Clostridium difficile

Dugić, Milica

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:986601

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Milica Dugić

Clostridium difficile

Završni rad

Mentor: Doc. dr. sc. Goran Palijan

Osijek, 2017. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Osijeku
Odjel za biologiju
Završni rad
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Clostridium difficile

Milica Dugić

Rad je izrađen na Zavodu za kvantitativnu ekologiju, Odjel za biologiju

Mentor: Dr.sc. Goran Palijan,**doc.**

Kratak sažetak završnog rada

Clostridium difficile je anaerobni, sporulirajući patogen, sve više istraživan zbog saznanja da je glavni uzročnik nozokomijalnih infekcija, odnosno infekcija koje se razvijaju u bolničkim uvjetima. Uočeno je da su u posljednjih dvadesetak godina te infekcije sve češće, što je direktno utjecalo na pojačano istraživanje ovog patogena i na traženje načina kako spriječiti širenje bakterije, ali i kako izliječiti pacijente koji su inficirani sa *C. difficile*.

Broj stranica: 24
Broj slika: 4
Broj literaturnih navoda: 10
Web izvor: 2
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: *Clostridium difficile*, nozokomijalna infekcija, binarni toksin, toksini A i B, metronidazol, vankomicin, fidaksomicin, probiotici, prebiotici, imunoterapija

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Osijek
Department od Biology
Bachelor's thesis
Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

Clostridium difficile

Milica Dugić

Thesis performed at the Subdepartment of Quantitative Ecology, Department of Biology

Supervisor: Goran Palijan, **PhD**, **Assist. Prof.**

Short abstract

Clostridium difficile is an anaerobic, sporulating pathogen, significantly investigated because it is known that this bacteria is the major cause of nosocomial infections or more precisely infections that are developed in hospital conditions. It has been observed that in the last twenty years, these infections were developed more often, which has directly influenced the investigation of this pathogen and searching the way how to prevent spreading this bacteria, and also how to cure patients infected with *C. difficile*.

Number of pages: 24
Number of figures: 4
Number of references: 10
Web source: 2
Original in: Croatian
Key words: *Clostridium difficile*, nosocomial infection, binary toxin, toxins A and B, metronidazole, vancomycin, fidaxomycin, probiotics, prebiotics, immunotherapy

Thesis deposited in the Library of Department of Biology, University of Osijek and in the National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Rad je izrađen na temelju dostupne literature, odnosno znanstvenih radova i osvrta pisanih na temu bakterije *Clostridium difficile* s naglaskom na sprječavanje i liječenje infekcije izazvane ovom bakterijom.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. EPIDEMIOLOGIJA 5
3. PRIJENOS BAKTERIJE I KAKO GA SPRIJEČITI 6
3.1. NOZOKOMIJALNE INFEKCIJE 6
4. ANTIBIOTICI 8
4.1. METRONIDAZOL I VANKOMICIN 8
4.2. FIDAKSOMICIN 8
4.3. NOVI ANTIBIOTICI 9
5. PONAVLJANJE INFEKCIJA 9
6. ULOGA IMUNOLOŠKOG SUSTAVA DOMAĆINA 11
7. PROBIOTICI I PREBIOTICI 12
8. DIJAGNOSTICIRANJE 14
9. IMUNOTERAPIJA 14
10. *C. difficile* KOD ŽIVOTINJA 15
11. ZAKLJUČAK 17
12. LITERATURA 18

1. UVOD

Bakterija *Clostridium difficile* prvi puta je izolirana 1935. godine. Izolirali su je Hall i O'Toole, dva znanstvenika koja su proučavala svakodnevne promjene u mikrobnoj flori fecesa novorođenčadi. Bakteriju su nazvali *Bacillus difficilis (difficilis* lat. težak*)* iz razloga što im je bilo vrlo teško izolirati ovu bakteriju. Danas je ova bakterija poznata pod nazivom *Clostridium difficile*, a značajna je po tome što uzrokuje velike probleme u posljednjih desetak godina, s obzirom da je vrlo teško spriječiti njezin rast, ali i njezino širenje.

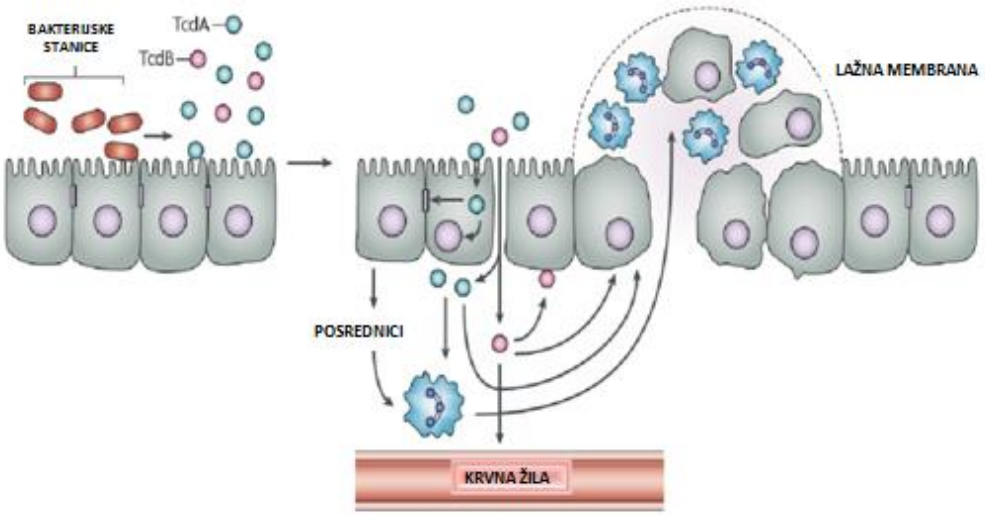
C. difficile je Gram pozitivna, anaerobna, štapićasta bakterija, inače poznata kao glavni uzročnik razvoja infekcije distalnog dijela debelog crijeva te rektuma, što se još naziva i kolitis, ali je uzročnik i nekih drugih simptoma. Bolest se razvija zbog citotoksičnog učinka bakterije na enterocite, podraživanja neurona debelog crijeva te razvoja upale (Kelly, LaMont, 2010), a pojavljuje se kao komplikacija uzrokovana uzimanjem gotovo svih vrsta antibiotika (najčešće klindamicinom ili cefalosporinima) i češća je kod starijih pacijenata (Bartlett, 2006). Također, bakterija ima sposobnost sporulacije. Spore su izrazito otporne na isušivanje, različite kemikalije i visoke temperature te zbog toga u nekom okolišu mogu opstati mjesecima pa čak i godinama. Sojevi poznati po uzrokovanju epidemija imaju znatno veću sposobnost sporulacije. Nedavno je dokazano da spore mogu preživjeti i procese pranja i dezinfekcije koji se provode u bolnicama prilikom pranja posteljine te na taj način se mogu prenositi na druge pacijente. Zbog toga su se počela koristiti sredstva koja sadržavaju klor u svom sastavu jer su se pokazala kao najbolja za uništavanje spora (Rupnik i sur. 2000).

Sredinom i krajem 1990. godine u bolnicama SAD-a zabilježeno je da je na 100 000 ljudi oko 30-40 bilo inficirano ovom bakterijom. U 2001. godini zabilježen je broj od 50 inficiranih, što je nešto više u odnosu na prethodne godine, a 2005. godine inficirane su bile čak 84 osobe, što je gotovo dvostruko u odnosu na 1990. godinu. Ozbiljnost situacije, ali i zabrinutost je ubrzano rasla kada je dokazano da je u Engleskoj *C. difficile* bio uzrok čak 499 smrtnih slučajeva 1999. godine, dok je 2006. zabilježeno čak 3393 žrtvi ove bakterije. Slično povišenje učestalosti infekcija, te smrtnosti uzrokovane ovom bakterijom zabilježeno je i u SAD-u, gdje je epidemija trajala od 2000.-2003.godine, a proučavali su je McDonald i suradnici analizom uzoraka iz osam bolnica smještenih u šest država SAD-a

(Georgia, Illinois, Maine, New Jersey, Oregon, i Pennsylvania). Dokazao je da je u gotovo svim uzorcima bio prisutan isti soj bakterije, već prethodno istražen i identificiran 1980. godine te nazvan BI. Danas taj isti soj nosi naziv NAP1 (North American Pulsed Field type 1) i PCR ribotype 027, odnosno NAP-1/027, i povezuje se isključivo sa bolničkim infekcijama. Prema Rupnik i sur. nedavno je soj NAP-1/027 povezan i sa infekcijama nastalim izvan bolnice, a kao mogući izvori ovog soja navedeni su tlo, voda, kućni ljubimci, životinje koje koristimo kao hranu, ali i povrće. S obzirom da nema jasnog objašnjenja koje bi odgovorilo na pitanje kako se infekcija sa *C. difficile* tako naglo proširila u posljednjih godina, hrana kao potencijalni uzročnik širenja je također uzeta u obzir. Razlog tome je bio što je u mesu prasadi i teladi pronađen bakterijski soj 027.

U ovisnosti o državi u kojoj je prisutna bakterija *C. difficile*, prisutni su i drugi sojevi, uključujući i PCR ribotipove 001, 053 i 106. Oni se također povezuju sa epidemijama i težim oboljenjima. U Europi je zabilježeno i povećanje rasprostranjenosti soja 078 za čak 10%. Ovaj soj je također pronađen u mesu životinja koje koristimo u prehrani, ali u puno većoj količini nego soj 027. Zaraženi sojem 078 najčešće su bili mlađi od osoba zaraženih sojem 027 (Rupnik i sur. 2000).

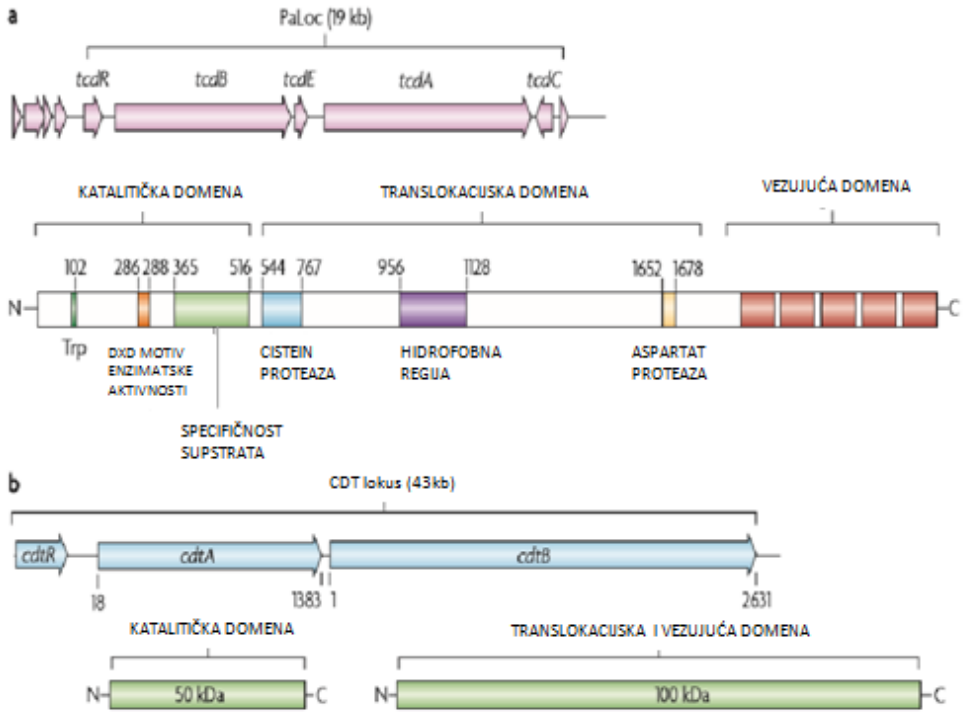
Tri bakterijska čimbenika soja NAP-1/027 osiguravaju razvoj epidemije, a to su proizvodnja A i B toksina, otpornost na fluorokinolon (antibiotik širokog spektra djelovanja) te proizvodnja binarnog toksina. Prema literaturi Rupnik i sur. bakterija na svojoj površini ima i proteine koji joj potpomažu u adheziji na epitelne stanice crijeva, te se ti proteini smatraju dodatnim čimbenikom virulencije (slika 1). Važno je naglasiti da su ti proteini drugačiji u različitim sojevima *C. difficile*, a osobito površinski sloj proteina A (SlpA). Nakon istraživanja povezanosti površinskih slojeva proteina i virulentnosti bakterije dokazano je da je SlpA izmijenjen kod soja NAP-1/027, što je direktno utjecalo na povećanu sposobnost adhezije bakterije na epitelne stanice crijeva.



Slika 1: Patogenost *C. difficile*. (*C. difficile* kolonizira crijevo nakon poremećaja normalne crijevne mikroflore. Još nije poznato u kojoj mjeri je povezano prianjanje i stvaranje biofilma sa patogenošću ove bakterije. Shema prikazuje slobodne bakterijske stanice koje se vežu na stanice domaćina. Toksični sojevi proizvode toksine TdcA i TdcB. TdcA se veže na gornju stranu stanice što uzrokuje promjene u staničnom citoskeletu. Tako dolazi do poremećaja čvrstih veza između stanica te epitelne barijere postaju propusne, ali može doći i do smrti stanice. Zbog propusnosti epitelne barijere toksini slobodno mogu ući u stanicu. Za razliku od toksina A, toksin B se češće veže za bazolateralnu stjenku stanica. Isto tako, toksin B je pokazao afinitet za vezanje na srčana tkiva što kao posljedicu ima ulazak toksina u krvotok. I A i B toksin su citotoksini, te uzrokuju upalne procese i nakupljanje neutrofila).

Toksini A i B su najzaslužniji za virulentnost soja NAP-1/027, a nastaju prepisivanjem lokusa patogenosti (PaLoc) koji uključuje pet gena: dva gena za toksin (tcdA i tcdB) te tri regulatorna gena od kojih se ističe gen tcdC s obzirom da je on zaslužan za negativnu regulaciju transkripcije toksina, odnosno ima funkciju u sprječavanju nastanka toksina u ranoj fazi razvoja bakterije. Nedavne studije su pokazale da ukoliko dođe do mutacije tcdC gena delecijom, pojačava se produkcija toksina kod *C. difficile.* Prema literaturi (Joksimović, Bastać, 2013) povećanje produkcije je za oko 16 puta za toksin A i 23 puta za toksin B. Ova mutacija tcdC gena bila je prisutna u svim sojevima analiziranim u razdoblju od 1980.-1990. godine u Americi. Toksin se zatim veže za

epitelne stanice crijeva te pospješuje glikozilaciju staničnog Rho proteina, što dovodi do smrti stanice. S obzirom da je zabilježena i rezistentnost soja NAP-1/027 *C. difficile* na fluorokinolon, razvila se teorija da je rezistentnost stečena kao odgovor na veliku uporabu ovog antibiotika u bolnicama. Ova teorija je i potvrđena pa je zaključak bio da se hitno treba smanjiti korištenje fluorokinolona te na taj način spriječiti daljnje nekontrolirano izbijanje infekcije uzrokovane sojem NAP-1/027. Treći čimbenik virulentnosti soja NAP-1/027 je stvaranje binarnog toksina, koji nije povezan s lokusom patogenosti, važnog za kodiranje A i B toksina (slika 2). Zabilježeno je da oko 6% izoliranih sojeva *C. difficile* proizvodi binarni toksin, koji je homologan iota toksinu izoliranom iz *C. perfringens.* Binarni toksin u *in vitro* uvjetima pokazuje enterotoksičnost, no njegova uloga u patogenosti *C. difficile* nije u potpunosti jasna. Sojevi *C. difficile* koji proizvode binarni toksin u odsustvu A i B toksina ne pokazuju patogenost, no otkriće proizvodnje binarnog toksina potaklo je razmišljanje o tome djeluje li on zajedno sa A i B toksinom prilikom razvoja kolitisa.



Slika 2: Toksini *C. difficile* [a] Dva duga toksina, toksin A i B (tdcA i tdcB), čiji je nastanak kodiran lokusom patogenosti (PaLoc), koji sadrži pet gena. Kod nepatogenih

sojeva ova regija je zamijenjena kratkom sekvencom od 115pb. Oba toksina su jednolančani proteini sa nekoliko funkcionalnih domena. TcdB je detaljno prikazan ispod lokusa patogenosti. [b] Treći toksin, odnosno binarni toksin (CDT) kodiran je drugim slijedom na kromosomu odnosno lokusom pod nazivom CdtLoc. Binarni toksin čine dva nepovezana proteina, CdtB i CdtA. CdtB ima vezujuću funkciju, dok CdtA je komponenta s enzimatskom funkcijom.

Ova tri čimbenika soja NAP-1/027 značajno su utjecala na to da je u posljednjih dvadesetak godina zabilježen značajan porast u razvoju infekcija uzrokovanih bakterijom *C. difficile*, ali i brojne smrti. To je dokaz razvitka novog, hipervirulentnog soja ove bakterije. Zbog toga je ova bakterija značajnije proučavana te su se pojavile nove, obećavajuće metode u tretiranju i liječenju nastale infekcije.

2. EPIDEMIOLOGIJA

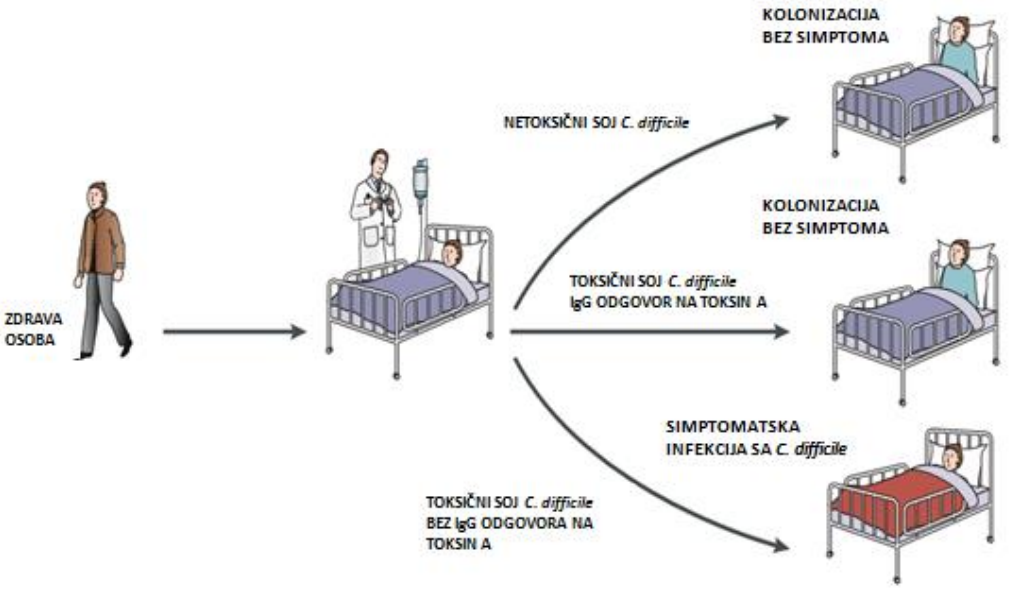
Infekcija uzrokovana *C. difficile* najčešće zahvaća starije, nemoćne osobe u bolnicama i staračkim domovima, no u posljednjih nekoliko godina Centar za kontrolu i prevenciju bolesti upozorava da postoji opasnost od zaraze i mladih, zdravih osoba koje nisu bile izložene bolničkim uvjetima ili nekim antibiotičkim terapijama. Direktan kontakt sa pacijentima zaraženim ovom bakterijom do sada je bio gotovo jedini način za zaražavanje u nekim pedijatrijskim slučajevima. Također je zabilježen i slučaj mlade žene u trudnoći kod koje je infekcija zahtijevala uklanjanje dijela debelog crijeva (kolektomiju), no unatoč tome pacijentica je umrla što je bilo u potpunosti neočekivano i zabrinjavajuće. Sve ovo je bio razlog za strah, ali i za hitno djelovanje u razvoju novih načina koji bi značajno ubrzali i olakšali dijagnosticiranje i liječenje infekcije izazvane od strane *C. difficile.*

3. PRIJENOS BAKTERIJE I KAKO GA SPRIJEČITI

3.1. NOZOKOMIJALNE INFEKCIJE

Nozokomijalnim infekcijama (eng. HAI-healthcare-associated infection) smatramo sve one infekcije koje je osoba stekla za vrijeme zdravstvene skrbi, odnosno svaka infekcija koja je stečena u zdravstvenoj ustanovi tijekom boravka pacijenta u objektu. Zbog toga su i dobile takav naziv (lat. *nosocomium*-bolnica). Takve infekcije mogu vrlo često uzrokovati smrt. Pacijenti koji u bolnicu dođu sa neinfektivnim bolestima (npr. rak ili bolesti srca) često bivaju inficirani nekom bakterijom unutar bolničkih uvjeta. Prema literaturi (Madigan i sur. 2015), ove infekcije godišnje pogode i do dva milijuna ljudi, od kojih gotovo 100 000 umre. Od tih 100 000, oko 36 000 umire od upale pluća, 31 000 od infekcija krvotoka, 13 000 od infekcija mokraćnog sustava, 8 000 od infekcija rane nakon kirurškog zahvata, a oko 11 000 je povezano s nekim drugim infekcijama. Važno je istaknuti da *C. difficile* najčešće uzrokuje infekcije gastrointestinalnog trakta, ali i infekcije povezane sa dišnim i krvožilnim sustavom (upala pluća, endokarditis i mionekrozu), odnosno infekcije koje imaju najveći postotak smrtnosti.

Bez obzira što veliki broj inficiranih osoba infekciju dobije u bolničkim uvjetima infekcija je moguća i izvan bolnice. To je potaknulo ideju da su radnici bolnice jednim dijelom zaslužni za širenje infekcije, odnosno smatralo se da oni na svojim rukama prenose ovu bakteriju sa inficiranih pacijenata na druge pacijente ili posjetitelje bolnice i na taj način ih ugrožavaju i potiču širenje nazokomijalne infekcije (slika 3). Radnici najčešće dolaze u dodir sa bakterijom direktnim putem (fekalijama inficiranih), ili rjeđe mjereći temperaturu pacijentima, pregledavajući ih ili hraneći ih. Ova teorija je i dokazana na način da je zabilježeno smanjenje u razvoju infekcija nakon uvođenja obveznog korištenja rukavica prilikom rada sa inficiranima. Također, prijenos infekcije moguć je i korištenjem iste bolničke opreme za inficirane i neinficirane osobe.



Slika 3: Način na koji se stječe infekcija sa *C. difficile*. (Pacijenti su izloženi sporama bakterije prilikom kontakta sa radnicima bolnice te u bolničkom okruženju. Ako organizam osobe koja dođe u kontakt sa infektivnim sojem *C. difficile* nakon uzimanja antibiotika počne stvarati IgG antitijela, neće se razviti simptomi nakon kolonizacije. Isto tako, ako pacijenti dođu u dodir sa sojem koji nije infektivan, infekcija se neće razviti. Infekcija se razvija samo kod osoba koje su kolonizirane infektivnim sojem i ne razvijaju imunološki odgovor, odnosno ne stvaraju IgG antitijela).

S obzirom na veliku smrtnost uzrokovanu nazokomijalnim infekcijama, razvile su se brojne mjere predostrožnosti. U Americi je, uz obvezno korištenje rukavica, preporučeno i često pranje ruku, s obzirom da i način skidanja rukavica može utjecati na prijenos bakterije na ruke. Društvo za zdravstvenu epidemiologiju u Americi (Society for Healthcare Epidemiology of America) predložilo je i redovito korištenje preparata na bazi alkohola za redovnu dezinfekciju ruku radnika, pogotovo za vrijeme epidemija (Kelly, LaMont, 2010). Preporučeno je i smještati inficiranu osobu u posebnu sobu po mogućnosti sa sanitarnim čvorom, čistiti sobu razrijeđenim izbjeljivačem te izbjegavati mjerenje temperature rektalnim toplomjerom (Bartlett, 2006). U Europi je za održavanje higijene ruku preporučeno korištenje vode i sapuna, no korištenje preparata na bazi alkohola za dezinfekciju se ne smatra obveznim, s obzirom na to da su spore *C. difficile* otporne na

alkohol. Također je preporučeno i redovito pranje ruku od strane pacijenata, njihovih posjetitelja i radnika bolnice. (Desayes i sur. 2017).

4. ANTIBIOTICI

4.1. METRONIDAZOL I VANKOMICIN

Vrlo kratko nakon identifikacije *C. difficile*, pojavili su se antibiotici, metronidazol i vankomicin, kao efektivna terapija. Bez obzira na dramatično povećanje učestalosti ove infekcije u posljednjih desetak godina, ova dva antibiotika su i dalje vodeći u borbi protiv *C. difficile*. Do 2000. godine ovi antibiotici su bili vrlo efektivni u kontroli infekcije, no nakon 2000. zabilježeno je mnogo slučajeva u kojima metronidazol nije bio efektivan u liječenju. Važno je naglasiti da je kod pacijenata tretiranih vankomicinom dijareja trajala znatno kraće nego kod onih tretiranih metronidazolom, što dokazuje da je vankomicin trenutno nešto efektivniji u liječenju. Također, pacijenti s ozbiljnijom infekcijom su imali puno bolji odgovor na tretman s vankomicinom. To je razlog zašto je trenutno metronidazol antibiotik koji se prvenstveno koristi kod blažih infekcija da bi se izbjegla povećana rezistentnost bakterija na vankomicin, ali i zbog toga što je jeftiniji. Ukoliko pacijent ne podnosi dobro terapiju metronidazolom ili dođe do pogoršanja infekcije, svakako se preporuča terapija vankomicinom. Unatoč svojoj superiornosti nad metronidazolom, vankomicin najčešće nije pogodan za korištenje kod onih pacijenata kod kojih se infekcija izrazito brzo razvija. Značajke jače infekcije *C. difficile* su kolitis, leukocitoza, akutno zatajenje bubrega te hipotenzija. Takvi pacijenti su najčešće podvrgnuti kirurškim zahvatima koji im mogu spasiti život.

4.2. FIDAKSOMICIN

Fidaksomicin je antibiotik uskog spektra djelovanja protiv Gram-pozitivnih aerobnih i anaerobnih bakterija, uključujući i *C. difficile*. Fidaksomicin najviše djeluje lokalno, u crijevima, s obzirom da se vrlo malo apsorbira u drugim dijelovima organizma. Ovaj antibiotik djeluje baktericidno na način da inhibira sintezu bakterijske RNA.

Fidaksomicin sprječava nastajanje spora *C. difficile* u *in vitro* uvjetima. U studijama provedenim *in vitro,* fidaksomicin je protiv *C. difficile* bio efektivniji čak i od vankomicina. Također, provelo se i kliničko ispitivanje, kojim je dokazano da je poslije desetodnevne terapije odgovor na terapiju fidaksomicinom (200 mg dva puta dnevno) bio sličan terapiji sa vankomicinom (125 mg četiri puta dnevno). Isto tako, znatno manje pacijenata je imalo problem s vraćanjem ove infekcije nakon tretmana fidaksomicinom. Prijavljene nuspojave uglavnom su bile rijetke i slične onima sa oralnim vankomicinom. Dakle, ovi podaci pokazuju da se fidaksomicin dobro podnosi te da ne zaostaje za oralnim vankomicinom u liječenju blagih i umjerenih infekcija sa *C. difficile.* Uzimajući u obzir troškove liječenja, fidaksomicin je uglavnom ograničen na korištenje kod bolesnika sa početnim oblikom infekcije te kod onih koji imaju visoki rizik od ponavljanja infekcije (npr. starije osobe, osobe koje primaju istovremeno neku drugu antibiotsku terapiju), a koji su zaražene nehipervirulentnim sojem. Fidaksomicin se, također, koristi i kod bolesnika koji imaju ozbiljnu nepodnošljivost ili alergijsku reakciju na oralni vankomicin (Joksimović, Bastać 2013).

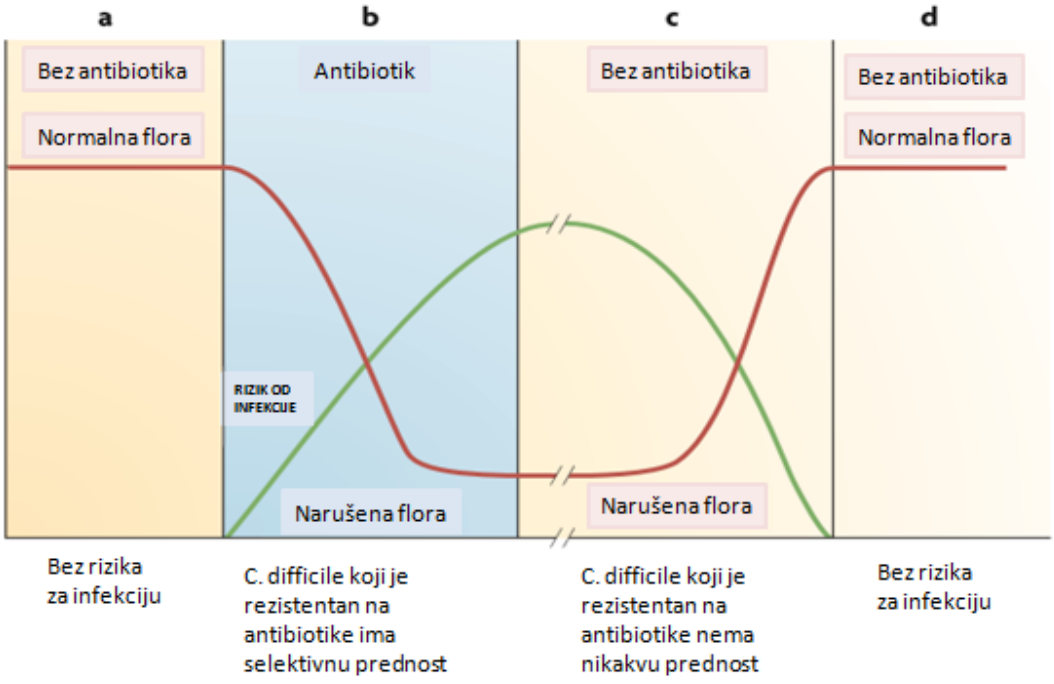
4.3. NOVI ANTIBIOTICI

Porast učestalosti i ozbiljnosti infekcija uzrokovanih *C. difficile* je potaknulo i ideju o razvoju novih antibiotika koji bi potpomogli u borbi protiv ovog patogena. Iako je vankomicin trenutno najpriznatija i najkorištenija terapija za infekciju, znanstvenici razmatraju i razne druge antimikrobne lijekove kao što su nitazoksanidi i rifaksimini. Također se proučava i djelovanje tolevamera, inertnog polimera velike molekularne težine, koji ima funkciju u vezanju A i B toksina. S obzirom da telovamer nema direktno antimikrobno djelovanje, on neće narušiti postojeću kolonizaciju bakterija u organizmu, pa će zbog toga pacijenti koji su imali pozitivan odgovor na liječenje telovamerom biti otporniji na ponavljanje infekcije, nego oni liječeni sa vankomicinom ili metronidazolom.

5. PONAVLJANJE INFEKCIJA

Ipak, i nakon uspješne terapije odgovarajućim antibioticima, nerijetko dolazi i do ponavljanja infekcije izazvane s *C. difficile*. Vjerojatnosti za vraćanje infekcije nakon

korištenja vankomicina i metronidazola su vrlo slične. Korištenje ovih antibiotika narušava otpor organizma prema ponovnoj kolonizaciji (slika 4) te olakšava nastanak nove infekcije koja se razvija u razdoblju od oko četiri tjedna nakon završetka terapije. I ponovljena infekcija se može ponovno tretirati istim antibioticima, s obzirom da nije zabilježen razvitak rezistencije *C. difficile* na vankomicin, dok je za metronidazol rezistencija vrlo rijetka. Ponavljanje infekcije je najčešće rezultat zaraze nekim drugim sojem *C. difficile*, ali ponekad i upornosti soja koji je izazvao i prethodnu infekciju.



Slika 4: Učinak antibiotika na normalnu crijevnu floru i rizik za infekciju sa *C. difficile.*

Pacijenti su rezistentni na infekciju sa *C. difficile* jer njihova crijevna flora nije narušena korištenjem antibiotika **(a)**. Nakon početka terapije antibioticima, postoji vjerojatnost za infekciju bakterijskim sojem otpornim na korišteni antibiotik, s obzirom na to da antibiotik narušava normalnu crijevnu mikrofloru **(b)**. Prestankom antibiotske terapije, količina antibiotika u crijevu je smanjena, ali je mikroflora crijeva i dalje narušena još neko vrijeme, ovisno o tome koji je antibiotik korišten **(c)**. U ovom periodu pacijent može biti inficiran sa *C. difficile*. Tek nakon određenog vremena, koje je potrebno da se crijevna mikroflora oporavi, osobi se vraća rezistentnost na kolonizaciju sa *C. difficile* **(d)**.

6. ULOGA IMUNOLOŠKOG SUSTAVA DOMAĆINA

S obzirom na saznanje da se infekcija sa *C. difficile* razvije samo kod polovine pacijenata koji su došli u dodir s bakterijom, došlo je do zaključka da je razvoj infekcije vjerojatno povezan i sa imunološkim sustavom osobe. Dok određeni broj ljudi obolijeva, neki mogu biti samo nositelji te se kod njih simptomi ne razvijaju. Dokazano je da je rizik od infekcije puno veći kod onih ljudi koji su infekciju već preboljeli, pa se tako nakon prve infekcije rizik za razvitak sljedeće povećava za 20%, a nakon razvitka druge infekcije rizik raste na oko 40%. Ako osoba preboli dvije infekcije, rizik za razvitak svih sljedećih infekcija je 60% i više. Takav razvoj situacije najprisutniji je kod osoba koje nemaju razvijen imunitet protiv ove bakterije, što ih čini znatno podložnijima infekcijama koje ona izaziva.

Kao odgovor organizma na infekciju *C. difficile* značajna je leukocitoza. Pojava leukocitoze u većem dijelu populacije može značiti da je osoba postala domaćin *C. difficile*, no kod određenog dijela populacije (oboljeli od raka koji su na kemoterapiji, primatelji transplantiranih hematopoetskih matičnih stanica) to nije tako. Takve osobe mogu imati nisku koncentraciju bijelih krvnih stanica što sprječava otkrivanje infekcije. Neutrofili su prve bijele krvne stanice koje su usmjerene ka crijevu nakon kolonizacije *C. difficile* te se zbog toga smatra da oni određuju težinu bolesti. U prisutnosti infekcije sa *C. difficile*, neutrofili bivaju aktivirani toksinom ove bakterije koji se veže na FPR-1 receptor (formyl peptide receptor-1) neutrofila i uzrokuju produkciju reaktivnih kisikovih molekula (ROS), a to je jedan od mehanizama kojim neutrofilni granulociti kontroliraju bakterijske infekcije. Zbog toga je *C. difficile* razvio mehanizam kojim se vrlo uspješno štiti od djelovanja takve reakcije organizma, tako što luči enzim glutamat dehidrogenazu. Taj enzim omogućuje bakteriji da izbjegne fagocitozu i neutrofilima inducirani oksidativni stres. Da bi neutrofili imali značajniju funkciju u borbi protiv *C. difficile*, njihov nastanak u organizmu mora biti dobro balansiran i kontroliran, jer jedino na taj način neće doći do oštećenja tkiva domaćina. Osim neutrofila, i eozinofili imaju bitnu ulogu u istraživanju ove infekcije, ali ne kao stanice sa antibakterijskom funkcijom protiv *C. difficile*. Za sada se proučava samo na koji je način snižena, normalna ili povišena koncentracija eozinofila povezana sa ozbiljnošću bolesti. Zbog toga je nedavno meta-analizom utvrđeno da bi se kod inficiranih pacijenata sa niskom koncentracijom eozinofila u krvi mogla pouzdano predvidjeti dugotrajna dijareja i smrt u prvih 12 dana terapije. Ulogu u odgovoru

organizma na infekciju imaju i B stanice limfocita. Čini se da su i one povezane sa ozbiljnošću infekcije, ali i mogućnosti njezinog vraćanja. Uloga T-stanica limfocita je manje jasna (Vargas i sur. 2017).

Kod osoba koje su samo asimptomatski prenositelji, nakon kolonizacije odgovor organizma zasniva se na povećanju IgG antitijela u serumu koja djeluju na toksin A. Povećanje IgG antitijela nije prisutno kod pacijenata koji obolijevaju od infekcije (slika 3). Prilikom početka infekcije, kod nekih pacijenata manifestira se i primarni imuni odgovor, koji se temelji na povećanom stvaranju IgM antitoksina A. To povećano stvaranje slijedi nakon povišenja koncentracije IgG antitoksina. U jednoj studiji je dokazano da oni pacijenti koji su na kraju antimikrobne terapije imali više IgG antitoksina u tijelu imaju manju mogućnost za ponovni razvoj infekcije od onih kod kojih je ta vrijednost bila niža.
Stoga, uzevši u obzir dosadašnja istraživanja, svakako se može reći da je diferencijalna krvna slika jedan od načina na koji se može utvrditi ozbiljnost infekcije sa *C. difficile* i isto tako dobiti sliku o reakciji imunološkog sustava domaćina na infekciju.

7. PROBIOTICI I PREBIOTICI

U tijelu i na tijelu čovjeka prisutni su brojni mikroorganizmi koji su dio normalne mikroflore i neophodni su za dobrobit svih viših organizama. Takvi mikroorganizmi se nazivaju mikrobnim ekosustavom čovjeka ili humanim mikrobiomom. Humani mikrobiom čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta koje koloniziraju u i na čovjeku s funkcijom zaštite od različitih patogena koji mogu imati negativan utjecaj na domaćina. Osim toga, mikroorganizmi normalne mikroflore u crijevu su i aktivni sudionici u probavi hrane i proizvodnji esencijalnih hranjivih tvari (Madigan i sur. 2015). Primarni sastav crijevne mikroflore svakog čovjeka određen je njegovim rođenjem, okruženjem i prehranom, stoga je za svakog od nas jedinstven (web 2).

S obzirom da nam je poznata važnost i pozitivan učinak normalne mikroflore organizma, nastojali smo taj učinak unaprijediti mijenjanjem, pojačavanjem i reguliranjem razvoja bakterija normalne mikroflore. Konzumiranje odabranih mikroorganizama može se koristiti za promjenu ili ponovnu uspostavu normalne gastrointestinalne mikroflore u svrhu poboljšanja zdravstvenog stanja, posebice kod osoba kojima je flora narušena lošom prehranom, operativnim zahvatom ili nekim od medicinskih tretmana (npr. lijekovi).

Proces rekonstruiranja mikroflore temelji se na oralnom uzimanju mikroorganizama koji se koriste u tu svrhu i nazivaju probioticima. Probiotici su zapravo suspenzije živih mikroorganizama (najčešće rodova *Saccharomyces, Lactobacillus, Bacillus i Propionibacterium*) koji se, ako ih se uzima u odgovarajućim količinama, smatraju povoljnima za organizam. Hrana koja je poznata kao dobar izvor probiotika je kiseli kupus (web 1). Nekoliko istraživanja uvjerljivo pokazuju da primjena probiotika ima dugotrajan i pozitivan učinak na zdravlje, no važno je naglasiti da probiotik nije lijek. Danas se tretmani probioticima preporučuju nakon uzimanja antibiotika, da bi se normalna mikroflora brže obnovila i da bi se prevenirala kolonizacija patogenih bakterija. To je i osnovni razlog zašto se uporaba probiotika ističe kada govorimo o *Clostridium difficile*, s obzirom da liječenje infekcije izazvane tom bakterijom zahtjeva uzimanje antibiotika. Takva terapija znatno narušava normalnu mikrofloru što omogućuje kolonizaciju patogenog *C. difficile*. Kvasci iz roda *Saccharomyces* mogu skratiti trajanje infekcije ovom bakterijom i do dva dana te smanjiti mogućnost za ponovno pojavljivanje proljeva. Uzimanje probiotika bi trebalo biti kontinuirano i redovito da bi se crijevna flora u potpunosti oporavila, a ako je uzimanje zaustavljeno flora se može vratiti u prvobitno stanje, što indicira na kratkoročno djelovanje probiotika (Madigan i sur. 2015).

Uz probiotike, važni su nam i prebiotici, koji u organizmu imaju potpuno različitu ulogu od probiotika. Prebiotici su poznati još i kao hrana za bakterije normalne flore, odnosno hrana za probiotike. Bez obzira što je uloga probiotika i prebiotika različita, njihova važnost za čovjekovo zdravlje je podjednaka. Prebiotici su spojevi (oligosaharidi) koje pronalazimo u sastavu ugljikohidrata, a hranom koja sadržava puno prebiotika smatra se grah, grašak, mahune, banane, bobičasto voće, zobene pahuljice i brojne druge namirnice. Točnije, prebiotici su vrsta vlakana koje čovjek ne može probaviti jer nema potrebne enzime za njihovu razgradnju, ali ih dobro probavljaju bakterije unutar probavnog sustava. Kada se uravnoteži unos probiotika i prebiotika dobije se optimalna razina „dobrih“ bakterija, što ima pozitivan utjecaj na probavni i imunološki sustav, a samim time i na cjelokupno zdravlje organizma (web 1).

8. DIJAGNOSTICIRANJE

Uspješnost liječenja infekcije izazvane *C. difficile* znatno ovisi i o dijagnosticiranju, odnosno otkrivanju prisutnosti ove bakterije u organizmu. Najčešće se primjenjuje citotoksin test koji se temelji na otkrivanju stanične citotoksičnosti za toksin B (poznat još i kao tdcB), a kod nekih sojeva i za otkrivanje toksina A. Da bismo dokazali prisustvo toksina citotoksin testom, koriste se specifična antitijela za bakterijski toksin koja neutraliziraju njegovo djelovanje. Također su dostupni i komercijalni kitovi za dokazivanje toksina. Najčešće se koriste imunoenzimski i membranski testovi. Prilikom dijagnosticiranja postoji i mogućnost dobivanja lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata što može dovesti do problema u liječenju. Ukoliko se dobiju lažno pozitivni rezultati dolazi do bespotrebnog liječenja no, ukoliko su rezultati lažno negativni, dolazi do odgode terapije i povećan je rizik od razvoja teže infekcije (Rupnik i sur. 2000).

9. IMUNOTERAPIJA

Kako bi se na neki način pomoglo osobama kod kojih imunološki sustav ne stvara imuni odgovor na *C. difficile,* došlo je do razvoj imunoterapije. Ona se temelji na pasivnoj ili aktivnoj imunizaciji protiv toksina *C. difficile* i koristi se za one osobe kod kojih dolazi do ponavljanja infekcije. Više od polovice odraslih ljudi u organizmu imaju antitijela protiv *C. difficile* i njihova funkcija se bazira na neutralizaciji toksina A i B koje stvara ova bakterija. Oni ljudi koji ta antitijela nemaju podložni su ponavljanju infekcije pa im se stoga intravenozno daju imunoglobulini (pasivan način imunizacije). Nakon te terapije zabilježeni su pozitivni rezultati iako još uvijek nije provedena niti jedna klinička studija, odnosno nije bilo kontroliranih ispitivanja. Terapija imunoglobulinima je bila manje djelotvorna kod onih pacijenata sa težim oblicima infekcije, koji nisu odgovorili ni na standardu antibiotsku terapiju. Kod takvih osoba najčešće se vršila kolektomija, odnosno uklanjanje jednog dijela debelog crijeva.

Također prisutno je i cjepivo koje omogućuje aktivan način imunizacije. Cjepivo sadržava toksoide toksina A i B i trenutno je testirano samo na zdravim osobama koje su pristale isprobati cjepivo. Nisu zabilježene nikakve nuspojave prilikom korištenja cjepiva.

Za sada je imunoterapija još uvijek u razvoju, no rezultati dobiveni određenim testiranjima su obećavajući. Da bi se ovi postupci imunizacije mogli značajnije koristiti svakako je potrebno provesti još kontroliranih istraživanja koja bi utvrdila efikasnost imunoterapije.

10. *C. difficile* KOD ŽIVOTINJA

Kada govorimo o *C. difficile*, najviše se baziramo na njegovu prisutnost u ljudskom organizmu, te se bavimo problemima koje on izaziva u čovjeka. No, važno je spomenuti da je ova bakterija prisutna i u životinjskim organizmima. *C. difficile* je poznati patogen konja, prasadi i teladi, ali i brojnih drugih domaćih ili divljih životinja (zečevi, mačke, psi, nojevi). Kao i kod nekih ljudi, obolijevanje životinja je povezano sa smanjenom otpornošću organizma uzrokovanu korištenjem antibiotika te u nekim slučajevima, malom starosti životinje. Iz životinjskih organizama je izolirano oko 30-50 različitih PCR ribotipova ove bakterije, što je znatno manje u odnosu na 190 ribotipova izoliranih iz čovjeka. Neki ribotipovi su jednaki i kod ljudi i kod životinja, ali puno je veći broj onih koji se razlikuju. Također, neki od njih su značajnije istraženi jer češće uzrokuju infekcije (Rupnik i sur. 2000).

S obzirom na to da je *C. difficile* izoliran iz domaćih životinja, postojala je pretpostavka da bi se ta bakterija mogla prenositi sa životinje na čovjeka, odnosno da bi životinja mogla biti rezervoar za bakterijski soj opasan za ljude. Godine 1993. O'Neill i njegovi suradnici su proveli istraživanje u kojem je utvrđeno da nema korelacije između sojeva izoliranih iz psa i sojeva izoliranih iz čovjeka. No, oni ipak nisu bili u potpunosti sigurni da ne postoji mogućnost prijenosa sojeva bakterije sa domaće životinje na čovjeka. Takvu opreznost u zaključivanju utemeljili su na činjenici da na području SAD-a u kućanstvima ima 132 milijuna pasa i mačaka, te se uzgaja više od pet milijuna konja, a s obzirom da su te životinje u svakodnevnom kontaktu sa svojim vlasnicima potencijal za prijenos *C. difficile* je vrlo velik (Arroyo i sur. 2015). Zbog toga se proveo veliki broj studija kojima je glavni cilj bio utvrditi mogu li ljudi doista biti ugroženi bakterijom *C. difficile* prisutnoj u životinjama. Prema (Keel i sur. 2007) jedna takva studija provedena u SAD-u je uključivala 232 izolata *C. difficile* iz kojih je izdvojeno devetnaest različitih bakterijskih ribotipova. Izolati iz goveda i svinja bili su mnogo sličniji međusobno u odnosu na one kod pasa, konja i ljudi. Tri različita ribotipa izolirana su iz teladi, dok su

četiri izolirana iz svinja. PCR ribotip 078 izoliran je iz goveda i činio je 94% od ukupnog broja ribotipova te životinje, a 83% od ukupnog broja ribotipova u svinja. Ovaj ribotip nije bio prisutan kod pasa, kod konja je činio 5% od ukupnog broja ribotipova, a kod čovjeka 4,4%. Kod pasa je najzastupljeniji bio ribotip 010 (čak 42%), dok je kod konja ribotip 015 bio zastupljen 30%. U ljudima je pronađeno 12 ribotipova, a najčešći je bio 020. Najveći postotak preklapanja u ribotipovima životinje i čovjeka prisutan je između čovjeka i konja. Važno je naglasiti i da četiri od dvanaest ribotipova prisutnih u čovjeku nije zabilježeno niti u jednoj od analiziranih životinja. U istoj studiji je dokazana prisutnost ribotipa 078 u svinja i u teladi koji nisu bili u izravnom međusobnom kontaktu, niti su imale kontakt sa drugim životinjama. Jedini zajednički faktor za obje vrste bio je čovjek koji je brinuo za životinje tijekom studije. S obzirom da je od ukupnih 12 izoliranih ribotipova iz čovjeka bio i 078, može se smatrati da je čovjek bio važan u prijenosu tog ribotipa među životinjama u ovoj studiji. U drugoj studiji, koju su proveli (Debast i sur. 2009) na dvije farme svinja, dokazano je da je PCR ribotip 078 bio prisutan u životinja sa dijarejom. Ribotip identičan tome izoliran je i iz svinja u Nizozemskoj, gdje je uzrokovao smrt ljudi, odnosno pacijenata nizozemske bolnice, što je potaklo ideju o tome da se sojevi *Clostridium difficile* s tim ribotipom mogu prenositi između životinja i ljudi. No, da bi se ova ideja potvrdila potrebno je provesti značajan broj istraživanja, jer se ne može sa sigurnošću tvrditi da su životinje bile prijenosnici infektivnog soja, s obzirom da nitko od radnika na farmi sa inficiranim svinjama i članova obitelji vlasnika farme nije bio inficiran niti je pokazivao bilo kakve simptome. Također je važno naglasiti i da uz brojne studije provedene u Americi, postoji i studija provedena u Europi, točnije u Sloveniji gdje je otkrivena prisutnost ribotipa 078. To je prva zabilježena pojava ovoga ribotipa na našem kontinentu. Dakle, prema dosadašnjim istraživanjima može se reći da postoji mogućnost prijenosa infektivnih bakterijskih sojeva sa životinje na čovjeka i obratno, no trenutno se provode istraživanja koja će u budućnosti to moći potvrditi sa puno većom sigurnošću.

11. ZAKLJUČAK:

Bakterija *Clostridium difficile* je anaerobni, štapićasti, sporulirajući patogen. Ova bakterija ima veliki broj sojeva od kojih su značajnije istraženi samo oni koji se najčešće pojavljuju i koji izazivaju najveći broj infekcija, kako kod ljudi tako i kod životinja. Najpoznatiji soj uzročnik infekcija kod ljudi je NAP-1/027, ali se još ističe i soj 078 pronađen u životinjskom mesu. Ova bakterija proizvodi toksine A i B, binarni toksin, a otporna je i na fluorokinolon, antibiotik širokog spektra djelovanja. To sve utječe na njezinu infektivnost. *C. difficile* je čest uzročnik infekcija u probavnom sustavu, najviše lokaliziranih u području debelog crijeva. S obzirom da se većina pacijenata zarazi u bolničkim uvjetima, smatra se da su radnici u bolnici najzaslužniji za tako značajno širenje ove bakterije, posebice u posljednjih dvadesetak godina. Zato su preporučene brojne mjere predostrožnosti, od kojih je glavna, a ujedno i najjednostavnija, obvezno i često pranje ruku. Za pacijente koji su već inficirani postoji terapija antibioticima, od kojih se ističe vankomicin za teže, te metronidazol za blaže infekcije. Oba su se pokazala kao vrlo uspješna terapija. Nakon uzimanja antibiotika preporuča se uzimanje probiotika u svrhu bržeg i lakšeg obnavljanja normalne crijevne flore. Uz pravilno liječenje i tretiranje inficiranih pacijenata oporavak može biti potpun, a smrtnost je mala. Isto tako, s obzirom da se ova bakterija sve više istražuje i da su sve poznatiji načini njezina širenja te načini za sprječavanje infekcija, velika je mogućnost da će u budućnosti problemi s ovom bakterijom biti svedeni na minimum.

12. LITERATURA

Znanstveni radovi:

Arroyo, L. G., Kruth, S. A., Willey, B. M., Staempfli, H. R., Low, D. E., & Weese, J. S. (2005). PCR ribotyping of Clostridium difficile isolates originating from human and animal sources. *Journal of medical microbiology*, *54*(2), 163-166.

Bartlett, John G. "Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile–associated enteric disease." *Annals of internal medicine* 145.10 (2006): 758-764.

Debast, S. B., Van Leengoed, L. A., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E. J., & Bergwerff, A. A. (2009). Clostridium difficile PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental microbiology*, *11*(2), 505-511.

Joksimović, Zoran, and Dušan Bastać. "Clostridium difficile infection: Overview of recent findings." *Timočki medicinski glasnik* 38.1 (2013): 50-60.

Jullian-Desayes, I., Landelle, C., Mallaret, M. R., Brun-Buisson, C., & Barbut, F. (2017). Clostridium difficile contamination of health care workers' hands and its potential contribution to the spread of infection: Review of the literature. *American journal of infection control*, *45*(1), 51-58.

Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S., & Songer, J. G. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among Clostridium difficile isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of clinical microbiology*, *45*(6), 1963-1964.

Kelly, Ciarán P., and J. Thomas LaMont. "Clostridium difficile—more difficult than ever." *New England Journal of Medicine* 359.18 (2008): 1932-1940.

Rupnik, Maja, Mark H. Wilcox, and Dale N. Gerding. "Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis." *Nature Reviews Microbiology* 7.7 (2009): 526-536.

Vargas, Edwin, Senu Apewokin, and Rajat Madan. "Role of the leukocyte response in normal and immunocompromised host after Clostridium difficile infection." *Anaerobe* (2017).

Knjiga:

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. 2015. Brock Biology of Microorganisms, 14th edition. Prentice Hall, New Jersey, USA. International Edition

Web izvori:

Web 1: http://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/probiotici-i-prebiotici-u-cemu-je-razlika/?refresh=true

Web 2: http://ordinacija.vecernji.hr/zdravi-tanjur/kolumna/probiotici-i-zdravlje/