Kliničke i mikrobiološke karakteristike Clostridium difficile infekcija u Kliničkom bolničkom centru Split

Novak, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:347488

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

ANITA NOVAK

KLINIČKE I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE *Clostridium difficile* INFEKCIJA U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT

DOKTORSKI RAD

Split, 2015.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te u Dipartimento di malattie infettive, parassitarie ed immunomediate, Istituto Superiore di Sanità (ISS), u Rimu, u Italiji.

Voditeljica rada:
Izv. prof. dr. sc. Marija Tonkić, prim. dr. med.

Zahvaljujem voditeljici rada, predstojnici Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split, pročelnici katedre za Medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, dragoj izv. prof. dr. sc. Mariji Tonkić, što je prepoznala vrijednost ove disertacije te me svojim mudrim savjetima, idejama i pomoći nesebično vodila kroz njeno ostvarenje.
Zahvaljujem doc. dr. sc. Ani Jerončić na strpljivoj i stručnoj pomoći u ključnim trenucima.
Zahvaljujem članovima Stručnog povjerenstva, prof. dr. sc. Emiliji Mlinarić-Missoni i prof. dr. sc. Borisu Lukšiću na vrijednim savjetima prilikom završnog oblikovanja disertacije. Osobito se zahvaljujem predsjednici povjerenstva, doc. dr. sc. Nataši Boban, na pažljivom iščitavanju doktorske disertacije, velikom strpljenju, utrošenom vremenu te pozitivnoj energiji i pravim smjernicama u trenucima moje malodušnosti.
Veliko hvala velikoj znanstvenici, kolegici i prijateljici, Patriziji Spigaglia, bez čije znanstvene zainteresiranosti i nesebičnog dijeljenja znanja, ova disertacija ne bi bila izvediva u ovom obliku.
Na koncu, hvala mojoj obitelji, suprugu i kćerkama, na bezgraničnom strpljenju i podršci tijekom višegodišnjeg rada na disertaciji te roditeljima, koji su prepoznali i uvijek podržavali moju želju za znanjem i znanstvenim istraživanjem.

SADRŽAJ

	Popis oznaka i kratica	5
1.	**UVOD**	7
1.1.	***Clostridium difficile***	8
1.1.1.	Mikrobiologija (povijest i klasifikacija)	8
1.1.2.	Životni ciklus	10
1.2.	***Clostridium difficile* infekcija (CDI)**	11
1.2.1.	Patogeneza	11
1.2.2.	Rizični čimbenici za nastanak CDI	13
1.2.3.	Klinička prezentacija CDI	14
1.2.4.	Epidemiologija CDI	15
1.2.5.	Hipervirulenti PCR-ribotip 027	18
1.2.6.	Značaj ostalih PCR-ribotipova	19
1.2.7.	Ekonomski značaj	20
1.2.8.	Dijagnostika	21
1.2.9.	Liječenje	22
1.2.10.	Mjere prevencije	24
2.	**CILJEVI I HIPOTEZE**	26
3.	**METODE ISTRAŽIVANJA**	29
3.1.	**Ustroj istraživanja**	30
3.2.	**Ishod istraživanja**	30
3.3.	**Ispitanici (kriteriji uključenja i isključenja)**	31
3.4.	**Izolati (kriteriji uključenja i isključenja)**	31
3.5.	**Postupci**	32
3.5.1.	Testiranje stolice na prisustvo toksina *C. difficile*	32
3.5.2.	Izolacija *C. difficile*	32
3.5.3.	Identifikacija *C. difficile*	32
3.5.4.	Ispitivanje osjetljivosti sojeva *C. difficile* na antibiotike	33
3.5.5.	Prikupljanje i analiza demografskih i kliničkih podataka oboljelih od CDI	34

3.5.6. Molekularna tipizacija sojeva *C. difficile* 35
3.5.6.1. *Klasična PCR-ribotipizacija na agaroznom gelu* 35
3.5.6.2. *Ribotipizacija kapilarnom gel elektroforezom* 36
3.6. Statistički postupci 37
4. REZULTATI 39
4.1. Demografski i epidemiološki podatci 40
4.2. Osnovne bolesti od kojih su bolovali ispitanici prije nastanka CDI 42
4.3. Laboratorijski i klinički nalazi ispitanika prilikom dijagnosticiranja CDI 44
4.4. Liječenje provedeno u ispitanika prije nastanka CDI 44
4.5. Specifično liječenje i ishod CDI 46
4.6. Rezultati genotipizacije izolata *C. difficile* 47
4.7. Osjetljivost izolata *C. difficile* na testirane antibiotike 50
4.8. Ponavljajuće i teške CDI 52
4.9. Povezanost čimbenika rizika s nastankom teških i ponavljajućih CDI 55
4.10. Povezanost prethodne primjene antibiotika i nastanka otpornosti na antibiotike 56
5. RASPRAVA 57
6. ZAKLJUČCI 68
7. SAŽETAK 70
8. SUMMARY 72
9. POPIS LITERATURE 74
10. ŽIVOTOPIS 90

POPIS OZNAKA I KRATICA

ADP - riboziltransferaza – adenozin difosfat ribziltransferaza

APACHE – *engl.* Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation

CA-CDI – *engl.* community-associated-CDI

CDC – *engl.* Center for Disease Control and Prevention

CDI – *C. difficile* infekcija

CIP – ciprofloksacin

CLI – klindamicin

CLSI – *engl.* Clinical Laboratory Standards Institute

CO-CDI – *engl.* community-onset-CDI

CRP – C-rektivni protein

DDD – definirana dnevna doza

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ECDC – *engl.* European Centre for Disease Prevention and Control

ECDIS – *engl.* European *C. difficile* Infection Study

EIA – *engl.* enzyme immunoassay

ERY - eritromicin

ESCMID – *engl.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ET – *engl.* ethanol method

FAM - karboksilfluorescein

FMT – *engl.* faecal microbiota transplantation

GAT - gatifloksacin

GDH – glutamat dehidrogenaza

GJIL – gastrointestinalna jedinica intenzivnog liječenja

HA-CDI – *engl.* healthcare-associated-CDI

HAI – *engl.* healthcare-associated infections

HO-CDI – *engl.* healthcare-onset-CDI

I – *engl.* intermediate

IBD – *engl.* Inflammatory Bowel Disease

JIL – jedinica intenzivnog liječenja

KBC – Klinički bolnički centar

LVX – levofloksacin

MDR – *engl.* multidrug-resistance

MEM - meropenem

MZ – metronidazol

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MLST – *engl.* multilocus sequence typing

MRSA – meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*

MXF - moksifloksacin

NAAT – *engl.* nucleic acid amplification test

NJIL – neurokirurška jedinica intenzivnog liječenja

NPV – negativna prediktivna vrijednost

PCR – *engl.* polymerase chain reaction

PFGE – *engl.* pulsed-field gel electrophoresis

PMK – pseudomembranski kolitis

PPS – *engl.* point prevalence study

R – *engl.* resistant

REA – *engl.* restriction endonuclease analysis

RIF - rifampicin

RTC – *engl.* randomized double-blind trial

S – *engl.* susceptible

TZP – piperacilin-tazobaktam

VAN – vankomicin

WEBRIBO – *engl.* Web-based PCR-ribotyping software

1. UVOD

1.1. *Clostridium difficile*

1.1.1. Mikrobiologija (povijest i klasifikacija)

Klostridiji su sporogeni, anaerobni gram-pozitivni bacili čije je prirodno stanište zemlja i probavni sustav životinja i ljudi, gdje žive kao saprofiti. Unutar roda *Clostridium* spp. nalazi se više od 190 vrsta koje pripadaju porodici *Clostridiaceae.* Dijele se u grupe prema sposobnostima fermentacije ugljikohidrata i razgradnje bjelančevina. Patogene vrste klostridija imaju sposobnost stvaranja toksina te uzrokuju smrtonosne infekcije poput botulizma, tetanusa, plinske gangrene i pseudomembranskog kolitisa (1).

Vrsta *Clostridium difficile* je prvi put izolirana i identificirana 1935. iz uzoraka stolice zdrave novorođenčadi. Prvotno je nazvana *Bacillus difficilis,* zbog tipične štapićaste morfologije i kompliciranе anaerobne kultivacije i identifikacije (2). Dokazano je da može stvarati toksin koji je smrtonosan za zamorce nakon intraperitonealne inokulacije, a gotovo je jednake jačine kao botulinum toksin.

Idućih godina, *C. difficile* je izoliran iz različitih humanih uzoraka, ali bez jasnog dokaza o povezanosti produkcije toksina i nastanka bolesti. Stoga se dugo smatralo da ovaj toksin nije značajan u patogenezi humanih infekcija (3).

Godina 1974. bila je prekretnica u razumijevanju patogeneze infekcija koje uzrokuje *C. difficile.* Neovisna istraživanja engleskih i američkih znanstvenika pružila su nedvojbene dokaze da je *C. difficile* značajan u nastanku postantibiotskih proljeva ljudi.

Do prvih značajnih rezultata došli su Green i suradnici koji su svojim pokusima dokazali postojanje citotoksina u stolici zamoraca koji su nakon davanja penicilina dobili proljeve (4). Istovremeno, Tedesco i suradnici, otkrivaju snažnu povezanost između liječenja klindamicinom i nastanka pseudomembranskog kolitisa (PMK). Klinički slučajevi pseudomembranskih lezija debelog crijeva se sporadično opisuju u medicinskoj literaturi počevši od 1893. Izvještaji postaju učestaliji uvođenjem antibiotske terapije (6, 7). U prospektivnoj studiji Tedesco-a i suradnika, od ukupno 200 pacijenata koji su liječeni klin-

damicinom, 42 pacijenta (21 %) su dobila proljeve, a 20 pacijenata (10 %) je razvilo endoskopski dokazan PMK. Klindamicinski kolitis je uskoro postao sinonim za pseudomembranski kolitis (5). U to vrijeme, *Staphylococcus aureus* je bio opće prihvaćeni uzročnik postantibiotskog ili postoperacijskog enterokolitisa jer se često mogao izolirati iz stolice oboljelih (8, 9). U prilog teoriji stafilokoknog enterokolitisa išla je i činjenica uspješnog liječenja peroralnim vankomicinom (10). Suprotno ovim shvaćanjima, Tedesco i suradnici nisu uspjeli dokazati *S. aureus* u stolici oboljelih. To je navodilo na zaključak da je za nastanak bolesti odgovaran neki drugi mikrobiološki ili kemijski čimbenik.

Tijekom svojih istraživanja, Tedesco i Green nisu poznavali etiološku podlogu svojih opažanja. Za to vrijeme, u Engleskoj, pod mentorstvom profesora Oakley-a, poslijediplomski student, dr. Hafiz, dovršava svoja istraživanja za potrebe doktorske disertacije o *C. difficile.* Nije znao da je bakterija koju istražuje odgovorna za nastanak simptoma koje su u ljudi i zamoraca opisali Tedesco i Green. Hafiz je otkrio sastavni dio kapsule bakterije, glutamat dehidrogenazu (GDH), koji je danas poznat kao zajednički antigen svih izolata *C. difficile* (11). Otkrio je i široku distribuciju *C. difficile* u prirodi te u stolici različitih životinja (konji, magarci, deve).

Nekoliko godina kasnije, Bartlett i suradnici su opisali klindamicinom izazvani kolitis u hrčaka i izolirali neidentificiranu vrstu klostridija iz stolice simptomatskih životinja (12). Kasnijim istraživanjima je dokazano da je ta bakterijska vrsta bila *C. difficile.*

Ubrzo, Larson i suradnici dokazuju postojanje citotoksina u stolici pacijenata s histološki dokazanim PMK (13).

Konačno, 40-tak godina nakon prve izolacije *C. difficile*, Larson i suradnici dokazuju uzročnu povezanost toksigenih sojeva *C. difficile* i postantibiotskih proljeva te svoja saznanja objavili u Lancetu, 1978. (14).

Danas je *C. difficile* najčešći uzročnik bolničkih proljeva u industrijski razvijenim zemljama (15), a u porastu su incidencija, obolijevanje, smrtnost kao i težina kliničke slike *C. difficile* infekcija (CDI) (16). Osim u ljudi, uzrokuje crijevne infekcije različitih životinjskih vrsta (psi, mačke, konji, ptice i štakori) što ih čini mogućim rezervoarom humanih infekcija. (17).

1.1.2. Životni ciklus

Životni ciklus *C. difficile* sastoji se od dvije faze, vegetativne i sporogene. Na Slici 1 prikazan je karakterističan izgled gram-pozitivnih bacila *C. difficile* s endosporama. Prijenos se odvija feko-oralnim putem. Nakon unošenja, vegetativne stanice budu brzo razgrađene i eliminirane. Suprotno njima, spore, uz pomoć žučnih soli, nesmetano klijaju u tankom crijevu te se u debelom crijevu uzastopno dijele i umnožavaju (18). Vegetativni oblici se iz organizma izlučuju stolicom i u nepovoljnim uvjetima ponovo sporuliraju. Budući su spore otporne na želučanu kiselinu, zagrijavanje, sušenje i mnoga baktericidna sredstva, godinama preživljavaju u okolišu i imaju ključnu ulogu u širenju *C. difficile* (18, 19, 20, 21).



Slika 1. Mikroskopski preparat kulture *C. difficile*, bojenje po Gramu (svjetlosni mikroskop, povećanje 1 000x)

1.2. *Clostridium difficile* infekcija (CDI)

1.2.1. Patogeneza

Primarni izvor zaraze su kolonizirani ili zaraženi pacijenti, zdravstveni djelatnici i zagađene površine bolničkih odjela (22). Bliski kontakt sa zaraženim ili koloniziranim pacijentom, feko-oralnim putem, najznačajniji je put prijenosa infekcije.

Za nastanak CDI, potrebno je ispuniti dva uvjeta. Prvi je poremećaj fiziološke flore i izostanak odgovarajuće imunološke reakcije, a drugi je prisutnost toksigenog soja *C. difficile* u crijevima bolesnika.

Fiziološka mikroflora debelog crijeva (crijevna mikrobiota) čini prvu liniju obrane od kolonizacije *C. difficile.* Promjena u sastavu crijevne mikroflore, najčešće zbog izloženosti širokom spektru antibiotika, mijenja uvjete okoliša i omogućuje umnožavanje *C. difficile* koji je otporan na većinu antibiotika.

Poznato je nekoliko faktora virulencije koji sudjeluju u kemotaksiji i adherenciji *C. difficile* na crijevne stanice: izvanstaniče organele za pokretanje (*lat.* flagella), proteolitički enzimi, proteini površinskog sloja (*engl.* surface layer proteins) i stvaranje parakrezola (23, 24, 25, 26).

Najznačajniji faktori virulencije *C. difficile* su toksini. Patogeni sojevi mogu stvarati dva snažna egzotoksina, toksin-A (TcdA, 308-kDa enterotoksin) i toksin-B (TcdB, 270-kDa citotoksin). Građeni su kao veliki, jednolančani proteinski lanci koji imaju tri funkcionalne regije (za aktivnost toksina, translokaciju i vezanje za ciljnu stanicu). Na razini aminokiselina pokazuju 63 % homologije. Djeluju sinergistički, budući da učinak toksina-B najčešće ovisi o staničnom oštećenju uzrokovanom djelovanjem toksina-A (27). Većina enteropatogenih izolata istovremeno stvara oba toksina, iako postoje i toksin-A negativni izolati (A^-B^+) pa se pretpostavlja da toksin-B može imati neovisnu ulogu u patogenezi CDI. Toksini se vežu na površinske receptore stanica debelog crijeva, ulaze u njih, uzrokuju zaokruživanje, apoptozu i smrt. Kataliziraju glikozilaciju citoplazmatskih Rho-proteina, narušavaju aktinski citoskelet i uništavaju proteine međustaničnih veza.

Aktiviraju crijevne makrofage i mastocite, potiču produkciju medijatora upale, povećavaju propusnost sluznice, izlučivanje tekućine i nastanak krvarenja (28). Neuspjeh u stvaranju serumskih protutijela, imunoglobulina G (IgG) na toksin A, značajno je povezan s nastankom prve epizode CDI, ali i ponavljajućim CDI (29).

Neki sojevi *C. difficile* (otprilike 10 % izolata), mogu stvarati treći, binarni toksin, koji je češći u hipervirulentnih sojeva (30). Binarni toksin se sastoji od dva proteinska lanca koja nisu međusobno povezana, ali oba pokazuju aktivnost toksina. Sudjeluje u adherenciji i kolonizaciji *C. difficile* kao aktin-specifična adenozin-difosfat (ADP)-riboziltransferaza, stimulirajući protruziju stanica domaćina na razini mikrotubula. Iako uloga binarnog toksina u patogenezi CDI nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da pojačava učinak toksina A i B (31).

U pokusima na hrčcima, otkriveno je da izolati *C. difficile* koji nemaju sposobnost stvaranja toksina A i B, već isključivo binarnog toksina (A^-B^- sojevi), ne mogu uzrokovati kliničke simptome (proljeve) kao ni smrt zaraženih životinja (32).

Stvaranje toksina A i B kodiraju dva glavna (tcdA i tcdB) te tri pomoćna gena (tcdR, E i C). Smješteni su u velikoj kromosomskoj PaLoc regiji (*engl.* pathogenicity locus) od 19 600 baznih parova (*engl.* base pairs, bp). Geni cdtA i cdtB kodiraju nastanak binarnog toksina, a smješteni su u zasebnoj kromosomskoj regiji, izvan PaLoc regije.

Sojevi u kojih je PaLoc regija zamijenjena sa sekvencijom od 115 bp su netoksigeni izolati i nemaju sposobnost stvaranja simptomatske CDI (33).

Nedavno je sekvencioniran genom višestruko otpornog i virulentnog *C. difficile* soja 630. Sastoji se od jednog okruglog kromosoma od 4 290 252 bp i jednog plazmida od 7 881 bp. Velika proporcija mobilnih genetskih elemenata (11 %) je možda odgovorna za antimikrobnu otpornost, virulenciju, površinske strukture i interakciju sa stanicama domaćina (34).

1.2.2. Rizični čimbenici za nastanak CDI

C. difficile je oportunistički patogen. Može se kultivirati iz stolice 3 % zdravih odraslih osoba te 80 % zdrave novorođenčadi i djece. Odatle proistječe pretpostavka da nije patogen u mlađoj životnoj dobi, iako tu pretpostavku treba znanstveno provjeriti, jer sve više ima izvješća o slučajevima CDI u djece (35, 36). Crijevna kolonizacija značajno raste (na 16-35 %) među bolničkim pacijentima, proporcionalno s brojem bolničkih dana i antibiotskim liječenjem (37). Deset do 30 % oboljelih od CDI ostaje kolonizirano nakon liječenja (22, 38).

Za nastanak CDI, značajni su svi čimbenici koji dovode do poremećaja crijevne mikrobiote. Najčešće su to antibiotici, želučano-crijevne operacije, citotoksična kemoterapija, IBD, crijevne infekcije druge etiologije, uporaba nazogastrične sonde, lijekovi koji smanjuju produkciju želučane kiseline (blokatori histaminskih receptora i protonske pumpe). Učinak antibiotika ovisi o primjenjenoj dozi, trajanju terapije, spektru djelovanja, koncentraciji koju postiže u crijevima i o aktivnosti prema *C. difficile*. Većina slučajeva CDI se klinički prezentira za vrijeme ili kratko nakon primjene antibiotika, iako simptomi CDI mogu nastati i do 3 mjeseca nakon prestanka antibiotskog liječenja.

Dodatni učinak ima narušeno opće zdravlje i imunološki status pacijenta koji doprinose nastanku teške kliničke slike i ponavljajućih infekcija, zbog smanjene sposobnosti učinkovitog imunološkog odgovora. Takva stanja su: prirođena ili stečena imunosupresija, životna dob iznad 65 godina, akutne i kronične bolesti, boravak u jedinici intenzivnog liječenja (JIL), produljeno bolničko liječenje, peripartalni period (16).

Ukoliko izostane oporavak crijevne mikroflore i optimalni imunološki odgovor na *C. difficile* (i njegove toksine), a spore perzistiraju u crijevima oboljeloga, dolazi do ponavljanja infekcije (39). Rizični čimbenici za nastanak ponavljajućih (rekurentnih) infekcija su ranije CDI (stopa incidencije je 50 % nakon druge epizode CDI, čak i nakon provedenog liječenja) te svi oni čimbenici koji su bili odgovorni za nastanak prve epizode CDI (najvažniji su starija životna dob, primjena antibiotika i neučinkovit imunološki odgovor na toksine). Vjerojatno i specifično antibiotsko liječenje CDI, samo po sebi, dodatno produžava i pogoršava neravnotežu i osjetljivost crijevne mikrobiote.

1.2.3. Klinička prezentacija CDI

CDI se može prikazati na različite načine, od asimptomatskog kliconoštva preko blagih i umjerenih proljeva do teškog kolitisa sa smrtnim ishodom.

Glavni prepoznatljivi simptom CDI su profuzni proljevi (najmanje tri stolice dnevno, ponekad i noću) praćeni bolnim grčevima i osjećajem nelagode u donjem trbuhu. Stolica je zelenkasta, vodenasta, smrdljiva te može imati primjese sluzi i svježe krvi. Melena i hematokezija nisu tipični (40). Infekcija je često praćena blagim sistemskim simptomima kao što su umjerena vrućica i leukocitoza (35).

Iako upala može zahvatiti bilo koji dio debelog crijeva, obično je teža i češća u distalnom kolonu i rektumu. Kod upale uzlaznog dijela debelog crijeva, proljevi obično izostaju ili su vrlo blagi. Štoviše, u tim je slučajevima smanjena crijevna peristaltika, a jedini simptomi su jaki desnostrani trbušni bolovi praćeni značajnom leukocitozom i vrućicom. Rijetko uzrokuje ileitis i to u kolektomiranih pacijenata (41).

Pseudomembranski kolitis je jedna od najtežih kliničkih prezentacija CDI. Prisutan je u gotovo polovice potvrđenih slučajeva pa se smatra patognomoničnim znakom CDI (42).

Ponekad CDI započne kao dijarealna bolest koja napreduje do megakolona i ileusa, što uzrokuje dnevno smanjenje broja stolica i pogrešno se može interpretirati kao kliničko poboljšanje. Ukoliko nastupi poremećaj crijevne peristaltike i paralitički ileus, dolazi do distenzije crijeva i izostanka proljeva (otprilike 1 % svih CDI slučajeva) što odgađa postavljanje dijagnoze (43). Toksični megakolon je najteža, životno ugrožavajuća komplikacija CDI (44).

Opisani su rijetki slučajevi artalgija i reaktivnog artritisa. U pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva (IBD), klinički znakovi i simptomi akutne CDI mogu nalikovati osnovnoj bolesti i biti pogrešno interpretirani kao njena aktivacija ili progresija.

Teška CDI se prezentira nizom kliničkih znakova kompliciranog kolitisa (vrućica, hemodinamska nestabilnost, ukočenost, znakovi peritonitisa ili ileusa, leukocitoza, skretanje u lijevo, porast serumskog kreatinina, visoke serumske vrijednosti laktata, nastanak pseudomembranskog kolitisa, rastezanje i povećanje volumena debelog crijeva, zadebljanje i nakupljanje masti oko stijenke crijeva, ascites nepoznatog uzroka). CDI bez ovih znakova se također može smatrati teškom infekcijom, ukoliko se radi o osobama s zna-

čajnim komorbiditetom, imunokompromitiranim pacijentima i onima koji se liječe u jedinicama intenzivnog liječenja (44).

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 CDI 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 toksin-producirajućeg soja *C. difficile* u stolici (44). Ne postoji generalno prihvaćen vremenski period definiranja rponavljajuće CDI, iako je prema ESCMID-u ograničen na 8 tjedana od prve epizode CDI (36). Rekurencija je česta, čak 25 % CDI se ponavlja unutar 30 dana od provedenog liječenja. Može biti relaps (infekcija uzrokovana istim sojem) ili reinfekcija (infekcija uzrokovana sojem različitim od onog koji je uzrokovao prvu epizodu).

1.2.4. Epidemiologija CDI

Prema mjestu nastanka simptoma, CDI se dijele na bolničke i izvanbolničke (*engl.* healthcare-onset, HO-CDI i *engl.* community-onset, CO-CDI). Bolničke infekcije su one čiji je početak simptoma nastupio u bolnici, a izvanbolničke one čiji je početak nastupio izvan bolničkih ustanova. Nadalje, CDI se dijele prema povezanosti s bolničkim liječenjem (*engl.* healthcare-associated CDI, HA-CDI i *engl.* community-associated CDI, CA-CDI). Slučaj HA-CDI je definiran pojavom simptoma u bolnici najmanje 48 sati nakon prijema, ili, unutar 4 tjedna nakon otpuštanja iz bolnice. Slučaj CA-CDI se definira pojavom simptoma izvan bolnice ili unutar prvih 48 sati bolničkog liječenja, ukoliko pacijent nije boravio u bolnici unatrag 12 tjedana. Ukoliko je pacijent otpušten iz bolnice 4-12 tjedana prije nastanka simptoma, ne možemo sa sigurnošću zaključiti radi li se o HA-CDI ili o CA-CDI (*engl.* unknown, nepoznato) (36).

Epidemiologija CDI se drastično promijenila u zadnjih 10 godina. Porast stope incidencije i težine kliničke slike, prvo su zabilježeni u Kanadi i SAD-u te vrlo brzo i u Europi (45, 16). Nekada povremene nuspojave antibiotskog liječenja, danas su *C. difficile* infekcije učestalije dva, odnosno četiri puta od infekcija koje u bolnicama Ujedinjenog

Kraljevstva (UK) i Njemačke uzrokuje meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus,* MR-SA, a *C. difficile* je najčešći uzročnik bolničkih proljeva (46, 47).

Porastu stope incidencije CDI u bolnicama doprinijelo je povećanje proporcije bolničke populacije starije od 65 godina, neracionalna primjena antibiotika širokog spektra, pojava novih hipervirulentnih genotipova (PCR-ribotipova 027 i 078, *engl.* polymerase chain reaction ribotyping) te neadekvatna primjena mjera kontrole i suzbijanja bolničkih infekcija (36, 48, 49, 50). Štoviše, incidencija CDI raste i u nekad niskorizičnoj populaciji (trudnice, mlađe odrasle osobe bez kroničnih bolesti i izvanbolnička populacija) (51, 52).

U studenom 2008. provedena je velika europska studija s ciljem prikupljanja što detaljnijih informacija o CDI u europskim državama, kako bi se unaprijedila dijagnostika i nadzor CDI. Istraživanje je obuhvatilo 34 europske države (uključujući Hrvatsku), a prikupljeno je 395 *C. difficile* izolata. Incidencija CDI (kao i stopa testiranja za CDI) se značajno razlikovala među državama, od 0,0 do 36,3 CDI slučaja na 10 000 pacijent-dana (*engl.* patient-days) te srednjom stopom incidencije 4,1. Stopa incidencije je bila relativno niska u Španjolskoj, Francuskoj i Italiji, a značajno viša u Skandinaviji, Irskoj i UK (16). Ova studija je potvrdila povezanost starije životne dobi (>65 godina), teškog komorbiditeta i prethodne antibiotske terapije s nastankom CDI te povezanost životne dobi iznad 65 godina, plućnih bolesti, fluorokinolonskih antibiotika te PCR-ribotipova 018 i 056 s nepovoljnim kliničkim ishodom i smrću.

Prema američkom Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (*engl.* Center for Disease Control and Prevention, CDC), *C. difficile* se nalazi na prvom mjestu liste najopasnijih višestruko otpornih bakterija čije infekcije zahtjevaju neodgodivu javnozdravstvenu intervenciju, a grupirane su prema utjecaju na ljudsko zdravlje, učestalosti i brzini širenja, mogućnostima prevencije i liječenja, ekonomskim posljedicama i procjeni učestalosti infekcije u idućih deset godina (53).

Europska društva, ESCMID i ECDC (*engl.* European Centre for Disease Prevention and Control) naglašavaju potrebu stalnog znanstvenog istraživanja CDI te potrebu suradnje i razmjene znanstvenih informacija u cijelom svijetu kako bi se unaprijedila dijagnostika, liječenje i prevencija tih infekcija.

U epidemiološkim istraživanjima *C. difficile* infekcija se koriste različite molekularne metode tipizacije *C. difficile* izolata: genotipizacija toksina (*engl.* toxynotyping based on sequence data of toxin A and B), PCR-ribotipizacija (*engl.* PCR-ribotyping), elektroforeza u pulsirajućem gelu (*engl*. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), metoda multilokusnog sekvencijskog tipiziranja (*engl*. multilocus sequence typing, MLST) i analiza restrikcijske endonukleaze (*engl*. restriction endonuclease analysis, REA).

Genotipizacija toksina je postupak detekcije polimorfizma PaLoc regije genoma *C. difficile* (tcdA, tcdB i susjednih regulacijskih gena), dok se PCR-ribotipizacija zasniva na određivanju razlika profila dobivenih PCR umnožavanjem regija genoma između 23S i 16S rRNA. MLST je metoda koja se danas smatra zlatnim standardom za određivanje strukture i genetičke pripadnosti unutar neke vrste. Zbog svoje genetičke uniformnosti, čini se da je *C. difficile* idealna vrsta za otkrivanje i praćenje pojave različitih tipova sekvencija (*engl.* sequence types, STs) MLST analizom. Prema rezultatima MLST analize napravljene na velikom uzorku izolata *C. difficile* sakupljenih u različitim studijama, otkriveno je da *C. difficile* izolati potječu iz pet različitih loza, od kojih se, generalno gledano, četiri podudaraju s najznačajnijim PCR-ribotipovima (PCR-ribotip 027, 017, 023, 078) dok peta loza čini veliku grupu sojeva koji uključuju sve preostale PCR-ribotipove.

Najčešće korištena metoda u Europi je PCR-ribotipizacija, a PFGE u SAD-u. Kardifski referentni laboratorij za anaerobne bakterije posjeduje kolekciju od preko 427 različitih PCR-ribotipova *C. difficile.*

Neki PCR-ribotipovi se povezuju s nastankom teže kliničke slike i ponavljajućih infekcija, a genotipizacija epidemijskih sojeva je nezamjenjiva metoda za otkrivanje izvora i praćenje širenja epidemije.

1.2.5. Hipervirulentni *C. difficile* PCR-ribotip 027; PFGE tip NAP1; REA tip B1; toksinotip III

Prva epidemija CDI s neuobičajeno teškom kliničkom slikom i visokim rizikom kliničkog ponavljanja, zabilježena je u ožujku 2003. u Kanadi (Montreal i Južni Quibec). Do siječnja 2005. incidencija je porasla pet puta u odnosu na dotadašnji prosjek, a stopa smrtnosti je iznosila 7,9 %. Iz uzoraka oboljelih pacijenata izoliran je novi, hipervirulentni soj *C. difficile* (PCR-ribotip 027 i toksinotip III). Izolirani soj je bio otporan na fluorokinolone (82,2 % izolata), a gene za sintezu binarnog toksina i parcijalnu deleciju tcdC gena imalo je 84,1 % izolata. (54, 55).

Istovremeno, američki CDC bilježi dvostruki porast prijavljenih bolničkih slučajeva CDI, brzo geografsko širenje epidemije (unutar 6 američkih država) te visoku stopu morbiditeta i mortaliteta. Iz stolice oboljelih je izoliran, do tada, rijedak soj *C. difficile,* otporan na fluorokinolone, s genetičkom varijacijom (delecija tcdC lokusa), hiperprodukcijom toksina A i B te produkcijom binarnog toksina. Genotipizacijom je svrstan u REA grupu B1 te PFGE tip NAP1 (56).

Hipervirulentni PCR-ribotip 027 je bio rijetko izoliran u Europi sve do listopada 2003. Prva europska epidemija je zabilježena u Stoke Mandeville-u (Ujedinjeno Kraljevstvo, UK) u razdoblju od listopada 2003. do lipnja 2004. Prijavljena su 174 slučaja CDI i 11 % smrtnih ishoda. U drugoj epidemiji, od listopada 2004. do lipnja 2005. zabilježeno je 160 novih slučajeva CDI i 12 % smrtnih ishoda (57).

U srpnju 2005. i veljači 2006., zabilježene su prve nizozemske epidemije CDI uzrokovane PCR-ribotipom 027, toksinotipom III (58, 59). U drugoj epidemiji je prijavljeno 22 % smrtnih ishoda te 19 % relapsa. Ubrzo su zabilježene prve epidemije u Belgiji (rujan 2005.) i u Francuskoj (ožujak 2006.) (60, 61). Nedugo zatim stižu i prva izvješća o izolaciji hipervirulentnog PCR-ribotipa 027 iz mnogih drugih zemalja (Australija, Koreja, Japan, Hong Kong i Latinska Amerika) (62, 63, 64, 65).

Iako su izolati *C. difficile* iz UK, Sjeverne Amerike i Kanade genotipizirani različitim molekularnim metodama (PCR-ribotipizacija, REA i PFGE), dokazano je da svi pripadaju istom epidemijskom soju. Svrstani su u grupu BI (REA metodom), NAP1

(PFGE metodom), PCR-ribotip 027 (PCR-ribotipizacijom) te su dobili zajednički naziv: BI/NAP1/027 epidemijski soj.

Pacijenti zaraženi PCR-ribotipom 027 imaju znatno teži klinički tijek bolesti, višu smrtnost i mnogo češće ponavljajuće infekcije u odnosu na pacijente inficirane drugim PCR-ribotipovima. Smatra se da su hipervirulencija i visoka stopa ponavljajućih infekcija uzrokovanih ovim PCR-ribotipom posljedica izlaganja pacijenata fluorokinolonima prije nastanka CDI, stvaranja većih koncentracija toksina (16 puta više toksina A i 23 puta više toksina B) kroz dulje vrijeme te pojačane sporulacije u odnosu na druge PCR-ribotipove (56). Sve nabrojeno ujedno povećava rizik širenja infekcije.

Na molekularnoj razini, PCR-ribotip 027 ima 18-bp deleciju i mutaciju na poziciji 117 *tcd*C gena. Posljedica te mutacije je stvaranje oštećenog, nefunkcionalnog proteina što vjerojatno dovodi do poremećaja regulacije ekspresije toksina A i B te se oni pojačano stvaraju u logaritamskoj fazi rasta bakterije, a to se povezuju s nastankom teške kliničke slike (67).

PCR-ribotip 027 je prvi puta identificiran 1998., a izoliran je iz stolice pacijenta oboljelog od pseudomembranskog kolitisa 1985. godine. Novi hipervirulentni PCR-ribotip 027 se genetski razlikuje od ovog povijesnog izolata. Pretpostavlja se da bi promjene na molekularnoj razini mogle biti povezane s eksplozivnim epidemijskim širenjem ovog visoko virulentnog soja na globalnoj razini.

1.2.6. Značaj ostalih PCR-ribotipova

Nekada se smatralo da je isključivo toksin A odgovoran za nastanak kliničkih simptoma CDI. Međutim, u posljednjem desetljeću zabilježene su epidemije teške CDI uzrokovane toksin A^-B^+ sojevima u Sjevernoj Americi, Europi i Aziji. Usporedbom A^-B^+ sojeva izoliranih u Velikoj Britaniji (VB), Belgiji i SAD-u otkriveno je da većina ovih izolata pripada PCR-ribotipu 017, dok ostali izolati pripadaju PCR-ribotipovima 110, 036 i 047 (68). PCR-ribotip 017 je kasnije izoliran s visokom prevalencijom u istočnoj Europi i azijsko-pacifičkim regijama (Poljska, Irska, Kina, Koreja, Argentina, Japan i Izrael). Zbog težine kliničke slike (koja je gotovo jednako teška kao ona uzrokovana PCR-

ribotipom 027) i visoke prevalencije u nekim državama, važno je njihovo prepoznavanje i praćenje.

C. difficile često kolonizira probavni sustav i uzrokuje infekcije u domaćih životinja i stoke. PCR-ribotip 078 je najčešće izolirani PCR-ribotip u svinja, teladi i konja te najčešći PCR-ribotip koji kontaminira hranu namijenjenu ishrani ljudi, uključujući ribe i plodove mora (69, 70, 71). Infekcije uzrokovane ovim PCR-ribotipom se prezentiraju sličnom težinom kliničke slike kao i infekcije uzrokave PCR-ribotipom 027. Iako ne postoje dokazi da je *C. difficile* patogen koji se prenosi hranom, PCR-ribotip 078 izoliran iz oboljelih ljudi i životinja je genetski gotovo identičan, što navodi na zaključak da za ovaj soj ne postoji međuvrsna barijera te nalaže potrebu nadzora životinjskih izolata (72).

Konačno, velike europske studije, pokazale su različitu geografsku distribuciju i prevalenciju kliničkih PCR-ribotipova *C. difficile* s različitom prezentacijom i težinom simptoma što također nalaže potrebu stalne izolacije, identifikacije i genotipizacije izolata *C. difficile* (16, 73).

1.2.7. Ekonomski značaj

CDI uzrokuju značajno dodatno ekonomsko opterećenje zdravstvenog sustava zbog potrebe za produženim bolničkim boravkom, simptomatskim i specifičnim liječenjem te provođenjem mjera prevencije širenja (dekontaminacija okoliša te, u slučajevima epidemije, izolacija, kohortiranje i privremeno zatvaranje odjela). Iako antibiotska terapija za liječenje blagih do umjerenih CDI ovisi o lokalnim protokolima i može varirati od države do države, ona predstavlja tek manji dio ukupnih dodatnih troškova (otprilike 1 %) u usporedbi s mjerama prevencije širenja infekcije (74). Nasuprot blagim, kompliciranе i rekurentne CDI stvaraju veće troškove zbog liječenja antibioticima rezerve te kirurškog zbrinjavanja i postoperativne njege. Sistematski pregledni članci pokazuju da su troškovi liječenja rekurentnih infekcija veći čak tri puta u odnosu na troškove liječenja prve epizode CDI (75). Oboljeli od CDI provedu prosječno 7-21 dodatnih dana u bolnici, u usporedbi s neinficiranim pacijentima. Upravo se povećanje broja bolničkih dana smatra najznačajnijim uzrokom povećanja troškova liječenja (76).

Za liječenje CDI se u Europskoj Uniji (EU) potroši oko 3 milijarde eura godišnje, a očekuje se da će troškovi drastično rasti povećanjem proporcije najrizičnije populacije tj. ljudi starijih od 65 godina (procjenjuje se da će ih do 2050. biti 134,5 milijuna) (36). U nedavno objavljenoj studiji Vonberga i suradnika, prosječan iznos cjelokupne zdravstvene skrbi za jednog pacijenta oboljelog od CDI je bio 33 840 eura, što je značajno više od iznosa potrošenog za skrb neinficiranog bolesnika (18 981 eura). Dodatni trošak liječenja po pacijentu, prouzročen isključivo CDI, također je bio značajno viši u odnosu na kontrolu (prosječno 7 147 eura, s rasponom pouzdanosti od 4 067 do 9 276 eura) (76).

1.2.8. Dijagnostika CDI

Točna i pouzdana mikrobiološka dijagnostika CDI je nezamjenjiva u ranom prepoznavanju i identificiranju oboljelih od CDI. Poteškoća u dijagnostici CDI je postojanje dvaju referentnih standarda, od kojih ni jedan nije prikladan za rutinski laboratorijski rad. Osim toga, ovi standardi detektiraju različite bakterijske komponente i, kao takvi, ne daju direktno usporedive rezultate. Prvi referentni standard je citotoksični test (*engl.* cytotoxin assay) koji dokazuje oslobođene toksine *C. difficile.* Drugi referentni standard je citotoksigena kultura (*engl.* cytotoxigenic culture) koja identificira toksigeni soj, tj. soj koji je sposoban stvarati toksine. Budući da su obje metode relativno spore i tehnički zahtjevne, većina mikrobioloških laboratorija ih ne koristi za svakodnevno testiranje stolice na CDI (15).

ESCMID-ove smjernice preporučuju testiranje isključivo proljevaste stolice pacijenata dvostupanjskim postupnikom. U prvoj fazi dvostupanjskog postupnika se koristi probirni test visoke negativne prediktivne vrijednosti (NPV) kao što je brzi, relativno jeftini i osjetljivi imuno-enzimski test (*engl.* enzyme immunoassay, EIA) za dokaz specifičnog GDH (glutamat-dehidrogenaza) antigena koji je zajednički antigen svim sojevima *C. difficile.* Sve GDH pozitivne uzorke stolice treba, u drugom stupnju, testirati potvrdnim imuno-enzimskim (EIA) ili molekularnim testom (*engl.* nucleic acid amplification test, NAAT) za dokaz *C. difficile* toksina A i B, budući da postoje i sojevi *C. difficile* koji ne stvaraju toksine (15, 16, 77). Molekularni testovi su superiorniji u odnosu na imuno-enzimske testove (imaju veću osjetljivost čak i od oba referentna standarda), ali ne mogu

razlikovati asimptomatsku kolonizaciju toksinogenim sojem od aktivne produkcije toksina i akutne infekcije. Stoga, neki savjetuju primjenu trostupanjskog postupnika, tj. korištenje i molekularnog testa za dokaz toksigene PaLoc regije i EIA test za dokaz toksina A i B. Većina smatra da bi trostupanjski postupnik nepotrebno povećao dijagnostičke troškove te da je za razlikovanje kolonizacije od infekcije dovoljno slijediti osnovno pravilo u dijagnostici CDI, a to je testiranje isključivo proljevaste stolice. Iako je ESCMID publicirao jasne smjernice za dijagnosticiranje CDI, rezultati nedavnih istraživanja pokazuju da se on neprihvatljivo slabo provodi u većini zemalja, koje kao jedini test za dokaz CDI koriste brzi imunoezimski (EIA) test (niske osjetljivosti i specifičnosti) za dokaz *C. difficile* toksina. Zbog nedostatka dosljednosti u nadzoru i dijagnostičkoj prakasi CDI među europskim zemljama, teško je procijeniti stvaran godišnji broj CDI slučajeva. Incidencija laboratorijski potvrđenih CDI slučajeva je vjerojatnije pokazatelj učestalosti testiranja, a ne učestalosti same bolesti (16). Uz to, broj pozitivnih slučajeva značajno ovisi o specifičnosti, osjetljivosti te pozitivnoj i negativnoj prediktivnoj vrijednosti korištene dijagnostičke metode.

Nakon provedenog antibiotskog liječenja CDI, ne radi se kontrolni test (tkz. test izlječenja), jer stopa postinfekcijske kolonizacije može iznositi čak 10-50 %. Štoviše, kolonizacija može imati zaštitnu ulogu ukoliko izazove jaki imunološki odgovor i stvaranje specifičnih protutijela na toksine *C. difficile* (78).

1.2.9. Liječenje CDI

U pacijenata oboljelih od CDI, glavni ciljevi liječenja su što brži nestanak simptoma, obnova fiziološke crijevne mikroflore te uspostavna normalne funkcije crijeva. Prvi korak u liječenju CDI je trenutno ukidanje antibiotske terapije koja je dovela do nastanka simptoma. Ova mjera je učinkovita tek u manjeg broja pacijenata s blagim simptomima CDI, dok je u pacijenata oboljelih od teških osnovnih bolesti i sistemskih infekcija najčešće kontraindicirana i sasvim neprihvatljiva.

U većine pacijenata treba provesti specifično antimikrobno liječenje prema europskim ili američkim smjernicama koje su, u osnovi, gotovo identične. U liječenju prve blage do umjereno teške epizode CDI se koristi peroralni metronidazol, a u slučaju teške

kliničke slike i ponavljajuće infekcije se primjenjuje pulsna terapija vankomicinom (44, 79). Pulsna terapija ima za cilj eradicirati vegetativne stanice *C. difficile* koje su germinirale iz spora, zaostalih nakon antibiotskog liječenja.

Posljednjih godina, sve je više izvještaja o smanjenoj učinkovitosti metronidazola u liječenju CDI. Stopa terapijskog neuspjeha je porasla sa 3 % na prosječno 18 % (raspon od 16 do 38 %) u razdoblju od 1966. do 2005 (37). Iako postoje izvještaji o smanjenoj osjetljivosti sojeva *C. difficile* na metronidazol, smatra se da ona nije jedini uzrok terapijskog neuspjeha, već se vjerojatno se radi o kombinaciji s lošim farmakokinetskim karakteristikama metronidazola, koji se, vrlo brzo nakon peroralne primjene, potpuno resorbira iz crijeva u krv (80, 39).

Zbog slabog terapijskog odgovora na standardnu terapiju te čestih ponavljajućih infekcija, uvode se novi terapijski postupci (fekalna transplantacija i imunoterapija) i nove klase antibiotika u liječenju CDI (81, 82).

Fekalna transplantacija (*engl.* faecal microbiota transplantation, FMT) je transplantacija stolice zdravog donora u crijeva oboljelog od CDI, a koristi se u liječenju višestruko ponavljućih CDI. Ishodi prve provedene multicentrične studije su vrlo optimistični. U studiju je bilo uključeno 77 pacijenata oboljelih od refraktorne, ponavljajuće CDI. U 74 % pacijenata je došlo do potpunog nestanka proljeva unutar 3 dana od provedene FMT (83). Zbog brojnih nedostataka (odabir prikladnog donora, priprema i način davanja transplantata, mogućnost prijenosa patogena različite etiologije), FMT ostaje rezervna metoda liječenja, u slučajevima kada su svi ostali pokušaji liječenja ponavljajućih CDI bili neuspješni.

Imunoterapija humanim monoklonalnim protutijelima na *C. difficile* toksine A i B još je u fazi kliničnih ispitivanja, ali se čini da bi u kombinaciji s antibiotskim liječenjem mogla biti učinkovita u prevenciji nastanka rekurentnih CDI (84).

Fidaksomicin je prvi iz klase novih, makrocikličkih antibiotika čija je baktericidna aktivnost ciljano usmjerena na *C. difficile* te ima minimalni učinak na floru debelog crijeva. Zbog toga dovodi do ranijeg oporavka crijevne mikrobiote i smanjuje rizik kolonizacije i prekomjernog umnožavanja *C. difficile.* Ima odličnu farmakokinetiku u liječenju infekcija probavnog sustava, budući da se nakon peroralne primjene gotovo uopće ne resorbira, već postiže izrazito visoke crijevne koncentracije. U dvije randomizirane dvostruko slijepe stu-

dije (*engl.* randomized double-blind trials, RTC), fidaksomicin se pokazao superiornijim od peroralnog vankomicina u smanjenju broja ponavljajućih infekcija (85).

1.2.10. Mjere prevencije CDI

C. difficile je lako prenosiv i vrlo otporan bolnički patogen pa su mjere prevencije, na lokalnoj i nacionalnoj razini, iznimno značajne u epidemiologiji CDI. Za njihovo uspješno provođenje, potrebno je zajedničko djelovanje zdravstvenih djelatnika različitih specijalnosti i stupnjeva obrazovanja. Jedna od najvažnijih i najučinkovitijih mjera prevencije nastanka CDI je pažljivi nadzor propisivanja antibiotske terapije (*engl.* antimicrobial stewardship). Kontinuiranom edukacijom liječnika i donošenjem jasnih smjernica za antimikrobno liječenje, može se uspješno smanjiti incidencija CDI.

Prva neposredna mjera prevencije širenja CDI je rano postavljanje dijagnoze te prijavljivanje i praćenje novih slučajeva (kako bi se mogla odrediti incidencija, težina kliničke slike, rizični faktori za nastanak infekcije i ishod). Jedno od osnovnih pitanja je kada i od kojih je pacijenata opravdano testirati uzorke stolice na CDI. Stolica se ne testira rutinski na *C. difficile* u većini mikrobioloških laboratorija, već isključivo na zahtjev liječnika. Međutim, sve je više znanstvenika koji se ne slažu s takvom, opće prihvaćenom praksom. Toksine A i B *C. difficile* bi trebalo tražiti sistematski u svim uzorcima stolice bolničkih pacijenata, koji su hospitalizirani duže od 3 dana (*engl.* „3-day rule“). Ovom preporukom se želi naglasiti veća vjerojatnost da su proljevi u ovih pacijenata uzrokovani CDI, nego ostalim uobičajenim izvanbolničkim crijevnim patogenim, kao što su to vrste *Salmonella, Shigella* i *Campylobacter*.

Nadalje, bolničko osoblje treba biti dobro informirano o osnovnim patogenetskim mehanizmima, potencijalnim rezervoarima, putevima prijenosa, mogućnostima kontaminacije okoliša, optimalnim mjerama dekontaminacije površina i ruku te ostalim mjerama kontrole infekcije. Važno je naglasiti da podjednaku pažnju treba pridavati edukaciji zdravstvenog (liječnici i medicinski tehničari), ali i nezdravstvenog osoblja, osobito djelatnika zaduženih za čišćenje bolničkih površina.

Budući je *C. difficile* patogen koji se prenosi kontaktom, jedna od osnovnih mjera prevencije širenja, nakon postavljanja dijagnoze CDI, je izolacija oboljelih pacijenata.

Ovisno o broju oboljelih, mogu se koristiti jednokrevetne sobe ili princip kohortiranja. U slučaju epidemije može doći i do zatvaranja cijelog odjela. Bolničko osoblje mora biti posebno educirano za ovakve situacije, a medicinska oprema koja se koristi na ovim odjelima ne smije se koristiti u ostalim djelovima bolnice, kako bi se kontaminacija okoliša svela na najmanju moguću mjeru. Mjere izolacije treba provodi za vrijeme trajanja aktivne bolesti i najmanje 48 sati nakon uspostave normalne crijevne peristaltike (tj. prestanka proljeva). Smatra se da retestiranje stolice nakon prestanka simptoma CDI, jednako kao i poznavanje statusa kliconoštva, nema nikakvi klinički značaj, usprkos činjenici da čak 30 % pacijenata može imati pozitivan test na toksine A i B nakon uspješno provedenog liječenja metronidazolom ili vankomicinom.

Standardna mjera higijene ruku utrljavanjem alkoholnih preparata je potpuno beskorisna u slučaju CDI. Niti ostali antiseptici (klorheksidin, heksaklorofen, iodofor, kloroksilenol i triklosan), koji se koriste za higijensko pranje ruku, nisu učinkoviti protiv *C. difficile* spora. Stoga se na odjelima s CDI preporučava nošenje zaštitnih rukavica, a nakon njihovog skidanja, prije kontakta s nekontaminiranim površinama, pranje ruku antiseptcima. Obavezno je i nošenje jednokratnih mantila i pregača preko radne odjeće.

Dobro je poznato da pacijenti oboljeli od CDI mogu dnevno stvarati velike količine vodenaste stolice, a nije rijetka ni pojava inkontinencije. Stoga je kontaminacija okoliša, osobito toaleta, kreveta i podova, izrazito velika. Budući su spore otporne na zagrijavanje, sušenje i većinu dezinficijensa, teško je pronaći sporocidno sredstvo koje će ih uspješno elinirati, a istovremeno neće štetiti zdravlju ljudi. Najčešće se koriste hipokloritni preparati koncentracije 1000 ppm (*engl.* parts per million). Vodena para vodikovog peroksida (*engl.* hydrogen peroxide vapour) učinkovito inaktivira spore *C. difficile*, ali je skupa i zahtjeva poseban oprez prilikom primjene, zbog nepovoljnog učinka na zdravlje ljudi.

Kad god je to moguće, preporučuje se korištenje jednokratne medicinske opreme (npr. termometri), a u svim ostalim slučajevima, opremu (npr. endoskope, stetoskope i sl.) treba pažljivo očistiti prikladnim dezinfekcijskim sredstvom (npr. 2 %-tna otopina glutaraldehida) (86).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Glavni ciljevi istraživanja su:

- izolirati i identificirati standardiziranim mikrobiološkim postupcima sve sojeve *C. difficile* iz uzoraka stolice pacijenata s kliničkom slikom podudarnom s CDI i pozitivnim imuno-kromatografskim testom za dokaz toksina A i B u razdoblju od siječnja 2010. do prosinca 2011. u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split

- ispitati osjetljivost na antibiotike svih kliničkih izolata *C. difficile* određivanjem najmanje koncentracije antibiotika (μg/mL) koja *in vitro* sprječava porast bakterija (minimalna inhibitorna koncentracija, MIK)

- metodom PCR-ribotipizacije genetipizirati izolirane sojeve *C. difficile* koji uzrokuju CDI u KBC Split

- ispitati postojanje novih, u svijetu do sada neizoliranih PCR-ribotipova te ustanoviti postojanje najučestalijih europskih i američkih PCR-ribotipova *C. difficile* među izolatima *C. difficile* koji uzrokuju CDI u KBC Split

Sporedni ciljevi istraživanja su:

- ispitati povezanost demografskih podataka (dobi i spola pacijenata) oboljelih od CDI s razvojem teške CDI i ponavljajućih CDI

- ispitati povezanost prethodnog bolničkog liječenja pacijenata oboljelih od CDI i duljine bolničkog liječenja s razvojem teške CDI i ponavljajućih CDI

- ispitati povezanost prethodne primjene medikamentozne terapije (različitih klasa antibiotika, kortikosteroida i lijekova za smanjenjenje lučenja želučane kiseline) s nastankom teških i ponavljajućih CDI

- ispitati povezanost zloćudnih bolesti, akutnih i kroničnih srčanih bolesti, akutnih i kroničnih plućnih bolesti, akutnog i kroničnog bubrežnog zatajenja, prethodnih kirurških operacija i šećerne bolesti u pacijenata oboljelih od CDI i nastanka teške CDI te ponavljajućih CDI

- ispitati povezanost različitih PCR-ribotipova *C. difficile* s nastankom teške CDI i ponavljajućih CDI

- ispitati povezanost različitih PCR-ribotipova *C. difficile* s nastankom otpornosti na antibiotike

Hipoteza istraživanja je da se iz uzoraka stolice pacijenata oboljelih od CDI u KBC Split osim najučestalijih europskih i američkih *C. difficile* PCR-ribotipova mogu izolirati i novi, u svijetu nepoznati PCR-ribotipovi te da je prethodno liječenje antibioticima povezano s nastankom teške kliničke slike i razvojem otpornosti na antibiotike izolata *C. difficile.*

3. METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je s obzirom na pristup i način dobivanja podataka opažajno, dok je s obzirom na namjenu temeljno. Istraživanje se temelji na sustavno prikupljenim kliničkim sojevima izoliranim u razdoblju od dvije godine u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split te kliničkim podatcima oboljelih od CDI retrospektivno sakupljenima iz povijesti bolesti pacijenata. Svaki uzorak stolice stacionarnih ili ambulantnih pacijenata KBC Split koji je bio upućen na rutinsku laboratorijsku pretragu sa sumnjom na CDI, testiran je na prisustvo *C. difficile* i samo su uzorci s pozitivnim nalazom uključeni u studiju. Specifični ustroj koji se koristio je presječna studija.

3.2. Ishod istraživanja

Primarni je ishod istraživanja genotipizacija sojeva *C. difficile* u uzorcima oboljelih od CDI na temelju molekularno-biološke karakterizacije sojeva izoliranih iz uzoraka stolice oboljelih te udjela tih sojeva u dvogodišnjem uzorku.

Ishod istraživanja je i određivanje udjela izolata otpornih na antibiotike te udjela višestruko otpornih izolata u dvogodišnjem uzorku. Antimikrobna osjetljivost izolata *C. difficile* testirana je na 11 antibiotika: moksifloksacin (MXF), ciprofloksacin (CIP), gatifloksacin (GAT), levofloksacin (LVX), eritromicin (ERY), klindamicin (CLI), meropenem (MEM), metronidazol (MZ), vankomicin (VAN), piperacilin-tazobaktam (TZP) i rifampicin (RIF). Za svaki će se izolat i za svaki testirani antibiotik utvrditi najmanje koncentracije antibiotika koje bakteriju sprječavaju u rastu (μg/mL) te će se osjetljivost izolata kvalitativno interpretirati kao: osjetljiv (*engl.* susceptible, S), umjereno osjetljiv (*engl.* intermediate, I) i otporan (*engl.* resistant, R), prema Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterijima (87, 88). Višestruka otpornost će se prema preporuci ESCMID-a definirati kao istovremena otpornost izolata na 3 i više antibiotika (89).

3.3. Ispitanici (kriteriji uključenja i isključenja)

U istraživanje su uključeni svi pacijenti s prvom epizodom CDI kojima je u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split dokazan toksigeni soj *C. difficile* u uzorku stolice, u razdoblju od 1. siječnja 2010. do 31. prosinca 2011. godine.

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).

Slučajevi ponovljenih CDI u vremenu praćenja su samo zabilježeni, ali nisu bili predmet daljnjeg istraživanja.

Ponavljajuće CDI su prema ESCMID-ovim smjernicama definirane kao ponovna pojava ili pogoršanje simptoma CDI nakon početnog poboljšanja (44).

3.4. Izolati (kriteriji uključenja i isključenja)

Uključeni su svi sojevi *C. difficile* izolirani iz uzoraka stolice pozitivnih na toksine A i B koji su zaprimljeni u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split u gore navedenom razdoblju istraživanja.

Uzorci stolice nisu testirani rutinski na prisustvo *C. difficile* toksina A i B već isključivo na zahtjev kliničara, koji su na osnovu kliničke slike postavili sumnju na CDI.

Do provođenja ispitivanja, sojevi su pohranjeni u tekućoj podlozi Müller-Hinton (Biolife, Italija) s dodatkom 20 % glicerola (Merck, Njemačka) na -80 °C.

Uzastopni (copy) sojevi *C. difficile* izolirani iz različitih uzoraka stolice istog bolesnika u periodu praćenja nisu uključeni u istraživanje.

3.5. Postupci

3.5.1. Testiranje stolice na prisustvo toksina *C. difficile*

Uzorci stolice pacijenata s kliničkom sumnjom na CDI, testirani su na prisustvo *C. difficile* toksina A i B brzim membranskim imuno-enzimskim testom (EIA), Immuno-card Toxins A/B (Meridian Bioscience, Italija), prema uputama proizvođača.

3.5.2. Izolacija *C. difficile*

Svi uzorci stolice pozitivni na *C. difficile* toksine A i B nasijani su na komercijalni *C. difficile* selektivni medij (CLO; bioMérieux, Marcy l´Etoile, Francuska) nakon standardnog postupka pročišćavanja alkoholom (*engl.* ethanol method, ET). Suspenzije uzoraka su pripremljene 30-minutnim miješanjem jednakih količina stolice i 96 %-tnog etanola (90). Po jedna kap pripremljenih suspenzija (0,1 mL) je nasijana na selektivne podloge, koje su inkubirane u anaerobnim uvjetima (korištenjem anaerobnog lonca i komercijalnih vrećica za stvaranje plina GasPak EZ, Becton Dickinson, SAD) na 37 °C kroz 48 sati.

3.5.3. Identifikacija *C. difficile*

Izolirani sojevi su fenotipski identificirani prema izgledu poraslih kolonija na selektivnoj bakteriološkoj podlozi, karakterističnom mirisu i bojenju po Gramu te komercijalnim biokemijskim identifikacijskim sustavima (RapID ANA bioMérieux, Marcy l´Etoile, Francuska i Vitek 2 Compact ANA Card bioMérieux, Marcy l´Etoile, Francuska).

Do provođenja daljnjih ispitivanja, sojevi su pohranjeni u tekućoj podlozi Müller-Hinton (Biolife, Italija) s dodatkom 20 % glicerola (Merck, Njemačka) na -80 °C.

3.5.4. Ispitivanje osjetljivosti sojeva *C. difficile* na antibiotike

Osjetljivost izoliranih sojeva *C. difficile* na antibiotike testirana je određivanjem najmanje inhibitorne koncentracije antibiotika (MIK), standardiziranom gradijent metodom E-testa (AB Biodisk, Solna, Švedska), prema uputama proizvođača. MIK je najniža koncentracija antibiotika koja sprječava umnožavanje testiranog soja, a izražava se kvantitativno u μg/mL.

MZ, VAN i RIF se mogu koristiti u liječenju CDI, a ostalim antibioticima se željelo ispitati povezanost s nastankom teške CDI.

Testiranje je napravljeno nasijavanjem standardizirane koncentracije ispitivanog soja (gustoće 1 McFarland) na ploče Brucella-krvnog agara obogaćenog s 1 mg/L vitamina K, 5 mg/L hemina i 5 % defibriniziranih ovčjih eritrocita. Test trakice su položene na površinu nasijanog agara te su ploče inkubirane u anaerobnoj atmosferi kroz 24 - 48 sati na 37 °C, nakon čega su očitane MIK vrijednosti na mjestu gdje zona inhibicije rasta bakterije „siječe“ test trakicu. Kvantitativno očitane MIK vrijednosti su kvalitativno interpretirane kao: osjetljivo (S), umjereno osjetljivo (I) i otporno (R), prema CLSI kriterijima. Granične MIK vrijednosti za otporne sojeve su 8 μg/mL za ERY, CLI i fluorokinolone te 32 μg/mL za MZ, u skladu sa CLSI interpretativnim kriterijima za anaerobne bakterije (87). Za ostale antibiotike nisu bili dostupni CLSI interpretativni kriteriji za anaerobne bakterije. Uobičajena je praksa da se za te antibiotike koriste CLSI interpretativni kriteriji za aerobne bakterije (91, 92). Tako su za interpretaciju MIK vrijednosti za rifampicin i vankomicin korišteni CLSI kriteriji za testiranje bakterije *Staphylococcus aureus*, dok su za meropenem i piperacilin-tazobaktam korišteni CLSI kriteriji za testiranje enterobakterija. Granična MIK vrijednost otpornih izolata za rifampicin je 4 μg/mL, za vankomicin 16 μg/mL, za meropenem 16 μg/mL te za piperacilin-tazobaktam 128 μg/mL (88).

Izračunate su vrijednosti MIK_{50} (koncentracija antibiotika potrebna za inhibiciju 50 % testiranih izolata) i MIK_{90} (koncentracija antibiotika potrebna za inhibiciju 90 % testiranih izolata).

Višestruka otpornost (*engl.* multidrug-resistance, MDR) je definirana kao otpornost ispitivanog bakterijskog soja na najmanje tri različite klase antibiotika (89).

3.5.5. Prikupljanje i analiza demografskih i kliničkih podataka pacijenata oboljelih od CDI

Klinički i demografski podatci su prikupljeni pregledom povijesti bolesti oboljelih od CDI. Svi prikupljeni podatci su tajni, zaštićeni laboratorijskim brojem i poznati su samo istraživaču. Bilježeni su dob i spol pacijenata, bolnička ili izvanbolnička pojavnost CDI, simptomi i klinički znakovi CDI (kao što su krvavi proljevi, vrućica i ileus), laboratorijski podatci (vrijednosti CRP, leukocita i kreatinina u serumu) trajanje i vrsta antibiotske terapije prije pojave CDI (prirodni penicilini, penicilini s inhibitorima beta-laktamaza, cefalosporini 1., 2., 3., i 4. generacije, karbapenemi, kinoloni 1., 2., 3. i 4. generacije, makrolidi, aminoglikozidi, tetraciklini, klindamicin, kolistin, trimetoprim/sulfametoksazol i kloramfenikol), radiološki nalazi, prethodna primjena lijekova koji sprječavaju stvaranje želučane kiseline i korikosteroida, kronične i akutne bolesti (srčane, plućne, bubrežne, zloćudne bolesti i šećerna bolest), prethodno kirurško liječenje, specifična terapija za CDI (metronidazol i vankomicin), klinički ishod (izlječenje ili ponavljajuća infekcija), a za bolničke pacijente su zabilježeni odjel i duljina trajanja bolničkog liječenja prije pojave CDI.

ESCMID-ove definicije su korištene prilikom identifikacije primarne epizode CDI, teške CDI, ponavljajuće CDI, početka bolesti (u bolničkoj ili izvanbolničkoj sredini) i povezanosti s prethodnim bolničkim liječenjem (HA-CDI, CA-CDI ili nepoznato) (44, 36).

Primarna epizoda CDI se definira po kliničkoj slici kompatibilnoj s CDI i mikrobiološki dokazanim toksigenim sojem *C. difficile* u uzorku stolice pacijenta.

Dijagnoza teške CDI se postavlja u imunokompetentnih pacijenata prema prisustvu kliničkih znakova kompliciranog kolitisa. CDI bez ovih znakova se također može smatrati teškom infekcijom, ukoliko se radi o osobama s značajnim komorbiditetom, imunokompromitiranim pacijentima i onima koji se liječe u jedinicama intenzivnog liječenja.

Ponavljajuća CDI je definirana ponovnom pojavom simptoma CDI nakon početnog poboljšanja i dobrog odgovora na terapiju uz mikrobiološki nalaz toksin-producirajućeg soja *C. difficile* u stolici.

HO-CDI je infekcija čiji je početak simptoma nastupio u bolnici, a CO-CDI je infekcija čiji je početak simptoma nastupio izvan bolničke ustanove.

Slučaj HA-CDI je definiran pojavom simptoma u bolnici najmanje 48 sati nakon prijema, ili, unutar 4 tjedna nakon otpuštanja iz bolnice.

Slučaj CA-CDI je definiran pojavom simptoma izvan bolnice ili unutar prvih 48 sati bolničkog liječenja, ukoliko pacijent nije boravio u bolnici unatrag 12 tjedana.

Ukoliko je pacijent otpušten iz bolnice 4-12 tjedana prije nastanka simptoma, ne možemo sa sigurnošću zaključiti radi li se o HA-CDI ili o CA-CDI.

Svi gore navedeni postupci istraživanja (4.5.1. – 4.5.5.) napravljeni su u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split.

3.5.6. Molekularna tipizacija sojeva *C. difficile*

Ovaj dio istraživanja napravljen je u Dipartimento di malattie infettive, parassitarie ed immunomediate, Istituto Superiore di Sanità (ISS), u Rimu, u Italiji.

3.5.6.1. Klasična PCR-ribotipizacija na agaroznom gelu

Izolati su tipizirani metodom PCR-ribotipizacije klasičnom lančanom reakcijom polimeraze na agaroznom gelu (*engl.* Polymerase Chain Reaction; PCR-ribotyping) prema metodi koju su uveli Bidet i suradnici (93).

U reakciji su korištene početnice 16S (5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3') i 23S (5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-3') (PrimmBiotech, Inc.). Bakterijska DNK (deoksiribonukleinska kiselina) je ekstrahirana iz čistih kultura *C. difficile* korištenjem Wizard Genomic DNK Purification Kit (Promega) prema uputama proizvođača. Reakcijska otopina je sadržavala: 25 µl HotStart Taq Master Mix (Qiagen, SAD), 1 µl (10 pmol/µL) svake početnice, 21 µl vode i 2 µl DNK . Uzorci su umnoženi u klasičnom PCR uređaju (Applied Biosystems) i to pri uvjetima: početni ciklus denaturacije 6 minuta na 94 ºC, zatim 35 ciklusa (svaka reakcija po minutu) na 94 ºC, 57 ºC i 72 ºC te

završni korak produljivanja na 72 ºC kroz 7 minuta. Umnoženi PCR produkti su razdvojeni elektroforetski na 3 %-tnom MetaPhor agaroznom gelu (Lonza) kroz 5 sati pri naponu od 130 V. Korišten je DNK marker (New England BioLabs, Inc.) od 50 bp kao standard veličine. Nakon toga, gel je obojen otopinom etidijeva bromida, osvjetljen na transluminatoru te snimljen kamerom.

Identifikacija dobivenih genomskih DNK uzoraka je napravljena uspoređivanjem i analizom s GelCompar II v6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgija). Analiza sličnosti je napravljena korištenjem Pearsonove korelacije, na razini značajnosti $P \leq 0{,}005$. Dobiveni DNA restrikcijski profili sojeva su uspoređeni s onima dobivenim PCR-ribotipizacijom sojeva koji pripadaju predominantnim PCR-ribotipovima u Europi (referentni sojevi), a koji su dobiveni od ECDC.

3.5.6.2. Ribotipizacija kapilarnom gel elektroforezom

Sojevi koji su imali restrikcijski profil drugačiji od referentnih sojeva, dodatno su analizirani metodom PCR-ribotipizacije Indre i suradnika, koja se temelji na kapilarnoj gel elektoforezi (94).

U ribotipizaciji kapilarnom gel elektroforezom, korištene su iste početnice kao i za klasičnu ribotipizaciju na agaroznom gelu (93), s tom razlikom da je 16S početnica označena na 5´kraju i to s karboksilfluoresceinom (FAM). Prije korištenja, DNK iz uzorka je razrijeđena na koncentraciju od 5 ng/µl te je 1 µl tako pripremljene otopine korišten u reakciji koja je sadržavala 25 µl HotStart Taq Master Mix, 0.3 µl (10 pmol/µL) svake početnice i 24.5 µl vode. Uzorci su umnoženi u klasičnom PCR uređaju (Applied Biosystems) i to pri uvjetima: početna aktivacija enzima kroz 15 minuta na 95 ºC; 22 ciklusa (svaka reakcija po minutu) na 95 ºC, 57 ºC i 72 ºC te završni korak produljivanja na 72 ºC kroz 30 minuta. PCR fragmenti su analizirani u ABI 3730 genetičkom analizatoru s 36 cm dugom kapilarom ispunjenom POP7 gelom (Applied Biosystems). Korišten je Liz 1200 (Life Tehnologies) kao unutrašnja kontrola svakog uzorka. Visina svakog dobivenog vrška je određena korištenjem Peak Scanner software 1.0 (Applied Biosystems).

Dobiveni rezultati PCR-ribotipizacije su analizirani i interpretirani pomoću WEBRIBO (*engl.* Web-based software) baze podataka, koja omogućava unos vlastitih rezultata i njihovu usporedbu s različitim pohranjenim PCR-ribotipizacijskim obrascima. http://webribo.ages.at. (94)

3.6. Statistički postupci

U analizi podataka korištene su metode opisne i inferencijalne statistike. Opisna statistika podataka dobivenih pobrojavanjem napravljena je uporabom apsolutnih i relativnih frekvencija. U opisnoj statistici podataka dobivenim mjerenjem korištene su mjere aritmetičke sredine i standardne devijacije ili pak metoda pet točaka: minimum, druga kvartila (Q1), medijan, treća kvartila i maksimum. Ispitivanje povezanosti različitih kvalitativnih varijabli napravljeno je χ^2-kvadrat testom, Fisherovim egzaktnim testom ili Kendallovim tau testom korelacije.

χ^2-kvadrat testom je ispitana povezanost nastanka teških i ponavljajućih CDI s bolničkim liječenjem te povezanost prethodnog liječenja antibioticima s nastankom otpornosti na antibiotike izolata *C. difficile.*

Fisherovim egzaktnim testom je ispitana povezanost nastanka teških i

ponavljajućih CDI s: prethodnom primjenom kortikosteroida, lijekova za smanjenje lučenja želučane kiseline, antibiotika, osnovnim bolestima pacijenata oboljelih od CDI

i izolacijom *C. difficile* otpornih na antibiotike iz uzoraka stolice pacijenata oboljelih od CDI.

Kendallovim tau testom korelacije je ispitana povezanost nastanka teških i ponavljajućih CDI s demografskim podatcima (dob pacijenata oboljelih od CDI),

duljinom hospitalizacije, duljinom antibiotskog liječenja, ukupnim brojem različitih klasa antibiotika koje je pacijent primao prije nastanka CDI i brojem izoliranih PCR-ribotipova *C. difficile.*

Sekundarne analize razlika srednje vrijednosti metričkih varijabli provedene su studentovim t-testom.

Metodom logističke regresije, ispitan je odnos niza čimbenika rizika (demografskih, epidemioloških, kliničkih, biokemijskih, mikrobioloških i genotipskih) i nastanka teških te ponavljajućih CDI.

Sve procijenjene vrijednosti izražene su s 95 % rasponom pouzdanosti. Rezultati su interpetirani na razini značajnosti $P \leq 0,05$. Sve analize su izrađene uz pomoć statističkog paketa Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

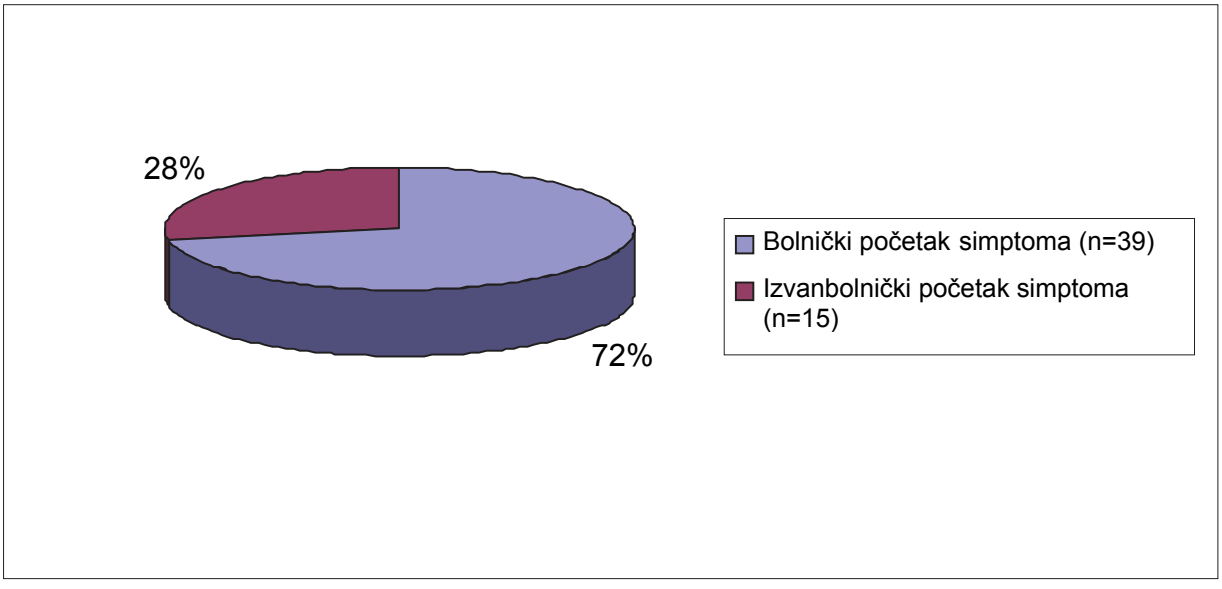
4. REZULTATI

4.1. Demografski i epidemiološki podatci

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 1. siječnja 2010. do 31. prosinca 2011. Testirana su ukupno 493 uzorka (237 u 2010. i 256 u 2011.) proljevaste stolice pacijenata s kliničkom sumnjom da boluju od CDI i zahtjevom za testiranje na prisustvo *C. difficile* toksina A i B. Ukupno su identificirane 54 primarne epizode CDI (dvadeset i četiri u 2010. te trideset u 2011.) koje su udovoljavale ESCMID-ovim kriterijima. Ukoliko nije drugačije naznačeno, relevantni demografski, klinički i laboratorijski podatci su bili dostupni za 51 pacijenta ukjučenog u studiju.

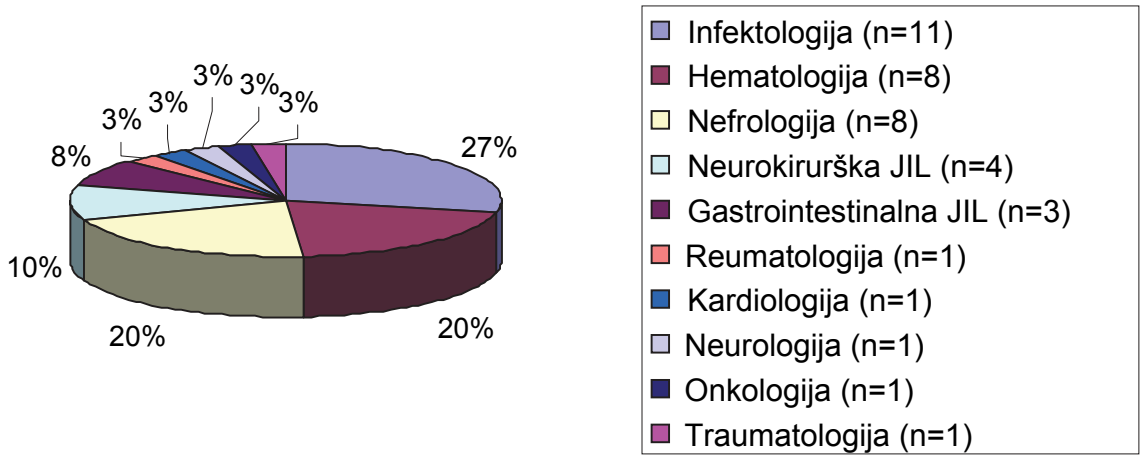
Tijekom ovog dvogodišnjeg istraživanja, većina oboljelih su bili odrasli pacijenti (96 %), od kojih je dvadeset devet bilo u rizičnoj skupini starijih od 65 godina. Medijan dobi pacijenata je bio 62,2 godine (raspon: 8-89), dok je distribucija po spolu bila otprilike ista, s neznatno većom proporcijom muškaraca (31/54, tj. 57,4 %).

U dvije trećine dijagnosticiranih primarnih epizoda CDI (39/54, 72,2 %), klinički simptomi su započeli u bolnici (HO-CDI) (Slika 2).



Slika 2. Raspodjela primarnih slučajeva CDI prema mjestu početka simptoma .

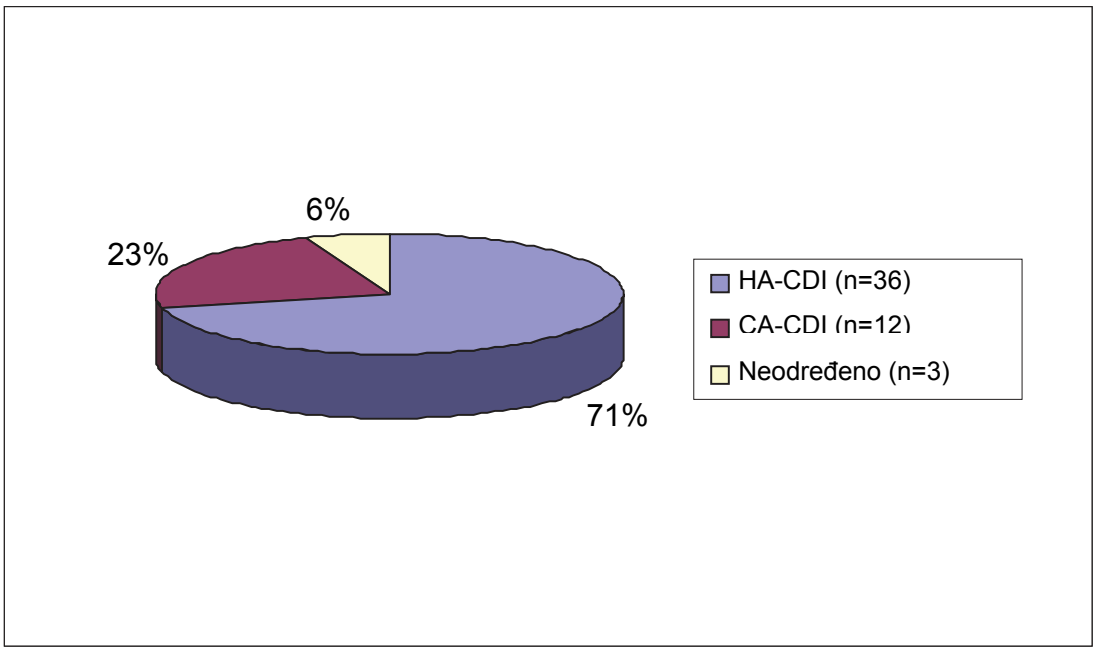
Na Slici 3 su prikazane proporcije HO-CDI slučajeva na pojedinim odjelima KBC Split (n=39). Medijan broja dana od prijema u bolnicu do pojave simptoma CDI je bio 7 (interkvartilno raspšenje, IQR 0-16,25).



Slika 3. Raspodjela primarnih slučajeva HO-CDI po odjelima na kojima je zabilježen početak simptoma.

Bez obzira gdje su započeli simptomi CDI (u bolnici ili izvan nje), bilo je potrebno ispitati je li infekcija povezana s prethodnim bolničkim liječenjem. Slijedeći ESCMID-ove kriterije, koji su detaljno objašnjeni u uvodnom dijelu (Epidemiologija CDI) i dijelu Metode istraživanja, povezanost nastanka CDI s bolničkim liječenjem (HA-CDI) utvrđena je u 36 od 51 pacijenta (70,6 %), P<0,001. U 12 pacijenata (23,5 %) infekcija nije bila povezana s bolničkim liječenjem (CA-CDI), dok je u troje pacijenata (5,9 %) infekcija nastupila u periodu kada se ne može sigurno zaključiti je li početak CDI povezan s bolničkim liječenjem ili nije (Slika 4). Svi pacijenti, u kojih je početak CDI zabilježen na odjelima hematologije, nefrologije, kardiologije, neurologije, traumatologije, onkologije te u gastrointestinalnoj i neurokirurškoj JIL, oboljeli su nakon dugotrajnog bolničkog liječenja. Troje pacijenata liječenih na Klinici za infektivne bolesti dobilo je proljeve unutar 24 sata od

prijema, ali su prethodno liječeni u bolnici (unutar 4-12 tj.). Također, nisu bili dostupni podatci za troje pacijenata s CO-CDI.



Slika 4. Raspodjela primarnih slučajeva CDI prema povezanosti s bolničkim liječenjem.

4.2. Osnovne bolesti od kojih su bolovali ispitanici prije nastanka CDI

Trideset i jedan pacijent, kojem je dijagnosticirana prva epizoda CDI (57,4 %), bio je teško bolestan prije nastanka ove infekcije. Najčešće se radilo o kroničnim srčanim, plućnim i bubrežnim bolestima, ali i o akutnim bakterijskim infekcijama dišnog i mokraćnog sustava (Tablica 1).

Među oboljelima od CDI, uočena je velika učestalost zloćudnih bolesti i kirurških operacija. Tako je petina pacijenata (23,5 %) bolovala od nekog oblika zloćudne bolesti. Unutar te skupine pacijenata, petero (9,8 %) je bolovalo od leukemije, a sedmero (13,7 %) od nehematoloških zloćudnih bolesti (po dvoje pacijenata od tumora debelog crijeva i tumo-

ra bubrega, dvije pacijentice od tumora dojke, dok je jedan pacijent bolovao od tumora prostate). Učestalost kirurških operacija, prije nastanka CDI, je bila još i viša od učestalosti zloćudnih bolesti. Naime, čak devetnaest pacijenta (35,2 %), je bilo operirano prije dijagnosticiranja CDI. Od toga je četvero pacijenata (7,8 %) imalo operacije probavnog sustava, osam pacijenata (15,7 %) neurokirurške operacije, četvero pacijenata (7,8 %) ortopedske operacije, a ostale operacije (vaskularne, ginekološke i torakalne) troje pacijenata (5,9 %).

Tablica 1. Osnovne bolesti od kojih su bolovali ispitanici prije nastanka CDI (n=51)

Osnovne bolesti	**Broj pacijenata (%)**
Kronične srčane bolesti	4 (7,8)
Arterijska hipertenzija	3 (5,9)
Akutna upala pluća	9 (17,6)
Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB)	2 (3,9)
Kronično bubrežno zatajenje	9 (17,6)
Akutna retencija urina	5 (9,8)
Akutne ili kronične infekcije mokraćnog sustava	18 (35,3)
Ciroza jetre	2 (3,9)
Šećerna bolest	3 (5,9)

4.3. Laboratorijski i klinički nalazi ispitanika prilikom dijagnosticiranja CDI

U vrijeme dijagnosticiranja CDI, mjereni su upalni parametri: tjelesna temperatura te laboratorijske vrijednosti leukocita i C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu.

Povišenu tjelesnu temperaturu je imalo 38 pacijenata (73,1 %).
Medijan CRP-a je iznosio 128.4 mg/L (raspon: 11-257,3), dok je medijan ukupnog broja leukocita u serumu bio $12x10^9$/L (raspon: 0,22-39). Povišenu vrijednost kreatinina u odnosu na bazalne vrijednosti imalo je 12/51 (23,5 %) pacijenata.
Sukladno postavljenim kriterijama za dijagnosticiranje CDI, svi pacijenti su imali učestale vodenaste stolice, dok je primjese krvi u stolici imalo 4 pacijenata (7,7 %).
Od ukupno 4 pacijenta koji su pregledani kolonoskopski, troje (75 %) je imalo ulceracije i pseudomembrane na sluznici debelog crijeva. Sedmero oboljelih je pregledano radiografski (*engl.* plan abdominal radiograph) te je u četvero od njih (57,1 %) uočeno rastezanje crijeva koje je moglo biti uzrokovano CDI.

4.4. Liječenje provedeno u ispitanika prije nastanka CDI

Devet ispitanika (17,6 %) je liječeno inhibitorima lučenja želučane kiseline, a inibitorima lučenja mokraćne kiseline 3 pacijenata (5,9 %). Imunosupresivnu terapiju je primao samo jedan od 50 pacijenata (2 %).

Svi pacijenti oboljeli od CDI su prethodno (unutar 3 mjeseca) primali antibiotsku terapiju (100 %). Antibiotici i duljina liječenja su prikazani u Tablici 2. Niti jedan pacijent nije primao tetracikline, kloramfenikol ni kolistin.

Tablica 2. Liječnje antibioticima 3 mjeseca prije pojave simptoma CDI **(**n=51**)**

Antibiotik	**Liječeni pacijenti (%)**	**Medijan trajanja u danima (minimum-maksimum)**
Prva i druga generacija kinolona	37,3	10 (4-30)
Aminopenicilini/inhibitori lučenja β-laktamaza	29,4	7 (3-21)
Treća generacija cefalosporina	21,6	10 (6-21)
Druga generacija cefalosporina	17,6	14 (2-30)
Prva generacija cefalosporina	9,8	14 (1-36)
Linkozamidi	9,8	7 (2-30)
Trimetoprim/sulfametoksazol	9,8	14 (7-150)
Karbapenemi	7,8	7 (2-14)
Aminoglikozidi	7,8	8 (7-35)
Makrolidi	5,9	1 (1-8)
Antipseudomonasni penicilin/inhibitori lučenja β-laktamaza	5,9	10 (2-12)
Četvrta generacija cefalosporina	3,9	12 (10-14)
Treća i četvrta generacija kinolona	3,9	9 (4-14)
Penicilin G	1,9	29 (29-29)
Aminopenicilini	1,9	6 (6-6)

Zbog teških osnovnih bolesti i produljenog bolničkog liječenja, gotovo polovica oboljelih od CDI (47 %) je liječena kombinacijom više različitih vrsta antibiotika. Petnaest pacijenata (29,4 %) je liječeno kombinacijom dva različita antibiotika (npr. penicilinom i aminoglikozidom), šest pacijenata (11,8 %) je primalo kombinaciju tri (npr. aminopenicilina, cefalosporina 3. generacije i kinolona ili aminopenicilina s inhibitorom stvaranja β-laktamaza, cefalosporina 3. generacije i makrolida), a troje pacijenata (5,9 %) je primalo kombinaciju četiri različita antibiotika (npr. aminopenicilina s inhibitorom stvaranja β-laktamaza, cefalosporina 3. generacije, linkozamida i kinolona).

4.5. Specifično liječenje i ishod CDI

Prva epizoda CDI je u 50 od 51 pacijenta (98 %) liječena metronidazolom (500 mg, tri puta dnevno, 10 dana), a u jednog pacijenta (2 %) vankomicinom (125 mg, četiri puta dnevno, 10 dana).

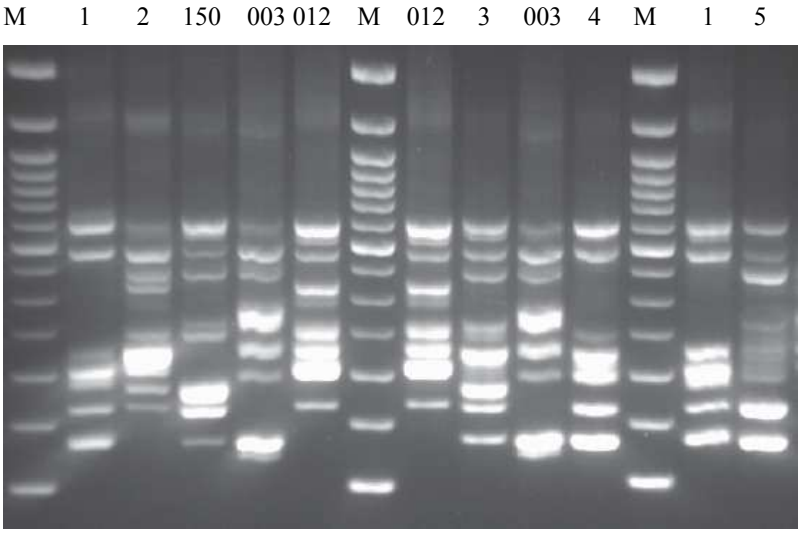
Za liječenje svih ponavljajućih epizoda korišten je vankomicin (125 mg peroralno, četiri puta dnevno).

U 6 pacijenata je došlo do ponavljanja infekcije unutar dvogodišnjeg perioda istraživanja, dok je u ostalih pacijenta došlo do kliničkog izlječenja nakon provedene specifične terapije. Ponavljajuće infekcije su detaljnije opisane u dijelu Ponavljajuće i teške CDI (vidjeti niže).

4.6. Rezultati genotipizacije izolata *C. difficile*

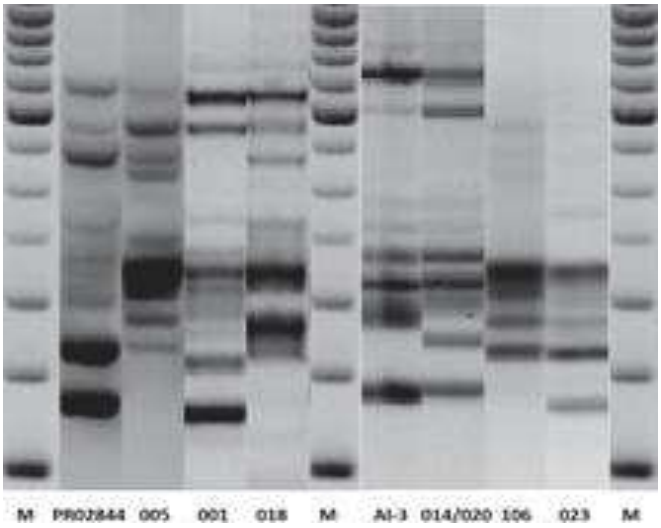
Standardiziranim mikrobiološkim postupcima, izolirano je i identificirano ukupno 54 soja *C. difficile* iz uzoraka stolice pacijenata s kliničkom slikom podudarnom s CDI i pozitivnim imuno-kromatografskim testom za dokaz toksina A i B.

Od ukupno 54 izolata *C. difficile*, 50 ih je bilo dostupno za genotipizaciju. Dva soja su bila kontaminirana, a dva su izgubila vijabilnost tijekom pohrane i transporta u referentni centar. Klasičnom PCR-ribotipizacijom, identificirana su ukupno 39 izolata (Slika 5). Preostali, neidentificirani izolati (n=11) su dodatno analizirani metodom PCR-ribotipizacije koja se temelji na kapilarnoj gel elektoforezi (Slika 6).



M = molekularni marker (*engl.* DNA Ladder, New England Bio Labs)
150, 003, 012 = identificirani PCR-ribotipovi
1, 2, 3, 4, 5 = nepoznati PCR-ribotipovi

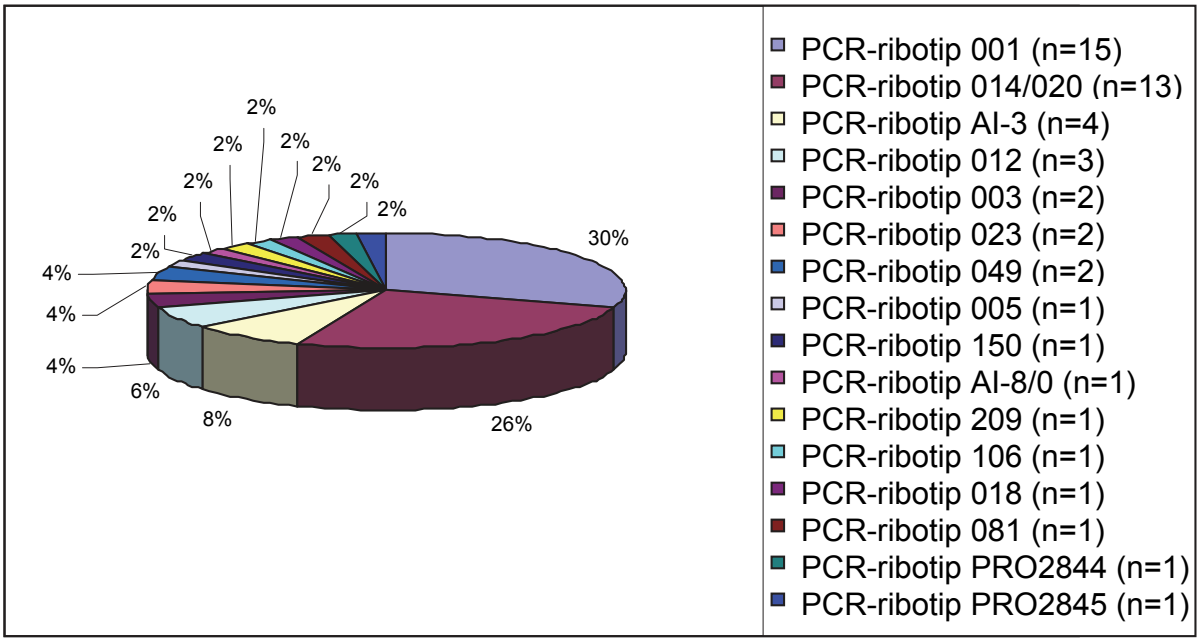
Slika 5. Različiti obrasci *C. difficile* izolata na agaroznom gelu dobiveni klasičnom PCR-ribotipizacijom.



Slika 6. Izgled različitih PCR-obrazaca *C. difficile* izolata dobivenih kapilarnom PCR-ribotipizacijom.

Ukupno je identificirano 16 različitih PCR-ribotipova. Klasičnom PCR-ribotipizacijom ih je identificirano devet: 001, 003, 012, 014/020, 018, 023, 081, 106 i i 150. PCR-ribotipizacijom s kapilarnom gel elektroforezom identificirano je preostalih sedam PCR-ribotipova: 005, 049, 209, AI-3, AI-8/0, PRO2844 i PRO2845.

Od 16 PCR-ribotipova identificiranih u ovom istraživanju, 14 ih je već opisano u europskim i američkim istraživanjima, dok su dva PCR-ribotipa imala različite obrasce od onih pohranjenih u WEBRIBO bazi pa su im, nakon unosa u bazu, dodijeljeni nazivi PRO2844 i PRO2845 i smatraju se novim, do sada neizoliranim PCR-ribotipovima. Prevalencija pojedinih PCR-ribotipova u ovom istraživanju, prikazana je na Slici 7.



Slika 7. Raspodjela učestalosti 50 genotipiziranih PCR-ribotipova.

Najčešći PCR-ribotipovi, izolirani iz stolice bolničkih i izvanbolničkih pacijenata oboljelih od CDI su: 001 (12 slučajeva HA-CDI i 3 slučaja CA-CDI) te 014/020 (8 slučajeva HA-CDI i 5 slučajeva CA-CDI). U 2010. je najčešće bio izoliran PCR-ribotip 014/020 (osam izolata od ukupno 24 *C. difficile* izolirana te godine), dok je PCR-ribotip 001 bio najčešći izolirani PCR-ribotip u 2011 (dvanaest od 30 izoliranih *C. difficile*). U vremenu istraživanja, nisu izolirani hipervirulentni PCR-ribotipovi 027 i 078.

4.7. Osjetljivost izolata *C. difficile* na testirane antibiotike

Raspon MIK-ova, MIK_{50}, MIK_{90} i postotak otpornih sojeva, prikazani su Tablici 3.

Tablica 3. Antimikrobna osjetljivost 54 soja *C. difficile* izoliranih u vremenu praćenja.

Antibiotici	**MIK_{50} (µg/mL)**	**MIK_{90} (µg/mL)**	**MIK raspon (min-max)**	**Otporni izolati (%)**
Metronidazol	0,016	0,125	<0,016-0,19	0
Vankomicin	0,125	0,5	<0,016-1,0	0
Klindamicin	0,75	32	<0,016->256	**20,4**
Eritromicin	0,19	3,0	<0,016->256	**9,3**
Ciprofloksacin	1,0	>32	<0,002->32	**38,9**
Levofloksacin	0,75	>32	<0,002->32	**18,5**
Gatifloksacin	0,5	>32	<0,002->32	**11,1**
Moksifloksacin	0,5	>32	<0,002->32	**9,3**
Piperacilin/tazobaktam	0,047	2,0	<0,016-8,0	0
Meropenem	0,125	0,5	<0,002-1,0	0
Rifampicin	<0,002	0,006	<0,002-0,016	0

Legenda: MIK_{50}**:** koncentracija antibiotika potrebna za inhibiciju 50% testiranih izolata, MIK_{90}: koncentracija antibiotika potrebna za inhibiciju 90% testiranih izolata, MIK: najniža koncentracija antibiotika koja sprječava umnožavanje testiranog izolata

Dvadeset i tri *C. difficile* izolata (42,6 %) su bila otporna na barem jedan testirani antibiotik. Većina rezistentnih izolata je pripadala PCR-ribotipovima 001 i 014/020. Tri izolata, sva pripadaju PCR-ribotipu 001, su bila otporna na tri ili više od tri različite klase antibiotika (MDR izolati).

Različite kombinacije otpornosti na antibiotike koje su imali pojedini otporni izolati, prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Različite kombinacije otpornosti na antibiotike koju su *in vitro* pokazala 23 otporna *C. difficile* izolata.

	PCR-ribotip (broj otpornih izolata)									
Kombinacije antibiotika na koje su izolati otporni	**001 (7)**	**005 (1)**	**014/020 (7)**	**018** (1)	**023** (1)	**106** (1)	**209** (1)	**AI-3** (2)	**PRO2844** (1)	**NT** (1)
CIP / / / / /	**1**	**1**	**2**			**1**		**1**	**1**	**1**
/ ERY / / / /					**1**					
CIP ERY / / / /				**1**				**1**		
CIP / CLI / / /	**1**		**1**							
/ ERY CLI / / /	**1**									
CIP / / LVX / /	**1**									
CIP / CLI LVX / /			**1**				**1**			
CIP / CLI LVX GAT /			**1**							
CIP / / LVX GAT MXF			**2**							
CIP ERY CLI LVX GAT MXF	**3**									

Legenda: CIP = ciprofloksacin, CLI = klindamicin, ERY = eritromicin, GAT = gatifloksacin, LVX = levofloksacin, MXF = moksifloksacin, NT = nije tipiziran

Rasponi MIK-ova su bili: 8->256 mg/L za ERY i CLI, 8->32 mg/L za CIP, LVX, GAT i MXF.

4.8. Ponavljajuće i teške CDI

U Tablicama 5. i 6., prikazan je broj teških i ponavljajućih CDI po godinama pojavljivanja (2010. i 2011.), PCR-ribotipovima koji su ih uzrokovali i pojavnosti simptoma (izvan bolnice ili na bolničkim odjelima).

U šest pacijenta (11,8 %) je nastupilo ponavljanje infekcije nakon provedenog specifičnog liječenja. Od njih, pet pacijenata je liječeno u bolnici (3 pacijenta na Nefrologiji te po jedan pacijent na Infektologiji i Neurologiji), a jedan je bio izvanbolnički pacijent. Najčešći PCR-ribotip je bio 001 (3 izolata), a ostali PCR-ribotipovi (014/020, 012 i jedan netipizirani izolat) su uzrokovali po jedan slučaj ponavljajuće infekcije.

Prema ESCMID-ovim kriterijima, od 54 primarne epizode CDI, zabilježeno je 37 teških CDI (72,5 %). Distribucija po godinama pojavljivanja je bila gotovo identična (19 slučajeva u 2010. te 18 slučajeva u 2011). U 29 od 37 (78 %) teških slučajeva CDI se radilo o bolničkim, a u 8 slučajeva o izvanbolničkim pacijentima. Teške CDI su činile 51,7 % svih bolničkih te 50 % svih izvanbolničkih slučajeva CDI.

Teška CDI je bila povezana s 14 različitih PCR-ribotipova. Najčešći PCR-ribotipovi su bili 001 i 014/020. Oba nova, do sada neizolirana *C. difficile* PCR-ribotipa, PRO2844 i PRO2845, su uzrokovali teške CDI. Prvi od njih, PCR-ribotip PRO2844, izoliran je iz uzorka stolice starijeg muškarca (74 g.) koji je primljen na Kliniku za infektivne bolesti zbog sumnje na infekciju mokraćnih puteva. Nakon obrade, započeto je liječenje cefalosporinima treće generacije (ceftriaksonom). Peti dan od početka antibiotskog liječenja, pacijent je dobio učestale vodenaste stolice (10-15 stolica dnevno), bolove i grčeve u trbuhu, bio je blago dehidriran, hipodinamičan i imao je vrućicu. U stolici su dokazani toksini A i B *C. difficile.* Nakon liječenja metronidazolom, nastupilo je kliničko poboljšanje i pacijent je otpušten na kućnu njegu.
Drugi novi PCR-ribotip, PRO2845, izoliran je iz uzorka stolice pacijentice (66 g.) koja je razvila postantibiotske proljeve nakon dugotrajnog opetovanog bolničkog liječenja zbog infektivnog endokarditisa. CDI je nastupila tijekom druge hospitalizacije, nakon 29 dana

kontinuiranog liječenja kombinacijom aminoglikozida (gentamicina) i amoksicilina s klavulanskom kiselinom. Osim starije životne dobi, kombinirane antibiotske terapije i bolničkog liječenja, pacijentica nije imala drugih rizičnih čimbenika za nastanak CDI. Prema kliničkoj slici i visokoj vrijednosti CRP (54,3) radilo se o teškoj CDI. Infekcija je uspješno liječena metronidazolom.

Tablica 5. Raspodjela PCR-ribotipova među pacijentima na različitim bolničkim odjelima i među izvanbolničkim pacijentima, broj slučajeva teških CDI i ponavljajućih CDI u 2010.

Početak simptoma CDI (Broj slučajeva)	**PCR-ribotip** (Broj sojeva)	**Teška CDI** (Broj slučajeva)	**Broj ponavljanja** (Broj slučajeva)	**Broj MDR‡ sojeva**
Izvan bolnice (7)	049 (1) 014/020 (4) AI-3- (1) NT# (1)	1 2 0 1	1x (1)	
Klinika za infektivne bolesti (5)	049 (1) PRO2844 (1) PRO2845 (1) 001 (1) 014/020 (1)	1 1 1 1 0		
Nefrologija (4)	001 (1) 012 (2) AI-8/0 (1)	1 2 0	3x (1) 2x (1)	
Hematologija (7)	014/020 (2) 005 (1) 150 (1) 003 (2) 001 (1)	2 1 1 2 1		1
Reumatologija (1)	014/020 (1)	1		
Ukupno	**24**	**19**	**3**	**1**

Legenda: NT#, nije tipiziran; MDR‡, (*engl.* multi-drug resistant) višestruko otporan izolat

Tablica 6. Raspodjela PCR-ribotipova među pacijentima na različitim bolničkim odjelima i među izvanbolničkim pacijentima, broj slučajeva teških CDI i ponavljajućih CDI u 2011.

Početak simptoma CDI (Broj slučajeva)	**PCR-ribotip** (Broj sojeva)	**Teška CDI** (Broj slučajeva)	**Broj ponavljanja** (Broj slučajeva)	**Broj MDR‡ sojeva**
Izvan bolnice (8)	NT# (1) 014/020 (1) 001 (3) 106 (1) 012 (1) 081 (1)	0 0 2 1 0 1		
Klinika za infektivne bolesti (6)	023 (1) 014/020 (2) 209 (1) 001 (1) AI-3 (1)	0 2 1 0 0	2x (1)	1
Nefrologija (4)	001 (4)	1	1x (1)	1
Hematologija (1)	NT (1)	1		
NJIL* (4)	001 (2) 018 (1) 023 (1)	2 1 1		
GJIL† (3)	001 (2) AI-3 (1)	2 1		
Traumatologija (1)	014/020 (1)	0		
Kardiologija (1)	014/020 (1)	1		
Neurologija (1)	NT (1)	0	3x (1)	
Onkologija (1)	AI-3 (1)	1		
Ukupno	**30**	**18**	**3**	**2**

Legenda: NT#, nije tipiziran; MDR‡, (*engl.* multi-drug resistant) višestruko otporan izolat, NJIL*, Neurokirurška jedinica intenzivnog liječenja**,** GJIL†, Gastrointestinalna jedinica intenzivnog liječenja

4.9. Povezanost čimbenika rizika (dobi i spola oboljelih od CDI, prethodnog bolničkog liječenja, duljine bolničkog liječenja, premedikacije, komorbiditeta, izoliranih PCR-ribotipova i na antibiotike otpornih izolata *C. difficile*) s nastankom teških i ponavljajućih CDI

Ispitivanjem povezanosti demografskih podataka (dobi i spola pacijenata) oboljelih od CDI s razvojem teških i ponavljajućih CDI, nije dobivena statistički značajna povezanost.

Iako je značajna proporcija pacijenata oboljelih od CDI bila povezana s bolničkim liječenjem (HA-CDI, 70,6 %), nije dokazana statistički značajna povezanost bolničkog liječenja i njegove duljine s razvojem teške i ponavljajuće CDI.

Ispitivanjem povezanosti prethodne primjene antibiotika, kortikosteroida i lijekova za smanjenjenje lučenja želučane kiseline u krvi pacijenata oboljelih od CDI s nastankom teških CDI i ponavljajućih CDI, dokazana je značajna povezanost nastanka teške kliničke slike s prethodnom primjenom cefalosporina 3. generacije ($P<0,05$).

Iako je antibiotsko liječenje, koje je prethodilo nastanku CDI, u nekih pacijenata bilo izrazito dugo (do 150 dana), a mnogi su primali kombinaciju više različitih klasa antibiotika (47,1 %), ovim istraživanjem nije dokazana statistički značajna povezanost ukupnog trajanja antibiotskog liječenja i broja kombiniranih klasa antibiotika s nastankom teške i ponavljajuće CDI.

Ispitivanjem povezanosti komorbiditeta s nastankom teških i ponavljajućih CDI dokazana je značajna povezanost zloćudnih bolesti s nastankom teške CDI ($P<0,05$), kao i značajna povezanost prethodnih kirurških operacija s nastankom teške CDI ($P<0,05$).

Učestalosti PCR-ribotipova 001 i 014/020 su bile veće u pacijenata s teškom CDI nego u pacijenata s blagom i umjereno teškom CDI, ali razlike u učestalosti između te dvije grupe bolesnika nisu bile statistički značajne.

Budući je teška CDI bila uzrokovana heterogenim sastavom *C. difficile* izolata (14 različitih PCR-ribotipova), nismo dokazali statistički značajnu povezanost niti jednog PCR-ribotipa *C. difficile* s nastankom teške CDI.

Iako je jedan dio teških CDI bio uzrokovan izolatima *C. difficile* koji su otporni na antibiotike, nije dokazana statistički značajna povezanost takvih izolata i nastanka teških CDI.

Pacijenti koji su prethodno bili kirurški operirani imaju 9,9 puta veći rizik za nastanak teške CDI u odnosu na pacijenta koji nisu bili operirani (OR 9,9; raspon od 1,2 do 83,8; $P<0,05$).

4.10. Povezanost prethodne primjene antibiotika i nastanka otpornosti na antibiotike

Ispitivanjem povezanosti prethodnog liječenja antibioticima s nastankom otpornosti na antibiotike izolata *C. difficile*, dokazana je značajno veća učestalost izolata *C. difficile* otpornih na kinolone u pacijenata koji su prethodno primali 1. i 2. generaciju kinolona ($P<0,05$).

6. RASPRAVA

Bolničke infekcije (*engl.* healthcare-associated infections, HAI) predstavljaju najveći zdravstveni izazov u razvijenim zemljama svijeta te se ulažu veliki napori u razvijanje i poboljšanje nacionalnih zdravstvenih strategija. Procijenjeno je da se najmanje 20 % HAI može spriječiti provođenjem specifičnih mjera nadzora i kontrole. Kako bi se povećala kvaliteta zdravstvene skrbi i sigurnost pacijenata, nužno je dobiti što detaljniji uvid u prirodu i obim postojećeg problema. Upravo zbog toga, epidemiološka i molekularno-mikrobiološka istraživanja tih infekcija, više su nego dobrodošla. Njihovo provođenje snažno zagovaraju i podupiru europska i američka udruženja (CDC, ECDC, ESCMID). Tako je i ovo istraživanje provedeno u skladu s njihovim preporukama te sa željom promicanja unapređenja kvalitete zdravstvene skrbi.

Tijekom 2011. – 2012., ECDC je proveo opsežnu studiju prevalencije HAI u više od 1 200 bolnica, u 29 zemalja članica EU i Hrvatskoj (koja u to vrijeme nije bila njen punopravni član) (95). Ovo je ujedno bila najveća dotad provedena studija o potrošnji antibiotika u europskim bolnicama (*engl.* European point prevalence study of antimicrobial use in acute care hospitals, PPS). Sve države uključene u studiju, koristile su isti standardizirani protokol, koji je nastao nakon dvogodišnjih usaglašavanja velikog broja znanstvenika i stručnjaka specijaliziranih za HAI te nakon provođenja više međunarodnih projekata kojima je testirana i validirana metodologija te educirani nacionalni i lokalni koordinatori. Procjenjuje se da su nacionalni koordinatori educirali preko 2 800 zdravstvenih djelatnika u cijeloj Europi, kako bi oni što uspješnije primijenili standardiziranu PPS metodologiju u lokalnim bolnicama. Reprezentativnost podataka prikupljenih iz različitih država ovisila je o dosljednosti u provođenju usvojene metodologije i značajno se razlikovala (od optimalne, kao što je to bio slučaj s podatcima iz Njemačke, Francuske, Italije i Mađarske, do loše raprezentativnosti podataka prikupljenih iz 24 % uključenih država, kao što su to bile Danska i Švedska). Nažalost, reprezentativnost podataka prikupljenih iz Hrvatske je bila slaba zbog malog uzorka (*engl.* sample size) i malog broja bolnica uključenih u istraživanje pa je propuštena izvanredna prilika za stvaranje platforme za izradu nacionalnih smjernica za antimikrobnu terapiju i prevenciju HAI.
Rezultati ove studije, potvrdili su HAI kao najveći europski zdravstveni problem, s prevalencijom od 5,7 % (4,5 – 7,4 %) ili 81 089 (64 624 – 105 895) pacijenata oboljelih od

HAI dnevno u europskim bolnicama. Procijenjeno je da je ukupan broj oboljelih od HAI tijekom 2011. – 2012. u EU bio 3,2 milijuna (CI 1,9 – 5,2 milijuna). Ovim istraživanjem, prikupljeni su opsežni epidemiološki podatci. Najveći rizik za nastanak HAI imali su hematološki bolesnici (osobito pacijenti kojima je bila potrebna transplantacija koštane srži), opečeni bolesnici te pacijenti liječeni u jedinicama intenzivnog liječenja. Pet najčešćih tipova HAI su bili: infekcije dišnog sustava (upale pluća 19,4 % i infekcije donjih dišnih puteva 4,1 %), infekcije kirurških rana (19,6 %), infekcije mokraćnih puteva (19 %), infekcije krvi (10,7 %) te infekcije probavnog sustava (7,7%).

C. difficile je bio najčešći uzročnik bolničkih infekcija probavnog sustava i dokazan je u čak 48 % ispitanih uzoraka. Uočene su velike razlike u prevalenciji HA-CDI među različitim državama, što je posljedica različite učestalosti testiranja kao i različite osjetljivosti i specifičnosti korištenih dijagnostičkih testova. Vjerojatno se radi o nedostatku financijskih sredstava, ali i dijagnostičkih smjernica. Iako mnoge europske države imaju razvijenu regionalnu i/ili nacionalnu mrežu prijavljivanja CDI, prema podatcima Europske komisije, nadzor nije standardiziran niti zakonom obvezujući u svim europskim državama, uključujući i Hrvatsku (96, 97, 98).

Rezultati ECDC PPS, ukazali su i na rastući epidemijski potencijal karbapenem-rezistentnih Gram-negativnih bakterija (7,6 % svih testiranih enterobakterija, 31,8 % testiranih izolata *Pseudomonas aeruginosa* i čak 81.2 % testiranih izolata *Acinetobacter baumannii*), pored već poznatih bolničkih patogena, *C. difficile* i MRSA (41,2 % svih testiranih izolata *S. aureus*).

Prevalencija pacijenata koji su primali barem jedan antibiotik je bila 35,0 % (raspon među bolnicama: 21,4 – 54,7 %). Od toga je 70,9 % pacijenata primalo jedan, 23,4 % pacijenat je primalo dva, a 5,7 % pacijenata je primalo tri ili više različitih antibiotika dnevno. Njemačka i Mađarska su imale najnižu stopu potrošnje antibiotika, a Grčka i Rumunjska najvišu.

Učestalost antimikrobnog liječenja je bila najviša u jedinicama intenzivnog liječenja (56,5 %), a najniža na odjelima psihijatrije (3,5 %). Najćešći put primjene antibiotika je bio parenteralan (70,6 %), a najčešće primjenjivani antibiotik je bio amoksicilin s dodatkom inhibitora stvaranja β-laktamaza (11.0 %). Zabrinjavajuća je činjenica da je čak 20,6 % pacijenata primalo antimikrobnu terapiju bez jasnog i opravdanog razloga, sudeći

po podatcima dostupnim iz medicinske dokumentacije. Mikrobiološki nalaz je imalo 54,1 % pacijenata liječenih od HAI, što znači da je gotovo polovica pacijenata liječena bez izolacije i identifikacije uzročnika infekcije. Propusti su uočeni i kod primjene kirurške profilakse. Naime, čak 59,2 % pacijenata je primalo „profilaksu“ duže od jednog dana.
Ova studija je dala odličan uvid u širinu problema neracionalne i nekontrolirane antimikrobne terapije. Liječenje antibioticima je najčešći rizični faktor za nastanak CDI pa stoga ne začuđuje podatak o visokoj učestalosti HA-CDI u ovom istraživanju.

Pod pokroviteljstvom ECDC, 2008. je provedeno veliko istraživanje o CDI u Europi (*engl.* European CDI Study, ECDIS) (16). U istraživanju su sudjelovale 34 države, uključujući Hrvatsku. Iz KBC-a Split je bilo uključeno troje pacijenata, dok je samo jedan *C. difficile* izolat bio dostupan za molekularnu genotipizaciju. Većina CDI slučajeva u ECDIS studiji (80 %) je bila povezana s boravkom u bolnici (HA-CDI). Čak 92 % oboljelih od CDI je primalo antibiotike unatrag tri mjeseca od nastanka simptoma CDI (od toga je 34 % primalo cefalosporine, 23 % kinolone i 19 % aminopeniciline s dodatkom inhibitora stvaranja β-laktamaza). Dvjesto i četiri (44 %) pacijenta su bolovala od teških osnovnih bolesti (*engl.* Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation, APACHE II score >0).
Genotipizirano je ukupno 389 *C. difficile* izolata i identificirano 65 različitih PCR-ribotipova. Najučestaliji PCR-ribotipovi su bili: 014/020 (16 %) i 001 (10 %). Budući da su PCR-ribotipovi 014 i 020 gotovo identični, a razlikuju se samo po jednoj vrpci u specfičnoj elektoforezi u agaroznom gelu, ovi ribotipovi se uvijek prikazuju zajedno kao PCR-ribotip 014/020.
Distribucija nekih PCR-ribotipova je ukazivala na njihovo regionalno širenje. Ova pojava je uočena za PCR-ribotip 106 u UK, Irskoj i Španjolskoj te za PCR-ribotip 018 u Italiji, Španjolskoj, Austriji i Sloveniji. Prevalencija hipervirulentnog PCR-ribotipa 027 je bila 5 %, što je niže nego u prethodno provedenoj studiji Barbuta i suradnika. S druge strane, porasla je prevalencija PCR-ribotipova 078 i 018 (16, 73). Za razliku od studije Barbuta i suradnika gdje je PCR-ribotip 078 bio predominantan jedino u Grčkoj, u ECDIS studiji je bio treći po učestalosti izolirani PCR-ribotip (8 %). Infekcije uzrokovane PCR-ribotipovima 018 i 056 su bile značajno povezane s kompliciranim ishodom bolesti (16).

Rezultati nedavno objavljene studije Tickera i sur. donose uvid u distribuciju različitih PCR-ribotipova *C. difficile* u SAD-u (99). Studija je provedena u dvogodišnjem vremenskom periodu (2011. – 2013.) u 32 američke bolnice. Izolirano je ukupno 508 sojeva *C. difficile.* Najčešći PCR-ribotipovi su bili: 027 (28,1 %), 014/020 (12,4 %), 106 (6,1 %) i 001 (4,3 %). Ovi rezultati se podudaraju s rezultatima studije Wilcoxa i sur., iz koje je vidljivo da je učestalost PCR-ribotipa 014/020 u Engleskoj značajno porasla (sa šestog na drugo mjesto najučestalijih PCR-ribotipova u periodu od 2009. do 2010., u odnosu na period od 2008. do 2009.) (100). Svi američki izolati PCR-ribotipa 014/020 su bili osjetljivi na većinu testiranih antibiotika, baš kao što je to dokumentirano i u europskim istraživanjima (101).

Cilj ove doktorske disertacije je bio identificirati, genotipizirati i odrediti antimikrobnu osjetljivost *Clostridium difficile* izolata koji uzrokuju CDI u KBC Split. Većina CDI identificiranih u dvogodišnjem periodu istraživanja su bile povezane s bolničkim liječenjem (70,6 %).

Kao i u europskim i američkim istraživanjima, molekularnom tipizacijom izoliranih sojeva je dobiven izrazito heterogen sastav. Ukupno je identificirano 16 različitih PCR-ribotipova. Najveću prevalenciju su imali najučestaliji europski i američki PCR-ribotipovi 014/020 i 001 (16, 73, 99). Iako ovim istraživanjem nije dokazana statistički značajna povezanost određenog PCR-ribotipa i nastanka teške kliničke slike, izolacija određenih PCR-ribotipova zaslužuje dodatno pojašnjenje. Ponajprije, važno je naglasiti izolaciju PCR-ribotipa 018 (1 izolat) koji je u ECDIS studiji bio značajno povezan s teškom CDI te univarijantnom statističkom analizom dokazan kao rizični faktor za komplicirani tijek bolesti (OR 9,22; 95 % CI 2,24-38,09). Prisutnost ovog PCR-ribotipa, mogla bi se objasniti geografskom blizinom Italije, u kojoj je on dominantan PCR-ribotip (16).

Značajan doprinos ovog istraživanja je izolacija dva nova, u svijetu do sada nepoznata PCR-ribotipa (PRO2844 i PRO2845). Oba su uzrokovala teške CDI, a oboljeli su pripadali rizičnoj skupini pacijenata starijih od 65 godina koji su prethodno primali antibiotsku terapiju. Ovi PCR-ribotipovi nisu bili povezani s nastankom ponavljajućih infekcija, niti sa značajnom rezistencijom na antibiotike (PCR-ribotip PRO2844 je bio otporan jedino na ciprofloksacin, a PCR-ribotip PRO2845 je bio osjetljiv na sve testirane antibiotike).

Među oboljelim od CDI, velik je broj onih koji su imali teške osnovne bolesti, kao što su to zloćudne ili kronične bolesti različite etiologije. Zloćudne bolesti snažno utječu na imunološti status, narašuvaju opće zdravstveno stanje pacijenta i povećavaju sklonost akutnim i kroničnim infekcijama. Stoga ne iznenađuje činjenica da je čak petina oboljelih od CDI u ovom istraživanju bolovala od zloćudnih bolesti. Osim toga, oboljeli od hematoloških zloćudnih bolesti, primaju dugotrajnu profilaktičku antimikrobnu terapiju, što ih čini dodatno osjetljivim za nastanak CDI. Svi pacijenti u ovom istraživanju su primali antibiotike unatrag tri mjeseca (100 %). Najčešće primijenjeni antibiotici su bili kinoloni (37,3 %), kombinacija aminopenicilina s inhibitorima stvaranja β-laktamaza (29,4 %) i treća generacija cefalosporina (21,6 %).

Na Odjelu hematologije KBC Split, u vrijeme provođenja ovog istraživanja, profilaktički su propisivani kinoloni (najčešće ciprofloksacin), a njihova se primjena povezuje s epidemijama hipervirulentnih PCR-ribotipova (16, 69, 73, 98). Hipervirulenti PCR-ribotipovi 027 i 078 nisu izolirani u ovome istraživanju. Moguće je da se radi o prostorno-vremenskim razlikama u distribuciji PCR-ribotipova u različitim geografskih područjima Hrvatske. Naime, pojavnost hipervirulentnih sojeva *C. difficile* bi se mogla očekivati u sjevernijim područjima Hrvatske zbog geografske blizine Slovenije, u kojoj je već potvrđena cirkulacija ovih PCR-ribotipova (101).

Međutim, u budućnosti možemo očekivati promjenu epidemiologije i genotipske distribucije PCR-ribotipova, ukoliko se nastavi dosadašnja praksa potrošnje antibiotika u KBC Split. Naime, čak 41,2% pacijenata oboljelih od teške CDI je primao treću generaciju cefalosporina ili fluorokinolone prije nastanka CDI.

Povećana potrošnja svih klasa antibiotika zamijećena je u 2011. u hrvatskim bolnicama [44,34 definiranih dnevnih doza (DDD) na 100 pacijent-dana, (*engl.* patient-days) u odnosu na 2010. (41,76 DDD/100 pacijent-dana)] (102).

Kroz ove dvije godine, potrošnja antibiotika u KBC Split je bila viša od prosječne hrvatske potrošnje (54,4 DDD/100 pacijent-dana u 2010. i 60 DDD/100 pacijent-dana u 2011.). Potrošnja cefalosporina je porasla s 17,6 DDD/100 pacijent-dana u 2010. na 19,6 DDD/100 pacijent-dana u 2011., a potrošnja kinolona s 8,9 DDD/100 pacijent-dana na 9,9 DDD/100 pacijent-dana u 2011.

Dvadeset i tri *C. difficile* izolata (42,6 %) analizirana u ovoj studiji su bila otporna na barem jedan testirani antibiotik. Tri izolata (PCR-ribotipa 001) su bila višestruko otporna (MDR). Prevalencija otpornih izolata se razlikuje između europskih država, ali općenito vlada trend porasta broja MDR izolata (92, 103, 104). Čak 38,9 % izolata je bilo otporno na kinolone, što je već opisano za nekoliko epidemijskih sojeva (105, 106).
U nedavnoj studiji Waselsa i sur. svi izolati hipervirulentnog epidemijskog klona II-I/027/NAP1, bili su otporni na sve testirane fluorokinolone, a otpornost je bila posljedica genetskih mutacija (107).
Doprinos ove disertacije je i dokaz veće učestalosti izolata otpornih na kinole u pacijenata koji su prethodno primali kinolone 1. i 2. generacije. Selektivni pritisak prekomjerne potrošnje kinolona u KBC Split mogao bi objasniti veliku proporciju izolata otpornih na ove antibiotike. To još jednom naglašava potrebu stalnog nadzora i pažljivog i promišljenog propisivanja antibiotika u KBC Split.

U ovom istraživanju, dokazana je velika proporcija teške CDI (72,5 %). Ovaj rezultat bi mogao biti posljedica pristranosti korištene dijagnostičke metode (*engl.* selection bias), budući da nije korišten preporučeni ESCMID-ov dvostupanjski postupnik u dijagnostici CDI. Moguće je da imuno-enzimskim testom nisu otkriveni slučajevi produkcije niže razine toksina A i B u stolici oboljelih i blaže kliničke slike CDI. Korištenje jednostupanjskog postupka testiranja *C. difficile* u stolici oboljelih je uobičajena praksa u mnogim europskim bolnicama, unatoč jasno publiciranim ESCMID-ovim smjernicama (16). Donošenje nacionalnih standarda i smjernica je nužno za optimiziranje dijagnostike CDI. Iako prelazak s jednostupanjskog na dvostupanjski postupnik testiranja CDI poskupljuje dijagnostičke testiranje, smatra se da bi ovaj postupak mogao donijeti velike ekonomske uštede zbog značajnije prevencije, ranog otkrivanja i liječenja CDI (108).
Znanstveni doprinos ovog istraživanja je i dokaz povezanosti prethodne primjene cefalosporina 3. generacije s nastankom teških CDI, što još jednom potvrđuje shvaćanje da se neke od ovih infekcija mogu uspješno spriječiti mudrom antibiotskom politikom. Značaj istraživanja je i dokaz povezanosti prethodnih kirurških operacija i zloćudnih bolesti s nastankom teških CDI u KBC Split. To navodi na zaključak da su ove dvije skupine paci-

jenata osobito osjetljive za nastanak teških CDI te zahtjevaju pojačan aktivni zdravstveni nadzor. Nedavno je objavljena zanimljiva studija Clantona i sur. u kojoj je prikazana statistički značajno veća učestalost prethodne apendektomije u pacijenata oboljelih od teške CDI u odnosu na populaciju pacijenata koji ne boluju od CDI (43,6 % u odnosu na 17,6 %) (109).

Iako su pacijenti oboljeli od šećerne bolesti često osjetljivi za nastanak različitih infekcija, ovim istraživanjem nismo dokazali njenu značajnu povezanost s nastankom teških i ponavljajućih CDI. Ove godine je objavljeno istraživanje Elikim-Raza i suradnika, prema kojem bi specifična dijabetička terapija metforminom, zbog svog povoljnog učinka na crijevnu mikrofloru, čak mogla imati preventivni učinak na nastanak CDI (110).

U ovom istraživanju, šest pacijenta (11,8 %) je imalo ponavljajuće infekcije, što je nešto niže nego što je to bilo zabilježeno u ECDIS studiji (18 %). Ove su infekcije najčešće bile izazvane PCR-ribotipom 001, iako nije dokazana njihova statistički značajna povezanost. Ponavljajuće infekcije čine najveći terapeutski problem zbog niza čimbenika koji su detaljno opisani u uvodu disertacije. Osobito je zanimljiv slučaj 40-godišnjeg profesionalnog ronioca koji je zbog baro-traume, protruzije intervertebralnih diskova Th 8 – Th 9 i spastičke parapareze liječen na Odjelu neurologije. Prije toga nije teže bolovao. Za vrijeme bolničkog liječenja, primao je trimetoprim-sulfametoksazol i ceftriakson. Desetog dana antimikrobnog liječenja, dobio je učestale vodenaste stolice. Test na toksine A i B *C. difficile* u stolici je bio pozitivan. Liječen je metronidazolom, ali je 3. dan nakon prestanka liječenja došlo do recidiva. Nakon desetodnevnog liječenja vankomicinom i kliničkog poboljšanja, otpušten je na kućnu njegu. Dva mjeseca nakon prve epizode CDI, liječen je ciprofloksacinom zbog infekcije mokraćnih puteva. Desetog dana antimikrobnog liječenja nastupio je novi recidiv CDI. Uspješno je liječen vakomicinom. Novi recidiv je nastupio nakon mjesec dana kada je pacijent, zbog nove uroinfekcije, bio liječen trimetoprim-sulfametoksazolom. I ovog puta je primjenjena terapija vankomicinom. Ovaj izolat je bio osjetljiv na sve testirane antibiotike. Nažalost, prilikom pohrane i transporta u laboratorij za molekularnu dijagnostiku, došlo je do kontaminacije izolata pa je njegova genotipizacija bila nemoguća.

Iako se CDI najčešće dovodi u vezu s bolničkim liječenjem, sve je više izvještaja u medicinskoj literaturi o izvanbolničkoj pojavnosti CDI. Oko 14 % slučajeva CDI zabilježenih u ECDIS studiji nije bilo povezano s bolničkim liječenjem, dok je proporcija CA-CDI zabilježena u ovom istraživanju bila čak i nešto veća od europskog prosjeka i iznosila je 23,5 % (16). Općenito, oboljeli od CA-CDI su mlađi od pacijenata oboljelih od HA-CDI i najčešće nisu bolovali od teških bolesti prije nastanka CDI pa prema tome ne spadaju u prethodno opisanu rizičnu populaciju za nastanak CDI (111, 112, 113, 114, 115). U ovom istraživanju, osobito je zanamljiv slučaj mlade trudnice (24.g.), koja je zbog akutne upale mokraćnih puteva ambulantno primala cefuroksim, te nakon samo dva dana antibiotske terapije dobila učestale vodenaste stolice (do deset stolica dnevno). Zbog općeg lošeg stanja, ponavljanja simptoma CDI nakon liječenja metronidazolom, sumnje na razvoj toksičnog megakolona i ugroženosti trudnoće, induciran je prijevremeni porod carskim rezom (*lat.* sectio caesarea). Započeto je liječenje vankomicinom te je, unutar mjesec dana od postavljanja dijagnoze CDI, došlo do postupnog kliničkog poboljšanja. Ova mlada žena nije imala nikakvih rizičnih čimbenika za nastanak CDI osim kratkotrajne antibiotske terapije. Štoviše, iz stolice je izoliran jedan od najčešćih PCR-ripotipova, 014/020, koji do sada nije bio povezivan s hipervirulencijom. Sličan klinički slučaj je opisao Candiotto (113). U 39-godišnje trudnice, bez prethodne hospitalizacije i bez akutnih i kroničnih bolesti u anamnezi, došlo je do pojave učestalih vodenastih stolica s primjesama krvi (>14 stolica dnevno). U stolici je dokazan toksigeni soj *C. difficile*. Pacijentica nije primala antibiotike 3 mjeseca prije nastanka CDI niti je imala bilo koji drugi poznati rizični faktor za nastanak CDI. Infekcija je imala izrazito kompliciranu tijek te je unatoč primjeni metronidazola i vankomicina došlo do razvoja toksičnog megakolona. Zbog teškog kliničkog stanja pacijentice, induciran je prijevremeni porod u 32. tjednu trudnoće. Uz nastavak liječenja vankomicinom, pacijentica je bez kliničkih znakova CDI i bez potrebe za kirurškim liječenjem, otpuštena kući. Prilikom kontrolnog pregleda, nakon 6 mjeseci, test za dokaz toksina A i B *C. difficile* u stolici je bio negativan. Ova dva slučaja otvaraju pitanje je li trudnoća nezavisni rizični faktor za nastanak CDI, a odgovor bi trebalo tražiti ispitivanjem na većem uzorku pacijentica.

Ohrabrujuća je činjenica, da usprkos visokoj potrošnji antibiotika u KBC Split i velike proporcije teških CDI, nije došlo do izbijanja epidemije CDI za vrijeme trajanja ovog istraživanja. Naime, genotipizacijom *C. difficile* izolata, dokazano je da ni jedan slučaj CDI nije bio ni prostorno ni vremenski klonalno povezan. To navodi na zaključak, da su u uvjetima skromnih bolničkih mogućnosti, provedene rigorozne mjere prevencije širenja infekcije. Nakon epidemioloških izvida i pažljive edukacije zdravstvenog osoblja provedene su mjere sprječavanja prijenosa infekcije kontaktom (higijena ruku, dispozicija otpadnog materijala i čišćenje bolničkog okoliša).

PCR-ribotipizacija i MLST su dobro poznate epidemiološke metode koje omogućavaju praćenje genotipske distribucije i eventualnog klonalnog širenja *C. difficile* na nekom prostoru. Ipak, ni jedna od njih ne može pružiti informacije o fenotipskim razlikama izolata koje bi mogle biti korisne za brzu identifikaciju virulentnijih i potencijalno zaraznijih sojeva. *C. difficile* je izrazito divergentna vrsta. Zajednički korjen seže unatrag 1,1 do 85 milijuna godina (116, 117). Nasuprot tome, patogeni izolati su se razvili iz više različitih loza, kroz kratki evolucijski period, sugerirajući da je virulencija evoluirala neovisno u više loza s jakim epidemijskim potencijalom (PCR-ribotipovi 017, 027 i 078). Zajedniči korjen loze hipervirulentnog PCR-ribotipa 027 je star svega 30-tak godina što se poduda-ra s njegovim globalnim širenjem (50). Nije poznat točan način evolucijskog razvoja ove bakterijske vrste: pojavljuju li se sojevi na jednom kontinentu, šire globalno i nakon toga nestaju; mutiraju li sojevi „u stvarnom vremenu“ između pacijenata na bolničkim odjelima te je li se opisano već dogodilo s PCR-ribotipom 027. Nedavno su objavljeni rezultati velike epidemiološke studije u kojoj je istraživan način prijenosa CDI na velikom endemskom području kroz 2,5 godine (101). MLST genotipizacijom 1 276 izoliranih sojeva *C. difficile*, dokazano je da je ova epidemija bila uzrokovana sojevima iz više različitih loza. Zaključak istraživanja je da se nastanak čak tri četvrtine novih slučajeva CDI na bolničkim odjelima ne može objasniti jednostavnim prijenosom infekcije od simptomatskih pacijenata. Rezultate genotipizacije *C. difficile* treba analizirati i interpretirati u kombinaciji s geografskim, demografskim i ostalim epidemiološkim podatcima. Samo na taj način, moguće je prostorno-vremenski mapirati različite genotipove na bolničkim odjelima, što nadalje omogućava nadzor njihove perzistencije, prijenosa i evolucije unutar bolnice. Razvoj novih probirnih platformi, koje se temelje na sekvencioniranju cijelog genoma, mo-

gao bi donijeti važne informacije o klonalnom širenju sojeva te pomoći u razlikovanju izvora ponavljajućih infekcija (relapsa i reinfekcija). Uvođenje sekvencioniranja *C. difficile* izolata u rutinsku mikrobiološku dijagnostiku, moglo bi značajno poboljšati prevenciju ovih infekcija (zbog brze identifikacije hipervirulentnih i epidemijskih sojeva) (118). Tijekom prošle i ove godine, revidirane su i nadopunjene smjernice za rano otkrivanje i liječenje CDI, kao i smjernice za sprječavanje njihovog širenja (86, 119, 120). Ponovno je naglašena potreba mudre zdravstvene politike, osobito kontrola propisivanja antimikrobnog liječenja, ali i potreba redovitog epidemiološkog praćenja distribucije različitih genotipova *C. difficile* i njihove osjetljivosti na antibiotike na lokalnoj, nacionalnoj i globalnoj razini.

7. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem je analizirana genotipska distribucija *C. difficile* izolata koji uzrokuju CDI u KBC Split i potvrđene su prethodno postavljene hipoteze.

Dokazano je postojanje najučestalijih europskih i američkih PCR-ribotipova *C. difficile* (001 i 014/020), ali i postojanje novih, u svijetu neizoliranih PCR-ribotipova (PRO2844 i PRO2845).

Izolirani su na antibiotike otporni i višestruko otporni *C. difficile*, a dokazana je i povezanost između otpornosti na antibiotike sojeva *C. difficile* koji uzrokuju CDI i prethodne antibiotske terapije oboljelih od CDI. Utvrđena je značajno veća učestalost izolata *C. difficile* otpornih na kinolone u pacijenata koji su prethodno primali 1. i 2. generaciju kinolona.

Preko 70 % pacijenata je imalo tešku CDI. Nastanak teške kliničke slike CDI je bio značajno povezan s prethodnom primjenom cefalosporina 3. generacije te sa zloćudnim bolestima i prethodnim kirurškim operacijama. Kirurški operirani pacijenti su imali 9,9 puta veći rizik za nastanak teških CDI u odnosu na neoperirane pacijente.

8. SAŽETAK

C. difficile je najznačajniji uzročnik bolničkih postantibiotskih proljeva u razvijenom svijetu. U ovom istraživanju, analizirana je klinička i molekularno-mikrobiološka osnova *C. difficile* infekcija u KBC Split.

U razdoblju od 1. siječnja 2010. do 31. prosinca 2011., testirano je ukupno 493 uzorka proljevaste stolice pacijenata s kliničkom sumnjom da boluju od CDI i zahtjevom za testiranje na prisustvo *C. difficile* toksina A i B u stolici. Ukupno su identificirane 54 primarne epizode CDI. Trideset i jedan pacijent (57,4 %) je bolovao od teških osnovnih bolesti, a 19 pacijenata (35,2 %) je imalo kirurški zahvat prije nastanka CDI. Trideset i sedam pacijenata (72,5 %) je razvilo tešku kliničku sliku CDI, a ponavljajuće infekcije je imalo 11,7 % pacijenata. Nije zabilježen niti jedan slučaj epidemije u vremenu praćenja.

Od 54 izolirana toksigena soja *C. difficile*, 50 ih je bilo dostupno za PCR-ribotipizaciju. Ukupno je izolirano šesnaest različitih PCR-ribotipova, a najučestaliji PCR-ribotipovi su bili 001 (27,8 %) i 014/020 (24,1 %). Izolirana su dva nova, u svijetu nepoznata PCR-ribotipa (PRO2844 i PRO2845). Tešku CDI je uzrokovalo četrnaest različitih PCR-ribotipova, uključujući i novoizolirane sojeve. PCR-ribotipovi 001 i 014/020 su uzrokovali većinu ovih infekcija.

Dvadeset tri izolata su bila otporna na barem jedan testirani antibiotik. Većina otpornih izolata pripada PCR-ribotipovima 001 i 014/020. Nije dokazana statistički značajna povezanost različitih PCR-ribotipova i nastanka teške CDI, ponavljajućih CDI ili određenog obrasca otpornosti na antibiotike. Ipak, 15 teških CDI (40,5 %) su uzrokovali izolati otporni na kinolone. Učestalost izolata otpornih na kinolone je bila značajno veća u pacijenata koji su primali kinolone prve i druge generacije prije nastanka CDI. Među otpornim izolatima, tri (13,0 %) su bila MDR.

Statistička analiza, s namjerom utvrđivanja povezanosti dobi, spola, premedikacije, akutnih i kroničnih bolesti te laboratorijskih parameterara s nastankom teške i ponavljajućih CDI, pokazala je značajnu povezanost nastanka teške CDI i liječenja trećom generacijom cefalosporina prije nastanka CDI, zloćudnih bolesti i prethodnih kirurških operacija. Pažljivom kontrolom propisivanja cefalosporinskih antibiotika mogao bi se spriječiti nastanak teške kliničke slike u kirurških i onkoloških pacijenata.

9. SUMMARY

Clostridium difficile is the leading cause of nosocomial antibiotic-associated diarrhoea in developed countries. The present study was undertaken in order to obtain clinical and molecular overview of *Clostridium difficile* infection (CDI) in the University Hospital Centre Split.

All patients (n=54) with a first episode of clinical picture compatible with CDI and microbiological evidence of toxin-producing *C. difficile* in stool, from January 2010 to December 2011, were included in the study. Thirty one patients (57.4 %) had chronic underlying diseases and nineteen patients (35.2 %) had undergone surgery prior to CDI. Six patients (11.7 %) had suffered one or more recurrences and 37 patients (72.5 %) showed severe CDI.

Fifty four strains were isolated and 50 of them were available for PCR-ribotyping. Sixteen different PCR-ribotypes were identified and two new PCR-ribotypes were detected (PRO2844 and PRO2845). The most prevalent were PCR-ribotype 001 (27.8 %) and 014/020 (24.1 %). Severe CDI was associated with fourteen different PCR-ribotypes (including new PRO2844 and PRO2845).

Fifteen severe CDI cases (40.5 %) were caused by strains resistant to fluoroquinolones. The frequency of strains resistant to these antibiotics was significantly higher in patients that received fluoroquinolones prior to the onset of CDI. Among 23 resistant strains, three (13.0 %) - all PCR-ribotype 001- were multi-resistant. Selective pressure derived from the extensive use of quinolones in University Hospital Centre Split could explain the predominance of strains resistant to these antibiotics observed in the study, underlining the need for a more careful use of antibiotics.

Statistical analysis showed a strong correlation between severe CDI and prior treatment with a third generation cephalosporin, malignancy and surgery. Awareness and better antibiotic stewardship among surgical and oncologic patients could prevent development of severe CDI in the future.

10. LITERATURA

1. Caroll KC. Spore-Forming Gram-Positive Bacilli: *Bacillus* and *Clostridium* Species. U: Brooks GF, Caroll KC, Butel JS, Morse SA, ur. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26. izd. New York: The McGraw-Hill Companies; 2013, str. 175-83.

2. 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.

3. Smith LD, King EO. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J Bacteriol 1962;82:65-7.

4. Green RH. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. Yale J Biol Med 1974;47:166-81.

5. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. Ann Intern Med 1974;81:429.

6. Finney JMT. Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. Bull Johns Hopkins Hosp 1893;4:53.

7. Penner A, Bernheim A. Acute postoperative enterocolitis. Arch Pathol 1939;27:966.

8. Hummel RP, Altemeier WA, Hill EQ. Iatrogenic staphylococcal enterocolitis. Ann Surg 1964;160:551.

9. Wakefield RD, Sommers SD. Fatal membranous staphylococcal enteritis in surgical patients. Ann Surg 1953;138:249.

10. Khan MY, Hall WH. Staphylococcal enterocolitis: treatment with oral vancomycin. Ann Intern Med 1966;65:1.

11. Hafiz S. *Clostridium difficile* and its toxins (disertacija) Leeds, UK: University of Leeds; 1974.

12. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium in hamsters. J Infect Dis 1977;136:701-5.

13. Larson HE, Parry JV, Price AB, Davies DR, Dolby J, Tyrell DA. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. BMJ 1977; 1:1246-8.

14. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet 1978;1:1063-6.

15. 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.

16. Bauer MP, Noretmans DW, van Benthem BH i sur. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011;377:63-73.

17. Songer JG. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. Animal Health Res Rev 2005;5:321-6.

18. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Can Med Assoc J 2004;171:51-8.

19. McFarland LV, Elmer GW, Surawich CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. Am J Gastroenterol 2002;97:1769-75.

20. Verity P, Wilcox MH, Fawley W, Parnell P. Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. J Hosp Infect 2001;49:204-10.

21. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*-more difficult than ever. N Engl J Med 2008;359:1932-40.

22. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 1989;320:204-10.

23. Eveillard M, Fourel V, Marc MC i sur. 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;7:371-81

24. Borriello SP, Davies HA, Kamiya S, Reed PJ,Seddon S. Virulence factors of *Clostridium difficile.* Rev Infect Dis 1990;12Suppl 2:185-91.

25. Bianco M, Fedele G, Quattrini A i sur. Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. J Med Microbiol 2011;60:1162-7.

26. Dawson LF, Donahue EH, Cartman ST i sur. The analysis of para-cresol production and tolerance in *Clostridium difficile* 027 and 012 strains. BMC Microbiology 2011;11:86.

27. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF i sur. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol 2005;54:113-7.

28. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol 2009;7:526-36.

29. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet 2001;357;189-93.

30. Barbut F, Decré D, Lalande V i sur. Clinical features of *Clostridium difficile*- associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. J Med Microbiol 2005;54:181-5.

31. Goncalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP ribosyltransferase) from *Clostridium difficile.* J Clin Microbiol 2004; 42:1933-9.

32. Geric B, Carman RJ, Rupnik M i sur. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. J Infect Dis. 2006;193:1143-51.

33. Clabots CR, Johnson S, Bettin KM i sur. Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. J Clin Microbiol 1993;31:1870-5.

34. Sebaihia M, Wren B, Mullany P i sur. The multidrug resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly, mobile mosaic genome. Nat Genet 2006;38:779-86.

35. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med 2002;31:334-9.

36. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P i sur. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2006;12:2-18.

37. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of CDAD: old therapies and new strategies. Lancet Infect Dis 2005;5:549-57.

38. 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.

39. DuPont HL. The search for effective treatment of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 2011;364:473-4.

40. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S 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.

41. Freiler JF, Durning SJ, Ender PT. *Clostridium difficile* small bowel enteritis occuring after total colectomy. Clin Infect Dis 2001;33:1429-32.

42. Gerding DN, Olson MM, Peterson LR i sur. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis in adults. A prospective case-controlled epidemiologic study. Arch Intern Med 1986;146:95-100.

43. Kyne L, Merry C, O'Connell B i sur. Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile.* Age Ageing 1999;28:107-13.

44. 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.

45. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, 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.

46. UK Health Protection Agency. English national point prevalence survey on healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2011: preliminary data. London; Health Protection Agency, 2012.

47. 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.

48. Health Protection Agency. Investigation into outbreaks of *Clostridium difficile* at Maidstone and Tunbridge Wells NHS Trust. Commission for Healthcare Audit and Inspection, 2007.

49. Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS i sur. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. Euro Surveill 2008;13.pii:18942.

50. Loo VG, Poirier L, Miller MA 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.

51. Kuijper EJ, van Dissel JT. Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. Can Med Assoc J 2008;179:747-8.

52. 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.

53. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. www.cdc.gov./drugresistance/threat-report-2013

54. Loo VG, Poirier L, Miller MA i sur. A predominantly clonal multi-institutional outbrake of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med 2005;353:2442-9.

55. Eggertson L. Quebec strain of *C. difficile* in 7 provinces. Can Med Assoc J 2006;174:607-8.

56. Mcdonald LC, Killgore GE, Thompson A i sur. An epdemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile.* N Engl J Med 2005;353:2433-41.

57. Smith A. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-production strains in Canada and the US. Eurosurveillance 2005; 10:050630. http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050630asp#2

58. Kuijper EJ, Debast SB, van Kregten E, Vaessen N, Notermans DW, van den Broek PJ. *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands. Ned Tijdschr Geneeskd 2005;49:2087-9.

59. Kuijper EJ, van den Berg R, Debast S i sur. *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands. Emerg Infect Dis 2006;12:827-30.

60. Joseph R, Demeyer D, Vanrenterghem D, van den Berg R, Kuijper EJ, Delmée M. First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. Eurosurveill Weekly 2005;10:E051020.4 http://www.eurosurveillance.org/ew2005/051020.asp#4

61. Tachon M, Cattoen C, Blanckaert K i sur. First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report. Eurosurveillance 2006;11:E060504.1. www.eurosurveillance.org/ew/2006/060504.asp#1

62. Riley TV, Thean S, Hool G, Golledge CL. First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027. Med J Aust 2009;190:706-8.

63. Tae CH,Jung SA, Song HJ i sur. The first case of antibiotic-associated colitis by *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 in Korea. J Korean Med Sci 2009;24:520-4.

64. Kato H, Ito Y, Van Den Berg RJ, Kuijper EJ, Arakawa Y. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. Euro Surveill 2007;12E070111.3. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3110

65. Cheng VC, Yam WC, Chan JF, To KK, Ho PL, Yuen KY. *Clostridium difficile* ribotype 027 arrives in Hong Kong. Int J Antimicrob Agents 2009;34:492-3.

66. Queseda-Gomez C, Rodriguez C, Gamboa-Coronado M. i sur. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. J Clin Microbiol 2010;48:669-70.

67. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. TcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile.* J Clin Microbiol 2007;45:215-21.

68. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS i sur. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. J Clin Microbiol 2003;41:1543-7.

69. Goorhuis A, Bakker D, Corver J i sur. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 2008;47:1162-70.

70. Rupnik M, Widmer A, Zimmermann O, Eckert C, Barbut F. *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. J Clin Microbiol 2008;46:2146.

71. Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. Anaerobe 2011;17:85-6.

72. Debast SB, Van Leengoed LA, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. Environ Microbiol 2009;11:505-11.

73. Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M i sur. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 2007;13:1048-57.

74. Wicox MH, Cunniffe JG, Trundle C, Redpath C. Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1996;34:23-30.

75. Ghantoji SS, Sail K, Lairson DR i sur. Economic healthcare costs of *Clostridium difficile* infection; a systematic review. J Hosp Infect 2010;74:309-18.

76. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M i sur. Costs of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. J Hosp Infect 2008;70;15-20.

77. Goldenberg SD, French GL. Diagnostic testing for *Clostridium difficile:* a comprehensive survey of laboratories in England. J Hosp Infect 2011;79:4-7.

78. Kyne L, Warny M, Qamar A i sur. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. N Engl J Med 2000;342:390-7.

79. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S 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.

80. Baines SD, O'Connor R, Freeman J i sur. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile.* J Antimicrob Chemother 2008;62:1046-52.

81. Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *Clostridium difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. J Clin Gastroenterol 2010;44:562-6.

82. Cornely OA, Crook DW, Esposito R i sur. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. Lancet Infect Dis 2012;12:281-9.

83. Brandt LJ, Aroniadis OC,Mellow M i sur. Long-term followup of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. Am J Gastroenterrol 2012;107:1079-87.

84. Lowy I, Molrine DC, Leav BA i sur. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. N Engl J Med 2010;362:197-205.

85. Crook DW, Walker AS, Kean Y i sur. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection:meta:analysis of pivotal randomized controlled trials. Clin Infect Dis 2012;55Supp 2:93-103.

86. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH i sur. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile.* Clin Microbiol Infect 2008;14:2-20.

87. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria-Seventh Edition: Approved standard M11-A7. Wayne, PA, USA: CLSI; 2007.

88. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18. Wayne, PA, USA: CLSI; 2008.

89. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i sur. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18:268–281.

90. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD. Comparison of Five Cultural Procedures for Isolation of Clostridium difficile from Stools. J Clin Microbiol 1992;30:514-6.

91. Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L, CDAD-CSI Study. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in south Québec, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3473-5.

92. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2011;66:2227-34.

93. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium diffcile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiology Letters 1999;175:261-6.

94. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M i sur. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J Med Microbiol 2008;57: 1377-82.

95. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of health care associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm:ECDC;2013.

96. European Commission. 2012. Commission staff working document: Detailed analysis of countries' reports on the implementation of the Council Recommendation (2009/C151/01) on patient safety, including the prevention and control of healthcare associated infections SWD (2012) 366 final. Brussels, EU.

97. Suetens C. *Clostridium difficile*: summary of actions in the European Union. Eurosurveillance. 2008;13:1-2.

98. Barbut F, Jones G, Eckert C. Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. Curr Opin Infect Dis 2011;24:370-6.

99. Ticker IA, Goering RV, Whitmore JD, Ashley NWL, Persing DH, Tenover FC. Strain types of antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:4214-8.

100. Wilcox MH, Shetty N, Fawley WN i sur. Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national ribotyping-based surveillance scheme in England. Clin Infect Dis 2012;55:1056-63.

101. Pirš T, Avberšek J, Zdovc I i sur. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. J Med Microbiol 2013;62:1478-85.

102. Payerl Pal M, Tambic Andrasevic A. Antibiotic consumption in Croatia. U: Tambic Andrasevic A, Tambic T, Katalinic-Jankovic V, Payerl Pal M, Bukovski S, Soprek S, ur. Antibiotic resistance in Croatia; 2011. Zagreb, Croatia: The Croatian Academy of Medical Science, 2012, str. 132-8.

103. Wasels F, Monot M, Spigaglia S i sur. Inter- and Intraspecies Transfer of a *Clostridium difficile* Conjugative Transposon Conferring Resistance to MLSB. Microb Drug Resist 2014; 20:555-60.

104. Lachowicz D, Pituch H, Obuch-Waszczatyński P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains belonging to different polymerase chain reaction ribotypes isolated in Poland in 2012. Anaerobe 2015;31:37-41.

105. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P i sur. Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe. J Med Microbiol 2008;57:784-89.

106. Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP. The emergence of "hypervirulence" in *Clostridium difficile*. Int J Med Microbiol 2010;300:387–95.

107. Wasels F, Kuehne SA, Cartman ST i sur. Fluoroquinolone resistance does not impose a cost on the fitness of *Clostridium difficile* in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:1794-6.

108. UK Department of Health. 2012. Update guidance on the diagnosis and report of *Clostridium difficile.* www.dh.gov.uk/publications

109. Clanton J, Subichin M, Drolshagen K, Daley T, Firstenberg MS. Fulminant *Clostridium difficile*: An association with prior appendectomy? World J Gastrointest Surg 2013;5:233-8.

110. Eliakim-Raz N, Fishman G, Yahav D i sur. Predicting *Clostridium difficile* infection in diabetic patients and the effect of metformin therapy: a retrospective, case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015;34:1201-5.

111. Kuijper EJ, van Dissel JT. Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. Can Med Assoc J 2008;179:747-8.

112. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM i sur. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. JAMA Intern Med 2013;173:1359–67.

113. Candiotto A, Pascoli I, Gritti A, Busato E, Dal Pozzo G. Toxic megacolon complicating a *Clostridium difficile* infection in a pregnant woman. J Med Microbiol 2009;59:124-6.

114. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL i sur. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. Am J Gastroenterol 2012;107:89-95.

115. Miyajima F, Roberts P, Swale A i sur. Characterization and carriage ratio of *Clostridium difficile* strains isolated from a community-dwelling elderly population in the United Kingdom. PLoS One. 2011;6(8):e22804.

116. Parkhill J, Wren BW. Bacterial epidemiology and biology-lessons from genome sequencing. Genome Biol 2011;12:230.

117. He M, Sebaihia M, Lawley TD i sur. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:7527-32.

118. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH I sur. Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. PLOS Med 2012;9(2):e1001172.

119. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ i sur. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014;20Supp 2:1–26.

120. Aguado JM, Anttila VJ, Galperine T i sur. Highlighting clinical needs in *Clostridium difficile* infection: the views of European Healthcare professionals at the front line. J Hosp Infect 2015;90:117-25.

11. ŽIVOTOPIS

Anita Novak je rođena 12. 12. 1971. u Splitu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (studij u Splitu) 1996. Specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom položila je 2005. Tijekom specijalizacije, završila je stručni poslijediplomski studij iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom, na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2008., upisuje znanstveni poslijediplomski doktorski studij „Klinička medicina utemeljena na dokazima (Evidence Based Medicine, EBM)" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Od 2005. do danas radi kao specijalist medicinske mikrobiologije na Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split. Članica je više znanstvenih i strukovnih domaćih (Hrvatski liječnički zbor, Hrvatska liječnička komora, Hrvatsko društvo za medicinsku mikrobiologiju s parazitologijom) i međunarodnih organizacija (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile,* ESCMID Study Group for Anaerobic Infections). Prva je autorica u tri i koautorica u sedam znanstvenih radova te tri kongresna sažetka s međunarodnom recenzijom koji se citiraju u bazi Current Contents. Koautorica je u dva znanstvena rada koji su citirani u bazi Indeks medicus/MEDLINE i Excerpta Medica te petnaest kongresnih radova koji su predstavljeni na međunarodnim kongresima i stručnim skupovima. Autorica je poglavlja „Protisti probavnog i urogenitalnog sustava" u knjizi „Medicinska mikrobiologija", ur. Uzunović- Kamberović S. Naslovna je asistentica na katedri Medicinska mikrobiologija i parazitologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu (medicina, dentalna medicina, farmacija i Medical Studies in English) i Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija (sestrinstvo i primaljstvo, fizioterapija, radiološka terapija i medicinsko- laboratorijska dijagnostika) od 2008.