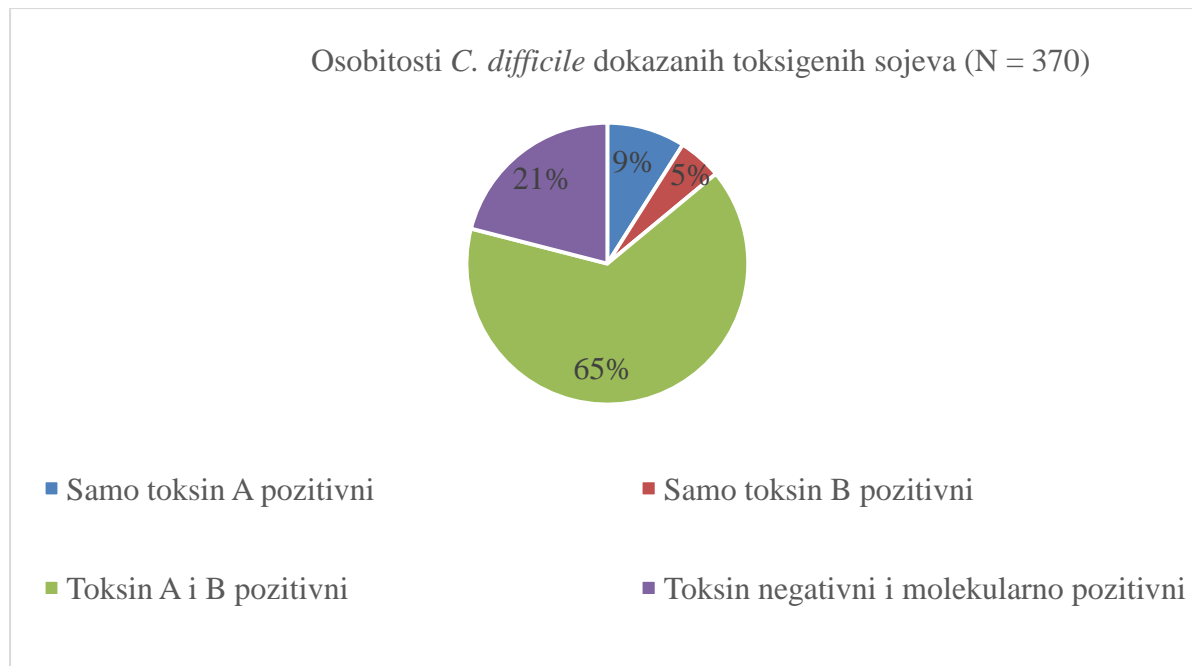


Slika 8. Raspodjela bolničkih pacijenata s primarnom CDI po odjelima

4.5 Toksikogene i molekularne karakteristike sojeva *C. difficile*

Slika 9. prikazuje raspodjelu toksigenih *C. difficile* sojeva prema rezultatima dvo i trostupanjskog dijagnostičkog testiranja. Kombiniranim imunokromatografskim, imunoenzimskim (ICT/EIA) testovima za dokazivanje specifičnog antigena *C. difficile* (GDH) i proizvodnje toksina A i B, ukupno je dokazano 370 uzoraka po prvi put pozitivnih na GDH antigen (primarna infekcija). Od toga su 32 (9%) uzorka bila pozitivna samo na proizvodnju toksina A, 18 (5%) uzoraka pozitivnih na proizvodnju toksina B te 241 (65%) uzorak sa pozitivnim toksinima A i B. Svi uzorci stolice u kojima je dokazan specifični antigen GDH, ali ne i aktivna proizvodnja toksina, dodatno su testirani molekularnom metodom za otkrivanje toksigene regije u genomu *C. difficile*. Toksin negativnih i molekularno pozitivnih uzoraka bilo je 79 (21%).

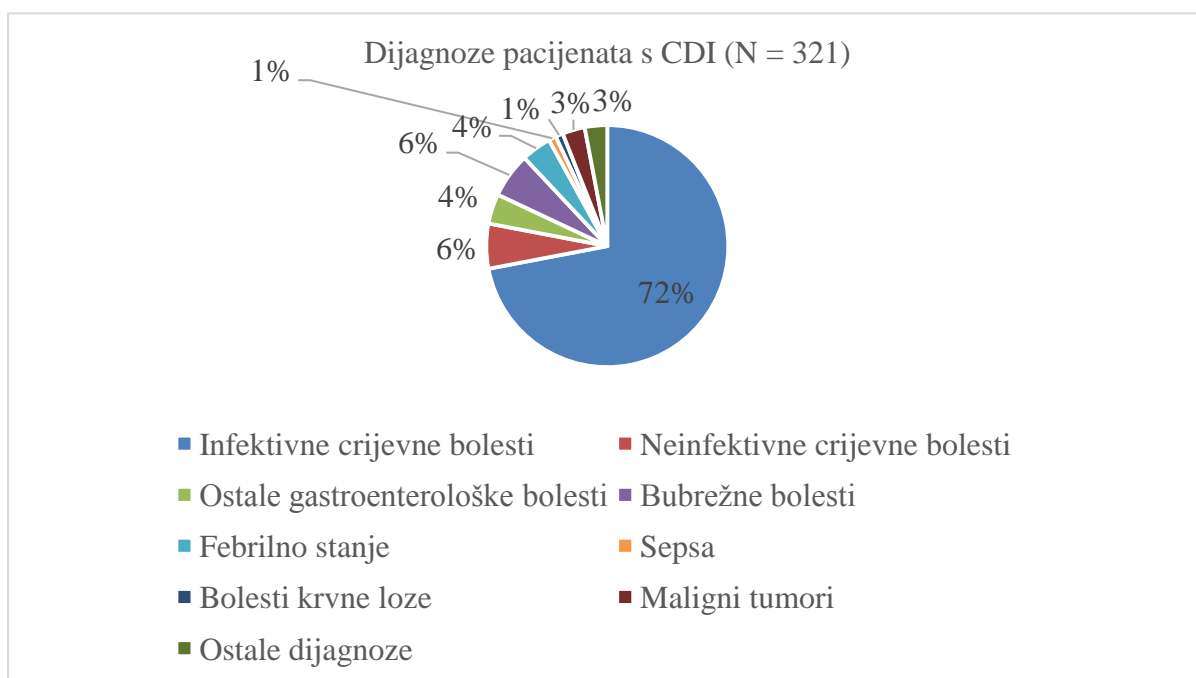
Statistički je značajno više bilo sojeva s dokazanom proizvodnjom samo jednog toksina (A ili B) te proizvodnjom oba toksina (A i B) u odnosu na toksin negativne uzorke (hi-kvadrat test, $p < 0,001$).



Slika 9. Mikrobiološke osobitosti *C. difficile* toksigenih uzoraka

4.6 Dijagnoze pacijenata s *C. difficile* infekcijom

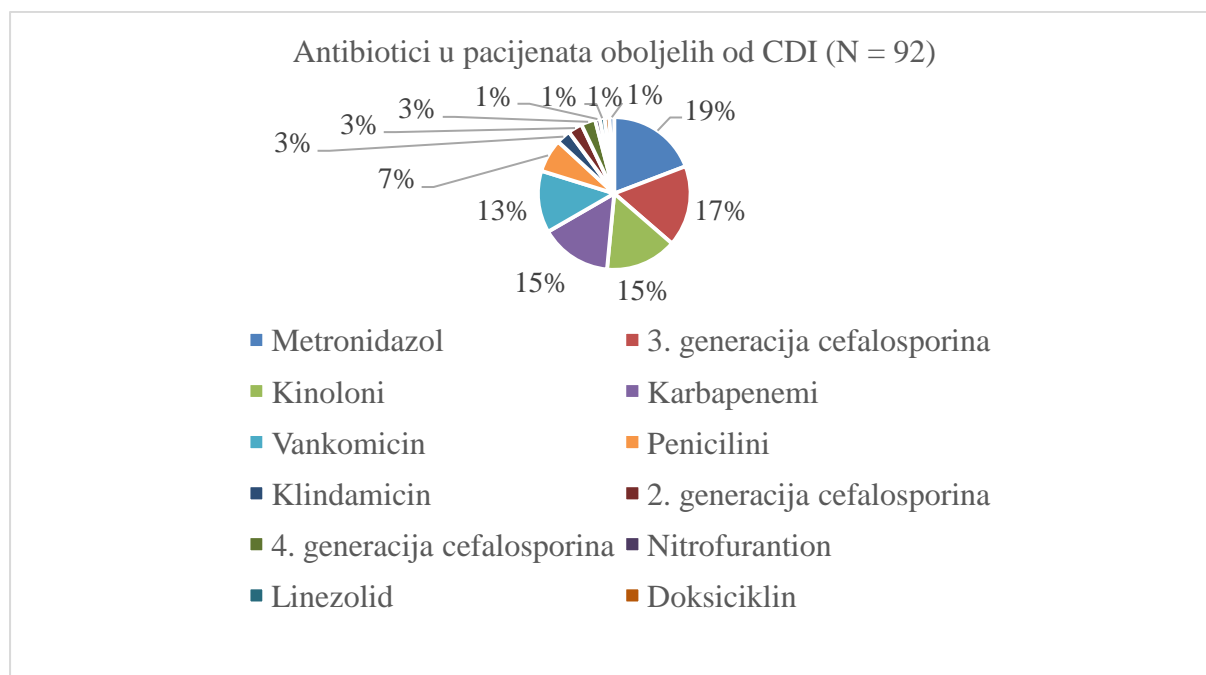
Sve uputne dijagnoze pacijenata s dokazanim toksigenim sojem *C. difficile*, predočene su Slikom 10. Ukupno je zabilježena 321 dijagnoza. Od toga su najzastupljenije bile infektivne crijevne bolesti (230 pacijenata, 72%) dok su neinfektivne upalne bolesti crijeva zabilježene u 20 (6%) pacijenata, a ostale gastroenterološke bolesti u njih 12 (4%). Bubrežne bolesti je imalo 18 (6%) pacijenata, febrilno stanje je dijagnosticirano u 15 (4%) pacijenata, sepsa u 4 (1%) pacijenta, bolesti krvne loze u 3 (1%) slučaja, maligni tumori u 10 (3%) pacijenata dok je ostalih dijagnoza bilo 9 (3%).



Slika 10. Raspodjela *C. difficile* pozitivnih pacijenata prema uputnim dijagnozama

4.7 Antibiotička terapija pacijenata pozitivnih na toksigeni soj *C. difficile*

Podatci o učestalosti pojedine antibiotičke terapije u pacijenata s dokazanim toksigenim sojem *C. difficile* prikazani su na Slici 11. Prema materijalima koji su bili dostupni pretraživanju, 92 pacijenta su primala antibiotike u trenutku dokazivanja toksigenog soja *C. difficile*. Najzastupljeniji među njima bili su metronidazol u 17 (19%) slučajeva, 3. generacija cefalosporina u 16 (17%) pacijenata, kinoloni u 14 (15%) pacijenata te karbapenemi također u 14 (15%) slučajeva. Vankomicin je primalo 12 (13%) pacijenata, penicilinski antibiotik 6 (7%) pacijenata, klindamicin troje (3%) te 2. i 4. generaciju cefalosporina također po troje (3%) pacijenata. Nitrofurantion, linezolid, doksiciklin i kolistin bili su najmanje korišteni antibiotici s obzirom da je svaki primijenjen u samo u jednog (1%) pacijenta. Specifičnu terapiju za liječenje CDI (metronidazol ili vankomicin) u trenutku dijagnosticiranja bolesti, primalo je 29 (40%) bolesnika.



Slika 11. Antibiotička terapija bolesnika s dokazanim toksigenim sojem *C. difficile*

5. RASPRAVA

Posljednja dva desetljeća, *C. difficile* infekcije su najčešće bakterijske infekcije u visoko razvijenim zemljama svijeta (Sjeverna Amerika, Europa i Japan) te je *C. difficile* najčešći uzročnik bolničkih proljeva (10, 16, 43-46). Zbog toga se osobitosti ovih infekcija kontinuirano prate u KBC-u Split od 2010. godine.

Cilj ovog retrospektivnog istraživanja bio je odrediti epidemiološke i mikrobiološke karakteristike *Clostridioides difficile* (nekada *Clostridium difficile*) infekcija (CDI) dijagnosticiranih tijekom 2017. godine u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split.

U razdoblju od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2017., testirano je ukupno 4126 uzoraka stolice bolničkih i izvanbolničkih pacijenata na bakterijske uzročnike proljeva. Ukupno je otkriveno 370 primarnih epizoda CDI te 149 ostalih crijevnih bakterijskih infekcija. Time je dokazano da je *C. difficile*, s udjelom od 71%, najčešće dijagnosticirani bakterijski patogen iz stolice simptomatskih pacijenata u KBC-u Split u 2017. godini.

Prvi podatci o CDI u Hrvatskoj objavljeni su 2014. godine, kada su analizirane 54 primarne epizode CDI u razdoblju od siječnja 2010. do prosinca 2011. (14). Tada je dokazana značajna proporcija teških oblika CDI i njihova povezanost s primjenom cefalosporina 3. generacije, dok povezanost s dobi i spolom pacijenata nije dokazana. Značajan broj infekcija je bio u bolničkih pacijenata, dok je izvanbolničkih pacijenata bilo 28%.

U ovom istraživanju, *C. difficile* je češće dokazan u uzorcima stolice bolničkih nego izvanbolničkih pacijenata. Ipak, 36% CDI u izvanbolničkih pacijenata naglašava potrebu testiranja stolice na *C. difficile* i u ovoj populaciji pacijenata. Zanimljivo je da je gotovo identičan rezultat nedavno objavljen u studiji Durovica i suradnika.

Prema dostupnoj literaturi, 37% CDI je imalo izvor u izvanbolničkoj sredini. Kontakt sa simptomatskim ili asimptomatskim pacijentima (uključujući djecu), boravak u staračkim domovima, kontaminirani okoliš u izvanbolničkim ustanovama za zdravstvenu njegu, kontakt i boravak na farmama životinja, vodeći su putevi prijenosa CDI u izvanbolničkoj populaciji (47).

Značaj CDI je vrlo često podcijenjen u izvanbolničkoj populaciji. U Francuskoj je provedeno 11-mjesečno istraživanje u populaciji izvanbolničkih pacijenata, u kojem je svaki uzorak stolice testiran na prisutnost toksigenog soja, bez obzira je li ta pretraga izričito tražena od liječnika. Barbut i suradnici su dokazali da bi gotovo 50% uzoraka sa toksigenim

sojem *C. difficile* ostalo neotkriveno, jer je specifično testiranje bilo traženo u svega 12,9% uzoraka (48). Ovakva istraživanja naglašavaju potrebu donošenja nacionalnih preporuka i dijagnostički algoritam za testiranje uzoraka izvanbolničkih pacijenata (49). Za sada, smjernice postoje u svega nekoliko zemalja kao što su Nizozemska i SAD (50,51).

Jedan od izazova u dijagnostici CDI jest odabir pouzdanog dijagnostičkog testa. Prema preporukama Europskog društva kliničkih mikrobiologa i infektologa (ESCMID), niti jedan komercijalno dostupan test se ne može koristiti kao jedini test u dijagnostici CDI zbog niske pozitivne prediktivne vrijednosti u sredinama sa niskom prevalencijom CDI (34).

Preporučeni dvostupanjski dijagnostički algoritam se koristi u KBC-u Split od 2014. godine. Većina infekcija u ovom istraživanju je dokazana već u prvom koraku tj. kombiniranim testom za detekciju antigena GDH i produkcije toksina A i B.

Ipak, dodatnih 21% infekcija je dokazano u drugom stupnju, molekularnom metodom za dokazivanje mogućnosti stvaranja toksina, tj. toksigene regije u genomu *C. difficile*. Odluka o tome radi li se o kolonizaciji ili o infekciji zasniva se na kliničkoj procjeni. Budući da se radilo o simptomatskim pacijentima, s kliničkom slikom kompatibilnom s CDI, oni su tretirani kao CDI te su primili specifičnu terapiju, iako nije dokazana aktivna produkcija toksina.

Tijekom godina rada i dijagnosticiranja CDI, pojavili su se novi problemi i dileme u laboratorijskom radu (neobični fenotip *C. difficile* na kromogenom selektivnom mediju, sojevi koji imaju gene samo za binarni toksin, sojevi koji su GDH negativni, a stvaraju toksine A i B, negativni testovi u pacijenata koji imaju endoskopski dokazani pseudomembranozni kolitis i nepouzdana rezultati molekularnog testiranja za epidemijski PCR ribotip 027) (52).

Među rizičnim faktorima za nastanak CDI, ističe se starija životna dob (16). Analizom dobne starosti svih pacijenata, dokazana je značajno veća proporcija pacijenata starijih od 65 godina. Kada su pacijenti analizirani po spolu, značajno veća proporcija žena je bila starija od 65 godina. Isti rezultat sa značajno većom proporcijom pacijenata starijih od 65 godina je dobiven i u skupini muških pacijenata.

Ovi pacijenti su najčešće skloni razvoju CDI i zbog drugih rizičnih faktora kao što su komorbiditet i boravak u bolnici. U cilju poboljšanja medicinske skrbi, značajno bi bilo predvidjeti rizičnu populaciju za nastanak CDI. Tako je skupina američkih znanstvenika

razvila jednostavan model prediktivnog indeksa rizika za nastanak CDI povezane s bolničkim liječenjem. Trideset dnevni prediktori za nastanak CDI su bili: antibiotici, dob, Charlsonov indeks komorbiditeta i inhibitori protonske pumpe (53).

Od ukupnog broja pacijenata s primarnom CDI značajno veća bila je proporcija pacijenata ženskog spola (dok je u prethodnom istraživanju bilo neznatno više muškaraca (57,4%) (14). Do sada, ženski spol se tek sporadično spominje kao mogući rizični faktor za nastanak primarne ili rCDI. Tako su u opservacijskom retrospektivnom istraživanju Jorgensona i suradnika, ženski spol, anemija i bubrežno zatajenje bili prediktori ponovne hospitalizacije nakon CDI (54). U toj studiji, istraživan je utjecaj različitih rizičnih faktora na nastanak CDI u populaciji pacijenata s transplantiranim bubregom. Također, u četverogodišnjem istraživanju Kunishime i suradnika, pojavnost CDI unutar prvih 90 dana nakon transplantacije je bila povezana s vrstom transplantata i ženskim spolom (55).

U ovom istraživanju, dokazano je 15% rekurentnih infekcija, što je nešto više nego u istraživanju iz 2010-2011., kada je bilo 11,7% rCDI (20). Ovaj udio je nešto niži od europskog i američkog prosjeka koji iznose 18-35% (16, 56, 57). U Japanu, 4-18% pacijenata razvije rCDI unutar nekoliko mjeseci od primarne infekcije (57). Rekurentna *Clostridium difficile* infekcija (rCDI) je jedna od najtežih komplikacija CDI, značajno povećava mortalitet, morbiditet, broj bolničkih dana i troškove liječenja (16, 58).

Zanimljivo je da je u trenutku testiranja, 40% od ukupno 92 pacijenta, za koja su bili dostupni podatci o terapiji, već primalo specifičnu terapiju za CDI. Moguće je da su pacijenti ove antibiotike primali zbog neke druge infekcije ili zbog jake kliničke sumnje na CDI.

Ograničenje ovog istraživanja je dostupnost podataka o primjeni antimikrobne terapije, komorbiditetu i uputnoj dijagnozi u trenutku testiranja stolice na prisutnost toksigenog soja *C. difficile*. Naime, istraživanju su bili dostupni samo laboratorijski podatci, tj. podatci o pacijentu koji su bili zabilježeni na uputnicama koje su zaprimljene zajedno sa uzorcima. Zbog toga se nisu mogli analizirati podatci o bolestima i stanjima, antimikrobnoj i drugoj terapiji kao i drugim, ne-mikrobiološkim dijagnostičkim testovima i njihova povezanost s nastankom CDI i rCDI.

Ipak, ovo istraživanje je donijelo vrijedne rezultate o pojavnosti CDI i rCDI, dobnoj, spolnoj i bolničkoj/izvanbolničkoj strukturi pacijenata kao i o mikrobiološkim osobitostima toksigenih sojeva.

6. ZAKLJUČAK

1. Najčešći bakterijski uzročnik proljeva u KBC-u Split tijekom 2017. godine bio je *Clostridioides difficile*.
2. Osobe starije od 65 godine, bez obzira na spol, značajno češće oboljevaju od crijevne infekcije uzrokovane sojem *C. difficile* u odnosu na populaciju mlađu od te starosne dobi.
3. Značajno češće oboljevaju žene u usporedbi s muškarcima.
4. Značajno je veći broj pacijenata u kojih je početak bolesti bio u bolnici u odnosu na broj pacijenata u kojih su simptomi započeli izvan bolnice.
5. Pacijenti s rizičnim čimbenicima poput starije životne dobi, antibiotske terapije širokog spektra, kroničnim i malignim bolestima, podložniji su razvoju ponavljane infekcije toksigenim sojem *C. difficile*.
6. Većina dokazanih toksigenih sojeva *C. difficile* stvarala je oba toksina (A i B), dok je tek manji broj sojeva stvarao samo toksin A ili samo toksin B. Najmanje je bilo toksigenih sojeva kojima nije dokazana aktivna produkcija toksina u trenutku dijagnosticiranja bolesti.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child. 1935;49:390-402.
2. Parte AC. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Res. 2014;42:D613-16.
3. Galperin MY, Brover V, Tolsov I, Yutin N. Phylogenomic analysis of the family *Peptostreptococcaceae* (*Clostridium* cluster XI) and proposal for reclassification of *Clostridium litorale* (Fendrich et al. 1991) and *Eubacterium acidaminophilum* (Zindel et al. 1989) as *Peptoclostridium litorale* gen. nov. comb. nov. and *Peptoclostridium acidaminophilum* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5506-13.
4. Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P i sur. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol. 1994;44:812-26.
5. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prevot 1938. Anaerobe. 2016;40:95-9.
6. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet. 1978;1:1063-6.
7. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I i sur. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol. 2005;54:113-7.
8. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2009;7:526-36.
9. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med. 2002;31:334-9.
10. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*, EU Member States, European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect. 2006;12:2-18.
11. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 1989;320:204-10.

12. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of CDAD: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:549-57.
13. Mcfarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. *J Infect Dis.* 1990;162:678-84.
14. Novak A, Spigaglia P, Barbanti F, Goic-Barisic I, Tonkic M. First clinical and microbiological characterization of *Clostridium difficile* infection in a Croatian University Hospital. *Anaerobe.* 2014;18-23.
15. Larson HE, Parry JV, Price AB, Davies DR, Dolby J, Tyrell DA. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *BMJ.* 1977;1:1246-8.
16. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M i sur. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet.* 2011;377:63-73.
17. Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N i sur. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med.* 2011;365:1693-16703.
18. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;31:334-9.
19. Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Teasley DG, Gebhard RL, Schwartz ML i sur. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis in adults. A prospective case-controlled epidemiologic study. *Arch Intern Med.* 1986;146:95-100.
20. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:1067-79.
21. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC i sur. 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;31:431-55.

22. Kyne L, Merry C, O'Connell B, Kelly A, Keane C, O'Neill D. Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. *Age Ageing*. 1999;28:107-13.
23. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K i sur. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Qubec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Can Med Assoc J*. 2004;171:466-72.
24. UK Health Protection Agency. English national point prevalence survey on healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2011: preliminary data. London; Health Protection Agency, 2012.
25. Meyer E, Gastmeier P, Weizel-Kage D, Schwab F. Associations between nosocomial meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial *Clostridium difficile*- associated diarrhoea in 89 German hospitals. *J Hosp Infect*. 2012;82:181-6.
26. Health Protection Agency. Investigation into outbreaks of *Clostridium difficile* at Maidstone and Tunbridge Wells NHS Trust. Commission for Healthcare Audit and Inspection, 2007.
27. Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML i sur. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill*. 2008;13.pii:18942.
28. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S i sur. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile* - associated diarrhoea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005;353:2442-9.
29. Kuijper EJ, van Dissel JT. Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. *Can Med Assoc J*. 2008;179:747-8.
30. Centers for Disease Control and Prevention. Severe *Clostridium difficile*-associated disease in population previously at low risk - four states, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005; 54:1201-5.
31. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI) *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:1053-66.

32. Goldenberg SD, French GL. Diagnostic testing for *Clostridium difficile*: a comprehensive survey of laboratories in England. *J Hosp Infect.* 2011;79:4-7.
33. Kyne L, Warny M, Qamar A i Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med.* 2000;342:390-7.
34. CrobachMJT, PlancheT, EckertC, BarbutF, TerveerEM, DekkersOM, WilcoxMH, KuijperEJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:S63-81.
35. Gateau C, Couturier J, Coia J, Barbut F. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:463-8.
36. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE i sur. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:431-55.
37. Debast SB et al. ESCMID: update of the treatment guidance document for *C. difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:1-26.
38. Crook DW, Walker AS, Kean Y, Weiss K, Cornely OA, Miller MA i sur. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection: meta-analysis of pivotal randomized controlled trials. *Clin Infect Dis.* 2012;55Supp 2:93-103.
39. Ooijevaar RE, van Beurden YH, Terveer EM, Goorhuis A, Bauer MP, Keller JJ I sur. Update of treatment algorithms for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:452-62.
40. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE i sur. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis.* 2018;66:e1-48.
41. VonbergRP, KuijperEJ, WilcoxMH, Barbut F, Tüll P, Gastmeier Pisur. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:2-20.

42. Tschudin-Sutter S, Kuijper EJ, Durovic A, Vehreschild MJGT, Barbut F, Eckert C i sur. Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings. Clin Microbiol Infect. 2018;24:1051-4.
43. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z I sur. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis. 2014 Dec;14(12):1208-19.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections: *Clostridium difficile* infections. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018.
45. Krutova M, Kinross P, Barbut F, Hajdu A, Wilcox MH, Kuijper EJ. How to: Surveillance of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Infect. 2018;24(5):469-75.
46. Kunishima H, Ito K, Laurent T, Abe M. Healthcare burden of recurrent *Clostridioides difficile* infection in Japan: A retrospective database study. J Infect Chemother. 2018;24:892-901.
47. Durovic A, Widmer AF, Tschudin-Sutter S. New insights into transmission of *Clostridium difficile* infection narrative review. Clin Microbiol Infect. 2018;24:483-92.
48. Barbut F, Day N, Bouee S, Youssouf A, Grandvoinet L, Lalande V i sur. Toxigenic *Clostridium difficile* carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. Clin Microbiol Infect. 2019;25:588-94.
49. Tschudin-Sutter S. *Clostridioides difficile* infection in outpatient settings - the need for studies on clinical impact. Clin Microbiol Infect. 2019;25:534-5.
50. Hensgens MP, Dekkers OM, Demeulemeester A, Buiting AG, Bloembergen P, van Benthem BH i sur. Diarrhoea in general practice: when should a *Clostridium difficile* infection be considered? Results of a nested case-control study. Clin Microbiol Infect. 2014;20:O1067-74.
51. Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K i sur. 2017 Infectious diseases society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious Diarrhea. Clin Infect Dis. 2017;65:e45-80.

52. Krutova M , Wilcox MH, Kuijper EJ. The pitfalls of laboratory diagnostics of *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2018;24:682-3.
53. Davis ML, Sparrow HG, Ikwuagwu JO, Musick WL, Garey KW, Perez KK. Multicentre derivation and validation of a simple predictive index for healthcare-associated *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2018;24:1190-4.
54. Verheyen E, Dalapathi V, Arora S, Patel K, Mankal PK, Kumar V, Lung E, Kotler DP, Grinspan A. High 30-day readmission rates associated with *Clostridium difficile* infection. Am J Infect Control. 2019;pii:S0196-6553(19)30026-4.
55. Jorgenson MR, Descourouez JL, Yang DY, Levenson GE, Saddler CM, Smith JA, Safdar N, Mandlebrot DA, Redfield RR. Epidemiology, Risk Factors, and Outcomes After Early Posttransplant *Clostridioides difficile* Infection in Renal Transplant Recipients. Ann Pharmacother. 2019;1060028019845003.
56. Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, Crook DW, Gorbach SL. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: fidaxomicin versus vancomycin. Clin Infect Dis. 2012;55(Suppl 2):S154-61.
57. Kunishima H, Ito K, Laurent T, Abe M. Healthcare burden of recurrent *Clostridioides difficile* infection in Japan: A retrospective database study. J Infect Chemother. 2018;24-892-901.
58. Sheitoyan-Pesant C, Chakra CNA, Pépin J, Marcil-Héguy A, Nault V, Valiquette L. Clinical and Healthcare Burden of Multiple Recurrences of CDI. Clin Infect Dis. 2016;62-574-80.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja je odrediti epidemiološku i mikrobiološku osnovu *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) infekcija (CDI) u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Split u razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2017. godine.

Materijali i metode: U ovom retrospektivnom istraživanju korišteni su podatci iz pismohrane Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split. Uključeni su svi pacijenti s prvom epizodom CDI kojima je u razdoblju praćenja dokazan toksigeni soj *C. difficile* iz uzorka stolice. Analizirani su demografski podatci pacijenata i mikrobiološke osobitosti toksigenih sojeva *C. difficile*. Zabilježeni su slučajevi ponavljajućih infekcija u istog pacijenta, ali bez dodatne karakterizacije *C. difficile* sojeva u tim epizodama. Statistički značajna razlika pojavnosti CDI među spolovima, pacijentima starijim i mlađim od 65 godina, izvanbolničkim i bolničkim pacijentima te toksigenim sojevima *C. difficile* sa i bez aktivne produkcije toksina, ispitivana je hi kvadrat testom, na razini značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati: Od ukupno 519 bakterijskih patogena dokazanih u uzorcima stolice, *C. difficile* je bio najučestaliji (71%). Primarnu *C. difficile* infekciju je imalo 370 pacijenata, dok su klinički i mikrobiološki potvrđenu rekurentnu infekciju imala 54 (15%) pacijenta. Od ukupno 370 pacijenata, njih 236 (64%) su bili bolnički pacijenti, a 134 (36%) izvanbolnički pacijenti u trenutku dijagnosticiranja CDI. Među bolničkim pacijentima, najveći broj je bio liječen na Internoj klinici (40%), u jedicama intenzivnog liječenja (28%) i Infektološkoj klinici (17%). Žena je bilo 218 (59%) što je značajno više u odnosu na muškarce (152 pacijenta, 41%). Značajno više je bilo pacijenata starijih od 65 godina (222 pacijenta, 62%), u odnosu na ukupan broj muškaraca i žena mlađih od 65 godina (134 pacijenta, 38%). Specifičnu terapiju za liječenje CDI (metronidazol ili vankomicin) u trenutku dijagnosticiranja bolesti, primalo je 29 (40%) pacijenata. Aktivna proizvodnja toksina je dokazana u 291 uzorak stolice od ukupno 370 primarnih slučajeva CDI. Od toga je u 32 (9%) uzorka dokazan samo toksin A, u 18 (5%) uzoraka samo toksin B, dok je u 241 (65%) uzorak dokazana proizvodnja oba toksina (A i B). U preostalih 79 uzoraka (21%), dokazan je toksigeni soj *C. difficile* bez aktivne produkcije toksina.

Zaključak: *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) je najčešći bakterijski uzročnik proljeva u KBC-u Split u vremenu trajanja istraživanja. Simptomatska *Clostridioides difficile* infekcija je najčešća u bolničkih pacijenata starijih od 65 godina, a žene obolijevaju češće od muškaraca. CDI najčešće uzrokuju toksigeni sojevi s aktivnom proizvodnjom toksina.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Epidemiological and microbiological characterization of *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) infection in a University Hospital of Split in 2017

Aim of the study: Aim of the present study is to determine the epidemiological and microbiological basis of *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) infection (CDI) in a University Hospital of Split from 1 January to 31 December 2017.

Material and methods: Data base of the Department of Clinical Microbiology was retrospectively examined and all patients with a first episode of CDI were enrolled in the study. Patients demographic data and microbiological characteristics of *C. difficile* strains were analyzed. Cases of recurrent infections were recorded without additional characterization of *C. difficile* strains. Chi-square (χ^2) test was used to examine significant differences among demographic data (sex, age, hospital and community onset) and toxigenic *C. difficile* strains with and without active production of toxins.

Results: In total, 519 different bacterial pathogens were found in patients' stool samples. Among them, *C. difficile* was the most frequent (71%). Primary *C. difficile* infection occurred in 370 patients, while clinically and microbiologically confirmed recurrent infection had 54 (15%) of them. Majority of infections, 236/370 (64%) had hospital occurrence (HO-CDI), while 134/370 (36%) infections occurred in community. Among hospitalised patients, majority were located at the Department for internal medicine (40%), Intensive care units (28%) and Department for infectious diseases (17%). Proportion of female patients (218/370, 59%) was significantly higher in comparison to male (152/370, 41%). Significantly more patients were older than 65 (222/356, 62%) compared to patients aged under 65 (134/356, 38%). Twenty eight (40%) patients were receiving specific therapy for CDI (metronidazole or vancomycin) at the time of diagnosis. Active toxin production was recorded in 291 of 370 positive stool samples. Only toxin A production was detected in 32 (9%) positive samples, only toxin B production in 18 (5%) positive samples, while production of both toxins (A and B) was proven in 241 (65%) positive samples. In the remaining 79 positive stool samples (21%), toxigenic *C. difficile* strain without active production of toxins was detected.

Conclusion: *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) is the most common bacterial cause of diarrhea in University Hospital of Split during the study period. *C. difficile* infections (CDI) occurred mostly among hospital patients older than 65. Female patients were far more

affected than male. Majority of CDI were caused by toxigenic *C. difficile* strain with active toxin production.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marijeta Lozina

Adresa: Krbavska 53, 21 000 Split

Email: lozina.marijeta@gmail.com

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 25. srpnja 1994., Zagreb

Obrazovanje

2001. – 2009. Osnovna škola Garešnica, Garešnica

2009. – 2013. Opća gimnazija Tin Ujević Kutina

2013. – 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Strani jezici: Engleski i njemački jezik