

Medicinski fakultet, Niš
Institut za javno zdravlje

Stručni članak
Professional article
UDK 579.61:616.34-008.314.4
DOI: 10.2298/MPNS0812632K

KLINIČKI ZNAČAJ NALAZA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* KOD HOSPITALIZOVANIH BOLESNIKA

CLINICAL IMPORTANCE OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* FINDING IN HOSPITALIZED PATIENTS

Branislava KOCIĆ i Predrag STOJANOVIĆ

Sažetak - Do sada objavljena istraživanja ukazuju da *Clostridium difficile* u najvećem broju slučajeva prouzrokuje infekcije kod hospitalizovanih bolesnika. Cilj istraživanja je bio utvrđivanje kliničkog značaja nalaza *Clostridium difficile* kultivisanog iz uzoraka stolice hospitalizovanih bolesnika. Materijal korišćen u istraživanju obuhvatio je 100 hospitalizovanih bolesnika sa najmanje jednom neformiranom ili tečnom stolicom i 100 hospitalizovanih bolesnika kontrolne grupe sa formiranom stolicom, pri čemu su svi ispitanici u bolnici proveli najmanje 48 h pre uzorkovanja materijala. *Clostridium difficile* je kultivisan na selektivnom CCF (cykloserin, cefoxitin, fruktoza) agaru (*Biomedics, Parg qe tehnicologico*, Madrid). Utvrđivanje prisustva toksina *Clostridium difficile* u stolici rađena je ELISA-RIDASCREEN *Clostridium difficile* Toxin A/B testom (R-Biopharm AG, Germany). *Clostridium difficile* je izolovan i identifikovan iz uzoraka stolica sedam bolesnika ispitivane kliničke grupe. Kod četiri (57,14%) od sedam bolesnika nađen je i toksin *Clostridium difficile* u stolici. Iz uzoraka pet bolesnika kontrolne grupe izolovan je i identifikovan *Clostridium difficile*, ali ni u jednom uzorku nije utvrđeno prisustvo toksina. Prisustvo dijarealnog sindroma kod četiri hospitalizovana bolesnika prouzrokovano *Clostridium difficile* potvrđuje značaj praćenja ove bakterije u bolničkoj sredini i potrebe preduzimanja odgovarajućih preventivnih mera.

Ključne reči: *Clostridium difficile*; Bolničke infekcije; Dijareja

Uvod

Clostridium (*C.*) *difficile* je anaerobna Gram-pozitivna, sporogena vrsta prisutna u zemlji i kolonu digestivnog trakta životinja, zdrave dece i odraslih ljudi. Izlučuje se stolicom domaćina, a infekcija nastaje od spora prisutnih u digestivnom traktu čoveka ili unosom spora i vegetativnih oblika bakterije, kontaminiranom hranom, vodom kao i preko prljavih ruku. Do sada objavljena istraživanja ukazuju da *C. difficile* u najvećem broju slučajeva prouzrokuje infekcije kod hospitalizovanih bolesnika. Najčešći putevi prenosa infekcije u bolnicama su kontaminirane površine prostorija i ruke medicinskog osoblja [1,2].

C. difficile izaziva patogena stanja u digestivnom traktu lučenjem dva egzotoksina, enterotoksina A i citotoksina B, koji prouzrokuju dijareju i kolitis. Dugo se smatralo da *C. difficile* produkuje oba tipa toksina (A+/B+), međutim novija istraživanja ukazuju na postojanje i sojeva koji produkuju samo toksin B (A-/B+). Pretpostavlja se da izmene u flori kolona i poremećaj funkcije motiliteta creva predstavljaju pogodnu podlogu za nastanak infekcije [3].

C. difficile se smatra odgovornim za niz različitih stanja i to od asimptomatske kolonizacije, dijareja različite težine do po život opasnih pseudomembranoznih kolitisa. Oboljenja koja izaziva poznata su kao bolesti povezane sa prisustvom *C. difficile* (*Clostridium difficile* associated disease - CDAD). Tipične manifestacije CDAD su abdominalni bolovi i grčevi, profuzna dijareja (sluzava, prljavozelenkasta, tečna stolica neprijatnog mirisa) uz povišenu temperaturu i leukocitozu. CDAD se

obično javlja nakon uzimanja antibiotika (klindamicina, linkomicina, ampicilina, cefalosporina itd) [4].

Epidemiološka istraživanja ukazuju da primena antibiotske, citostatske, imunosupresivne i zračne terapije, hospitalizacija duža od 10 dana, primena gastrointestinalnih invanzivnih procedura, davanje klizmi i starost osobe (osobe starije od 65 godina) predstavljaju faktore rizika za nastanak infekcije [5].

Cilj istraživanja je bio utvrđivanje kliničkog značaja nalaza *Clostridium difficile* kultivisanog iz uzoraka stolice hospitalizovanih bolesnika.

Materijal i metode

Dizajn istraživanja

Istraživanje je urađeno u Institutu za javno zdravlje Niš, u Sektoru za mikrobiologiju sa parazitologijom tokom 2006. godine. Tokom istraživanja prospektivno su prikupljeni i obrađeni podaci o hospitalizovanim bolesnicima klinika Kliničkog centra Niš iz čijih je uzoraka stolice kultivisan *C. difficile*. Podaci su prikupljeni iz mikrobiološke laboratorije (izolovana vrsta mikroorganizma, produkcija toksina) i sa klinika Kliničkog centra Niš (pol, starost, dijagnoza bolesti, broj stolica u toku 24 h, vrednosti telesne temperature, broja leukocita). Posebno su beleženi podaci o prisustvu faktora visokog rizika za nastanak infekcije izazvane *C. difficile*: trajanje hospitalizacije, primenjena terapija i njeno trajanje, primena gastrointestinalnih invazivnih procedura i davanje klizmi).

Kao izvor podataka korišćeni su dnevni nalazi (radne liste, laboratorijski protokoli) o izolaciji uzročnika u mikrobakteriološkoj laboratoriji i me-

Skraćenice

<i>C. difficile</i>	- <i>Clostridium difficile</i>
CDAD	- <i>Clostridium difficile</i> associated disease
PMC	- pseudomembranozni kolitis
CCFA	- cikloserin, cefoxitin, fruktoza agar
Tcd	- toksin/toxin

dicinska dokumentacija (istorije bolesti, temperaturne liste).

Ispitanici

Ispitivana, klinička grupa je obuhvatila 100 hospitalizovana bolesnika.

Kriterijumi za odabir bolesnika:

- Najmanje jedna neformirana ili tečna stolica,
- Hospitalizacija u trajanju od najmanje 48 h pre pojave tečne ili neformirane stolice,
- Postojanje validne medicinske dokumentacije sa odabranim i praćenim parametrima za svakog bolesnika na osnovu kojih je tumačen nalaz *C. difficile* u stolici.

Kontrolna grupa je obuhvatila 100 bolesnika koji su odabrani metodom slučajnog uzorka među hospitalizovanim bolesnicima sa formiranom stolicom, koji su u bolnici proveli najmanje 48 h.

Laboratorijske metode

Stolica je nakon defekacije uzorkovana standardnim patronom za koprokulturu. Odmah po dopremanju stolice u laboratoriju, uzorak je direktno zasejavan na hranjive podloge za izolaciju bakterija izazivača zaraznih bolesti digestivnog trakta (5% ovčiji krvni agar, Endo agar, selektivni SS agar, Selenit F bujon, CIN agar i podloga po Skirowu) i selektivni CCFA (cikloserin, cefoxitin, fruktoza) agar (*Biomedics, Parg qe tehnicologico*, Madrid) za kultivisanje *C. difficile*.

Zasejani Selenit F bujon, 5% ovčiji krvni, Endo i SS agar inkubirani su u aerobnim uslovima na 37° C/24 h. Selenit F bujon je nakon propisane inkubacije presejan na SS agar i termostetiran u aerobnim uslovima na 37° C/24 h. Zasejani CIN agar inkubiran je u aerobnim uslovima na 25° C/24 h i podloga po Skirowu na temperaturi od 42° C/48 h. Identifikacija poraslih kolonija vršena je klasičnim mikrobiološkim metodama.

CCFA agar je inkubiran u anaerobnim uslovima na 37° C/48 h. Za postizanje anaerobnih uslova u loncima za inkubiranje korišćene su AnaeroGen kesice (OXOID, England). Provera anaerobnih uslova je vršena indikatorskim trakama (*Anaerobic indicator*, OXOID, England). Biohemijska identifikacija izolata *C. difficile* karakterističnog izgleda kolonija i morfologije bakterijskih ćelija na mikroskopskom preparatu vršena je API sistemom za anaerobne bakterije (*BioMerieux*), katalaza testom i ciljanom proverom produkcije indola, hidrolize eskulina, fermentacije glukoze i manitola.

Utvrđivanje prisustva toksina *C. difficile* u stolici rađena je ELISA-RIDASCREEN *Clostridium difficile* Toxin A/B testom (*R-Biopharm AG, Germany*).

Definicije

Slučaj hospitalne CDAD [6]: bolesnik sa tečnom ili neformiranom stolicom kod koga su se simptomi CDAD javili najmanje 48 h nakon hospitalizacije, pri čemu je utvrđen pozitivan laboratorijski nalaz toksina (Tcd) A i/ili toksina (Tcd) B *C. difficile* u stolici, ili nalaz toksin-produkujućih sojeva *C. difficile* u stolici čije je prisustvo utvrđeno kultivisanjem na hranljivoj podlozi ili nekom drugom dijagnostičkom metodom.

Statističke metode

Praćeni parametri su grupisani i obrađeni Hi-kvadrat (χ^2), Fisher exact i Mann-Whitney (Wilcoxon rank sum test) testom sa ciljem provere nulte hipoteze (nema statistički značajne razlike između testiranih grupa). Vrednosti p manje od 0,05 ($p < 0,05$) prihvaćene su kao statistički značajne.

Rezultati

Tokom istraživanja pregledan je 141 uzorak stolica 100 hospitalizovanih bolesnika Kliničkog centra Niš starosti 22-70 godine (57% muškog, 43% ženskog pola) i 100 uzoraka stolica bolesnika kontrolne grupe starosti 19-71 godine (54% muškog, 46% ženskog pola).

C. difficile je izolovan i identifikovan iz uzoraka stolica sedam bolesnika ispitivane kliničke grupe. Kod četiri (57,14%) od sedam bolesnika nađen je i toksin *C. difficile* u stolici. Bolesnici sa nalazom toksina u stolici bili su starosti 41-68 godina (75% muškog i 25% ženskog pola), a bili su hospitalizovani i lečeni na klinikama za neurologiju (dva bolesnika - Dg. *Infarcus cerebri*), hirurgiju (Dg. *Status post operacionem calculosis vaesicae faelleae*) i hematologiju (Dg. *Trombocitopenia*).

Kod tri bolesnika sa dijarejom i izolatom *C. difficile*, ali bez nalaza toksina, iz stolice je izolovana *Salmonella enteritidis* (kod dva bolesnika) i *Shigella flexneri* 2.

Iz uzoraka pet bolesnika kontrolne grupe starosti 39-71 godine (60% muškog i 40% ženskog pola) izolovan je i identifikovan *C. difficile* ali ni u jednom uzorku nije utvrđeno prisustvo toksina (Tabela 1).

Kod svih bolesnika sa nalazom toksina u stolici i izolatom *C. difficile* registrovana je povišena temperatura, povećan broj leukocita i veliki broj dnevnih evakuacija stolice (do 10 u toku 24 h) (Tabela 2).

Iz uzoraka bolesnika kontrolne grupe nisu izolovane patogene vrste izazivači infekcija intestinalnog trakta.

Svi bolesnici sa nalazom toksina *C. difficile* u stolici su tokom boravka u bolnici pre pojave CDAD primali antibiotsku terapiju. Od pet bolesnika kontrolne grupe sa nalazom *C. difficile* u stolici, samo je jedan uzimao antibiotike ($\chi^2 = 0,0845$; $p = 0,04$) (Tabela 3).

Ni kod jednog bolesnika ispitivane i kontrolne grupe sa nalazom *C. difficile* u stolici nisu rađene

Tabela 1. Nalaz *Clostridium difficile* kod bolesnika ispitivanih grupa**Table 1.** The finding of *Clostridium difficile* in examined group

Grupa Group	Broj Number	Broj pre- gledanih Number of samples	Broj i % bolesnika sa nalazom <i>C. difficile</i> Number and percent of patients with <i>C. difficile</i>	Broj i % bolesnika sa nalazom toksina u stolici Number and percent of patients with toxin in stool samples
			n %	n %
Ispitanici Patients	100	141	7 7	4 4
Kontrola Control	100	100	5 5	0 0

invazivne gastrointestinalne procedure niti su davane klizme.

Kod bolesnika ispitivane, kliničke grupe sa dijarejom izazvanom *C. difficile* statistički značajno su više vrednosti praćenih parametara u odnosu na bolesnike kontrolne grupe sa nalazom *C. difficile* (vrednost telesne temperature, broj stolica u toku 24

Tabela 2. Nalaz praćenih kliničkih parametara kod bolesnika sa prisustvom *C. difficile* u stolici**Table 2.** The finding of followed clinical parameters in patients having *C. difficile* in stool samples

Grupa Group	Redni broj izolata Serial number of isolates	Prisustvo toksina u stolici/Pre- sence of toxin in stool samples	Broj stolica u 24 h/Number of evacuee stool 24h	Broj leukocita (μ L)/Number of leucocytes (μ L)	Telesna temperatura ($^{\circ}$ C)/Body tem- perature ($^{\circ}$ C)
Ispitanici Patients	1	Da/Yes	7	11450	38,1
	2	Da/Yes	8	12350	38,4
	3	Da/Yes	7	12500	38
	4	Da/Yes	10	18000	39,7
	5	Ne/No	5	9850	37,8
	6	Ne/No	6	7650	37,9
	7	Ne/No	3	9450	37,6
Kontrola Control	1	Ne/No	2	8745	37,1
	2	Ne/No	1	7650	36,9
	3	Ne/No	3	6750	37
	4	Ne/No	2	8950	36,7
	5	Ne/No	1	5950	37,2

Tabela 3. Prisustvo faktora rizika kod bolesnika sa nalazom *Clostridium difficile* u uzorcima stolice**Table 3.** Presence of risk factor on patients with *Clostridium difficile* in stool samples

Grupa Group	Redni broj izo- lata/Serial num- ber of isolates	Prisustvo toksina u stolici/Presence of toxin in stool samples	Vrsta i doza primenjenog antibiotika Class and dose giving antibiotics	Trajanje antibiotske terapije koja je prethodila CDAD (u danima; dan=24 h) Duration of antibio- tics therapy preceding CDAD (in days; day=24 h)	Trajanje boravka u bolnici pre pojave dijareje (u da- nima; dan=24 h)/Duration of stay in hospital befo- re appearance of diarrhoea (in days; day=24 h)
Ispitanici Clinical	1	Da/Yes	Amikacin (500 mg/2 * dnevno/per day)	16	17
	2	Da/Yes	Ciprofloksacin (500 mg/2 * dnevno/per day)	15	15
	3	Da/Yes	Clindamycin (300 mg/3 * dnevno/per day)	13	17
	4	Da/Yes	Cefuroxim (100 mg/4 * dnevno/per day)	16	21
	5	Ne/No	/	/	6
	6	Ne/No	/	/	9
	7	Ne/No	/	/	11
Kontrola Control	1	Ne/No	/	/	5
	2	Ne/No	/	/	9
	3	Ne/No	/	/	12
	4	Ne/No	/	/	6
	5	Ne/No	Ampicilin (500 mg/4 * dnevno/per day)	5	5

Tabela 4. Statističko upoređivanje praćenih parametara bolesnika sa dijarejom izazvanom *C. difficile* i bolesnika kontrolne grupe sa nalazom *C. difficile***Table 4.** Statistical comparison of followed parameters in the patients with diarrhoea induced by *C. difficile* and in the controls with *C. difficile*

Varijabla/Variable	Bolesnici sa dijarejom izazvanom <i>C. difficile</i> Patients with diarrhoea caused <i>C. difficile</i> Srednja vrednost $\pm$ SD/Mean value $\pm$ SD	Bolesnici kontrolne grupe sa nalazom <i>C. difficile</i> difficile/Controls with <i>C. difficile</i> Srednja vrednost $\pm$ SD/Mean value $\pm$ SD	P
Telesna temperatura ($^{\circ}$ C)/Body temperature ($^{\circ}$ C)	38,55 $\pm$ 0,785	36,98 $\pm$ 0,192	0,01
Broj stolica u toku dana/Number of evacuee stool 24 h	7,75 $\pm$ 0,96	1,8 $\pm$ 0,84	0,02
Broj leukocita/ μ L/Number of leucocytes μ L	13575 $\pm$ 2986,22	7609 $\pm$ 1282,64	0,02
Trajanje antibiotske terapije (u danima; dan=24 h) Duration of antibiotics therapy preceding CDAD (in days; day=24 h)	15 $\pm$ 1,41	1 $\pm$ 2,24	0,02
Trajanje boravka u bolnici pre pojave dijareje (u danima; dan=24 h) Duration of stay in hospital before appearance of diarrhoea (in days; day=24 h)	17,5 $\pm$ 2,52	7,4 $\pm$ 3,05	0,02
Starost bolesnika (u godinama)/Age (expressed in years)	57 $\pm$ 12,57	55,2 $\pm$ 13,88	0,91

h, broj leukocita). Analizirajući vreme boravka u bolnici i trajanje antibiotskog tretmana utvrđena je statistički značajna razlika između vrednosti kod bolesnika sa dijarejom izazvanom *C. difficile* i bolesnika kontrolne grupe sa nalazom *C. difficile* (Tabela 4).

Diskusija

Primarni uslov za ispoljavanje patogenosti toksigenih sojeva *C. difficile* je remećenje normalnog odnosa bakterija kolonizatora digestivnog trakta koji predstavlja barijeru umnožavanju patogenih mikroorganizama. Prema podacima do sada objavljenih

istraživanja 70-90% infekcija izazvanih *C. difficile* nastaje nakon primene antibiotika. Skoro svi antibiotici, osim intravenski datih aminoglikozida, mogu dovesti do nastanka CDAD [7]. Podaci istraživanja Bignardija i saradnika [8] ukazuju da davanje antibiotika širokog spektra dejstva ima veliki uticaj na normalnu floru intestinum, naročito ako su antibiotici davani oralno (penicilin, penicilin sa inhibitorima β -laktamaza, cefalosporini i klindamicin). Kombinacija antibiotika ili druga primena povećava rizik od nastanka bolesti. Zanimljivo je i to da faktor rizika može biti i primena antibiotika prema kojem je *C. difficile in vitro* osetljiv. Ovaj paradoks je još uvek nerazjašnjen, ali se pretpostavlja da je proliferacija *C. difficile* iz perzistirajućih spora brža, što dovodi do njegove dominacije prilikom restitucije normalne flore kolona [9]. Rezultati istraživanja sprovedeni u Institutu za javno zdravlje u Nišu odgovaraju do sada objavljenim istraživanjima jer su svi bolesnici sa nalazom toksina *C. difficile* u stolici primali antibiotsku terapiju duže od 14 dana.

Dejstvo antibiotika remeti normalnu floru kolona, omogućavajući endogenim i egzogenim sojevima *C. difficile* da proliferišu i kolonizuju kolon. Nosilaštvo toksigenih sojeva je veoma nisko (1-2% osoba) tako da je endogena kolonizacija relativno retka. Najverovatniji način nastanka infekcije kod hospitalizovanih bolesnika je unos rezistentnih spora, a koje u bolničkoj sredini mogu da perzistiraju mesecima predstavljajući stalnu opasnost za razvoj bolničkih infekcija. Prenos je takođe moguć od asimptomatskih kliconoša direktno ili preko ruku bolničkog osoblja. Asimptomatsko nosilaštvo je utvrđeno kod 7% hospitalizovanih bolesnika, kod 14% hospitalizovanih starijih bolesnika sa odeljenja intenzivne nege, i kod 20% starijih bolesnika hospitalizovanih zbog neke hronične bolesti i potrebne tuđe nege i pomoći ili su se nalazili na aparatima za održavanje vitalnih funkcija [10]. Bolesnici sa asimptomatskom kolonizacijom predstavljaju moguću izvor infekcije i potrebno ih je ukloniti iz soba gde su smeštene osobe sa visokim rizikom za nastanak infekcije *C. difficile* [11].

Faktori rizika za nastanak CDAD su prepoznati u studijama slučaj - kontrola. Osim davanja antibiotika, starost bolesnika (80% bolesnika je starije od 65 godina), teška osnovna bolest (maligna i hronična renalna bolest), boravak na nekom od odeljenja intenzivne nege, hirurška intervencija u abdomenu, primena invazivne gastrointestinalne procedure (npr. nazogastrična intubacija) i klizme faktori su rizika povezani sa nastankom CDAD [12,13]. Podaci epidemioloških istraživanja ukazuju da se infekcije *C. difficile* češće javljaju kod bolesnika koji su hospitalizovani duže od 10 dana [14], što se povezuje sa produženom izloženošću ovoj bakteriji. Mnogi od ovih faktora rizika imaju kao zajedničku karakteristiku remećenje zaštitne uloge normalne crevne flore. Podaci dobijeni tokom istraživanja u Institutu za javno zdravlje u skladu su sa prethodno objavljenim

istraživanjima jer su bolesnici sa nalazom toksina u stolici bili hospitalizovani između 15 i 21 dan.

Rezultati dosadašnjih istraživanja potvrđuju da *C. difficile* ima značajnu ulogu u nastanku dijarealnih oboljenja kod hospitalizovanih bolesnika, koja često mogu da poprime i epidemijski karakter na odeljenjima intenzivne nege. Podaci američkih Centara za kontrolu bolesti (*Centers for Disease Control* - CDC) ukazuju na konstantan porast incidencije CDAD od 0,13 na 1,55% u periodu 1986-1989. godine. Ovakvi podaci odgovaraju rezultatima istraživanja epidemiologa Francuske, Engleske, Holandije, Velsa, Španije, Italije i Nemačke, po kojima je incidencija CDAD tokom poslednjih deset godina 0,1-2% [15]. Tokom desetogodišnjeg istraživanja, Olsona i saradnika CDAD kod 908 bolesnika pokazala je incidenciju 0,4-1%. Analizom rezultata studije, 93% slučajeva je klasifikovano u hospitalne infekcije (dobijene tokom boravka u bolnici) [16]. U studiji Bowena i saradnika incidencija CDAD bila je 0,42%, ali je zato stopa bila viša kod bolesnika sa transplantiranom kostnom srži i bolesnika koji su bili podvrgnuti kardiovaskularnoj operaciji [17]. U bolnici *Saint-Antoine* (Pariz) godišnja incidencija infekcije je mnogo manja i kreće se 0,07-0,12% na 100 primljenih bolesnika, ali je viša stopa incidencije takode uočena kod bolesnika smeštenih u sobama intenzivne nege, na onkologiji i odeljenju hematologije. Više od 70% slučajeva analiziranih ovom studijom je okarakterisano kao hospitalna infekcija [18].

Incidencija CDAD je u bolnicama relativno mala, međutim podaci prospektivnih studija kojima su proučavani putevi prenošenja *C. difficile* pokazuju porast stope kliconoštva kod bolesnika nakon jedne ili eventualno dve nedelje po prijemu u bolnicu. Ovim studijama je potvrđena stopa kliconoštva nakon boravka u bolnicama zapadne Evrope od najmanje 7 dana i iznosila je 5,9-11%. To je mnogo viša stopa (od 3%) koja se javlja kod zdravih odraslih ljudi i može da bude posledica prethodne primene antibiotika ili kolonizacije tokom prethodne hospitalizacije [19]. Ovi rezultati ilustruju značajan patogeni pontecijal *C. difficile* u bolničkim uslovima što zahteva konstantno epidemiološko praćenje i nadzor. Na značaj praćenja CDAD ukazuju Olson i saradnici [16] koji su ispitivali mortalitet povezan sa infekcijom *C. difficile*. Njihovi rezultati na 908 slučajeva CDAD pokazuju da je 6 bolesnika (0,6%) umrlo od aktivnog pseudomembranoznog kolitisa (PMC) kao primarne bolesti. Rezultati studije Morrisa i saradnika [20] pokazuju da je mortalitet bolesnika sa kolonomijom i toksičnim megakolonom ili perforativnim kolonom visok (35-50%). U bolnicama Velike Britanije je zabeležen porast smrtnih slučajeva koji su tokom svoje osnovne bolesti imali infekciju i *C. difficile*. Podaci takođe ukazuju na dva do tri puta veću smrtnost tokom 2004. u odnosu na 1999. godinu [21].

CDAD je tokom istraživanja sprovedenog u Institutu za javno zdravlje u Nišu utvrđena kod četiri

(4%) od 100 pregledanih bolesnika, što je saglasno sa nalazom Berga i saradnika [22]. Oni su kod 6 (7,05%) od 85 hospitalizovanih bolesnika našli toksine ove bakterije u stolici. Rezultati istraživanja sprovedenog u Nišu mogu se porediti i sa nalazima Wongwanich i saradnika [23] koji utvrđuju prisustvo toksina kod 18/132 (13,63%) pregledanih hospitalizovana bolesnika. Međutim, nalaz toksina u stolici kod četiri (57,14%) od sedam bolesnika ispitivane grupe sa izolatom *C. difficile* nešto je drugačiji od rezultata Gayane i saradnika [24]. Oni su kod 12/18 (66,66%) bolesnika sa nalazom *C. difficile* utvrdili prisustvo toksina u stolici. Međutim, treba imati u vidu da je istraživanje Gayane i saradnika obuhvatilo samo bolesnike hospitalizovane na odeljenjima intenzivne nege koji su visoko rizična grupa za nastanak CDAD. Dalja proučavanja CDAD istih autora tokom 2004. i 2005. godine [25] na većem broju hospitalizovanih bolesnika iz visoko rizične grupe dala su isolate *C. difficile* iz uzoraka 97 bolesnika i toksin u stolici kod 72 (74,22%). Slične rezultate je publikovala Hanna P. sa saradnicima [26]. Njena istraživanja su pokazala da je kod 134/142 hospitalizovana odrasla i pedijatrijska bolesnika utvrđen toksin *C. difficile* u stolici. Svi bolesnici sa nalazom toksina u stolici su tokom hospitalizacije uzimali najmanje jedan antibiotik sa ciljem lečenja infekcije izazvane nekom drugom vrstom bakterije.

Kultivisanje *C. difficile* i drugih patogenih mikroorganizama iz istog uzorka stolice zahteva posebno razmatranje. Stav studijske grupe za proučavanje *C. difficile* ESCMID organizacije publikovan 2006. godine kaže da je osnovni kriterijum za utvrđivanje kliničkog značaja izolata *C. difficile* prisustvo toksina u stolici bolesnika [6]. Poštujući ovakav stav tražili smo kultivacijom *C. difficile*, ali i bakterije vrste rodova *Salmonellae spp.*, *Shigellae spp.*, *Campylobacter spp.*, i druge crevne bakterije u istom uzorku stolice. Samo u slučaju utvrđivanja prisustva

toksina *C. difficile* u stolici, moglo je da se zaključi da se radi o istovremenoj infekciji dvema različitim vrstama bakterija. Ovakav stav potvrđuju i nekoliko prikaza slučajeva gde se samo potvrdom prisustva toksina *C. difficile* u stolici uz nalaz nekog drugog patogenog mikroorganizma digestivnog trakta zaključuje o istovremenoj infekciji dvema vrstama mikroorganizama [27,28].

Infekcije izazvane *C. difficile* se mogu završiti smrću, što nalaže hitan terapijski tretman koji podrazumeva prekid antibiotske terapije koja je prethodila infekciji, i primenu etiološke (vankomicin, metronidazol, bacitracin itd.) i probiotske terapije. Kod nekih kliničkih oblika CDAD potrebna su i dodatna terapijska sredstva. Metronidazol i vankomicin su tokom poslednjih 25 godina najčešće primenjivani lekovi u terapiji CDAD. Zbog sličnog terapijskog efekata ova dva antibiotika, a usled pojave rezistentnih bakterija na vankomicin, američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti preporučuje metronidazol kao lek izbora u terapiji CDAD [29]. Antiperistaltičke lekove, npr. loperamid, treba izbegavati u terapijskom tretmanu CDAD. Nekoliko prikaza slučajeva ukazuju da antiperistaltički lekovi kod bolesnika sa CDAD mogu dovesti do nastanka toksičnog megakolona, verovatno zbog usporene ekskrecije toksina stolicom te pojedini autori smatraju da je primena antiperistaltičkih lekova kontraindikovana kod CDAD [29,30].

Zaključak

U istraživanju sprovedenom u Institutu za javno zdravlje u Nišu utvrđeno je prisustvo dijarealnog sindroma kod četiri hospitalizovana bolesnika prozrokovanog *Clostridium difficile*. To potvrđuje značaj praćenja ove bakterije u bolničkoj sredini i potrebe preduzimanja odgovarajućih preventivnih mera.

Literatura

1. Wilson KH. The microecology of *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis 1993;16(Suppl 4):214-8.
2. McFarland LV, Stamm WE. Review of *Clostridium difficile* associated diseases. Am J Infect Control 1986;14:99-109.
3. Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother 1998;41(Suppl C):13-9.
4. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978;298:531-4.
5. Samore MH. Epidemiology of nosocomial *Clostridium difficile* infection. Compr Ther 1993;19:151-6.
6. Kuijper EJ, Coignard B. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect Dis 2006;12:2-18.
7. Barbut F. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect 2001;7:405-11.
8. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1998;40:1-15.
9. Thibault A, Miller MA, Gaese C. Risk factors for the development of *Clostridium difficile*-associated diarrhea during a hospital outbreak. Infect Control Hosp Epidemiol 1991;12:345-8.
10. Schwaber MJ, Simhon A, Block C, Roval V, Ferderber N, Shapiro M. Factors associated with nosocomial diarrhoea and *C. difficile* associated disease on the adult wards of an urban tertiary care hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:9-15.
11. Delmee M, Vandercam B, Avesani V. Epidemiology and prevention of *Clostridium difficile* infection in leukemia unit. Eur J Clin Microbiol 1987;6:623-7.
12. Watanakunakorn PW, Hazy J. Risk factors associated with *Clostridium difficile* in hospitalized adult patients: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol 1996;17:232-5.
13. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC, Arbeit RD, Karchmer AW. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. Am J Med 1996;100:32-40.

14. Spencer RC. Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:5-12.
15. DuPont HL, Ribner BS, Bennett JV. Hospital infections. 3rd ed. In: Infectious gastroenteritis. Boston: Little Brown; 1992:641-58.
16. Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT, Gerding DN. Ten years of prospective *Clostridium difficile* disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982 - 91. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15:371-81.
17. Bowen KE, McFarland LV, Greenberg N, Ramsey MM, Record KE, Svenson J. Isolation of *Clostridium difficile* at a University hospital: a two-year study. *Clin Infect Dis* 1995;20: 261-2.
18. Beaugerie L, Flahaut A, Barbut F. Diarrhea des antibiotiques et *Clostridium difficile* en population generale. In: Journees Francophones de pathologies digestives. Paris: 2001; 1-14.
19. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RYY. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989;320:204-10.
20. Morris JB, Yollinger RM, Stellato TA. Role of surgery in antibiotic-induced pseudomembranous enterocolitis. *Am J Surg* 1990;160:535-9.
21. Deaths involving *Clostridium difficile*: England and Wales, 1999-2004. *Health Statistics Q* 2006;30:56-60.
22. Berg RJ, Kuijper EJ, Claas ECJ. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. *Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 12:178-96.
23. Wongwanich S, Pongpench P, Dhirapurta C. Characteristics of *Clostridium difficile* strains isolated from asymptomatic individuals and from diarrheal patients. *Clin Microbiol Infect Dis* 2001;7:438-41.
24. Gayane M, Szczesny A, Silva J. *Clostridium difficile* in emergency room. *Clin Microbiol* 2005;11:258-61.
25. Gayane M, Stuart C, Szczesny A, Silva J. Analysis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among patients hospitalized in tertiary academic hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;52:153-5.
26. Hanna P, Piotr O, Wultanska D, Luczak M. A survey of metronidazole and vancomycin resistance in strains of *Clostridium difficile* isolated in Warsaw, Poland. *Antimicrob Suscept* 2005;11:197-9.
27. Grinblat J, Weiss A, Grosman B, Dicker D. Diarrhea in elderly patients due to *Clostridium difficile* associated with *Salmonella* and *Shigella* infection. *Arch Gerontol Geriatr* 2004;39: 277-82.
28. Navarro V, Espinosa A, Solera J. Diarrhea associated with *Clostridium difficile* and *Salmonella* enteritidis in a patient with HIV infection. *Med Clin* 1995;105:756-59.
29. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1996;22:813-8.
30. Aslam S. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 2005;5:549-57.

Summary

Introduction

Clostridium difficile infections predominately occur among hospitalized patients. The aim of this study was to evaluate the importance of finding the isolate of *Clostridium difficile* cultured from the stool of hospitalized patients.

Material and methods

Material consisted of 100 patients with at least one liquid stool samples and control group with form stool. Every patient spent minimum 48h in hospital before the sampling. The material was immediately cultured on mediums for isolation of enteric pathogens, and on selective CCFA medium (Biomedics) for *Clostridium difficile* in anaerobic condition. Diagnosis of *Clostridium difficile* toxin in stool samples was achieved by ELISA-RIDASCREEN *Clostridium difficile* Toxin A/B test (R-Biopharm).

Results

One-hundred forty one stool samples of patients in Clinical Centre Nis were cultivated and examined for *C. difficile*. The

bacteria was isolated in seven patients from the clinical group. In four (57.14%) patients, the presence of *C. difficile* toxin in stool was established. The bacteria was diagnosed from the stool samples of five patients from the control group, but the toxin was not found in their stool samples.

Discussion

The results performed at the Institute for Public Health Nis are in accordance with previously published results that all patients with positive findings of *Clostridium difficile* toxin in stool samples were on antibiotic treatment longer than 14 days. By analysing the patient's stay in hospital and duration of antibiotic treatment, we observed the statistically significant difference in findings between the patients with CDAD and the patients from the control group with positive bacteria.

Conclusion

The study confirms the importance of finding *Clostridium difficile* associated disease in four (4%) hospitalized patients.

Key words: *Clostridium Difficile*; Cross Infection; Diarrhea

Rad je primljen 8. VI 2007.

Prihvaćen za štampu 11. VII 2007.

BIBLID.0025-8105:(2008):LXI:11-12:632-637.