

Genotipizacija toksigenih sojeva *Clostridium difficile*

Genotyping of toxigenic strains of *Clostridium difficile*

Tanja Petrović*, Sanja Jakovac

Sažetak. Cilj: Cilj rada je molekularna analiza radi utvrđivanja genotipova toksigenih sojeva *C. difficile*. **Ispitanici i metode:** Istraživanje je provedeno na uzorcima stolice bolničkih pacijenata Sveučilišne kliničke bolnice Mostar. U stolicama je ELFA tehnikom (engl. *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) dokazana produkcija A i B toksina. Izolirana *C. difficile* umnožena je PCR reakcijom (engl. *polymerase chain reaction*), a hibridizacijskom metodom detektirani su: *C. difficile* specifični gen (*tpi*), geni za produkciju A i B (*tcdA*, *tcdB*) te binarnog toksina (*cdtA* i *cdtB*), delecija u *tcdC* genu na pozicijama 18 bp, 39 bp i 117 bp i dvije različite mutacije u *gyrA* genu. **Rezultati:** U svih ispitivanih sojeva *C. difficile* prisutni su geni za toksin A i B (*tcdA/tcdB*). Zastupljenosti mutacije gena za rezistenciju na moksifloksacin (*gyrA*) u ispitivanih sojeva *C. difficile* dokazana je u 96,66 % sojeva *C. difficile*. U istih je sojeva dokazana i produkcija binarnog toksina, čime je potvrđeno da ti sojevi pripadaju hipervirulentnom ribotipu 027. **Zaključci:** Među toksigenim sojevima *C. difficile* u Sveučilišnoj bolnici Mostar dominantan je moksifloksacin rezistentni, hipervirulentni ribotip 027.

Ključne riječi: *Clostridium difficile*; genotip; hipervirulentni ribotip

Abstract. Aim: The aim of this paper was the molecular analysis of toxigenic strains of *C. difficile* to determine the distribution of different genotypes. **Subjects and methods:** The study was performed on stools samples from patients hospitalized in the University Clinical Hospital Mostar. Production of toxins A and B was detected by ELFA technique in all clinical samples. Isolated *C. difficile* DNA was amplified by PCR reaction. Hybridization method was used for determination of: *C. difficile* specific gene (*tpi*), genes responsible for production of toxins A and B (*tcdA*, *tcdB*) and binary toxins (*cdtA*, *cdtB*), deletions in *tcdC* gene at positions 18 bp, 39 bp and 117 bp, and two different mutations in the *gyrA* gene. **Results:** In all of the strains *C. difficile*, the toxin A and B genes (*tcdA*, *tcdB*) were present. Presence of the mutation in the gene for moxifloxacin (*gyrA*) resistance was demonstrated in 96.66 % *C. difficile* strains. The same strains have also been shown to produce binary toxins, confirming that these strains belong to the hypervirulent ribotype 027. **Conclusions:** This study has shown that in the University Clinical Hospital Mostar among toxigenic strains of *C. difficile* the predominant genotype was moxifloxacin-resistant, hypervirulent ribotype 027.

Key words: *Clostridium difficile*; genotype; hypervirulent ribotype

Zavod za mikrobiologiju i molekularnu dijagnostiku, Sveučilišna klinička bolnica Mostar, Bosna i Hercegovina

***Dopisni autor:**

Mr. sc. Tanja Petrović, dr. med.,
spec. med. mikrobiologije i parazitologije
Zavod za mikrobiologiju i molekularnu
dijagnostiku
Sveučilišna klinička bolnica Mostar
Bijeli brijeg, Mostar, BiH
e-mail: tnjptrvc@yahoo.co.uk

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Pojava i masovna uporaba antibiotika širokog spektra doveli su i do porasta incidencije njihovih neželjenih efekata. Još 1940-ih godina opisana je klinička slika proljeva povezanog s uporabom antibiotika, no tek je prije četrdesetak godina dokazano da je uzročnik tog sindroma zapravo bakterija *Clostridioides (Clostridium) difficile (C. difficile)*. Danas je poznato da se infekcija uzrokovana bakterijom *C. difficile* (engl. *C. difficile* infec-

Kod kliničke sumnje na infekciju *Clostridium difficile* treba provesti mikrobiološku dijagnostiku bez obzira na dob pacijenta, prijašnju uporabu antibiotika, komorbiditet i početak dijareje. Nakon liječenja i prestanka simptoma nije potrebno ponavljati testiranje („test liječenja“). U slučajevima sumnje na rekurentnu *C. difficile* infekciju ponoviti testiranje i isključiti druge moguće uzroke.

tion, CDI) može prezentirati različito teškim kliničkim slikama, od blagog, samolimitirajućeg proljeva, do teškog pseudomembranoznog kolitisa i megakolona koji mogu završiti i smrtnim ishodom.

C. difficile je anaerobna, gram-pozitivna, sporogena bakterija široko rasprostranjena u prirodi, tlu, vodama i probavnom sustavu životinja, zdrave djece i odraslih ljudi. Spore ove bakterijske vrste mogu se naći na različitim površinama i predmetima koji se koriste u svakodnevnom životu i radu, izrazito su otporne na različite fizikalne čimbenike (temperaturu, isušivanje, kemijska sredstva) te mogu opstati mjesecima, pa čak i godinama. Sojevi koji uzrokuju epidemije imaju znatno veću sposobnost sporulacije i mogu preživjeti procese dezinfekcije, zbog čega je danas *C. difficile* jedan od vodećih uzročnika infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi¹.

Glavni čimbenici virulencije ove bakterije jesu brojni enzimi i egzotoksini koji djeluju na enterocite, podražuju neurone koji inerviraju crijevo te potiču snažnu upalnu reakciju². *C. difficile* proizvodi toksin A (*tcdA*) s lokalnim, enterotoksičnim učinkom i toksin B (*tcdB*), citotoksin sa sustavnim učinkom³. Većina toksigenih sojeva *C. difficile*

proizvode oba toksina (A+B+), međutim, ustanovljeno je da neki patogeni sojevi mogu producirati samo toksin B (A-B+)⁴. Od 1987. godine dokazano je da određeni sojevi produciraju i treći, binarni toksin (engl. *Clostridium difficile* transferase, CDT) čija uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena⁵. Ipak, dokazano je da CDT potencira učinak toksina A i B te utječe na imunološku reakciju domaćina, pa su takvi sojevi odgovorni za teže kliničke slike i češće rekurencije⁶. Geni koji kodiraju enterotoksin A i citotoksin B (*tcdA* i *tcdB*), zajedno s negativnim (*tcdC*) i pozitivnim (*tcdD*) regulatorima njihove ekspresije te genom *tcdE* značajnim za oslobađanje toksina iz stanice nalaze se unutar patogenskog lokusa (PaLoc), dok su dva gena koji kodiraju aktivnu (*cdtA*) i podjedinicu odgovornu za vezanje (*cdtB*) binarnog toksina smještena na nepoznatoj udaljenosti izvan PaLoc-a (slika 1)⁷. Ustanovljeno je da promjene u represornom *tcdC* genu dovode do gubitka njegove funkcije, odnosno nemogućnosti inhibicije transkripcije proteina odgovornih za stvaranje toksina A i B. Zbog ove promjene, ovakvi, tzv. hipervirulentni sojevi *C. difficile* stvaraju šesnaest puta više razine toksina A i dvadeset i tri puta više razine toksina B.

U 2005. godini provedeno je presječno istraživanje kojim je obuhvaćeno 38 bolnica u 14 europskih zemalja te je, molekularnim postupcima, u Irskoj, Nizozemskoj i Belgiji, detektiran novi hipervirulentni ribotip *C. difficile* (BI/NAP1/027 – restriction endonuclease analysis group, BI/North American pulsed-field gel electrophoresis type 1, NAP1/Polymerase chain reaction ribotype 027). Kroz sljedeće tri godine ribotip 027 proširio se u najmanje 16 europskih država, dok se u SAD-u smatra jednim od najčešće potvrđenih izolata. Danas je ovaj hipervirulentni soj globalno rasprostranjen i odgovoran za izbijanje bolničkih epidemija s težom kliničkom slikom bolesti širom svijeta^{8,9}.

U mikrobiološkim laboratorijima za identifikaciju *C. difficile* koriste se testovi koji se temelje na kultivaciji i izolaciji toksigene bakterije te dokazivanju toksina i strukturnih dijelova bakterije¹⁰. Kultivacija je složen proces koji zahtijeva korištenje specifičnih selektivnih hranilišta i anaerobnih uvjeta inkubacije. Najveći nedostatak ove meto-

de je vrijeme potrebno do dobivanja rezultata i niska osjetljivost zbog nemogućnosti razlikovanja toksigenih od netoksigenih sojeva. Za to je potreban neki od postupaka za dokaz toksina, kao npr. test neutralizacije citotoksina u staničnoj kulturi koji je vremenski i laboratorijski zahtjevan ili reakcija lančane polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) za dokaz *tcdC* gena nakon ekstrakcije nukleinske kiseline¹¹. U rutinskom mikrobiološkom radu sve se češće koriste imunoenzimski testovi (engl. *Enzyme immunoassay*, EIA) koji se izvode izravno iz uzorka stolice. Glutamat dehidrogenaza (GDH) predstavlja antigen staničnog zida *C. difficile* te se često koristi kao probirni test za dokaz prisutnosti bakterije u uzorku. S obzirom na to da i neke druge bakterije mogu posjedovati GDH, test ima nisku specifičnost. Ipak, negativna prediktivna vrijednost testa iznosi 98 do 100 %, što znači da negativan test s velikom sigurnošću isključuje CDI. Imunoenzimski testovi za dokaz toksina A i/ili B iz uzorka stolice su visokospecifični, ali su ograničeni niskom osjetljivošću (75 – 80 %), što znači da do 30 % uzoraka može biti lažno negativno. Dodatno ovim se testovima ne može otkriti luči li se i binarni toksin, odnosno pripada li soj hipervirulentom ribotipu. Visokospecifična i osjetljiva PCR reakcija također se može izvoditi izravno iz uzorka stolice. Ciljani geni su *tcdA* i *tcdB* koji su odgovorni za stvaranje toksina A i B, te *tcdC* koji negativno regulira njihovu produkciju. Naravno, postupak zahtijeva posebnu tehničku opremljenost i visoke troškove, a pri tome, laboratorijski, nije moguće razlikovati asimptomatske kliconoše od pacijenata sa simptomatskom infekcijom.

Stavovi o optimalnom dijagnostičkom algoritmu s obzirom na senzitivnost i cijenu testova još su uvijek oprečni. Koncept najčešće primjenjivanog dijagnostičkog algoritma za dokazivanje CDI-ja podrazumijeva probir detekcijom GDH imunoenzimskim testom, a potom testiranje GDH pozitivnih uzoraka PCR metodom. Između dva spomenuta testa može se dodati i EIA test za produkciju toksina A i B iz uzorka, pa se PCR test provodi samo iz GDH pozitivnih, toksin A/B negativnih uzoraka¹².

S obzirom na to da smo uočili porast CDI-ja u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici (SKB) Mostar, svrha ovog

istraživanja bila je identificirati *C. difficile* iz uzorka stolice i utvrditi zastupljenost virulentnih i hipervirulentnih sojeva, uključujući ribotip 027. Brza i točna dijagnostika preduvjet je adekvatnog liječenja, a poznavanje epidemiološke situacije u zdravstvenoj ustanovi svakako pridonosi unaprijeđenju postupaka za praćenje i suzbijanje bolničkih infekcija.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Zavodu za mikrobiologiju i molekularnu dijagnostiku Sveučilišne kliničke bolnice (SKB) Mostar u razdoblju od 1. lipnja do 1. prosinca 2012., u okviru rutinske laboratorijske dijagnostike s ciljem prikupljanja najmanje 60 uzoraka s toksigenim sojevima *C. difficile*. Uključeni su samo odrasli (starosti od 18 godina nadalje), hospitalizirani pacijenti u kojih je postavljena klinička sumnja na CDI. Istraživanje je provedeno uz dozvolu Povjerenstva za etička pitanja SKB Mostar, a rezultati su neobjavljeni dio znanstvenog magistarskog rada prve autorice.

Imunoenzimski postupak

Svi uzorci stolice obrađeni su prema rutinskom protokolu kvalitativnim imunoenzimskim testom s fluorescentnom detekcijom (engl. *Enzyme Linked Fluorescent Assay*, ELFA), koristeći testove za istovremenu detekciju toksina A i B izravno iz fecesa (CDAB test, bioMerieux, Marcy L'Etoile, Francuska). Radi se o automatiziranom postupku provedenom na miniVIDAS instrumentu (bioMerieux, Marcy L'Etoile, Francuska) prema preporuci proizvođača. Testne vrijednosti kontrola, kao i kvalitativni rezultati (pozitivno, negativno ili granično) dobivene su na kraju obrade za svaki pojedini uzorak. Granica detekcije za toksin A iznosi > 7.73 ng/ml, a za toksin B > 4.55 ng/ml. Uzorci u kojima su detektirani toksin A i/ili B pohranjeni su u ledenici na -20 °C, radi daljnje obrade.

Molekularna dijagnostika

Uzorci stolice u kojima je prethodno dokazana prisutnost toksina *C. difficile* dalje su testirani molekularnim testom GenoType CDiff (Hain Lifescience, Nehren, Njemačka) kojim se, osim identifikacije uzročnika, dokazuju toksini A i B, binarni

toksin i rezistencija na moksifloksacin čime se razlikuju nepatogeni, virulentni i hipervirulentni ribotipovi 078, 126 i 027. Ovim testom detektiraju se za *C. difficile*-specifični gen (*tpi*), svi poznati geni vezani za produkciju toksina (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* i *cdtB*), tri prethodno opisane delecije u *tcdC* genu na pozicijama 18 bp, 39 bp i 117 bp te dvije različite mutacije u *gyrA* genu koje su povezane s rezistencijom prema moksifloksacinu. Svi postupci izvedeni su prema preporuci proizvođača. Ukratko, ukupni fekalni genomski DNK ekstrahiran je iz svakog uzorka pomoću odgovarajućih reagencija (GXT Stool Extraction kit, Hain Lifesciences, Nehren, Njemačka). Ekstrahirani genomski DNK korišten je kao kalup u PCR reakciji, a produkti amplifikacije su hibridizirani na testnim trakicama. Tijekom hibridizacije, jednolančani amplikon veže se specifično za analogne probe, dok se nespecifično vezani amplikoni otklone ispiranjem. Specifično vezani amplikoni, obilježeni alkalnom fosfatazom, postaju vidljivi u kolorimetrijskoj re-

akciji detekcije. Na taj se način na trakici razvijaju specifične pruge (bendovi).

Po završetku reakcije rezultati su interpretirani kao nepatogeni, moksifloksacin osjetljivi soj; virulentni moksifloksacin osjetljivi soj; virulentni, moksifloksacin rezistentni soj (ribotip 001, 042, 046, 070, 077, 081, 087); hipervirulentni, moksifloksacin osjetljivi soj (ribotip 078, 126); hipervirulentni, moksifloksacin rezistentni ribotip 027.

Statistika

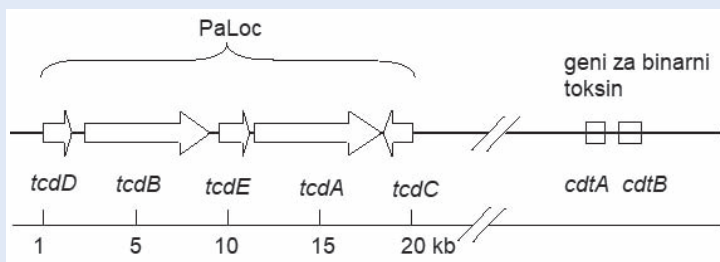
Za testiranje značajnosti razlike između sojeva koji pripadaju hipervirulentnom ribotipu 027 i virulentnim, moksifloksacin osjetljivim tipovima korišten je χ^2 test. Razina značajnosti bila je $p < 0,05$. Prilikom obrade korišten je statistički program SPSS (verzija 15), te Microsoft Excel 2007.

REZULTATI

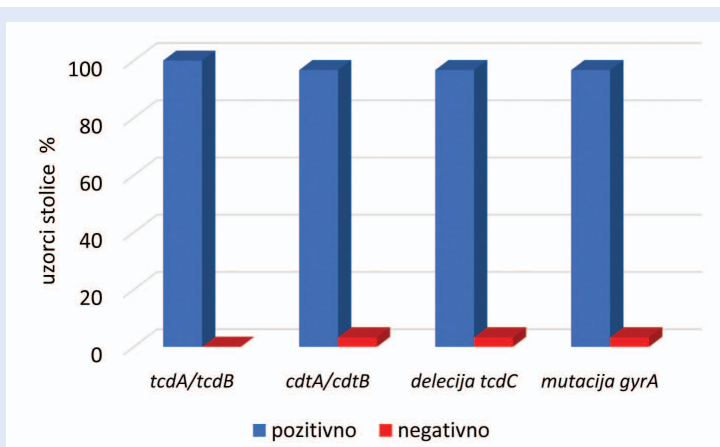
Tijekom šestmesečnog razdoblja prikupljeno je 60 uzoraka stolice odraslih pacijenata hospitaliziranih u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici Mostar, kod kojih je klinički postavljena sumnja na CDI. U stolicama svih 60 pacijenata EIA testom detektirana je prisutnost toksina A i toksina B te potvrđena dijagnoza CDI-ja. Uzorci su pohranjeni do provođenja molekularne dijagnostike. Molekularnom analizom u svim uzorcima detektiran je za vrstu specifični *tpi* gen, kao i prisutnost obaju gena, *tcdA* i *tcdB* (slika 2), čime je potvrđeno da se u svim uzorcima stolice nalazi *C. difficile* te da su svi sojevi toksigeni sa sposobnošću produkcije obaju toksina (A+B+ sojevi).

Geni, *cdtA* i *cdtB*, odgovorni za produkciju binarnog toksina, dokazani su u 58 od 60 (96,7 %) prikupljenih uzoraka. U istih 58 uzoraka dokazana je i delecija u regulatornom *tcdC* genu, kao i mutacija u *gyrA* genu, iz čega proizlazi da statistički značajan broj sojeva *C. difficile* ($p < 0,001$) pripada hipervirulentnom ribotipu 027 (slika 2).

U svega dva uzorka (3,3 %) izostala je prisutnost *cdtA* i *cdtB* gena, odnosno potvrđeno je da ti sojevi nemaju sposobnost stvaranja binarnog toksina. U istih sojeva nije detektirana delecija u *tcdC* genu, niti mutacija u *gyrA* genu (slika 2), te je potvrđeno da se radi o virulentnim, moksifloksacin osjetljivim sojevima.



Slika 1. Smještaj gena unutar patogenskog lokusa (PaLoc) u bakterije *Clostridium difficile* i odnos prema genima za binarni toksin (prilagođeno iz McDonald LC i sur., 2005)⁷



Slika 2. Genotipizacija *Clostridium difficile* sojeva

RASPRAVA

Dramatične promjene u epidemiologiji CDI-ja koje su se dogodile tijekom posljednjih desetak godina, s povećanjem učestalosti i težine kliničkog tijeka bolesti, učinile su CDI globalnim izazovom za javno zdravstvo^{13,14}. Pojava novog soja *C. difficile*, hipervirulentnog ribotipa 027, smatra se jednim od uzroka povećanja incidencije i češćih teških kliničkih oblika bolesti s recidivima, razvoja pseudomembranoznog i fulminantnog kolitisa te megakolona, zbog čega je CDI potencijalno smrtonosna bakterijska infekcija. Osim što proizvodi značajno više koncentracije toksina te stvara dodatni binarni toksin, ribotip 027 pokazuje visoku otpornosti na moksifloksacin zbog genske mutacije. Masivna uporaba fluorokinolona odgovorna je za pojavu rezistencije na ove antibiotike i razvoj novih svojstava, odnosno novih tipova *C. difficile*¹⁵. Ustanovljena je povezanost između prethodne uporabe bilo kojeg fluorokinolona i rezistencije na moksifloksacin u *C. difficile* te korelacija između konzumacije ciprofloksacina u ambulantnih pacijenata i povećane učestalosti CDI-ja u izvanbolničkoj populaciji^{16,17}. Iako nijedna studija nije dokazala da uporaba moksifloksacina podrazumijeva veći rizik za CDI od drugih uobičajenih antibiotika, zapaženo je da ograničenje uporabe ovog kinolonskog preparata dovodi do smanjenja broja CDI-ja^{18,19}. Iz navedenih razloga fluorokinolone treba propisivati restriktivno kada ne postoje druge mogućnosti liječenja.

Dijagnoza CDI-ja treba biti utemeljena na kombinaciji specifičnih simptoma (proljevi, groznica, grčevi u trbuhu, krv i/ili sluz u stolici) i laboratorijskih nalaza (povišena razina leukocita, dokaz uzročnika). Zbog različitosti simptoma i različito teške kliničke slike, smatra se da je gotovo dvije trećine slučajeva CDI-ja propušteno ili neprepoznato od strane kliničara te uopće nije traženo laboratorijsko testiranje, zbog čega je moguće da je incidencija CDI-ja podcijenjena^{20,21}. Dodatno, dijagnostika CDI-ja još uvijek predstavlja izazov za mikrobiološke laboratorije²². Svakako je rano i brzo otkrivanje samog mikroorganizma, odnosno prvenstveno njegovih toksina, od presudne važnosti jer omogućava raniji terapijski pristup koji može utjecati na smanjenje pobola, smrtnosti, širenja bakterije u zdravstvenim usta-

novama te medicinskog troška. No, još uvijek se raspravlja o tome koji od dva referentna testa treba smatrati *zlatnim standardom* u dijagnostici CDI-ja. Je li to dokaz stanične citotoksičnosti (engl. *Cell Cytotoxicity Neutralization Assay*, CCNA) ili dokaz toksina iz kulture (engl. *Toxigenic culture*, TC). CCNA test izvodi se tako da se filtrat uzorka stolice inokulira na osjetljivu kulturu stanica te prati pojava karakterističnog citopatičnog učinka koji se potvrđuje neutralizacijom pomoću za *C. difficile* toksin specifičnih protutijela. TC po-

U Sveučilišnoj kliničkoj bolnici Mostar dominira moksifloksacin rezistentni, hipervirulentni ribotip 027 *C. difficile*. Određivanje genotipova i poznavanje njihove distribucije na lokalnoj razini, odnosno u pojedinoj zdravstvenoj ustanovi, značajno je klinički i epidemiološki u smislu brzog početka liječenja i promptnog uvođenja mjera sprječavanja i suzbijanja širenja epidemije CDI-ja.

drazumijeva kultivaciju uzročnika iz uzorka stolice naciepljivanjem na specifična hranilišta, inkubacijom (do 5 dana) u anaerobnim uvjetima te identifikacijom vrste. Međutim, sama kultivacija nije dostatna jer ne razlikuje toksigene od netoksigenih sojeva. Stoga je nakon kultivacije potrebno potvrditi produkciju toksina na isti način kako je opisano za CCNA ili nekim drugim dostupnim, npr. EIA testovima^{23,24}. Unatoč visokoj osjetljivosti i specifičnosti, oba su testa laboratorijski i vremenski izuzetno zahtjevna, zbog čega su nepraktični za svakodnevnu mikrobiološku praksu²⁵. Srećom, danas se na tržištu nalaze brojni komercijalno dostupni EIA/ELFA testovi kojima se, brzo i tehnički relativno jednostavno, izravno u uzorku stolice mogu dokazati izlučeni toksini. U rutinskom radu našeg laboratorija ELFA je probirni test kojim smo dokazali prisutnost toksigenih sojeva *C. difficile*. U našem istraživanju svi prikupljeni izolati producirali su oba toksina (A+B+). Dugo se smatralo da svi toksigeni sojevi *C. difficile* proizvode oba toksina koji djeluju sinergistički, međutim, tijekom posljednjih desetak godina ustanovljeno je postojanje klinički značajnih sojeva koji izlučuju samo toksin B (A-B+)^{26,27}. Iako su EIA testovi za dokaz toksina *C. difficile* visokospe-

cifični, problem je njihova niska osjetljivost, iz čega slijedi da bi se isključivim korištenjem samo ovog testa neki slučajevi CDI-ja mogli propustiti. Primjena dijagnostičkog algoritma u dva koraka, u kojem se EIA test za detekciju bakterijskog GDH antigena koristi kao probirni, a EIA test za dokaz toksina provodi samo na GDH pozitivnim uzorcima, povećava osjetljivost dijagnostike CDI-ja. GDH test je visokoosjetljiv, ali ne i specifičan jer se radi o metaboličkom enzimu koji pretvara glutamat u α -ketoglutarat, te je uobičajeno prisutan u različitim eukariota i prokariota, uključujući i različite vrste klostridija. I dok je negativan GDH test visokopouzdan i prediktivan, pozitivni GDH test može dovesti do lažne dijagnoze CDI-ja u trećine ili četvrtine testiranih uzoraka^{28,29}. Upravo je stoga dijagnostički algoritam u tri koraka razumno rješenje. Prvi korak podrazumijeva detekciju GDH-a. Na svim GDH pozitivnim uzorcima provodi se EIA za detekciju toksina A i B. Ako se radi o GDH pozitivnim, toksin negativnim uzorcima, preporučuje se uključivanje trećeg koraka, odnosno molekularne dijagnostike za detekciju gena odgovornih za produkciju toksina. Molekularni postupci su visokoosjetljivi, ali manje specifični jer mogu detektirati kolonizaciju toksigenim sojem u osoba koje imaju proljev iz nekog drugog razloga. Stoga molekularne tehnike nisu odgovarajuće za razlikovanje pravog CDI-ja od asimptomatskog kliconoštva ili kolonizacije, no značajno pridonose dijagnostici u kombinaciji s EIA testovima za dokaz GDH i toksina A i B. Molekularnim testovima u našem smo istraživanju potvrdili prisutnost oba gena *tcdA* i *tcdB* u svih prikupljenih sojeva. Iznenadilo nas je da smo u većine izolata (96,7 %) dokazali prisutnost *cdtA/cdtB* gena odgovornog za produkciju binarnog toksina. Također smo u istih sojeva detektirali delecije u regulatornom *tcdC* genu, zbog čega takve mutante stvaraju povećane koncentracije toksina A i B²⁹. Dodatno, u istih smo sojeva potvrdili mutaciju *gyrA* gena koja je u *C. difficile* odgovorna za rezistenciju prema fluorokinolonima. Sve navedeno govori u prilog većinskoj zastupljenosti hipervirulentnog ribotipa 027 sa značajnim epidemijskim potencijalom. Iako i neki drugi ribotipovi mogu izazvati jednako teške kliničke slike i epidemijsko širenje, još uvijek je ribotip 027 najčešće odgovoran za bolničke

epidemije³⁰⁻³². Iako svrha ovog rada nije bila istraživanje epidemije, kao ni kliničke slike, liječenja i ishoda bolesti, već dijagnostika, odnosno genotipizacija, visoka prevalencija ribotipa 027 ukazuje na to da se 2012. u Sveučilišnoj bolnici u Mostaru radilo o epidemiji CDI-ja izazvanoj moksifloksacin rezistentnim, hipervirulentnim 027 ribotipom *C. difficile*.

ZAKLJUČAK

Ovo je istraživanje pokazalo da među toksigenim sojevima *C. difficile* prisutnim u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici Mostar dominira moksifloksacin rezistentni, hipervirulentni ribotip 027.

Određivanje genotipova i poznavanje njihove distribucije na lokalnoj razini, odnosno u pojedinoj zdravstvenoj ustanovi, značajno je klinički i epidemiološki u smislu brzog početka liječenja i promptnog uvođenja mjera sprječavanja i suzbijanja širenja epidemije CDI-ja.

Izjava o sukobu interesa: autorice izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Depestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract.* 2013;26:464-75.
2. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:723-50.
3. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes* 2014;5:579-93.
4. Carter GP, Rood JJ, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol.* 2012;20:21-9.
5. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 2014;5:15-27.
6. Cowardin CA, Buonomo EL, Saleh MM, Wilson MG, Burgess SL, Kuehne SA et al. The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. *Nat Microbiol* 2016;1:16108.
7. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;353:2433-41.
8. Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP. The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol* 2010;300:387-95.
9. O'Donoghue C, Kyne L. Update on *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:38-47.
10. Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can

- molecular amplification methods move us out of uncertainty? *J Mol Diagn* 2011;13:573-82.
11. Luk S, To WK, Ng TK, Hui WT, Lee WK, Lau F et al. A Cost-Effective Approach for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*: Toxigenic Culture Using ChromID *Clostridium difficile* Agar. *J Clin Microbiol* 2014;52:671-73.
 12. Crobach MJT, Baktash A, Duszko N, Kuijper EJ. Diagnostic Guidance for *C. difficile* Infections. *Adv Exp Med Biol* 2018;1050:27-44.
 13. Vindigni SM, Surawicz CM. *C. difficile* Infection: Changing Epidemiology and Management Paradigms. *Clin Transl Gastroenterol* 2015;6:e99.
 14. Depestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract* 2013;26:464-75.
 15. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3:23-42.
 16. Ackermann G, Tang-Feldman YJ, Schaumann R, Henderson JP, Rodloff AC, Silva J et al. Antecedent use of fluoroquinolones is associated with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:526-30.
 17. Borgmann S, Jakobiak T, Gruber H, Reil M, Schroder H, Kist M et al. Association of ciprofloxacin prescriptions to outpatients to *Clostridium difficile* infections. *Euro Surveill* 2010;15.
 18. Aldeyab MA, Kearney MP, Scott MG, Aldiab MA, Alahmadi YM, Darwish Elhajji FW et al. An evaluation of the impact of antibiotic stewardship on reducing the use of high-risk antibiotics and its effect on the incidence of *Clostridium difficile* infection in hospital settings. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2988-96.
 19. Wenisch JM, Equiluz-Bruck S, Fudel M, Reiter I, Schmid A, Singer E et al. Decreasing *Clostridium difficile* infections by an antimicrobial stewardship program that reduces moxifloxacin use. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:5079-83.
 20. Oake N, Taljaard M, van Walraven C, Wilson K, Roth V, Forster AJ. The effect of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection on in-hospital mortality. *Arch Intern Med* 2010;170:1804-10.
 21. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN et al. Treatment with Monoclonal Antibodies against *Clostridium difficile* Toxins. *N Engl J Med* 2010;362:197-205.
 22. Peng Z, Ling L, Stratton CW, Li C, Polage CR, Wu B et al. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:15.
 23. Pancholi P, Kelly C, Raczkowski M, Balada-Llasat JM. Detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of the cell culture neutralization, Xpert *C. difficile*, Xpert *C. difficile*/Epi, and Illumigene *C. difficile* assays. *J Clin Microbiol* 2012;50:1331-5.
 24. She RC, Durrant RJ, Petti CA. Evaluation of enzyme immunoassays to detect *Clostridium difficile* toxin from anaerobic stool culture. *Am J Clin Pathol* 2009;131:81-4.
 25. Kufelnicka AM, Kirn TJ. Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2011;52:1451-7.
 26. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis* 2007;11:5-10.
 27. King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. *Future Microbiol* 2015;10:1-4.
 28. Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, Xu ZP, Sun LY, Hou X et al. The Role of Glutamate Dehydrogenase (GDH) Testing Assay in the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections: A High Sensitive Screening Test and an Essential Step in the Proposed Laboratory Diagnosis Workflow for Developing Countries like China. *PLoS One* 2015;10:e0144604.
 29. Arimoto J, Horita N, Kato S, Fuyuki A, Higurashi T, Ohkubo H et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:29754.
 30. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005;366:1079-84.
 31. Birgand G, Blanckaert K, Carbonne A, Coignard B, Barbut F, Eckert C et al. Investigation of a large outbreak of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006-2007 and associated clusters in 2008-2009. *Euro Surveill* 2010;15.
 32. Oleastro M1, Coelho M, Gião M, Coutinho S, Mota S, Santos A et al. Outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027-the recent experience of a regional hospital. *BMC Infect Dis* 2014;14:209.