Dijagnostika Clostridioides difficile infekcija

Ževrnja, Irena

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:560019

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Irena Ževrnja

DIJAGNOSTIKA *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFEKCIJA

Završni rad

Split, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Irena Ževrnja

DIJAGNOSTIKA *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFEKCIJA

DIAGNOSTIC OF *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFECTIONS

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

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

Spec. medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Split,2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: doc. dr. sc. Anita Novak, dr. med.

DIJAGNOSTIKA *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFEKCIJA

Irena Ževrnja, 311223

Sažetak:

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja je opisati metode mikrobiološke dijagnostike *C. difficile* te istražiti mikrobiološke osobitosti toksigenih sojeva i demografske karakteristike pacijenata oboljelih od CDI u KBC-u Split od 1. siječnja do 31. prosinca 2020. godine.

Materijali i metode istraživanja: U ovom istraživanju korišteni su podatci Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split. Uključeni su svi pacijenti kojima je u navedenom razdoblju dokazan toksigeni soj *C. difficile* iz uzorka stolice. Mikrobiološka dijagnostika CDI provodi se prema smjernicama ESCMID-a prema tkz. dvostupanjskom i trostupanjskom dijagnostičkom postupniku. U ovom istraživanju je korišten kombinirani membranski imunoenzimski/ imunokromatografski test (Savyon Diagnostics Ltd.) koji istovremeno testira glutamat dehidrogenazu (GDH antigen) i proizvodnju toksina A i B *C. difficile*. Na taj način se istovremeno provode prvi i drugi korak preporučenog ESCMID-ovog postupnika za dijagnostiku CDI. . Kao potvrdni test, korišten je HG *C. difficile* molekularni test proizvođača HiberGene. Test koristi izotermalnu LAMP (*engl*. loop-mediated isothermal amplification) tehnologiju kojom se dokazuje prisustvo toksigene regije u genomu *C. difficile.*

Rezultati: U Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split u 2020. godini pod sumnjom na *C. difficile* infekciju zaprimljeno je 1675 uzorka stolice. Od toga je 1265 bilo negativno, a u 397 (24 %) uzoraka dokazan je toksigeni soj *C. difficile*. Od ukupno 397 toksigenih sojeva *C. difficile*, 3 % je

bilo pozitivno samo na proizvodnju toksina A, 5 % uzoraka je bilo pozitivno na proizvodnju toksina B, 65 % uzoraka je bilo pozitivno na proizvodnju toksina A i B, a 27 % toksigenih sojeva *C. difficile* nije stvaralo toksine u trenutku testiranja. Muškaraca je bilo 176 (44 %), dok je žena bilo 221 (56 %). Najveći broj pacijenata (66 %) je imao 65 ili više godina. Bolničkih pacijenata je bilo 72 %, a najveći broj njih je liječen u Klinici za unutarnje bolesti (34 %), Klinici za infektivne bolesti (16 %) te u Klinici za plućne bolesti (14 %). Najčešće uputne dijagnoze su crijevne infekcije (20 %), ostale bolesti probavnog sustava (23 %) te respiratorne bolesti (16 %).

Ključne riječi: dijagnostika *Clostridioides difficile*, medicinsko laboratorijska dijagnostika, *Clostridioides difficile* infekcija

Rad sadrži: 30 stranica, 16 slika, 25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Univeristy Department for Health Studies

Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health

Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: doc. dr. sc. Anita Novak, dr. med.

DIAGNOSTIC OF *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFECTIONS

Irena Ževrnja, 311223

Summary:

Aim of the study: The aim of this study is to describe the methods of microbiological diagnostic of *C. difficile* and to investigate the microbiological characteristics of toxigenic strains and demographic characteristics of patients with CDI in the University Hospital of Split from 1 January to 31 December 2020.

Materials and methods of the study: Data base of the Department of Clinical Microbiology and Parasitology in the University Hospital of Split was used in this study. All patients for whom a toxigenic strain of *C. difficile* from a stool sample was detected during this period were included. Microbiological diagnostic of CDI is carried out according to the guidelines of the ESCMID according to the so-called two-stage and three-stage diagnostic procedure. A combined membrane enzyme-linked immunosorbent assay/ immunochromatography test (Savyon Diagnostics Ltd.) was used in this study, which simultaneously tests glutamate dehydrogenase (GDH antigen) and the production of *C. difficile* toxins A and B. This way, the first and second step of the recommended ESCMID procedure for diagnosing CDI are performed simultaneously. As a confirmatory test, the HG *C. difficile* molecular test manufactured by HiberGene was used. The test uses loop-mediated isothermal amplification technology to prove the presence of a toxigenic region in the *C. difficile* genome.

Results: In 2020, 1675 stool samples were received at the Department of Clinical Microbiology and Parasitology in the Univeristy Hospital of Split under suspicion of *C. difficile* infection. Of these, 1265 were negative, and a toxigenic strain of *C. difficile* was detected in 397 (24 %) samples. Of a total of 397 toxic strains of *C. difficile*, 3 % were only positive for toxin A production, 5 % of samples were positive for toxin B production, 65 % of samples were positive for toxin A and B production, and 27 % of toxigenic *C. difficile* strains did not produce toxins at the time of testing. There were 176 men (44 %) and 221 women (56 %). The largest number of patients (66 %) were 65 or older. There were 72 % of hospital patients, and the largest number of them were treated in the Clinic for Internal Medicine (34 %), the Clinic for Infectious Diseases (16 %) and the Clinic for Lung Diseases (14 %). The most common diagnoses are intestinal infections (20 %), other diseases of the digestive system (23 %) and respiratory diseases (16 %).

Keywords: diagnostic of *Clostridioides difficile*, medical laboratory diagnostics, *Clostridioides difficile* infection

Thesis contains: 30 pages, 16 pictures, 25 literary references

Original in: Croatian

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. *Clostridioides difficile* 1

1.2 *Clostridioides difficile* infekcija (CDI) 1

1.2.1. Patogeneza i rizični čimbenici 1

1.2.2. Klinička slika 2

1.2.3. Dijagnostika 3

1.2.4. Liječenje 4

1.2.5. Prevencija 4

2. CILJEVI RADA 5

3. METODE ISTRAŽIVANJA 6

3.1. Testiranje stolice na prisustvo toksigenog soja 6

3.1.1. Kombinirani imunoenzimski/ imunokromatografski test za dokaz GDH antigena i toksina A i B 7

3.1.2. Molekularna metoda za dokaz toksigenih regija u genomu *C. difficile* 13

3.2. Analiza mikrobioloških karakteristika sojeva *C. difficile* te demografskih i epidemioloških podataka pacijenata kojima je dokazana *C. difficile* infekcija 17

4. REZULTATI 18

4.1. Mikrobiološke karakteristike sojeva *C. difficile* 18

4.2. Demografski podatci 20

4.3. Raspodjela pacijenata prema mjestu uzorkovanja 22

4.4. Zastupljenost bolničkih odjela i klinika KBC-a Split 23

4.5. Uputne dijagnoze pacijenata s *C. difficile* infekcijom 24

5. ZAKLJUČAK 25

6. POPIS LITERATURE 26

7. ŽIVOTOPIS 29

1. UVOD

1.1. *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile je gram-pozitivna, anaerobna i sporogena štapićasta bakterija. Spore *C. difficile* se prenose feko-oralnim putem te su široko rasprostranjene u okolišu. Prvi put je izolirana 1935. godine iz uzorka stolice zdravog novorođenčeta. Oko 5 % odraslih i 15-70 % dojenčadi je kolonizirano s ovom bakterijom. Potencijalni rezervoari zaraze su asimptomatski nosioci, zaraženi pacijenti, kontaminirani okoliš i crijevni trakt životinja (1, 2).

1.2 *Clostridioides difficile* infekcija (CDI)

Clostridioides difficile infekcija jedna je od najznačajnijih bolničkih infekcija današnjice. Karakterizirana je širokim rasponom simptoma, od blagih ili umjerenih proljeva do teške kliničke slike s pseudomembranoznim kolitisom, ileusom, toksičnim megakolonom, sepsom ili smrću. Dijagnoza CDI se postavlja na temelju kliničkih simptoma i laboratorijskih testova (3).

1.2.1. Patogeneza i rizični čimbenici

Najvažniji rizični čimbenici za nastanak CDI su izloženost antibioticima, starija životna dob i hospitalizacija. Gotovo je svaki antibiotik povezan s razvojem CDI, a posebice cefalosporini, klindamicin i fluorokinoloni (1). Rizik za nastanak CDI je 8-10 puta veći tijekom i 4 tjedna nakon završetka antimikrobne terapije u odnosu na osobe koje nisu primale antibiotike (4). Pacijenti stariji od 65 godina imaju povećani rizik za razvoj teže kliničke slike i smrtni ishod (1, 5). Većina slučajeva CDI je povezana s boravkom u bolničkom okruženju ili staračkim domovima (6). Postotak koloniziranih pacijenata raste s duljim boravkom u bolnici, a spore *C. difficile* preživljavaju u okolišu mjesecima zbog svoje otpornosti na visoku temperaturu, alkohol, isušivanje i antibiotike (7, 8).

Glavna obrana od nastanka CDI je normalni sastav crijevne mikrobiote. Infekcija nastaje kada se poremeti ravnoteža crijevnih mikroorganizama te *C. difficile* počne kolonizirati debelo crijevo. Nakon što bakterijske spore uđu u crijeva, žučne kiseline induciraju njihovu germinaciju u vegetativne bakterijske oblike (9). *C. difficile* je oportunistički patogen za čiju su virulenciju zaslužni enzimi (poput kolagenaze, hijaluronidaze, hondroitin-sulfataze) i toksini koji oštećuju citoskelet epitelnih stanica. Zajedničkim djelovanjem narušavaju integritet crijevne barijere koja tako gubi svoju funkcionalnost (10, 11). *C. difficile* može stvarati dva vrlo snažna egzotoksina, toksin A (enterotoksin) i toksin B (citotoksin). Toksini se prenose u staničnu citoplazmu gdje inaktiviraju Rho obitelj GTP-aza. Rho proteini sudjeluju u polimerizaciji aktina i stabilizaciji stanica pa njihova inaktivacija pojačava upalni proces. Sposobnost stvaranja toksina određena je tcdA i tcdB genima pa sojevi koji ne posjeduju te gene, nisu toksigeni i ne mogu izazvati kliničku sliku CDI (12, 13).

1.2.2. Klinička slika

Klinička slika CDI vrlo je heterogena i može varirati od stanja asimptomatske kolonizacije do vrlo teške slike pseudomembranoznog, fulminantnog kolitisa sa smrtnim ishodom. Iako razdoblje inkubacije nije precizno određeno, neka istraživanja sugeriraju da je to najčešće 2-3 dana (14). Većina pacijenata ima blage proljeve koji spontano prolaze nakon prestanka primjene antibiotske terapije. Pored proljevastih stolica, kliničke značajke CDI mogu biti bolovi u trbuhu, vrućica, mučnina, povraćanje, slabost i gubitak apetita. U težim slučajevima mogu nastati dehidracija, hipoalbuminemija s perifernim edemima i cirkulacijski šok. Ozbiljne komplikacije CDI uključuju toksični megakolon, perforaciju debelog crijeva, ileus, zatajenje bubrega, sindrom sistemskog upalnog odgovora, septikemiju i smrt (15). Stopa smrtnosti iznosi oko 5 %, ukoliko se radi o primarnoj infekciji, a značajno raste u slučaju nastanka komplikacija (15-25 %), osobito ukoliko se pacijenti liječe na jedinicama intenzivnog liječenja (34 %) (5).

1.2.3. Dijagnostika

Laboratorijska dijagnostika *C. difficile* je kompleksna (uključuje probirni i potvrdni test) te prema smjernicama Europskog društva kliničke mikrobiologije i infektologije, ESCMID-a, (*engl*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) ni jedan test nije dovoljno osjetljiv i specifičan da bi se mogao koristiti samostalno (16). Na CDI treba posumnjati ukoliko pacijent ima ≥ 3 tekuće stolice tijekom 24 h, a u anamnezi ima neki od rizičnih faktora za nastanak ove infekcije. Dijagnoza CDI se postavlja na temelju karakteristične kliničke slike i pozitivnog mikrobiološkog nalaza.

Kao probirni test se koristi imunoenzimski/imunokromatografski test (*engl*. enzyme immunoassay, EIA) kojim se dokazuje GDH (glutamat dehidrogenaza), antigen kojega posjeduju svi sojevi *C. difficile* (toksigeni i netoksigeni). EIA je metoda koja ima brzo vrijeme izrade (<1h) te ima specifičnost koja varira od 95 do 100 %, a osjetljivost od 75 do 85 %. Zbog svoje niske cijene i jednostavnosti uporabe, ova metoda se koristi u većini laboratorija. Ukoliko je GDH antigen pozitivan, potrebno je uzorak testirati na prisustvo slobodnih toksina A i B (tkđ. imunoenzimskim/imunokromatografskim testom) (17, 18).

Od 2009. godine koriste se NAAT testovi (*engl*. nucleic acid amplification test) koji se temelje na PCR tehnologiji, koja otkriva prisutnost gena koji kodiraju sintezu toksina te tako potvrđuje prisutnost toksigenog soja. Ova metoda ima svoja ograničenja (npr. visoka cijena), ali ima veću osjetljivost i specifičnost u usporedbi s EIA (15, 19).

Optimalan dijagnostički pristup je tkz. „Postupnik u dva ili tri koraka". Prvi test bi trebao biti test s visokom negativnom prediktivnom vrijednošću (test za GDH antigen ili NAAT), koji ukoliko je negativan isključuje CDI, a drugi test s visokom pozitivnom prediktivnom vrijednošću (test na toksine A i B metodom EIA), koji ukoliko je pozitivan potvrđuje CDI (16).

1.2.4. Liječenje

Liječenje treba započeti samo u pacijenata sa simptomima CDI, dok prisutnost toksina *C. difficile* bez simptoma infekcije nije indikacija za liječenje. Najčešće korišteni lijekovi za liječenje CDI su metronidazol, vankomicin i fidaksomicin. Metronidazol je lijek prvog izbora kod blagih oblika CDI, vankomicin se koristi za liječenje težih oblika infekcije, dok se fidaksomicin primjenjuje kod višestruko ponavljajuće CDI (20). Stupanj težine kliničke slike i odabir metode liječenja se postavlja na temelju laboratorijskih nalaza (npr. hipoalbuminemija, leukocitoza, visoka razina kreatinina i visoka temperatura govore o razvoju teške kliničke slike) (21). Osim standardnih metoda liječenja, transplantacija fekalne mikrobiote (*engl.* fecal microbiota transplantation, FMT) se pokazala kao vrlo učinkovita alternativna metoda liječenja. Koristi se za liječenje višestruko ponavljajućih CDI, u slučaju neučinkovitosti ostalih metoda liječenja (22).

1.2.5. Prevencija

Prevencija CDI započinje edukacijom zdravstvenog osoblja o značaju CDI, načinima širenja, prevencije i liječenja. Učinkovite mjere prevencije uključuju pranje ruku, nošenje jednokratnih rukavica i zaštitne odjeće, pravilnu dekontaminaciju, čišćenje bolesnikovog okoliša, izolaciju i kohortiranje zaraženih pacijenata te optimalno i racionalno primjenjivanje antibiotika (23, 24, 25).

2. CILJEVI RADA

1. Opisati metode mikrobiološke dijagnostike *Clostridioides difficile* infekcije.

2. Analizirati mikrobiološke karakteristike sojeva *C. difficile* koji su dokazani tijekom 2020. godine u Kliničkom bolničkom centru Split.

3. Analizirati demografske i epidemiološke podatke pacijenata kojima je dokazana *C. difficile* infekcija tijekom 2020. godine u KBC-u Split.

3. METODE ISTRAŽIVANJA

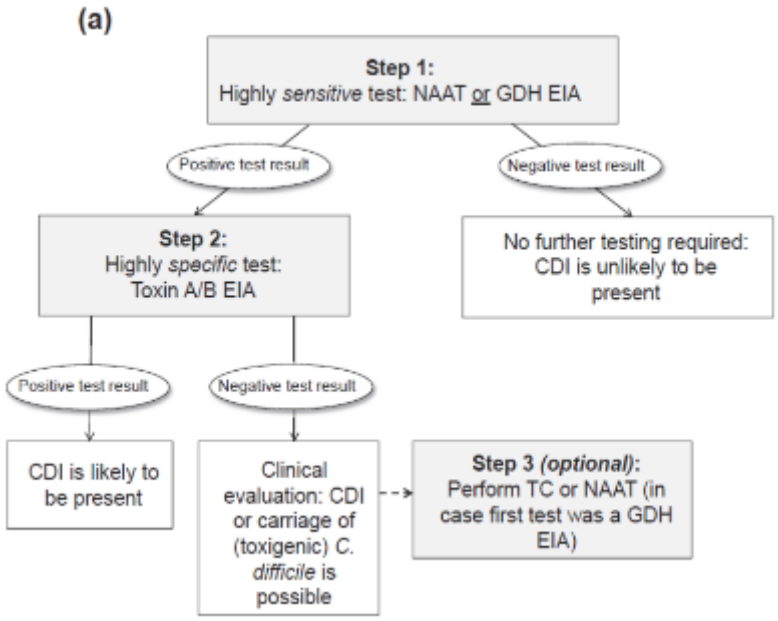
3.1. Testiranje stolice na prisustvo toksigenog soja

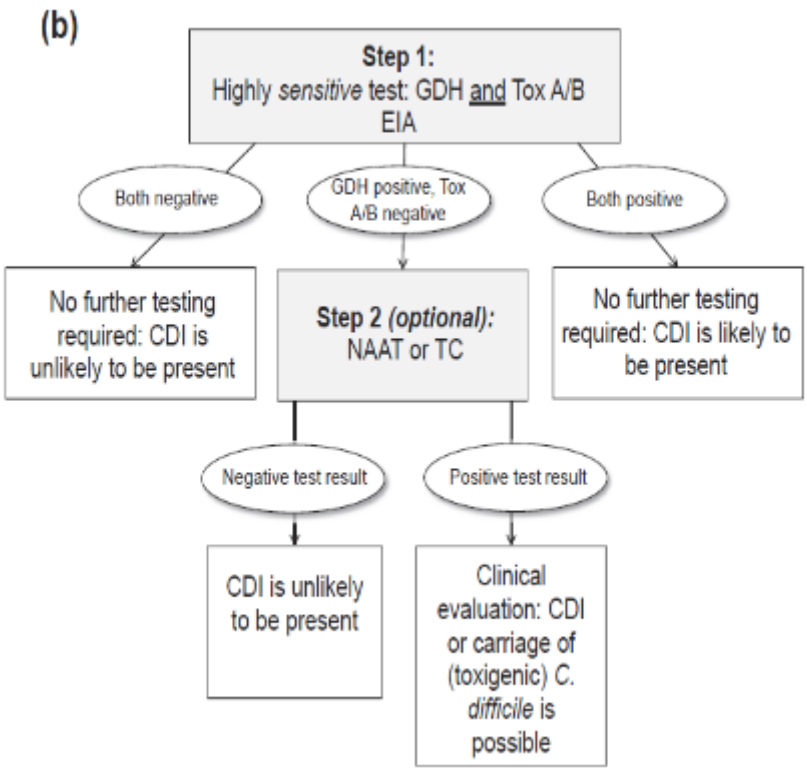
Mikrobiološka dijagnostika CDI provodi se prema ESCMID-ovom dvostupanjskom ili trostupanjskom dijagnostičkom postupniku (slika 1.).

Dvostupanjski dijagnostički postupnik u prvom koraku koristi imunoenzimski test (EIA) za dokaz antigena glutamat dehidrogenaze (GDH). Svi sojevi *C. difficile* posjeduju taj antigen pa se ovaj test koristi kao probirni test.

GDH negativni uzorci se smatraju negativnim na prisustvo *C. difficile* i nije potrebno nikakvo dodatno testiranje.

Svim uzorcima s pozitivnim GDH antigenom treba testirati proizvodnju toksina A i B. To se može raditi visoko specifičnim imunoenzimskim testom ili osjetljivim molekularnim testom. Ukoliko se radi samo jedan od ta dva testa, govorimo o dvostupanjskom postupniku, dok se u trostupanjskom postupniku koriste oba testa.





Slika 1. ESCMID-ov postupnik za mikrobiološku dijagnostiku CDI (MJT Crobach et al. Clinical Microbiology and Infection 22 (2016) S63-S81).

3.1.1. Kombinirani imunoenzimski/ imunokromatografski test za dokaz GDH antigena i toksina A i B

Korišten je kombinirani membranski imunoenzimski/ imunokromatografski test (Savyon Diagnostics Ltd.) koji istovremeno testira GDH antigen i proizvodnju toksina A i B *C. difficile*. Na taj način se istovremeno provode prvi i drugi korak preporučenog ESCMID-ovog postupnika za dijagnostiku CDI. U originalnoj kutiji proizvođača nalaze se svi potrebni reagensi za izradu testa. Testovi se čuvaju u originalnoj ambalaži na 2-30 °C do trenutka korištenja. Za svaki uzorak potrebno je koristiti posebnu testnu kasetu (svaka kaseta je zapakirana zasebno) koja se otvara neposredno prije korištenja.

3.1.1.1. Princip testa

Kaseta testa se sastoji od tri membrane. Membrana testa A je obložena monoklonskim antitijelima za GDH antigen *C. difficile*, membrana testa B monoklonskim antitijelima za toksin A, dok je membrana testa C obložena monoklonskim antitijelima za toksin B. Tijekom ispitivanja, uzorak reagira s crveno obojenim česticama obloženim s anti-GDH protutijelima (test A), anti-toksin A protutijelima (test B) ili anti-toksin B protutijelima (test C). Smjesa se kreće prema gore na membrani kapilarnim djelovanjem. U slučaju pozitivnog rezultata uočava se jedna crvena obojena linija. Intenzitet crvene linije u testnoj jažici varirati će, ovisno o koncentraciji antigena u uzorku. Međutim, ovo je kvalitativni test te se njime ne može odrediti kvantitativna vrijednost antigena. Zelena boja se uvijek pojavljuje u kontrolnoj liniji i služi kao potvrda da je dodana dovoljna količina uzorka, tj. da je test ispravan. Osjetljivost i specifičnost testa je >99 %.

3.1.1.2. Prikupljanje i čuvanje uzorka

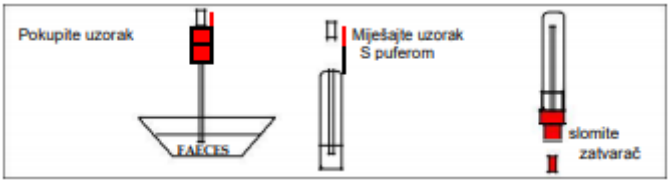
Potrebno je prikupiti dovoljnu količinu proljevaste stolice (1-2 g kašastog ili 1-2 ml tekućeg uzorka). Uzorci se prikupljaju u čiste i suhe spremnike (bez konzervansa ili transportne podloge). Mogu se čuvati u hladnjaku (2-8 °C) kroz 24 sata prije ispitivanja. Za duže skladištenje, moraju se zamrznuti na -20 °C. U tom slučaju, uzorak treba potpuno odmrznuti prije ispitivanja.

3.1.1.3. Postupak testiranja

U kartonskoj kutiji se nalazi 20 testnih kasetica u pojedinačnim aluminijskim pakiranjima i reagensi za 20 pacijenata. Svaki reagens je pakiran zasebno u plastičnu bočicu koja je zatvorena poklopcem s navojem. Na poklopcu se nalazi štapić koji se koristi za uzimanje određene količine uzorka stolice pacijenta.

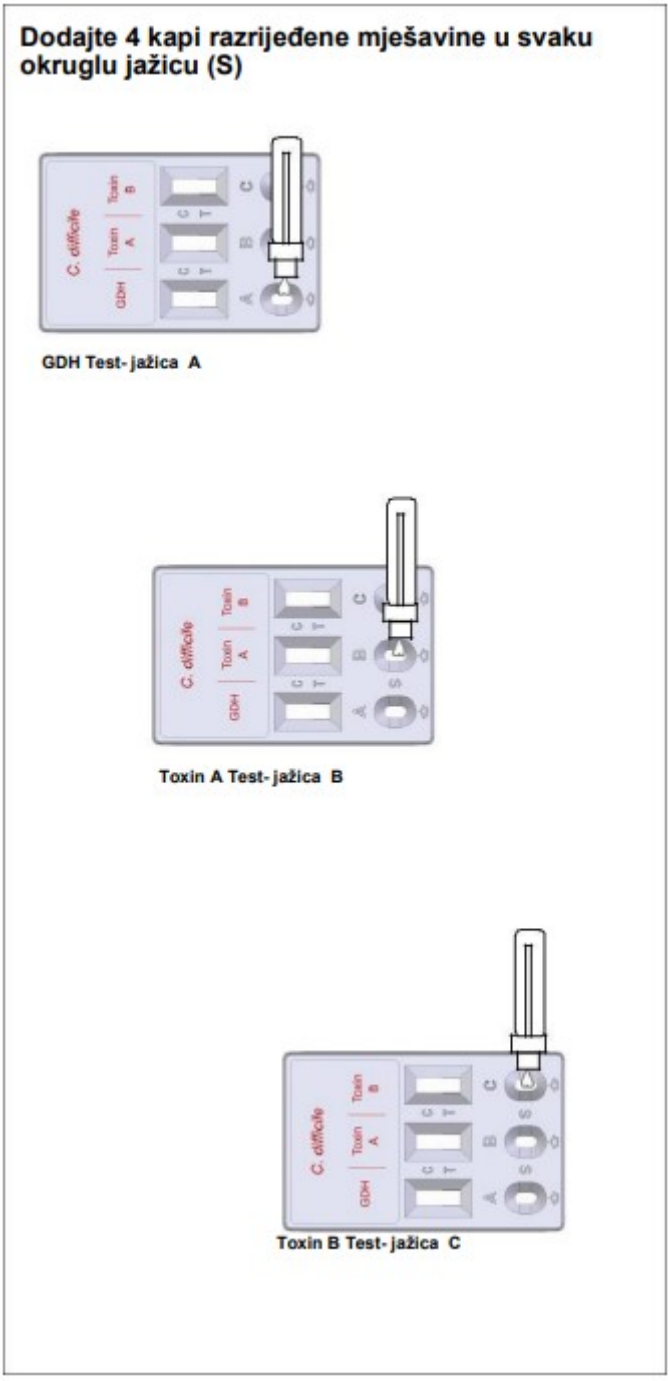
Reagense, testove i uzorke stolice treba temperirati prije izvođenja testa (moraju postići jednaku, sobnu temperaturu). Zaštitna aluminijska pakiranja treba otvoriti neposredno prije izvođenja testa, a kasetu iskoristiti što je prije moguće.

Prilikom izvođenja testa, potrebno je uzeti odgovarajuću količinu uzorka štapićem (cca. 125 mg) i dodati ga u posudu s reagensom (puferom). Zatvoriti bočicu s puferom i uzorkom. Izmiješati sadržaj na miješalici kroz 15 sekundi kako bi se osigurala dobra disperzija uzorka. Ukoliko se radi o tekućem uzorku stolice, kapaljkom se uzme 125 µl takvog uzorka i doda u bočicu s puferom (slika 2.).



Slika 2. Postupak miješanja odgovarajuće količine uzorka s reagensom (puferom).

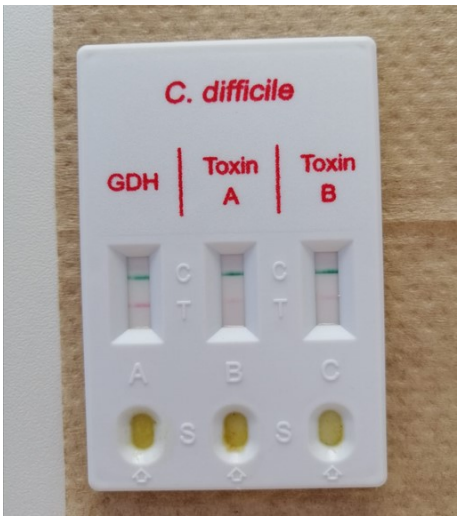
Dodati točno 4 kapi ili 100 µl pripremljene suspenzije uzorka i pufera u tri okrugle jažice na dnu kazete (označene su slovom S, *engl*. sample). Suspenzija polako difundira iz jažica (S) prema testnim prozorčićima koji postaju vidljivo namočeni difundiranom suspenzijom uzorka i pufera. Ukoliko su testni prozorčići suhi, tj. nije došlo do difuzije suspenzije (najčešće zbog prečvrstih čestica ili primjesa sluzi u uzorku), potrebno je promiješati suspenziju dodanu u jažice uzorka (S) štapićem ili dodati kap pufera, dok ne vidimo da tekućina prolazi kroz zone reakcije. Rezultat se očitava 10 minuta nakon dodavanja uzorka s puferom (slika 3.).



Slika 3. Procedura testa.

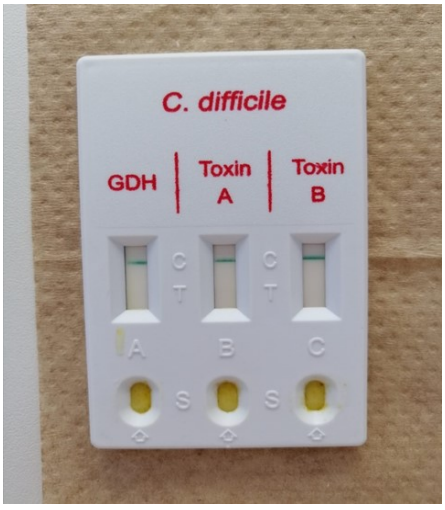
3.1.1.4. Interpretacija rezultata

Ukoliko se u sva tri testna prozorčića pojavi crveno obojena linija, rezultat je pozitivan za antigen GDH, toksin A i toksin B. To je dokaz prisustva toksigenog soja *C. difficile* i aktivne produkcije oba toksina (slika 4.).



Slika 4. Interpretacija rezultata: antigen GDH, toksin A i toksin B su pozitivni. Dokazan je toksigeni *C. difficile* i aktivna produkcija toksina A i B.

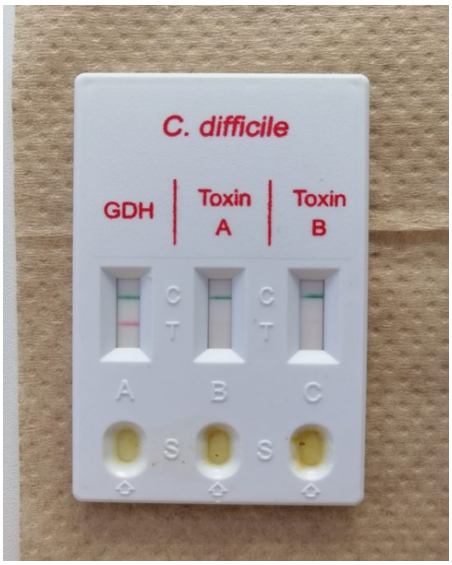
Ako su sva tri rezultata negativna (antigen GDH, toksin A i toksin B) isključena je *C. difficile* infekcija, tj nije dokazan toksigeni soj u uzorku stolice pacijenta (slika 5.).



Slika 5. Interpretacija rezultata: GDH, toksin A i toksin B negativni. Nije dokazan toksigeni *C. difficile.*

Ukoliko je pozitivan antigen GDH i samo jedan od toksina (A ili B) dokazana je infekcija toksigenim sojem i aktivna proizvodnja jednog toksina.

U slučaju da je dokazan *C. difficile* bez aktivne proizvodnje toksina (pozitivan samo antigen GDH, dok su toksini A i B negativni), potrebno je dodatno testirati sposobnost stvaranja toksina specifičnijim testom tj. molekularnom analizom (slika 6.).



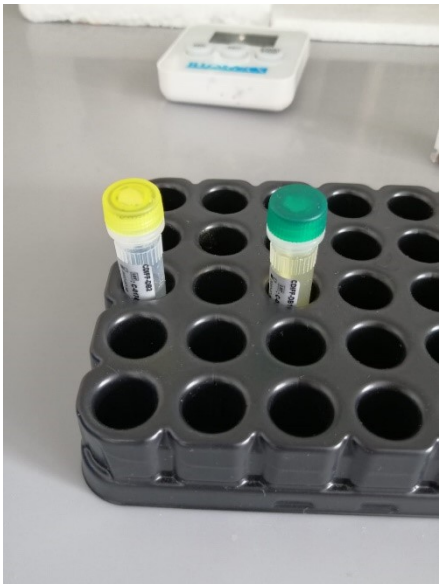
Slika 6. Interpretacija rezultata: antigen GDH pozitivan, toksin A i toksin B negativni. Potrebna je dodatna molekularna analiza sposobnosti produkcije toksina.

Ponekad se rezultat provedenog testiranja ne može interpretirati nego je potrebno ponoviti testiranje istom ili drugom metodom (npr. molekularnom analizom). Budući da svaki test ima svoju unutarnju kontrolu kvalitete, ukoliko ne dođe do pojave zelene kontrolne linije u bilo kojoj testnoj jažici, test je neispravan i treba ga ponoviti. Također, ukoliko je rezultat testiranja za antigen GDH negativan, a za jedan ili oba toksina pozitivan, potrebno je ponoviti testiranje jer ili imamo lažno negativni GDH ili lažno pozitivne toksine.

3.1.2. Molekularna metoda za dokaz toksigenih regija u genomu *C. difficile*

U ovom istraživanju korišten je test proizvođača HiberGene. Kit dobiven u pakiranju potrebno je pohraniti na 2-8 °C i iskoristiti prije isteka roka trajanja navedenog na pakiranju. HG *C. difficile* koristi izotermalnu LAMP (*engl*. loop-mediated isothermal amplification) tehnologiju za postizanje brzog i osjetljivog testiranja za *C. difficile*. LAMP test je usmjeren na regiju tcdA gena očuvanog u toksin A+/B+ i toksin A-/B+ sojevima *C. difficile*, a LAMP početnice za ovu regiju sadržane su u *C. difficile* ciljnoj reakcijskoj smjesi. Također, u reakcijskom stripu su prisutne i početnice za bakteriofagnu sekvencu koja djeluje kao ekstrakcijska kontrola (EC), kako bi dokazala da su sve faze ispitivanja napravljene ispravno. Reakcijske smjese sadrže i interkalacijsku boju koja povećava fluorescenciju te čije se povećanje fluorescencije prati u realnom vremenu na HG Swift instrumentu.

Za svaki uzorak stolice koji se testira, treba koristiti poseban bris (dostupan u pakiranju). Bris uroniti u uzorak stolice tako da je prekriveno otprilike ¾ površine brisa. Staviti premazani bris u bočicu s puferom za ispiranje 1 (zeleni čep). Umočiti bris gore i dolje 10 puta te zatim odrezati vrh brisa. Zatvoriti bočicu pufera za ispiranje 1 i promiješati izokretanjem 10 puta. Korištenjem kalibrirane mikropipete, uzeti 100 µl sadržaja iz bočice pufera za ispiranje 1 i dodati u bočicu pufera za ispiranje 2 sa žutim čepom (slika 7.).



Slika 7. Pufer za ispiranje 1 (zeleni čep) i pufer za ispiranje 2 (žuti čep).

Lizirati i denaturirati pripremljeni uzorak inkubacijom bočice pufera za ispiranje 2 na 105 °C u inkubatoru suhe kupelji na 10 minuta (slika 8.).

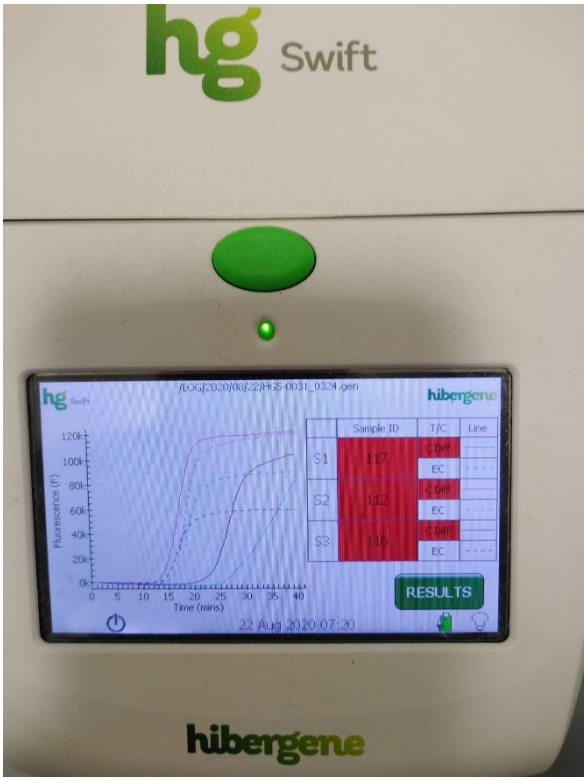


Slika 8. Inkubator suhe kupelji.

Nakon inkubacije, potrebno je izvaditi reakcijske stripove, jedan za svaki test koji će se provesti. Kada se poklopci okrenu od korisnika, lijeva tubica na stripu sadrži *C. difficile* ciljnu reakcijsku smjesu, a desna tubica sadrži EC reakcijsku smjesu. Ukloniti plastični poklopac na tubicama te dodati po 25 µl u obje tubice, ciljnu (T) i kontrolnu (EC). Tapkati s tubicom po čvrstoj podlozi kako bi se osiguralo da se većina rekonstruirane reakcijske smjese vrati na dno tubice.

Uključiti HG Swift na prekidaču. Odabrati START NEW RUN i umetnuti reakcijske stripove na blok HG Swift uređaja pomoću držača stripova. Unijeti ID korisnika, za svaki uzorak koji se testira selektirati HG C Diff te pritisnuti RUN. HG *C. difficile* testni ciklus traje 40 minuta. Tijekom rada, na ekranu je vidljiva amplifikacijska krivulja i fluorescencija svih uzoraka.

Pozitivni uzorci, tj. uzorci koji generiraju pozitivne amplifikacijske signale bit će označeni crvenim poljem u tablici uzorka (slika 9.).



Slika 9. Amplifikacijski signali na zaslonu HG Swift uređaja.

U bilo kojem trenutku za vrijeme trajanja testa, zaslonu se može pristupiti pritiskom tipke RESULTS. Rezultati testa mogu se interpretirati kao pozitivni, negativni ili invalidni (slika 10.). POSITIVE rezultat znači da je *C. difficile* otkriven u uzorku te će za te uzorke biti navedeno i vrijeme amplifikacije što nam omogućava polukvantitativnu informaciju. NEGATIVE rezultat znači da *C. difficile* nije otkriven u uzorku. INVALID rezultat znači da nije amplificirana interna kontrola zbog pogreške u pripremi uzorka ili prisutnosti inhibitora. Takav uzorak treba ponovno ekstrahirati i ponovno testirati.



Slika 10. Prikaz pozitivnih *C. difficile* rezultata testa.

3.2. Analiza mikrobioloških karakteristika sojeva *C. difficile* te demografskih i epidemioloških podataka pacijenata kojima je dokazana *C. difficile* infekcija

U istraživanju su korišteni podatci prikupljeni u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split tijekom 2020. godine (1. 1. 2020. do 31. 12. 2020).

Uključeni su svi toksigeni *C. difficile* sojevi koji su dokazani prvi put, a uzastopni (tkz. „copy") sojevi koji se ponavljaju u višekratnim uzorcima istog pacijenta, isključeni su iz istraživanja.

Analizirana je dob, spol, uputna dijagnoza i mjesto početka kliničkih simptoma (izvan bolnice ili na bolničkim odjelima).

Za statističku obradu dobivenih podataka je korišten program MedCalc za Windows.

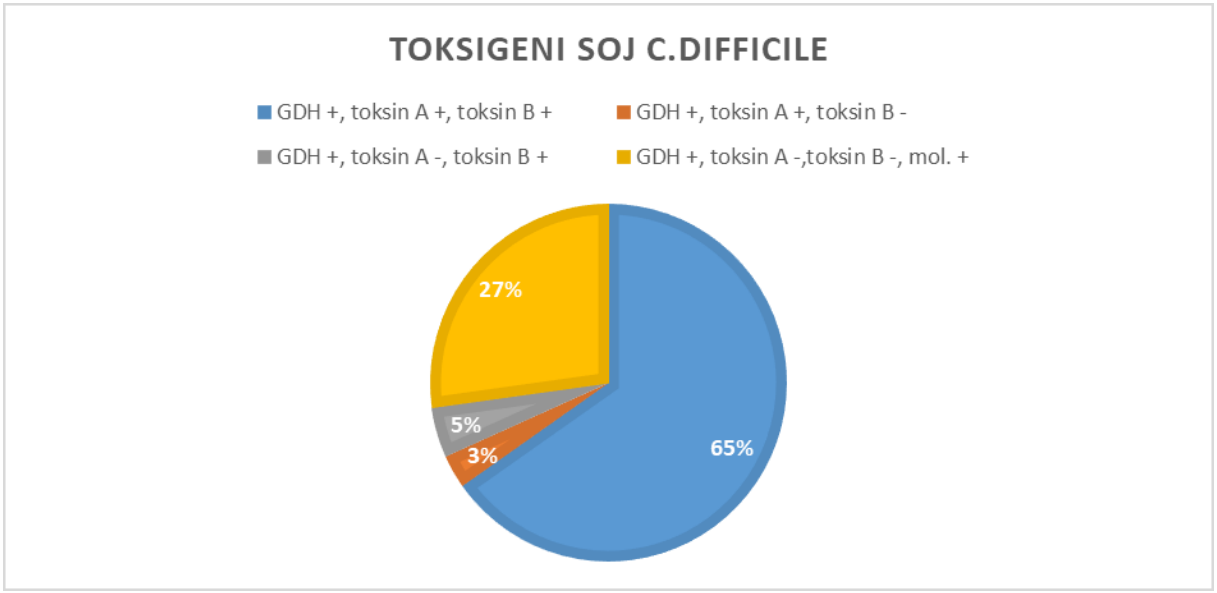
4. REZULTATI

4.1. Mikrobiološke karakteristike sojeva *C. difficile*

U Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split u 2020. godini, pod sumnjom na primarnu *C. difficile* infekciju, zaprimljeno je 1675 uzoraka stolice. Negativan rezultat imalo je 1265 uzoraka, dok je u 397 (24 %) uzoraka dokazan toksigeni soj *C. difficile*. U istraživanje je uključeno svih 397 pozitivnih nalaza.

Uzorci s jasno negativnim rezultatom kao i trinaest uzoraka s dvojbenim rezultatom probirnog testa (GDH +, toksini A i B neg.) su isključeni iz istraživanja. Za 10 dvojbenih uzoraka je rezultat molekularne analize bio neinterpretabilan (zbog inhibitora u reakcijskoj smjesi), a za preostale uzorke, zbog nedostatne količine, molekularna analiza nije napravljena.

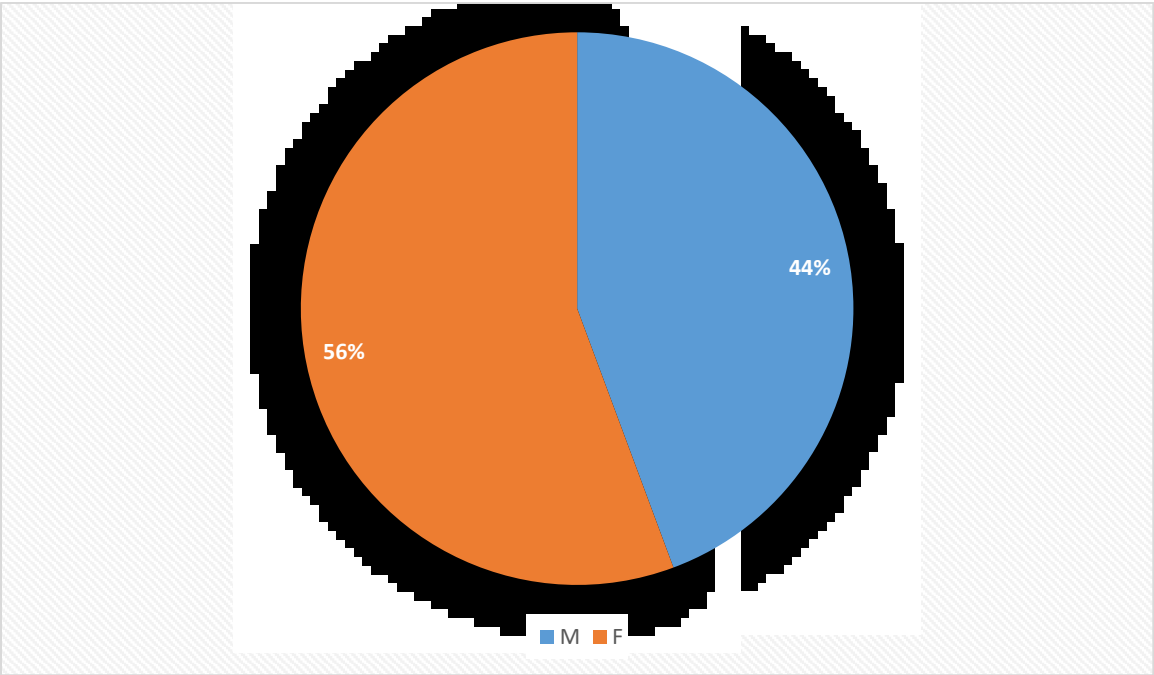
Raspodjela pozitivnih uzoraka je prikazana na slici 11. Od ukupno 397 toksigenih *C. difficile*, 12 sojeva (3 %) je proizvodilo samo toksin A, 18 sojeva (5 %) je proizvodilo samo toksin B, dok je 259 sojeva (65 %) proizvodilo oba toksina. Svi uzorci stolice u kojima je dokazan GDH antigen, ali bez proizvodnje toksina, testirani su molekularnom metodom, kojom je dodatno otkriveno još 108 toksigenih sojeva (27 %). Ukupno gledano, značajno je više sojeva s proizvodnjom jednog ili oba toksina u odnosu na toksin negativne uzorke ($p<0,0001$).



Slika 11. Raspodjela toksigenih sojeva prema rezultatima imunoenzimskog i molekularnog testiranja (N=397).

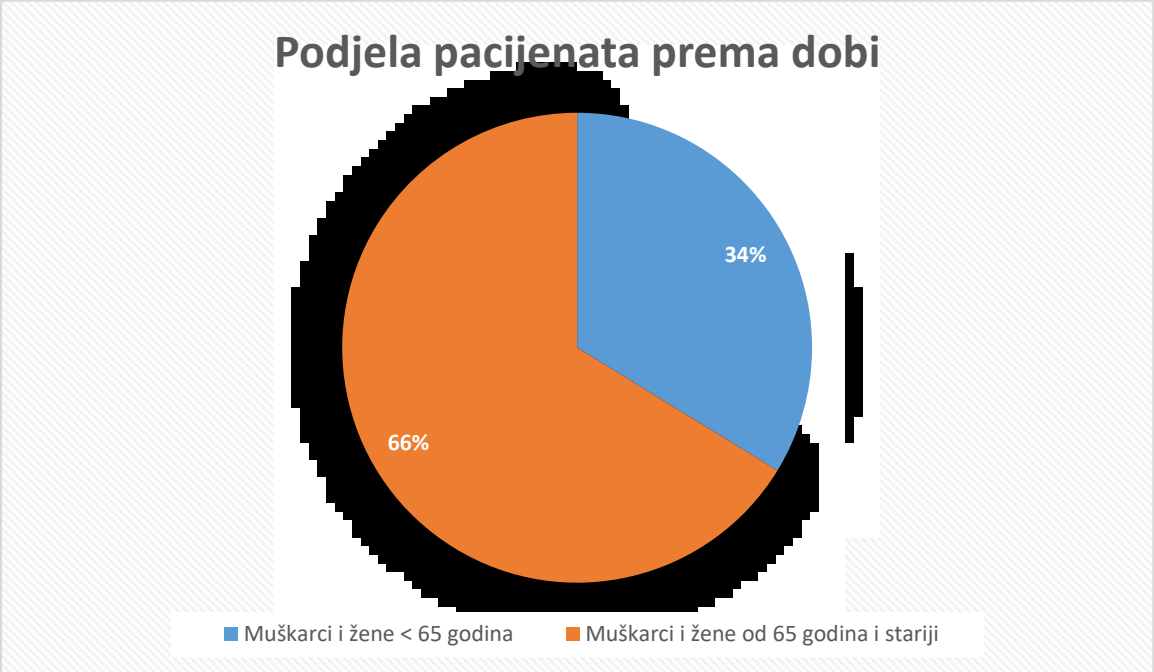
4.2. Demografski podatci

Analizom podataka o spolu pacijenata, uočen je veći broj žena (221; 56 %) u odnosu na broj muških pacijenata (176; 44 %), što je prikazano na slici 12.



Slika 12. Raspodjela ispitanika po spolu (N=397).

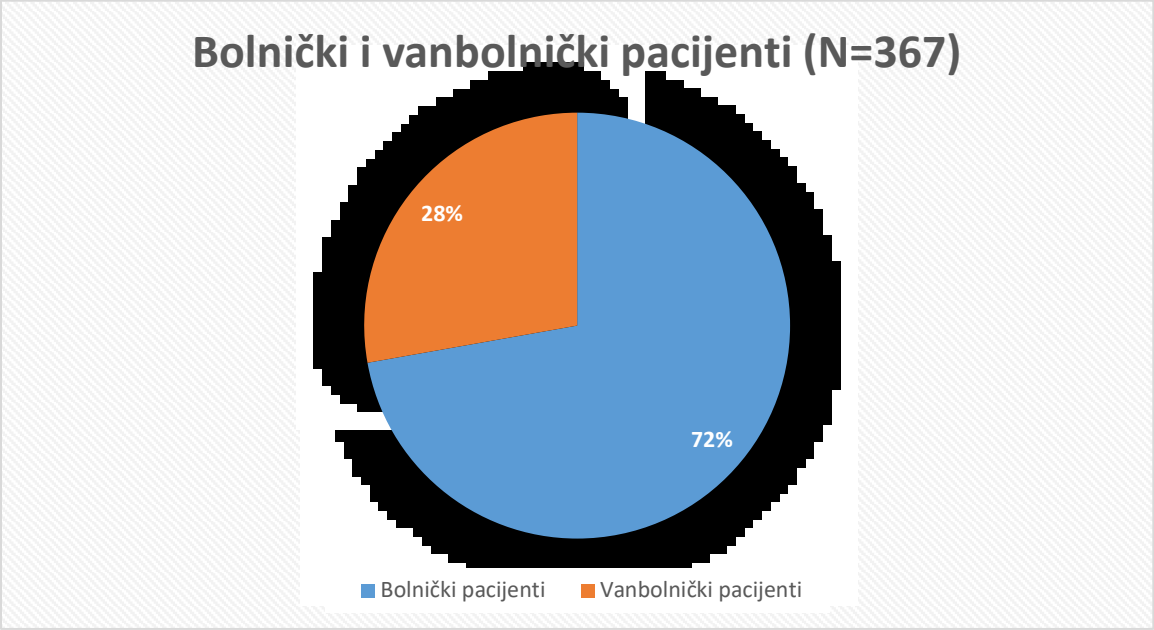
Pacijenti su prema dobi raspoređeni u dvije skupine. Prvu skupinu čine muškarci i žene mlađi od 65 godina kojih je bilo 134 (34 %), a drugu skupinu čine muškarci i žene u dobi od 65 godina i stariji kojih je bilo ukupno 263 (66 %), što prikazuje slika 13. Značajno je manji broj pacijenata bio mlađi od 65 godina u odnosu na stariju dobnu skupinu (p<0,0001).



Slika 13. Podjela ispitanika po dobi (N=397).

4.3. Raspodjela pacijenata prema mjestu uzorkovanja

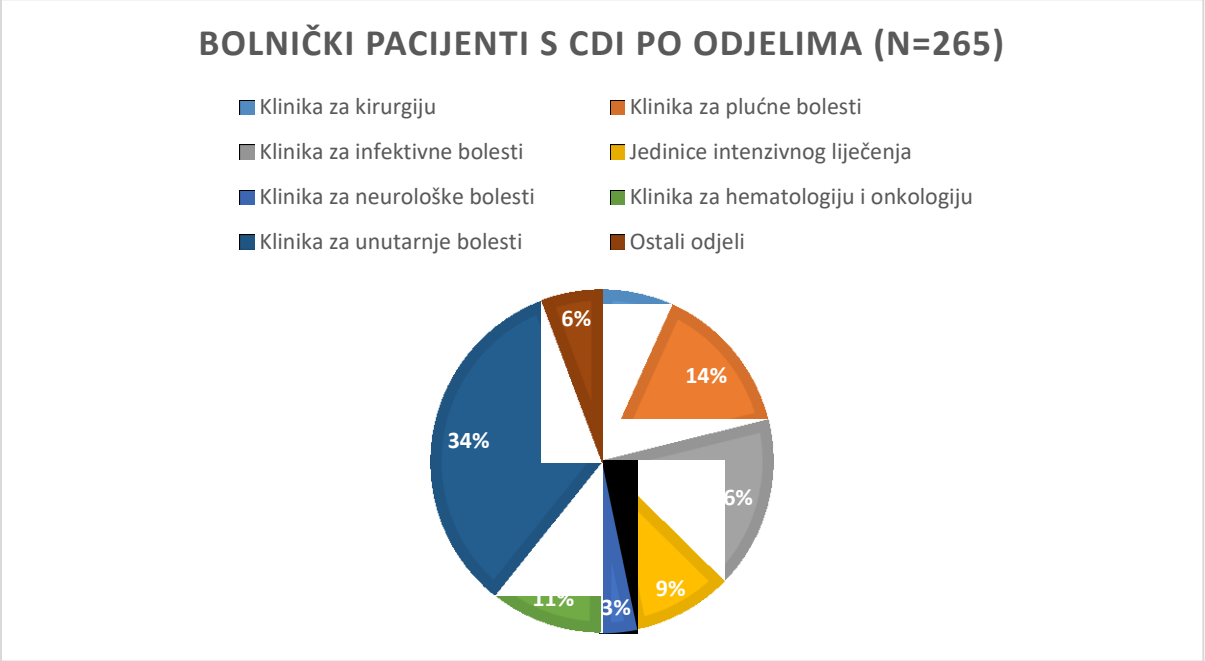
Podatci o zastupljenosti pozitivnih uzoraka prema mjestu uzorkovanja bili su dostupni za 367 od ukupno 397 pacijenata. Slika 14. prikazuje da je 265 (72 %) uzoraka pripadalo hospitaliziranim pacijentima, što je značajno više od broja pozitivnih uzoraka (108; 28 %) izvanbolničkih pacijenata ($p<0,0001$).



Slika 14. Raspodjela pacijenata prema boravku u bolnici u vrijeme uzorkovanja.

4.4. Zastupljenost bolničkih odjela i klinika KBC-a Split

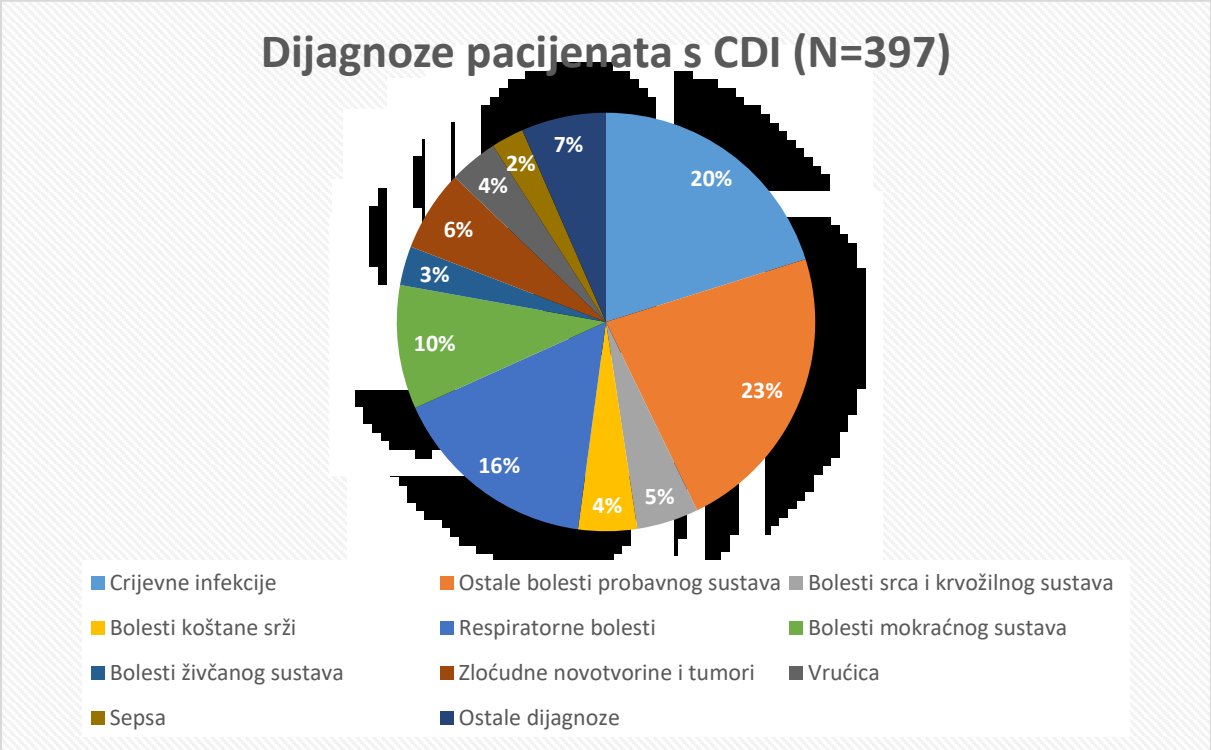
Na slici 15. je prikazana raspodjela hospitaliziranih pacijenata po odjelima i klinikama. Od ukupno 295 bolničkih pacijenata, za njih 265 bili su dostupni podatci. U Klinici za kirurgiju liječeno je 18 (7 %) pacijenata, u Klinici za plućne bolesti njih 38 (14 %), u Klinici za infektivne bolesti ukupno 43 (16 %) pacijenta, u jedinicama intenzivnog liječenja 25 (9 %) pacijenata, u Klinici za neurološke bolesti 9 (3 %) pacijenata, u Klinici za hematologiju i onkologiju njih ukupno 28 (11 %) te u Klinici za unutarnje bolesti 89 (34 %) pacijenata. Na ostalim odjelima (Odjel za neonatologiju, Odjel za dermatologiju, Zavod za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju i drugi) bilo je ukupno 15 (6 %) pacijenata s CDI.



Slika 15. Zastupljenost pojedinih odjela i klinika KBC-a .

4.5. Uputne dijagnoze pacijenata s *C. difficile* infekcijom

Slika 16. prikazuje sve zabilježene dijagnoze pacijenata s CDI. Najzastupljenije su bile bolesti probavnog sustava, infektivne (80 pacijenata, 20 %) i neinfektivne (90 pacijenata, 23 %) etiologije. Respiratorne bolesti imalo je 64 (16 %) pacijenta dok su bolesti mokraćnog sustava bile zastupljene u 38 (10 %) pacijenata. Zloćudne novotvorine i tumore imalo je ukupno 25 (6 %) pacijenata, bolesti srca i krvožilnog sustava 19 (5 %) pacijenata, bolesti koštane srži njih 18 (4 %) dok je bolesti živčanog sustava imalo 12 (3 %) pacijenata. Vrućica je dijagnosticirana u 15 (4 %) pacijenata, sepsa u njih 10 (2 %) te je ostalih dijagnoza bilo 26 (7 %).



Slika 16. Distribucija zabilježenih uputnih dijagnoza.

5. ZAKLJUČAK

U Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split, mikrobiološka dijagnostika CDI se provodi prema ESCMID-ovom dvostupanjskom ili trostupanjskom dijagnostičkom postupniku. U periodu od 1. 1. do 31. 12. 2020. godine, zaprimljeno je 1675 uzoraka, a u 25 % (410 uzoraka) je dokazan toksigeni soj *C. difficile.*

U većini pozitivnih uzoraka dokazano je prisustvo oba toksina (toksin A i B), dok je najmanji bio broj pozitivnih uzoraka bez produkcija toksina.

Žene češće obolijevaju od CDI u odnosu na muškarce, a osobe koje su starije od 65 godina, imaju veći broj pozitivnih uzoraka u odnosu na mlađe osobe.

Značajno je veći broj pacijenata koji su razvili CDI u bolnici od onih koji su dobili prve simptome infekcije izvan bolnice.

Najviše bolničkih pacijenata bilo je smješteno u Klinici za unutarnje bolesti, Klinici za infektivne bolesti te u Klinici za plućne bolesti.

Pacijenti sa crijevnim, probavnim i respiratornim bolestima podložniji su razvoju infekcije uzrokovane s *C. difficile.*

6. POPIS LITERATURE

1. Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 2015;372(16), 1539–1548.

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. Cleary RK.. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Dis Colon Rectum. 1998; 41(11):1435–1449.

4. Hensgens MPM, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. J Antimicrob Chemother, 2012;67(3):742–748.

5. Czepiel J, Kędzierska J, Biesiada G, Birczyńska M., Perucki W, Nowak P i sur. (2015). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection: results of a hospital-based study in Krakow, Poland. Epidemiol Infect. 2015;143(15):3235–3243.

6. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL i sur. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. Am J Gastroenterol. 2012:107(1):89–95.

7. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. J Infect Dis. 1992;166(3):561–567.

8. Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MGJ, de Boer E i sur. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? Clin Microbiol Inf. 2012;18(7):635–645.

9. Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, Shoshiev MS, Hagan AK, Hastie JL i sur. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. PLoS Pathog. 2017;13(7), e1006443.

10. Baktash A, Terveer EM, Zwittink RD, Hornung BVH, Corver J, Kuijper EJ i sur. Mechanistic insights in the success of fecal Microbiota transplants for the treatment of *Clostridium difficile* infections. Front Microbiol. 2018;9:1242.

11. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16020.

12. Androga GO, Hart J, Foster NF, Charles A, Forbes D, Riley TV. Infection with toxin A-negative, toxin B-negative, binary toxin-positive *Clostridium difficile* in a young patient with ulcerative colitis. J Clin Microbiol. 2015;53(11):3702–3704.

13. Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infec Immun. 1985;47(2):349–352.

14. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RYY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* Infection. N Engl J Med. 1989;320(4):204–210.

15. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE i sur. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis. 2018;66(7):e1–e48.

16. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM i sur. (2016). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2016;22(Suppl.4):S63-81.

17. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review: *Clostridium difficile* infection. J Am Geriatr Soc. 2010;58(8):1556–1564.

18. Bartlett JG. Detection of *Clostridium difficile* infection. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31:(Suppl.1):S35-7.

19. Su WY, Mercer J. Van Hal SJ, Maley M. *Clostridium difficile* testing: have we got it right? J Clin Microbiol. 2013;51(1):377–378.

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

21. Czepiel J, Biesiada G, Dróżdż M, Gdula-Argasińska J, Żurańska J, Marchewka J i sur. The presence of IL-8 +781 T/C polymorphism is associated with the parameters of severe *Clostridium difficile* infection. Microb Pathog. 2018;114:281–285.

22. Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, Brill JV, Demarco DC, Franzos MA i sur. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9(12):1044–1049.

23. Boyce JM, Havill NL, Otter JA, McDonald LC, Adams NM, Cooper T i sur. Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental

contamination and transmission in a healthcare setting. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008;29(8):723–729

24. Gerding DN, Muto CA, Owens RC Jr. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis. 2008;46 (Suppl1):S43-9.

25. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Tüll P, Gastmeier P i sur. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 2008;14(Suppl.5):2-20.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Irena Ževrnja

Datum i mjesto rođenja: 1. srpnja 1999. godine, Split

Adresa: Jeretova 1 B, 21000 Split

E-adresa: irenazev1@outlook.com

Državljanstvo: hrvatsko

Obrazovanje

2006. – 2014. Osnovna škola "Split 3"

2014. – 2018. Druga jezična gimnazija Split

2018. – 2021. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Split