

# PRIMJENA MULTIPLEKS LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM ZA DOKAZIVANJE TCDA I TCDB GENA ZA TOKSINE BAKTERIJE CLOSTRIDIODES DIFFICILE U FECESU PASA

---

**Kamber, Magda**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:636900>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

MAGDA KAMBER

**PRIMJENA MULTIPLEKS LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM  
ZA DOKAZIVANJE *TCDA* I *TCDB* GENA ZA TOKSINE BAKTERIJE  
*CLOSTRIDIODES DIFFICILE* U FECESU PASA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
2. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof
3. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina
4. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina (zamjena)

## *Zahvale*

*Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Suzani Hadini, što me potaknula na odabir teme diplomskog rada te na prenesenom znanju i korisnim savjetima koji su uvelike pridonijeli njegovom ostvarenju. Hvala Vam za svaku smjernicu i uloženi trud za izradu ovog rada.*

*Također zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl. ing. mol. biol., na svemu što me naučila o molekularnoj dijagnostici i radu u laboratoriju, na strpljenju i uvijek pruženoj pomoći, zbog koje mi je rad u laboratoriju bio još ljepši.*

*Hvala svim djelatnicima Klinike za zarazne bolesti na predivne i poučne dvije godine volontiranja, a posebno asistentici Ivi Benvin, dr. med. vet., koja mi je nesebično prenosila znanje od samih početaka volontiranja i uvijek mi bila podrška. Hvala mojim curama na dežurstvima ispunjenima veseljem i dobrom voljom, u čijem su društvu noćne smjene i vikendi bili manje zahtjevni i teški.*

*Hvala mojim dragim kolegama koji su bili uz mene na ovom putu i bili mi veliki oslonac kroz sve uspone i padove tijekom studiranja, na svim lijepim i nezaboravnim trenucima kojih je bezbroj, s kojima sam stvorila prijateljstva za cijeli život.*

*Neizmjereno zahvaljujem svojoj obitelji i Maru na beskonačnoj potpori tijekom cijelog studiranja. Hvala vam na razumijevanju i pruženoj ljubavi, što ste uvijek vjerovali u mene i poticali me da svoje snove sprovedem u djela.*

*Ovaj rad posvećujem svom najvoljenijem nonu.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	2
2.1. Povijest .....	2
2.2. Etiologija .....	2
2.3. Epizootiologija.....	4
2.4. Patogeneza .....	5
2.5. Klinička slika .....	6
2.6. Patoanatomski i patohistološki nalaz.....	7
2.7. Dijagnostika.....	7
2.8. Diferencijalna dijagnostika.....	10
2.9. Liječenje .....	11
2.10. Profilaksa .....	12
2.11. Javno zdravstvo .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Uzorkovanje.....	15
3.2. Izdvajanje DNK iz fecesa pasa .....	16
3.3. Multipleks lančana reakcija polimerazom .....	17
3.4. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	20
3.4.1. Priprema TAE pufera .....	21
3.4.2. Priprema agaroznog gela.....	22
3.4.3. Nanošenje PCR proizvoda u gel i provođenje elektroforeze .....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Istraživana populacija pasa .....	23
4.2. Klinički znakovi bolesti probavnog sustava u istraživanoj populaciji pasa .....	27

4.3. Utvrđivanje prisutnosti <i>tpi</i> gena za bakteriju <i>C. difficile</i> i gena za toksine <i>tcdA</i> i <i>tcdB</i> metodom multipleks lančane reakcije polimerazom u istraživanoj populaciji pasa .....	28
4.4. Podaci o psima kod kojih je utvrđena prisutnost gena za različite sojeve bakterije <i>C. difficile</i> u fecesu.....	31
4.5. Klinički znakovi bolesti u pasa u kojih je utvrđena prisutnost toksogenih sojeva bakterije <i>C. difficile</i> (A+B-).....	32
5. RASPRAVA.....	34
6. ZAKLJUČCI.....	39
7. LITERATURA.....	40
8. SAŽETAK.....	50
9. SUMMARY .....	51
10. ŽIVOTOPIS .....	52

## POPIS I OBJAŠNJENJA KRATICA

*tcdA* – gen za toksin A bakterije *Clostridioides difficile*

*tcdB* – gen za toksin B bakterije *Clostridioides difficile*

TcdA – toksin A bakterije *Clostridioides difficile*

TcdB – toksin B bakterije *Clostridioides difficile*

CDT – *Clostridioides difficile* transferaza

PYG (engl. *peptone yeast glucose*) – pepton-ekstrakt kvasca-glukozni medij

kbp (engl. *kilobase pair*) – par kilobaza

PaLoc (engl. *pathogenicity locus*) – lokus patogenosti

TPI (engl. *clostridial triphosphate isomerase*) – klostridijska trifosfat izomeraza

LCGT (engl. *large clostridial glucosylating toxins*) - veliki klostridijski glukozilirajući toksini

GTP (engl. *guanosine triphosphate binding proteins*) - proteini koji vežu gvanozin-trifosfat

GTD (engl. *N-terminal glucosyltransferase domain*)–N-terminalna domena glukoziltransferaze

CCFA (engl. *cycloserine-cefoxitin fructose agar*) - cikloserin-cefoksitin fruktozni agar

EIA (engl. *enzyme-immunoassay*) - imunoenzimni test

GDH (engl. *glutamate dehydrogenase*) - glutamat dehidrogenaza

CCA (engl. *cell culture cytotoxicity assay*) – test citotoksičnosti

REA (engl. *restriction endonuclease analysis*) – analiza restrikcije endonukleaze

PFGE (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*) – gel elektroforeza u pulsirajućem polju

MLST (engl. *multilocus sequence typing*) – metoda tipiziranja na osnovu multilokusnih sekvenci

CDI (engl. *Clostridioides difficile infection*) – infekcija uzrokovana bakterijom *C. difficile*

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

16S rRNK – 16S ribosomska ribonukleinska kiselina

PCR (engl. *polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimerazom

qPCR (engl. *real-time polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

ITS (engl. *intergenic spacer region*) – intergenska razmaknica

CDAC (engl. *Clostridium difficile-associated colitis*) – kolitis uzrokovan bakterijom *C. difficile*

RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*) - polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

CPAD (engl. *C. perfringens-associated disease*) - bolest uzrokovana bakterijom *C. perfringens*



## POPIS PRILOGA

### Popis grafikona

**Grafikon 1.** Zastupljenost pasmina u istraživanoj skupini zdravih pasa

**Grafikon 2.** Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini zdravih pasa

**Grafikon 3.** Zastupljenost dobnih skupina u istraživanoj skupini zdravih pasa

**Grafikon 4.** Zastupljenost pasmina u istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

**Grafikon 5.** Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

**Grafikon 6.** Zastupljenost dobnih skupina u istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

### Popis tablica

**Tablica 1.** Stupnjevanje prisutnosti i težine kliničkih znakova bolesti probavnog sustava

**Tablica 2.** Početnice korištene u svrhu utvrđivanja *tpi* gena za bakteriju *Clostridioides difficile*, te *tcdA* i *tcdB* gena odgovornih za sintezu toksina A i B

**Tablica 3.** Reagensi korišteni za izvođenje multipleks lančane reakcije polimerazom

**Tablica 4.** Sastavnice mješavine početnica (primera)

**Tablica 5.** Protokol za izvođenje multipleks „touchdown“ lančane reakcije polimerazom u svrhu utvrđivanja prisutnosti *tpi*, *tcdA* i *tcdB* gena bakterije *C. difficile*

**Tablica 6.** Prikaz zastupljenosti kliničkih znakova bolesti probavnog sustava u istraživanoj populaciji pasa

**Tablica 7.** Prikaz prisutnosti *tpi* gena za bakteriju *C. difficile* i gena za toksine *tcdA* i *tcdB* utvrđenih metodom multipleks lančane reakcije polimerazom u uzorcima fecesa zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

**Tablica 8.** Prikaz prisutnosti različitih sojeva bakterije *C. difficile* u analiziranim uzorcima fecesa zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava dobivenih utvrđivanjem prisutnosti *tpi*, *tcdA* i *tcdB* gena

**Tablica 9.** Prikaz podataka o psima u čijem je fecesu potvrđena prisutnost gena za različite sojeve bakterije *C. difficile*

**Tablica 10.** Klinički znakovi bolesti probavnog sustava u pasa u čijem je fecesu utvrđena prisutnost *tcdA* gena za toksin odnosno toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-)

### **Popis slika**

**Slika 1.** Prikaz rezultata dobivenih multipleks PCR reakcijom

## 1. UVOD

*Clostridioides difficile* je gram-pozitivna, anaerobna, štapićasta, sporulirajuća bakterija koja je sastavni dio crijevne mikroflore ali i važan enteropatogen u ljudi i mnogih vrsta životinja. Vodeći je uzročnik bolničkih crijevnih infekcija povezanih s primjenom antimikrobnih pripravaka u ljudi, uslijed čega dolazi do narušavanja fiziološke crijevne mikroflore i prekomjerne kolonizacije ove bakterije u kolonu te posljedičnog nastanka probavnih poremećaja. Smatra se glavnim patogenom koji dovodi do pseudomembranoznog kolitisa u ljudi, a dosadašnja istraživanja pokazala su i da može uzrokovati enteritis u odraslih konja, ždrjebadi, zečeva i prasadi, te upalu slijepog crijeva i kolitis u hrčaka i zamorčića (BARTLETT, 1990.; SILVA i sur., 2013.; AVBERŠEK, 2017.; CHANDRASEKARAN i LACY, 2017.). Prisutnost bakterije *C. difficile* utvrđena je i u fecesu pasa, međutim njezina važnost u patogenezi nastanka enteritisa još uvijek nije sasvim razjašnjena.

Poznato je da postoje toksogeni i netoksogeni sojevi ove bakterije te da samo toksogeni sojevi uzrokuju probavne poremećaje. Toksogeni sojevi proizvode tri toksina: toksin A (TcdA), toksin B (TcdB), te binarni toksin, *Clostridioides difficile* transferazu (engl. *Clostridioides difficile* transferase, CDT), čija uloga u nastanku kliničkih znakova bolesti u pasa još uvijek nije razjašnjena (SILVA i sur., 2013.). S obzirom na činjenicu da bakterija može biti prisutna u probavnom sustavu pasa koji ne pokazuju kliničke znakove bolesti, još uvijek nije poznato jesu li toksini bakterije *C. difficile* vodeći uzročnici enteritisa u pasa, oportunistički patogeni koji zajedno s drugim uzročnikom mogu uzrokovati bolest ili su tek slučajan nalaz u fecesu pasa (MARKS i sur., 2002.).

Budući da je bakterija *C. difficile* izrazito važan patogen koji uzrokuje probavne poremećaje u čovjeka, a ribotipovi koji su dokazani u pasa nerijetko su jednaki onima koji su izdvojeni iz stolice ljudi, ova bakterija ima sve veći javnozdravstveni značaj te je u novije vrijeme sve više pažnje usmjereno na istraživanje njezinog zoonotskog potencijala i povezanosti s nastankom infekcije uzrokovane ovom bakterijom (engl. *Clostridioides difficile* infection, CDI) u ljudi (AVBERŠEK, 2017.; ALAM i sur., 2019.; LIM i sur., 2019.; RODRIGUEZ-PALLARES i sur., 2022.).

Cilj ovog rada je istražiti prisutnost gena *tcdA* i *tcdB* za toksine bakterije *Clostridioides difficile* u fecesu zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava koristeći metodu multipleks lančane reakcije polimerazom te utvrditi njihovu ulogu u nastanku probavnih poremećaja u pasa.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Povijest

Bakterija *Clostridioides difficile* prvi put je izdvojena 1935. godine iz uzoraka stolice zdrave novorođenčadi. Zbog svog štapićastog oblika (lat. *bacillus*, štapić) te vrlo teškog postupka izdvajanja (lat. *difficilis*, težak) prvotno je dobila naziv *Bacillus difficilis* (HALL i O'TOOLE, 1935.). Kasnije je utvrđeno da ova bakterija proizvodi toksin koji je u eksperimentalnim uvjetima bio smrtonosan za zamorčiče i zečeve (BARTLETT, 1990.). S obzirom da je ustanovljeno da ova gram-pozitivna bakterija raste isključivo u anaerobnim uvjetima i stvara endospore, tri godine nakon njezinog otkrića svrstana je u rod *Clostridium* i dobila naziv *Clostridium difficile* (BRAZIER i BORRIELLO, 2000.). Od 1977. godine smatra se primarnim uzročnikom pseudomembranoznog kolitisa u ljudi te je prvi izolat izdvojen iz pacijenata s proljevom nastalog za vrijeme liječenja klindamicinom (BARTLETT, 1990., VOTH i BALLARD, 2005.).

Početkom 21. stoljeća ustanovljene su određene razlike između navedene bakterije i ostalih uzročnika iz roda *Clostridium*, te je za *C. difficile* predložen novi naziv, *Peptoclostridium*. Naime, ustanovljeno je da prilikom rasta u pepton-ekstrakt kvasca-glukoznom mediju (engl. *peptone yeast glucose*, PYG) bakterija *C. difficile* stvara velike količine vodika i mješavinu nezasićenih i zasićenih masnih kiselina, što je zajednička osobina ove bakterije i bakterije *Clostridioides manganotii*. Međutim, u konačnici taj naziv nije prihvaćen, već je bakterija zadržala dotadašnji naziv, *Clostridium difficile*. Prestaje biti pripadnik porodice *Clostridiaceae* i reklasificirana je u porodicu *Peptostreptococcaceae*, rod *Clostridioides* (lat. „nalik na klostridij“) 2016. godine, zajedno s bakterijom *C. manganotii* s kojom ima 94,7% podudarnosti genoma. One su, zasada, jedine vrste bakterija koje pripadaju ovom rodu (LAWSON i sur., 2016.).

### 2.2. Etiologija

*Clostridioides difficile* je gram-pozitivna anaerobna bakterija koja stvara spore. Pripada redu *Eubacteriales*, porodici *Peptostreptococcaceae* i rodu *Clostridioides*. Njezine vegetativne

stanice štapićastog su oblika, a mogu biti u parovima ili kratkim lancima. Pod mikroskopom vidljive su duge vretenaste stanice s endosporama smještenim na njihovim krajevima (subterminalno).

Spore bakterija iz roda *Clostridioides* izgledaju poput endospora bakterija iz roda *Clostridium*, odnosno imaju oblik kugle ili boce, dok su endospore ostalih rodova bakterija obično jajolikog oblika te ih se na taj način može razlikovati. Predstavljaju infektivni stadij uzročnika i teško ih je uništiti jer su otporne na toplinu, zračenja i različite vrste dezinficijensa. Zbog svega navedenog preživljavaju u okolišu, bolničkim prostorijama i površinama nekoliko mjeseci, pri čemu im niske temperature u rasponu od 4 do 5°C i visoka vlaga omogućuju dugotrajnije preživljavanje. Svaka spora sadrži kompletnu kopiju genoma u jezgri koja je zaštićena debelim slojem peptidoglikana, a obavijena je vanjskom ovojnicom koja se naziva egzosporij, za koju se smatra da je vrlo važna za njezino preživljavanje i otpornost u vanjskoj sredini (AWAD i sur., 2015.). Dokazano je i da spore vrlo dobro opstaju na nehrđajućem čeliku koji se često nalazi u bolničkim prostorima gdje borave pacijenti (JOSHI i sur., 2012.).

Prilikom rasta na krvnom agaru kolonije su promjera 2-5 mm, neprozirne, sivkaste ili bjelkaste i mat do sjajne površine, okruglog ili rizoidnog oblika te ravnog ili blago konveksnog profila (BAVERUD, 2002.).

Bakterija je pokretna i posjeduje bičeve. Samo neki sojevi posjeduju fimbrije koje su promjera 4-9 nm i duljine 6 mm (AWAD i sur., 2015.). Optimalni uvjeti uzgoja za njezin rast su temperature u rasponu od 30 do 37°C u anaerobnim uvjetima na krvnom agaru, iako je dokazan rast i na temperaturama od 25 i 45°C. Ona je katalaza negativna i superoksid dismutaza negativna bakterija (BAVERUD, 2002.).

Postoje patogeni i apatogeni sojevi bakterije *C. difficile*. Patogeni sojevi stvaraju toksine, a geni koji su odgovorni za sintezu toksina nalaze se unutar 19,6 kbp (engl. *kilobase pair*) regije kromosoma, poznate kao lokus patogenosti ili PaLoc kromosomska regija (engl. *pathogenicity locus*, PaLoc) (AWAD i sur., 2015.). Lokus patogenosti posjeduju samo patogeni sojevi koji nakon kemotaksije i pričvršćivanja za stanice crijeva počinju proizvoditi toksine, dok sojevi koji ga ne posjeduju ne mogu proizvoditi toksine i smatraju se apatogenima. Međutim, smatra se da može doći do horizontalnog prijenosa gena za sintezu toksina s patogenih sojeva na apatogene sojeve koji na taj način stječu sposobnost proizvodnje toksina i postanu patogeni (CHANDRASEKARAN i LACY, 2017.). Netoksogeni sojevi na mjestu PaLoc regije imaju sekvencu od 127 bp (HAMMOND i sur., 1995.).

Dva glavna toksina koja proizvodi *C. difficile* su toksin A, koji djeluje kao enterotoksin i citotoksin, te toksin B, koji je isključivo citotoksin. TcdA i TcdB imaju 66% sličnosti u sekvencama, a homolognost između ova dva toksina i sličan način ulaska u stanicu domaćina ukazuju na to da imaju sličnu 3D strukturu (DI BELLA i sur., 2016.). Nadalje, oni su kodirani *tcdA* i *tcdB* genima koji su smješteni u PaLoc kromosomskoj regiji. U toj regiji također se nalaze *tcdC*, *tcdE* i *tcdR* dodatni geni, za koje se smatra da sudjeluju u proizvodnji toksina TcdA i TcdB koji se izlučuju stanice (AWAD i sur., 2015.). Za razlikovanje bakterije *C. difficile* od drugih vrsta bakterija značajan je *tpi* gen koji kodira enzim trifosfat izomerazu (engl. *clostridial triphosphate isomerase*, TPI). TPI je specifična za bakteriju *C. difficile* i važna je u procesima glikolize, sintezi masnih kiselina i glukoneogenezi (HUI i sur., 2018.). Tek pojedini sojevi proizvode i treći, binarni toksin, *C. difficile* transferazu (CDT), koji može pridonijeti virulentnosti i nastanku bolesti (PERSSON i sur., 2008.). Binarni toksin sastoji se od enzimske komponente (CDT<sub>a</sub>) i vezivne komponente (CDT<sub>b</sub>) (DEL PRETE i sur., 2019.).

Toksogeni sojevi mogu proizvoditi sve tri vrste toksina (A+B+CDT<sup>+</sup>), toksin A i B (A+B+CDT<sup>-</sup>), toksin B i binarni toksin (A-B+CDT<sup>+</sup>) ili samo jedan toksin (A-B+CDT<sup>-</sup>, A+B-CDT<sup>-</sup>, A-B-CDT<sup>+</sup>) (RUPNIK i JANEŽIČ, 2016.) Svi navedeni toksini pripadaju porodici velikih klostridijskih glukozilirajućih toksina (engl. *large clostridial glucosylating toxins*, LCGT). To su jednolančani proteinski toksini veličine od 250 do 300 kDa koji sadrže najmanje četiri funkcionalne domene koje su važne u mehanizmu djelovanja ovih toksina: katalitičke, autoproteolitičke i translokacijske domene te domene koje se vežu na receptore (POPOFF, 2017.).

### 2.3. Epizootiologija

Na bakteriju *C. difficile* prijemljivi su ljudi i mnoge vrste domaćih i divljih životinja: konji, goveda, svinje, mali preživači, psi, mačke, nojevi, perad, slonovi itd. (AVBERŠEK, 2017.). Glavni način prijenosa je feko-oralni put ingestijom bakterije ili njezinih spora, koje su sveprisutne u okolišu, a posebice su široko rasprostranjene u tlu (BAVERUD, 2002.; JANEŽIČ i sur., 2018.; WEESE, 2020.). RODRIGUEZ i sur. (2019.) utvrdili su prisustvo toksogenog soja bakterije *C. difficile* u sluznici nosne šupljine inficiranih pasa, stoga se smatra da se infekcija može širiti i kapljičnim putem. AL SAIF i BRAZIER (1996.) dokazali su prisutnost bakterije *C. difficile* u riječnim vodama (87,5%), jezerima (46,7%) i bazenima. Također, njezina

prisutnost dokazana je i u hrani, kao npr. u sirovom mesu (svinjetini, piletini, govedini, puretini), ribi, škampima, sirovom povrću i salati koji mogu predstavljati izvor infekcije (METCALF i sur., 2011.).

Identični ribotipovi bakterije *C. difficile* dokazani su u životinja i ljudi, stoga se posljednjih godina sve više pažnje posvećuje njezinom zoonotskom potencijalu te prijenosu ovog uzročnika sa životinja na ljude, naročito od strane onih koje su u bliskom kontaktu s ljudima, npr. pasa koji borave u kućanstvima (JANEŽIČ i sur., 2012.; ALVAREZ-PEREZ i sur., 2015.).

Prema WEESE i sur. (2020.), predisponirajući čimbenici koji utječu na nastanak CDI u pasa su: antimikrobna terapija, primjena imunosupresivnih lijekova, kontakt s ljudima koji su boravili u zdravstvenim ustanovama te bliski kontakt s djecom koja su česti asimptomatski nositelji uzročnika. Zasada još nije u potpunosti razjašnjeno postoji li dobna dispozicija koja pridonosi kolonizaciji ove bakterije u crijevima pasa. U nekih vrsta životinja, kao što su svinje, goveda i perad, infekcija ovom bakterijom puno češće se javlja u mlađih u odnosu na odrasle jedinke. Smatra se da je razlog tome taj što je bakterija sposobnija kolonizirati i razmnožavati se u crijevima mlađih jedinki kojima je crijevna mikroflora još nedovoljno razvijena (NORMAN i sur., 2009.; USUI i sur., 2014.; RODRIGUEZ i sur., 2016.).

## 2.4. Patogeneza

Nakon ulaska u organizam domaćina, spore bakterije *C. difficile* ulaze kroz želudac u tanko crijevo gdje procesom germinacije prelaze u metabolički aktivan vegetativan oblik. Anaerobni uvjeti u debelom crijevu pogoduju umnažanju vegetativnih oblika i proizvodnji toksina (AWAD i sur., 2015.). Većina sojeva bakterije *C. difficile* proizvodi dva glavna toksina, TcdA i TcdB, kodiranih genima *tcdA* i *tcdB*. Mehanizam djelovanja oba toksina temelji se na inaktivaciji proteina koji vežu gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate binding proteins*, GTP), odnosno u citosolu ciljnih stanica inaktiviraju enzime Rho i Rac GTP-aze odgovorne za proces glukozilacije, koji je neophodan za održavanje homeostaze u crijevima (VOTH i BALLARD, 2005.). Taj proces rezultira oštećenjem epitelnih stanica, izloženosti domaćina mikroorganizmima iz crijeva i aktivacijom upalnog odgovora (CHANDRASEKARAN i LACY, 2017.).

Toksini TcdA i/ili TcdB vežu se na jedan ili više staničnih receptora na ciljnoj stanici crijeva i procesom endocitoze ulaze u endosom koji im omogućava premještanje u citosol stanice domaćina. Posljedično tome dolazi do pada pH vrijednosti u endosomu i zakiseljavanja medija što dovodi do stvaranja pora na njegovoj membrani. Kroz novostvorene pore na membrani endosoma omogućeno je otpuštanje toksina u citosol, a oslobađanjem aktivne N-terminalne domene glukoziltransferaze (engl. *N-terminal glucosyltransferase domain*, GTD) dolazi do inaktivacije malih proteina (Rho, Rac i Cdc42) te blokiranja procesa glukozilacije. Na taj način onemogućena je njihova funkcija regulacije fagocitoze i proizvodnje citokina te dolazi do citopatogenog i citotoksičnog učinka toksina bakterije *C. difficile* (DIBELLA i sur., 2016.).

TcdA prvenstveno djeluje na epitelne stanice crijeva te dovodi do povećane propusnosti crijevnog epitela, što rezultira povećanom sekrecijom tekućine u lumen crijeva, razvoja proljeva i hemoragične nekroze (VOTH i BALLARD, 2005.). TcdB ima širi stanični tropizam i dovodi do jakog upalnog odgovora, nastanka ulcera i formiranja žuto-bijelih naslaga (pseudomembrana) na stijenci debelog crijeva (OFOSU, 2016.). Također, u nekim istraživanjima navodi se da TcdA i TcdB imaju sinergistički učinak pri čemu najprije toksin A dovodi do oštećenja sluznice crijeva, čime je omogućen citotoksični učinak toksina B (GREENE, 2012.).

## 2.5. Klinička slika

CDI i njezina uloga u nastanku enteritisa u pasa još uvijek nije sasvim razjašnjena. Prema dosadašnjim istraživanjima, toksini bakterije *C. difficile* dokazani su kao uzročnici proljeva u 10 do 21% populacije pasa (WEESE i sur., 2001.; CAVE i sur., 2002.). Također, njihova prisutnost dokazana je i u fecesu zdravih pasa u 0-58% slučajeva (WEESE i sur., 2001.; CAVE i sur., 2002.; MARKS i sur., 2002.; CHOUICHA i MARKS, 2006., MARKS i sur., 2011.).

Važno je napomenuti da ne postoji patognomonična klinička slika prema kojoj bi se moglo utvrditi da se radi o CDI, s tim da mogu biti prisutni znakovi bolesti tankog ili debelog crijeva (MARKS i sur., 2011.; WEESE, 2011.). Klinička slika može varirati, od subkliničke infekcije bez prisustva znakova bolesti probavnog sustava, blagog samoograničavajućeg proljeva popraćenog dehidracijom, pa sve do akutnog hemoragičnog enteritisa koji se smatra najtežim oblikom bolesti jer može dovesti do hipovolemičnog šoka, sepse i letalnog ishoda.



Klinički znakovi hemoragičnog enteritisa uključuju: učestalo defeciranje s pojačanim izlučivanjem fekalne sluzi, tenezam, hematoheziju te hipovolemiju popraćenu letargijom, tahikardijom, produljenim vremenom punjenja kapilara i slabim pulsom (MARKS i sur., 2011.; UNTERER i BUSCH, 2021.). Smatra se da rekurentne ili kronične infekcije toksogenim sojevima bakterije *C. difficile* u pasa nastaju posljedično disbiozi u crijevima te da u takvim slučajevima ova bakterija ne predstavlja primarnog uzročnika proljeva (CARVALHO i sur., 2022.).

## 2.6. Patoanatomski i patohistološki nalaz

Patoanatomske i patohistološke promjene uzrokovane bakterijom *C. difficile* opisane su u eksperimentalnim infekcijama laboratorijskih životinja. Dokazano je da toksini bakterije *C. difficile* uzrokuju ulceracije crijevne sluznice, gubitak crijevnih kripti, dovode do hiperplazije enterocita, submukoznog edema i krvarenja, te masivne infiltracije polimorfonuklearnih stanica u laminu propriju u miševa i hrčaka (SMITS i sur., 2016.). Eksperimentalno, pročišćeni toksin A primijenjen intragastrično u hrčaka uzrokuje nekrozu tkiva, krvarenja i infiltraciju stanica imunološkog sustava, dok toksin B nije imao takve učinke *in vivo*, već samo u *in vitro* uvjetima (RIEGELER i sur., 1995.; GREENE, 2012.). U istraživanjima provedenima u humanoj medicini, toksin B imao je jači enterotoksični učinak od toksina A (CARTER i sur., 2012.).

RAMOS i sur. (2021a) kod jednog psa u čijem je fecesu potvrđena prisutnost toksina bakterije *C. difficile* ustanovili su prisutnost krvavog sadržaja u želucu i crijevima, a tanko i debelo crijevo bili su ispunjeni gustim hemoragičnim sadržajem. Patohistološkom pretragom utvrdili su nekrozu crijevnih resica, prisutnost krvarenja i veliku količinu gram-pozitivnih bacila koji su prianjali uz površinu sluznice želuca i crijeva.

## 2.7. Dijagnostika

Laboratorijsku dijagnostiku najbolje bi bilo provoditi na svježe uzetom uzorku fecesa, no često u praksi to nije moguće. S obzirom da na sobnoj temperaturi dolazi do denaturacije toksina ove bakterije u fecesu, uzorak je, ukoliko se odmah nakon uzorkovanja ne proslijedi u laboratorij, potrebno pohraniti na temperaturi od 4°C pri kojoj bakterija *C. difficile* može preživjeti mjesecima, ili na -70°C, kada preživljava čak desetljećima (BRAZIER i

BORRIELLO, 2000.). Toksini bakterije *C. difficile* ostaju stabilni u uzorcima fecesa oko 120 dana ukoliko su pohranjeni na temperaturi od -80°C, dok pohrana na vrijednostima temperature nižim od -30°C u razrijeđenim uzorcima fecesa dovodi do njihovog propadanja (SCHORA i sur., 2018.).

Uzgoj toksogenog soja *C. difficile* predstavlja visoko osjetljivu (94-100%) i specifičnu (99%) metodu dijagnostike. Za izdvajanje ove bakterije koriste se selektivni mediji, i to najčešće cikloserin-cefoxitin fruktozni agar (engl. *cycloserine-cefoxitin fructose agar*, CCFA), zatim komercijalne hranjive podloge, poput podloge za izdvajanje bakterije *C. difficile* s dodatkom norfloksacina i moksalaktama, konjskog seruma, žumanjka, cisteina, lizozima ili natrijevog taurokolata, te mediji koji sadrže manitol umjesto fruktoze koji omogućavaju bolju germinaciju spora. Selektivni medij inkubira se u anaerobnim uvjetima tijekom 48 sati na temperaturi od 37°C. Osjetljivost metode može se povećati kratkotrajnim izlaganjem uzoraka fecesa temperaturi od 80°C tijekom 10 minuta ili miješanjem uzorka fecesa i alkohola u jednakom volumenu kroz 30 minuta do jednog sata, prije njegove inokulacije na hranjivu podlogu (GEORGE i sur., 1979.; CHOUICHA i MARKS, 2006.; AVBERŠEK, 2017.). Iako se uzgoj ove bakterije smatra zlatnim standardom dijagnostike, zahtijeva specijaliziranu opremu, tehnički je zahtjevan i dugotrajan.

U humanoj medicini često se koriste imunoenzimni testovi (engl. *enzyme-immunoassay*, EIA) kojima se utvrđuje prisutnost toksina A i B u fecesu (DIONNE i sur., 2013.). Iako su takvi testovi vrlo jeftini i rezultati su brzo gotovi (za dva do četiri sata), nepoželjno ih je koristiti kao samostalnu metodu dijagnostike jer podaci o njihovoj pouzdanosti i točnosti variraju (COHEN i sur., 2010.; BOYANTON i sur., 2012.). Zbog vrlo niske osjetljivosti, koja za pse varira u rasponu od 7 do 60%, te posljedično visoke učestalosti lažno negativnih rezultata, imunoenzimne testove koji se koriste u humanoj medicini za utvrđivanje prisutnosti toksina bakterije *C. difficile* ne preporuča se koristiti za utvrđivanje prisutnosti toksina u fecesu pasa (WEESE i sur., 2001.; GREENE, 2012.). Osim toksina A i B, imunoenzimnim komercijalnim testovima može se utvrditi prisutnost antigena stanične stijenke glutamat dehidrogenaze u fecesu (engl. *glutamate dehydrogenase*, GDH). Takvi testovi visoko su osjetljivi, ali nisko specifični jer GDH tvore i toksogeni i netoksogeni sojevi ove bakterije, ali i neke druge vrste bakterija. Stoga, ukoliko je rezultat ovog testa negativan, može se isključiti infekcija, no pozitivni rezultati uvijek bi trebali biti potvrđeni dokazivanjem toksina A i B u fecesu (GREENE, 2012.; CARVALHO i sur., 2022.). Osjetljivost ove metode u dijagnostici infekcije u konja, svinja i pasa ispituje se tek posljednjih godina, te su potrebna daljnja istraživanja kako

bi se razjasnila prikladna kombinacija ovog testa s ostalim metodama dijagnostike u svrhu postavljanja konačne dijagnoze (KNETCH i sur., 2014.; RAMOS i sur., 2020.; RAMOS i sur., 2021b; CARVALHO i sur., 2022.).

Test citotoksičnosti (engl. *cell culture cytotoxicity assay*, CCA) je visoko osjetljiva i specifična metoda dijagnostike, u kojoj se određuje citopatogeni učinak toksina B koji nastaje nakon inokulacije fecesa na stanične kulture humanih fibroblasta. Nakon vidljivog citopatogenog učinka, primjenjuje se specifični antiserum čija protutijela neutraliziraju djelovanje toksina bakterije i na taj način se utvrđuje njegova prisutnost. Nedostaci ove metode su što su rezultati gotovi za jedan ili dva dana, potrebno je educirano osoblje i specijalizirana oprema. Osim toga, ukoliko je prisutna mala količina toksina, citopatogeni učinak može izostati, zbog čega postoji mogućnost dobivanja lažno negativnih rezultata (AVBERŠEK, 2017.).

Molekularna metoda dijagnostike lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u početku je bila ograničena na utvrđivanje prisutnosti 16S rRNK gena čime nije bilo moguće razlikovati toksogene od netoksogenih sojeva. Naknadno su razvijeni protokoli koji utvrđuju prisutnost gena koji su odgovorni za sintezu toksina bakterije *C. difficile* koji se i danas uspješno primjenjuju (GUMERLOCK i sur., 1993.; KATO i sur., 1993.). ANIS i sur. (2021.) dokazali su da je multipleks PCR visoko osjetljiva (94,4%) i specifična metoda (85%) s negativnom prediktivnom vrijednošću od 98,1% u dijagnostici ove infekcije u pasa. U multipleks PCR metodi koristi se više parova početnica pri čemu se umnaža više odsječaka DNK, odnosno istovremeno se utvrđuje prisutnost više gena odgovornih za proizvodnju različitih toksina, u ovom slučaju TcdA i TcdB. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*, qPCR) je novija i suvremenija metoda koja omogućuje istovremeno utvrđivanje prisutnosti gena za toksine i njihovu količinu u uzorku. To je osjetljivija i brža metoda, ali i znatno skuplja (AVBERŠEK, 2017.).

U novije vrijeme sve više se provode metode genotipizacije, poput PCR ribotipizacije, u kojoj se koriste početnice za umnažanje intergenske razmaknice (engl. *intergenic spacer region*, ITS) koja se nalazi između dvaju očuvanih regija 16S i 23S rRNK. Nakon umnažanja različitog broja alela rRNK operona, dobiveni fragmenti odvajaju se u agaroznom gelu. Različiti uzorci fragmenata određuju različite skupine sojeva koji se nazivaju PCR-ribotipovi i označavaju se arapskim brojevima od broja 001 do 300 (JANEŽIČ i RUPNIK, 2010.). Ostale molekularne metode u dijagnostici CDI su primjerice analiza restrikcije endonukleazom (engl. *restriction endonuclease analysis*, REA) i gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-*

*field gel electrophoresis*, PFGE) koje se uglavnom provode u referentnim laboratorijima jer zahtijevaju dodatne edukacije osoblja i kompleksnije su izvedbe. Također, koristi se metoda tipiziranja na osnovu multilokusnih sekvenci (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) koja se temelji na određivanju sljedova nukleotida više gena za tipizaciju sojeva bakterije *C. difficile* (GRIFFITHS i sur., 2009.; SMITS i sur., 2016.) te polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP), u kojem se pomoću restrikcijske endonukleaze dobivaju fragmenti DNK uzoraka koji se razdvajaju po dužini gel elektroforezom, a dužina pojedinog fragmenta određuje se prema komplementarnosti sa sondom kojom je obilježen svaki pojedini fragment (ANDRES-LASHERAS i sur., 2018.).

Unatoč važnosti u otkrivanju prisutnosti ove bakterije u fecesu pasa, ne postoje smjernice za dijagnostiku CDI u životinja. Svi dostupni komercijalni testovi standardizirani su za analizu uzoraka humane stolice. Nadalje, postoje indikacije da se u fecesu životinja nalaze neke tvari ili enzimi koji uzrokuju nespecifično vezanje početnica u molekularnim metodama ili proteinskih antigena u imunoenzimnim testovima te na taj način inhibiraju reakcije. S obzirom da se prisutnost toksogenih sojeva bakterije *C. difficile* može utvrditi i u zdravih životinja, postavljanje dijagnoze bolesti mora biti u skladu s epizootiološkim podacima, kliničkom slikom te odgovarajućim lezijama u probavnom sustavu (CARVALHO i sur., 2022.).

## **2.8. Diferencijalna dijagnostika**

Diferencijalno dijagnostički potrebno je razlikovati kliničke znakove bolesti probavnog sustava uzrokovane ovom bakterijom od neinfektivnih uzroka te drugih mogućih infektivnih uzročnika koji dovode do nastanka sličnih znakova bolesti. Kako bi se uspješno razlikovalo o kojem uzroku bolesti je riječ, prije provedbe dijagnostičkih postupaka nužno je uzeti detaljnu anamnezu i obaviti klinički pregled koji će pomoći definirati težinu i vrstu bolesti. Osim toga, potrebno je utvrditi postoje li čimbenici rizika koji pogoduju nastanku bolesti (povijest putovanja, hranjenje sirovim ili nedovoljno termički obrađenim mesnim proizvodima, nedavni kontakt s bolesnim životinjama, nedavna antimikrobna ili neka druga terapija te je li životinja imunokomprimirana) (MARKS i sur., 2011.).

Neki od neinfektivnih uzroka koji mogu dovesti do hemoragičnog gastroenteritisa su: preosjetljivost na hranu, terapija nesteroidnim protuupalnim lijekovima koji mogu uzrokovati iritaciju crijevne sluznice, akutni pankreatitis, akutno zatajenje bubrega ili jetre, strano tijelo u

crijevima, intususcepcija ili volvulus mezenterija, intoksikacije, gastrointestinalne neoplazije, upalna bolest crijeva, hipoadrenokorticism, itd. (UNTERER i BUSCH, 2021.; RAMOS i sur., 2021a). Od enteropatogenih mikroorganizama u obzir treba uzeti značajne virusne uzročnike gastroenteritisa u pasa, a to su parvovirus, coronavirus i rotavirus, a od bakterijskih značajne su bakterije iz roda *Campylobacter* i *Salmonella*, te vrste *Clostridium perfringens* i *Escherichia coli* (ALLENSPACH, 2015.).

## 2.9. Liječenje

Liječenje CDI u pasa uključuje primjenu antimikrobne i simptomatske terapije, ovisno o kliničkim znakovima bolesti. Najčešće korišten antibiotik je metronidazol, u dozi 10-15 mg/kg na usta svakih 12 sati kroz 5 dana. Utvrdi li se da je peroralna terapija bezuspješna, potrebno ga je primijeniti intravenski u dozi od 15 mg/kg svakih 12 sati kroz 5 dana. Nepravilna primjena antibiotika može dovesti do razvoja antimikrobne rezistencije. U Kini je provedeno istraživanje u kojem je dokazano da su svi izolati bakterije *C. difficile* rezistentni na klindamicin i cefoksitin (WEI i sur., 2019.). Također, dokazana je i rezistencija ove bakterije na aminoglikozide (FEKETY i sur., 1979.; NAKAMURA i sur., 1981.). MARKS i KATHER (2003.) dokazali su da je bakterija *C. difficile* izdvojena iz fecesa pasa s proljevom i bez proljeva osjetljiva na metronidazol, odnosno da se ovaj antimikrobni pripravak smatra učinkovitim u liječenju infekcije. Važno je napomenuti da je prema nekim istraživanjima antimikrobna terapija jedan od važnijih čimbenika koji može potaknuti kolonizaciju crijeva pasa ovom bakterijom. Tako su ALBUQUERQUE i sur. (2021.) dokazali da sedmodnevna antimikrobna terapija povećava rizik od nastanka infekcije za 1,67 puta. Međutim, pojedine studije navode kako kod pasa antimikrobna terapija nije predisponirajući čimbenik koji utječe na nastanak infekcije (STRUBLE i sur., 1994.; CAVE i sur., 2002.; SILVA i sur., 2013.). Ukoliko se ustanovi da je CDI nastala kao posljedica primjene antimikrobne terapije, uputno ju je prestati primjenjivati.

Osim antimikrobne terapije, u liječenju se mogu primjenjivati adsorbensi, probiotici te dijetalna prehrana (MARKS i sur., 2011.). Crijevni adsorbensi primjenjuju se peroralno, a djeluju tako što se vežu za toksine bakterije *C. difficile* u lumenu crijeva i na taj način smanjuju njihovo djelovanje, odnosno ublažavaju težinu znakova bolesti. Di-trioktadarski smektit veže se za toksine bakterija *C. difficile* i *C. perfringens* u *in vitro* uvjetima i koristi se u terapiji klostridioza u pasa i mačaka, međutim nema dokaza o njegovoj učinkovitosti *in vivo*. Probiotici

se u liječenju ove infekcije zasada koriste u humanoj medicini, pri čemu se primjenjuje gljivica *Saccharomyces boulardii*, koja pomoću enzima proteaze sprječava djelovanje toksina A vezujući se za njegov receptor u crijevima. Terapija probioticima dokazano je smanjila recidive u ljudi za 17% (GREENE, 2012.).

## **2.10. Profilaksa**

Pse kod kojih je utvrđena prisutnost bakterije *C. difficile* u fecesu potrebno je izdvojiti od ostalih životinja kako bi se spriječio izravan i neizravan kontakt između zaraženih i prijemljivih jedinki. Prilikom manipulacije sa zaraženim životinjama preporuča se nositi zaštitni ogrtač i rukavice, a nakon manipulacije važno je provoditi pravilnu higijenu ruku, iz razloga što spore bakterije mogu preživjeti i do 70 dana u okolišu. Preporuča se ruke oprati sapunom i vodom radije nego antisepticima na bazi alkohola jer su spore bakterije otporne na alkohol. Zaražene životinje uputno je šetati na mjestima na kojima nema drugih pasa, a feces je nužno pravilno ukloniti (GREENE, 2012.).

Imunoprofilaksa u veterinarskoj medicini zasada se ne provodi. Dok postoje cjepiva protiv drugih uzročnika klostridioza, kao npr. bakterije *Clostridium perfringens*, proizvodnja cjepiva protiv bakterije *C. difficile* tek je u počecima u humanoj medicini (LIM i sur., 2019.). U eksperimentalnim uvjetima provedena su istraživanja na miševima i hrčcima kod kojih je utvrđeno da primjena protutijela za toksine A i B sprječava njihovo vezanje prilikom infekcije bakterijom *C. difficile* te na taj način dovodi do slabijeg upalnog odgovora, a time i blažih kliničkih znakova bolesti (KINK i WILLIAMS, 1998.).

## **2.11. Javno zdravstvo**

Budući da je kod farmskih životinja i kućnih ljubimaca često utvrđena prisutnost toksogenih sojeva bakterije *C. difficile*, čak i u odsustvu znakova bolesti, čini se vjerojatnim da bi infekcija ovim uzročnikom mogla imati zoonotski potencijal. Sve više se razmatra uloga životinja u prijenosu ovog uzročnika na ljude: onečišćenjem okoliša, izravnim ili neizravnim kontaktom, kontaminacijom hrane; uključujući kontaminaciju trupa i mesa pri klanju, upotrebom organskog gnojiva ili onečišćenih voda u kojima se nalaze spore bakterije

(RODRIGUEZ i sur., 2016.). Spore preživljavaju preporučenu temperaturu kuhanja mesa (71°C) dulje od dva sata, stoga meso farmskih životinja kontaminirano uzročnikom koji preživljava proces prerade na klaonici i dolazi do točke ljudske potrošnje predstavlja moguć izvor infekcije za čovjeka (LIM i sur., 2019.).

Izravan prijenos uzročnika između životinje i čovjeka prvi put je zabilježen između svinja i svinjogojaca u Nizozemskoj (KNETSCH i sur., 2014.). Još 1993. godine započela su istraživanja o ulozi kućnih ljubimaca kao rezervoara infekcije bakterijom *C. difficile* i mogućem prijenosu na ljude ali tada bez podudaranja između ljudskih i životinjskih izolata (O'NEILL i sur., 1993.). Međutim, STONE i sur. (2016.) MLST metodom utvrdili su prisutnost bakterije *C. difficile* u 17% uzoraka fecesa pasa, od kojih je njih 10% imalo gene za toksine koji uzrokuju infekciju u ljudi. JANEŽIČ i sur. (2018.) dokazali su vrlo visoku stopu kontaminacije sporama bakterije *C. difficile* u kućanstvima te je u 24% analiziranih obrisaka psećih šapa nakon šetnje susjedstvom bila utvrđena prisutnost ove bakterije, čime su ukazali na moguću važnu ulogu pasa u njezinom širenju unutar ljudske populacije. U istraživanju koje su proveli ANDRES-LASHERAS i sur. (2018.), ribotip 014 najčešće je bio utvrđen u fecesu pasa, čija je prisutnost ujedno vrlo često utvrđena i u stolici ljudi, čime se potvrđuje vrlo vjerojatan prijenos uzročnika među vrstama. ALAM i sur. (2019.) dokazali su visoku stopu kolonizacije bakterije u pasa i životinja iz zoološkog vrta ribotipovima koji su slični onima nađenima u ljudi. RODRIGUEZ-PALLARES i sur. (2022.) dokazali su izravan prijenos toksogenog soja bakterije *C. difficile* između psa i desetomjesečnog djeteta metodama genotipizacije, pri čemu su utvrdili prisutnost ribotipa 020 i u psa i u djeteta. Navedeni rezultati istraživanja sugeriraju da su psi potencijalni izvori infekcije za ljude.

S druge strane, postoje istraživanja u kojima se navodi da kućni ljubimci koji su u vlasništvu imunokompromitiranih osoba ili onih koji su na antimikrobnoj terapiji imaju povećan rizik od infekcije, vjerojatno zbog toga što vlasnik ima veću šansu od oboljenja i na taj način postaje izvor infekcije za kućnog ljubimca (WEESE, 2020.).

Bolest u čovjeka očituje se na više načina. Zaražena osoba može biti asimptomatski nositelj uzročnika, pri čemu izlučuje bakteriju u okoliš i na taj način širi infekciju unatoč odsustvu simptoma bolesti. Klinička manifestacija bolesti uključuje blagi do teški proljev (pojavnost meke stolice tri puta u 24 sata ili češće no što je normalno za pojedinca), kolitis uzrokovan bakterijom *C. difficile* (engl. *C. difficile-associated colitis*, CDAC) pri čemu nastaju bol u trbuhu, mučnina, slabost, anoreksija, vodeni proljev i moguća prisutnost krvi u tragovima u stolici. Zatim pseudomembranozni kolitis, koji se očituje grčevima u trbuhu,

hipoalbuminemijom, vodenim proljevom i nastankom žućkastih plakova u kolorektalnoj sluznici, te fulminantni kolitis, koji nastaje u 3% slučajeva, koji uključuje teške komplikacije kao što su prolongirani ileus, perforacija crijeva, megakolon i smrt (GOUDARZI i sur., 2014.; CROBACH i sur., 2018.). Među čimbenicima rizika najvažnija je prekomjerna primjena antimikrobne terapije, naročito antimikrobnih pripravaka širokog spektra (cefalosporina i fluorokinolona) koji narušavaju crijevnu mikrofloru i pogoršavaju kliničke znakove bolesti. Od ostalih čimbenika to su starija životna dob, hospitalizacija, imunosupresivna terapija i prisutnost upalne bolesti crijeva. Također, sve je važniji zoonotski potencijal koji je prethodno opisan, stoga je ova bolest izrazito važna u aspektu javnog zdravstva (CROBACH i sur., 2018.; DEL PRETE i sur., 2019.).



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uzorkovanje**

U svrhu ovog istraživanja analizirano je 116 arhiviranih uzoraka fecesa koji potječu od zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, pohranjenih na  $-80^{\circ}\text{C}$  u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od ukupnog broja analiziranih uzoraka, njih 49 potjecalo je od zdravih pasa, dok je preostalih 67 uzoraka bilo podrijetlom od pasa s različitim kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, zaprimljenih ili stacioniranih na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prikupljanje i obrada uzoraka provedeni su u vremenskom razdoblju od 2021. do 2022. godine.

Prilikom organizacije uzoraka, prikupljeni su podaci iz anamneze te podaci koji su evidentirani tijekom kliničke obrade pacijenta (podaci o zdravstvenom statusu, prisutnosti odnosno odsutnosti apetita, učestalosti povraćanja, konzistenciji fecesa i stupnju dehidracije). Procjena prisutnosti i težine kliničkih znakova bolesti probavnog sustava podijeljena je u tri različite kategorije na osnovu već poznatog sustava vrednovanja: 0 (bez promjena), 1 (blagi klinički znakovi bolesti), 2 (umjereni klinički znakovi bolesti), 3 (teški klinički znakovi bolesti) (BUSCH i sur., 2015.; DUIJVESTIJN i sur., 2016.) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Stupnjevanje prisutnosti i težine kliničkih znakova bolesti probavnog sustava - 0 (bez promjena), 1 (blagi klinički znakovi bolesti), 2 (umjereni klinički znakovi bolesti), 3 (teški klinički znakovi bolesti) (prilagođeno prema BUSCH i sur., 2015.; DUIJVESTIJN i sur., 2016.).

PARAMETAR	0	1	2	3
<b>Zdravstveno stanje</b>	nepromijenjeno	ambulantno liječenje	stacionarno liječenje 1 dan	stacionarno liječenje više dana
<b>Apetit</b>	uredan	blago promijenjen	smanjen	odsutan
<b>Povraćanje</b>	nije prisutno	1 x dnevno	2 x dnevno	> 3x dnevno
<b>Konzistencija fecesa</b>	formiran	kašast/pastozan	vodeni proljev	krvavi proljev
<b>Dehidracija</b>	nema	< 5%	5-10%	> 10%

### 3.2. Izdvajanje DNK iz fecesa pasa

Iz prikupljenih uzoraka fecesa izdvojena je DNK u svrhu daljnje analize uzoraka metodom multipleks lančane reakcije polimerazom. Da bi se izdvojila DNK koristio se komercijalni komplet Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (ZYMO Research, SAD). Prema uputi proizvođača, izvagalo se 150 mg fecesa koji je prebačen u ZR Bashing Bead eprueticu. Eprueticu ZR Bashing Bead sadrži staklene kuglice promjera 0.1 i 0.5 mm čija je uloga mehaničko razaranje bakterijske stanice. Nakon fecesa u nju se dodalo 750 µl Bashing Bead pufera koji pospješuje navedenu mehaničku lizu. Sadržaj eprueticu miješao se na laboratorijskoj stolnoj miješalici (LSE Vortex Mixer, Corning) tijekom 10 minuta, nakon čega se eprueticu centrifugirala u mikrocentrifugi (Minispinplus, Eppendorf) tijekom jedne minute na 10,000 rcf. U međuvremenu, Zymo-Spin III-F eprueticu s membranom umetnuta je u Eppendorf eprueticu volumena 1,5 ml te se u nju otpipetiralo 400 µl supernatanta dobivenog prethodnim postupkom centrifugiranja, pri čemu se pazilo da se ne zahvati talog. Navedeni postupak ponovio se s ostatkom supernatanta uz centrifugiranje na 8,000 rcf tijekom jedne minute.

U sljedećem koraku, u dobiveni filtrat dodano je 1200 µl pufera za lizu (Genomic Lysis Buffer). Nakon kratkog miješanja, 800 µl otopine prebačeno je u Zymo-Spin II-CR eprueticu s membranom koja je umetnuta u sabirnu eprueticu te se ponovio proces centrifugiranja na 10,000 rcf tijekom jedne minute. Odbačen je filtrat iz sabirne eprueticice i s ostatkom uzorka ponovljen je prethodni korak. Potom je Zymo-Spin II-CR eprueticica prebačena u novu sabirnu eprueticu i dodalo se 200 µl pufera za primarno ispiranje DNK (DNA Pre-Wash Buffer) koja se centrifugirala tijekom jedne minute na 10,000 rcf. Zatim je dodano 500 µl pufera za ispiranje genomske DNK (g-DNA Wash Buffer) i uslijedilo je centrifugiranje tijekom jedne minute na 10,000 rcf. Zymo-Spin II-CR eprueticica s membranom prebacila se u čistu Eppendorf eprueticu zapremine 1,5 ml i dodalo se 80 µl pufera za ispiranje DNK (DNA Elution Buffer) izravno na središnji dio membrane. Uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od pet minuta te centrifugiranje na 10,000 rcf tijekom 30 sekundi. U međuvremenu je pripremljena Zymo-Spin III-HRC eprueticica s membranom s čistom sabirnom eprueticom u koju je dodano 600 µl otopine za pripremu membrane (Prep Solution) te se centrifugirala na 8,000 rcf tijekom tri minute. DNK dobivena u filtratu iz Zymo-Spin II-CR eprueticice s membranom prebacila se u Zymo-Spin III-HRC eprueticu. Zatim se centrifugirala na 16,000 rcf tijekom tri minute, a dobivena DNK u filtratu pohranjena je na -80° C do daljnje obrade metodom lančane reakcije polimerazom.

### **3.3. Multipleks lančana reakcija polimerazom**

Nakon izdvajanja genomske DNK prisutne u istraživanom uzorku provedena je molekularna metoda multipleks lančane reakcije polimerazom (PCR) pomoću koje se određivala prisutnost *tpi* gena, te *tcdA* i *tcdB* gena za toksine bakterije *Clostridioides difficile* u uzorcima fecesa pasa. Prisutnost *tpi* gena utvrđena multipleks PCR metodom ukazivala je na prisutnost vrste bakterije *C. difficile* u analiziranim uzorcima, dok je prisutnost *tcdA* i *tcdB* gena određivala je li soj toksogen ili netoksogen. Kao početnice korišteni su poznati sljedovi oligonukleotida (LEMEE i sur., 2004.) (Tablica 2).

**Tablica 2.** Početnice korištene u svrhu utvrđivanja *tpi* gena za bakteriju *Clostridioides difficile*, te *tcdA* i *tcdB* gena odgovornih za sintezu toksina A i B (LEMEE i sur., 2004.)

Početnice	Slijed oligonukleotida (5'-3')
<i>tpi</i> -F	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA
<i>tpi</i> -R	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC
<i>tcdA</i> -F	AGATCTCTATATTTACATGACAATAT
<i>tcdA</i> -R	GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT
<i>tcdB</i> -F	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA
<i>tcdB</i> -R	ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT

Za izvođenje multipleks lančane reakcije polimerazom u svrhu ovog istraživanja ukupni volumen PCR reakcijske smjese iznosio je 23,75  $\mu$ l, a korišteni su sljedeći reagensi (Tablica 3 i Tablica 4):

**Tablica 3.** Reagensi korišteni za izvođenje multipleks lančane reakcije polimerazom.

Reagens	Količina ( $\mu$ L) za jedan uzorak
EmeraldAmp MAX HS Premix, 2XPCR Master Mix	12,5
Primer Mix	6,25
dH <sub>2</sub> O	5
DNK	1,25

**Tablica 4.** Sastavnice mješavine početnica (primera).

Primer	Količina (μL) za jedan uzorak
<i>tpi</i> -F, 10 μM	0,625
<i>tpi</i> -R, 10 μM	0,625
<i>tcdA</i> -F, 10 μM	1,25
<i>tcdA</i> -R, 10 μM	1,25
<i>tcdB</i> -F, 10 μM	1,25
<i>tcdB</i> -R, 10 μM	1,25

Za kontrolu ispravnosti odvijanja PCR reakcije pripremljene su pozitivna i negativna kontrola. Kao negativna kontrola u reakcijsku smjesu je dodana DNA-ase/RNA-ase slobodna sterilna voda (1,25 μl). Za pozitivnu kontrolu korištena je DNK (1,25 μl) izdvojena iz stolice čovjeka s utvrđenom prisutnošću TcdA i TcdB toksina bakterije *C. difficile*, gdje je umnažanjem *tpi*, *tcdA* i *tcdB* gena, te njihovim sekvenciranjem utvrđeno 100% podudarnosti sa *C. difficile* ATCC 9689 sojem (pristupni broj CP011968, NCBI GenBank baza podataka). Ukupni volumen PCR reakcijske smjese prilagođavao se ovisno o broju upotrijebljenih uzoraka u PCR reakciji.

Nakon pripreme PCR reakcijske smjese, uzorci su stavljeni u PCR uređaj za izvođenje lančane reakcije polimerazom (Biorad, TC100) prema sljedećem protokolu (Tablica 5):

**Tablica 5.** Protokol za izvođenje multipleks „touchdown“ lančane reakcije polimerazom u svrhu utvrđivanja prisutnosti *tpi*, *tcdA* i *tcdB* gena bakterije *C. difficile*

Temperatura	Vrijeme	
95°C	3 minute	
94°C	30 sekundi	} 40 x
65-55°C	30 sekundi, 11x -1°C	
55°C	30 sekundi, 29x	
72°C	1 minuta	
72°C	5 minuta	
4°C	∞	

Multipleks lančana reakcija polimerazom sastoji se od tri koraka, koja uključuju razdvajanje dvolančane DNK u dva jednolančana lanca na temperaturi od 95°C, sparivanje početnica na temperaturi od 55 do 65°C pri čemu se početnice vežu za svoje komplementarne sljedove baza i produljivanje lanaca DNK pri temperaturi od 72°C. Cijeli postupak ponavlja se 40 puta. U „touchdown“ PCR-u početna temperatura vezanja početnica viša je od optimalne za nekoliko stupnjeva te se svakim ciklusom postepeno smanjuje, kako bi se poboljšala specifičnost reakcije i potaknulo umnažanje samo željenih fragmenata.

### 3.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Nakon multipleks lančane reakcije polimerazom, uspješnost umnažanja ciljnog odsječka DNK provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu.

Oprema i pribor korišteni za izvođenje elektroforeze:

- kalup za gel
- češljic za pripremu jažica u gelu
- analitička vaga
- mikrovalna pećnica
- Eppendorf pipeta 0,5-10  $\mu$ l
- izvor el. struje - sustav za provođenje elektroforeze (Consort, EV232)
- uređaj za snimanje i arhiviranje fotografija gelova (Gel doc, Biorad)

Kemikalije korištene za pripremu agaroznog gela i izvođenje elektroforeze:

- TAE pufer 1x
- agaroz
- boja za gel (Diamond<sup>TM</sup> Nucleic Acid Dye, Promega)
- DNK biljeg

### **3.4.1. Priprema TAE pufera**

Reagensi koji su potrebni za pripremu 50 x koncentriranog TAE pufera:

- 93,5 g EDTA (EDTA etilendiamintetraoctena kiselina, Sigma Aldrich)
- 242 g Tris (TRIZMA baza: 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propadinol  $C_4H_{11}NO_3$ , Sigma Aldrich)
- 57 ml ledene octene kiseline  $CH_3COOH$  (Kemika)

U prvom koraku, kako bi se pripremilo 0,5 M otopine EDTA, u 400 ml redestilirane vode otopilo se 93,5 g EDTA. Dodavanjem granulica NaOH, pH je podešen na 8,0. Zatim se dopunila redestilirana voda do volumena 500 ml. Nakon toga, u 750 ml redestilirane vode otopilo se 242 g Tris baze i dodalo se 100 ml 0,5 EDTA i 57 ml ledene octene kiseline. Zatim se dopunila redestilirana voda do volumena 1000 ml. S obzirom da je za izvedbu elektroforeze potreban 1x koncentriran TAE pufer, u destiliranu vodu volumena 490 ml dodalo se 10 ml prethodno

napravljenog TAE pufera koncentriranog 50x te je na taj način dobiven 1x koncentriran TAE pufer.

### 3.4.2. Priprema agaroznog gela

Za izvođenje elektroforeze najprije je bilo potrebno složiti kalup za gel. U kalup se umetnuo češljic koji nakon ulijevanja i polimerizacije agaroznog gela tvori jažice u koje su se dodali uzorci, odnosno PCR proizvodi. Nakon pripreme kalupa uslijedila je priprema 1% otopine agaroze. U Erlenmayerovu tikvicu dodalo se 100 mL TAE pufera, 1x. Nakon toga, pomoću analitičke vage odvagalo se 1 g praha agaroze, koja se zatim dodala u tikvicu u kojoj se nalazio pufer. Uslijedilo je zagrijavanje tikvice u mikrovalnoj pećnici tijekom dvije minute.

Otopina se hladila nekoliko minuta, a zatim se dodalo 5  $\mu$ l boje za DNK u gelu. Nakon što se dodala boja, tikvica se lagano miješala te se otopina izlila u prethodno pripremljen kalup za gel. Zaštićena od svjetlosti ostavila se na sobnoj temperaturi kako bi se ohladila i polimerizirala agarosa. Nakon hlađenja gela, češljici i gumene stranice su se uklonili s rubova kalupa te se kalup s gelom uronio se u kadu za elektroforezu u kojoj se nalazio TAE, 1x pufer.

### 3.4.3. Nanošenje PCR proizvoda u gel i provođenje elektroforeze

Svaki pojedini PCR proizvod nanosio se u jažice agaroznog gela u volumenu od 4  $\mu$ l. U jednu od jažica također se stavio i DNK biljeg. Pozitivna i negativna kontrola PCR reakcije dodane su u posljednje dvije jažice. Zatim se pokrenula elektroforeza pod zadanim uvjetima napona od 100 V i jačine struje 80 mA tijekom jednog sata.

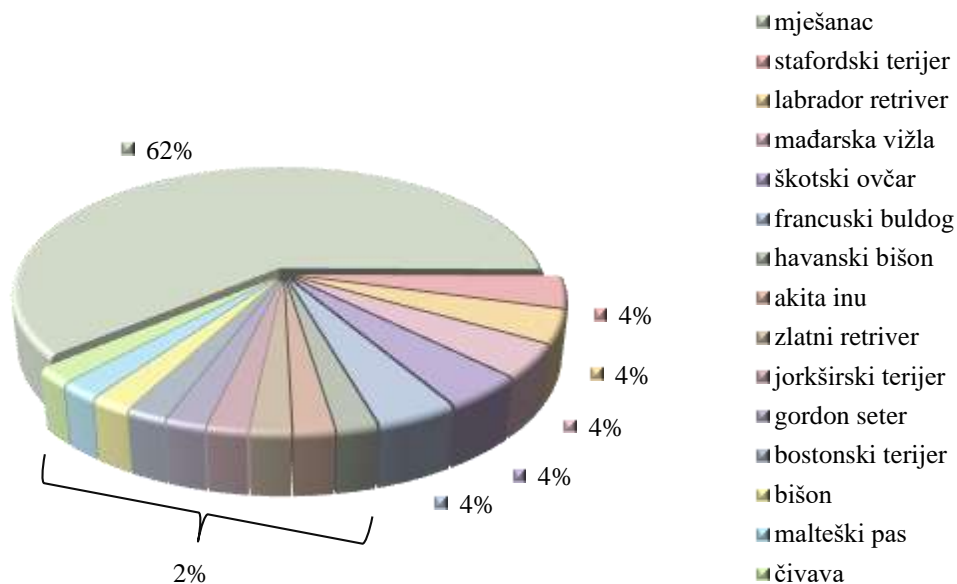
Za vizualizaciju, fotografiranje i analizu rezultata koristila se komora s izvorom UV zračenja koja je spojena s kamerom i računalom. Pozitivna reakcija za pojedini PCR proizvod očitovala se pojavom signala na gelu. Usporedbom dobivenih signala u jažicama u kojima su stavljeni PCR proizvodi sa signalima DNK biljega određena je približna veličina umnoženih dijelova DNK. Veličina PCR proizvoda dobivenih u ovom istraživanju uspoređivala se s otprije poznatom veličinom PCR proizvoda za svaki umnoženi gen za toksine bakterije *C. difficile* određenih prema LEMEE i sur. (2014.), pri čemu je *tpi* gen veličine 230 bp, *tcdA* gen veličine 369 bp, te *tcdB* gen 160 bp.



## 4. REZULTATI

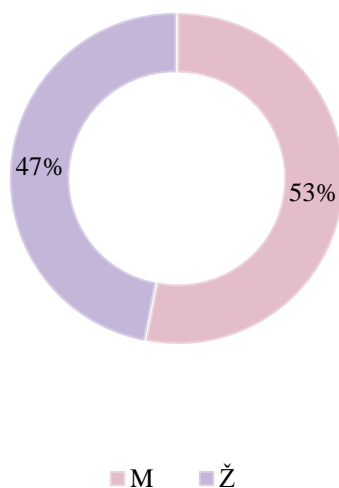
### 4.1. Istraživana populacija pasa

U ovom istraživanju analizirani su uzorci fecesa uzorkovani od 49 zdravih pasa i 67 pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. Uzorci fecesa zdravih pasa potjecali su od 15 različitih pasmina, s najvećom zastupljenošću mješanaca u iznosu od 62% (30/49). Pet pasmina (stafordski terijer, labrador retriever, mađarska vižla, škotski ovčar i francuski buldog) bilo je zastupljeno u iznosu od 4% (2/49). U preostalih devet pasmina uzorkovana je samo jedna životinja, s zastupljenošću od 2% (Grafikon 1).



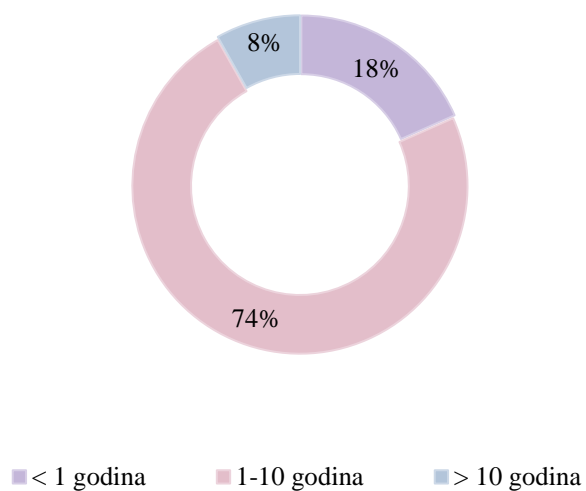
**Grafikon 1.** Zastupljenost pasmina u istraživanoj skupini zdravih pasa

Zastupljenost muškog spola u skupini zdravih pasa iznosila je 53% (26/49), a ženskog 47% (23/49) (Grafikon 2).



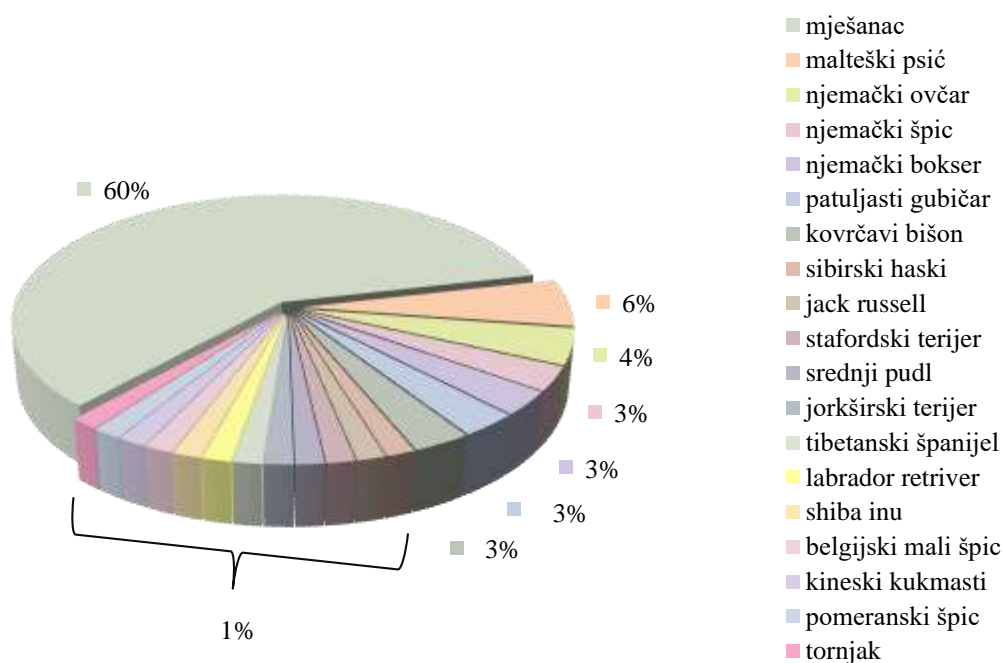
**Grafikon 2.** Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini zdravih pasa

U istraživanoj skupini zdravih pasa, prosječna dob životinja iznosila je 4,54 godine (u rasponu od dva mjeseca do 14 godina starosti). Od ukupnog broja zdravih životinja 18% (9/49) pasa bilo je mlađe od godinu dana, 74% (36/49) u rasponu od 1 do 10 godina, a starijih od 10 godina 8% (4/49) (Grafikon 3).



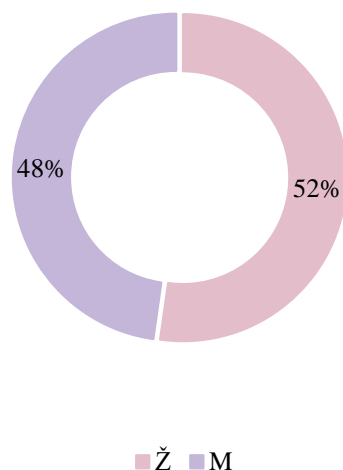
**Grafikon 3.** Zastupljenost dobnih skupina u istraživanoj skupini zdravih pasa

U skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, uzorci fecesa potjecali su od 17 različitih pasmina pasa, s najvećom zastupljenošću mješanaca u iznosu od 60% (40/67), zatim malteških pasa 6% (4/67) i njemačkih ovčara 4% (3/67). Četiri pasmine pasa (njemački špic, njemački bokser, patuljasti gubičar i kovrčavi bišon) bile su zastupljene u iznosu od 3% (2/67), dok je preostalih 11 pasmina bilo zastupljeno s po jednom životinjom, odnosno 1,5% (1/67) (Grafikon 4).



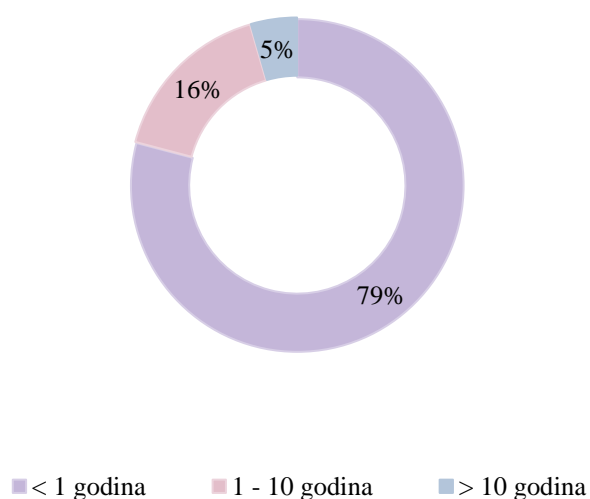
**Grafikon 4.** Zastupljenost pasmina u istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

Zastupljenost muškog spola u skupini životinja s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava iznosila je 48% (32/67), a ženskog 52% (35/67) (Grafikon 5).



**Grafikon 5.** Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

U istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, prosječna dob životinja iznosila je 1,8 godina (u rasponu od jednog mjeseca do 15 godina starosti). Od toga je pasa mlađih od godinu dana bilo 79% (53/67), starosti od jedne do deset godina 16% (11/67), te starijih od deset godina 5% (3/67) (Grafikon 6).



**Grafikon 6.** Zastupljenost dobnih skupina u istraživanoj skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava

## 4.2. Klinički znakovi bolesti probavnog sustava u istraživanoj populaciji pasa

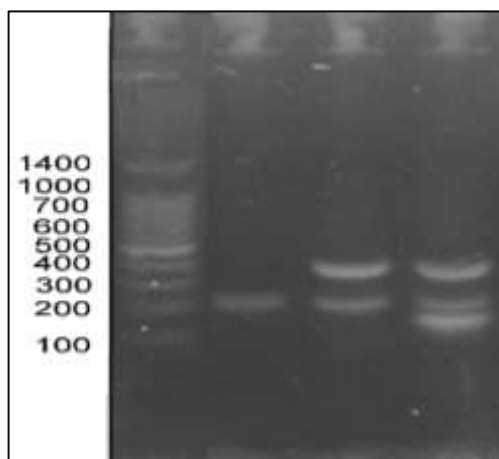
Od 67 pasa istraživanih u skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, njih 9% (6/67) bilo je na ambulantnom liječenju, 7% (5/67) bilo je stacionirano na jedan dan na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta, a 84% (56/67) tijekom nekoliko dana. Prema podacima iz anamneze, 18% (12/67) pasa imalo je uredan apetit, 21% (14/67) blago promijenjen, 16% (11/67) pasa imalo je smanjen apetit, dok je u 45% (30/67) pasa apetit bio u potpunosti odsutan. U 27% (18/67) pasa nije utvrđena prisutnost povraćanja, dok je u 6% (4/67) pasa povraćanje zabilježeno jednom dnevno, 30% (20/67) pasa povraćalo je dva do tri puta dnevno, a njih 37% (25/67) više od tri puta dnevno. Formiran feces imalo je 4% (3/67) pasa, 15% (10/67) pasa imalo je feces pastozne ili kašaste konzistencije, njih 34% (23/67) imalo je vodeni, a 46% (31/67) krvavi proljev. Kliničkim pregledom životinja u 13% (9/67) pasa utvrđen je uredan hidracijski status, dok je stupanj dehidracije do 5% utvrđen u 28% (19/67) pasa, deficit u rasponu od 5 do 10% u 54% (36/67) pasa, a deficit veći od 10% u 4% (3/67) pasa (Tablica 6).

**Tablica 6.** Prikaz zastupljenosti kliničkih znakova bolesti probavnog sustava u istraživanoj populaciji pasa. 0 (bez promjena), 1 (blagi klinički znakovi bolesti), 2 (umjereni klinički znakovi bolesti), 3 (teški klinički znakovi bolesti).

PARAMETAR	0	1	2	3
<b>Zdravstveno stanje</b>	0% (0/67)	9% (6/67)	7% (5/67)	84% (56/67)
<b>Apetit</b>	18% (12/67)	21% (14/67)	16% (11/67)	45% (30/67)
<b>Povraćanje</b>	27% (18/67)	6% (4/67)	30% (20/67)	37% (25/67)
<b>Konzistencija fecesa</b>	4% (3/67)	15% (10/67)	34% (23/67)	46% (31/67)
<b>Dehidracija</b>	13% (9/67)	28% (19/67)	54% (36/67)	4% (3/67)

#### 4.3. Utvrđivanje prisutnosti *tpi* gena za bakteriju *C. difficile* i gena za toksine *tcdA* i *tcdB* metodom multipleks lančane reakcije polimerazom u istraživanoj populaciji pasa

Istraživani uzorci fecesa zdravih i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava podvrgnuti su multipleks PCR metodi u kojoj je amplifikacija unutarnjeg fragmenta domaćinskog *tpi* gena (eng. *housekeeping gene*) omogućila utvrđivanje prisutnosti vrste bakterije *C. difficile* na osnovu utvrđenog signala na visini od 230 bp. Istovremeno, prisutnost signala na visini od 369 bp označavala je prisutnost *tcdA* gena odgovornog za proizvodnju toksina A, odnosno na visini od 160 bp prisutnost *tcdB* gena odgovornog za proizvodnju toksina B. Na taj način odredila se prisutnost toksogenih (A+B+, A+B-, A-B+), odnosno netoksogenih sojeva (A-B-) bakterije *C. difficile* u analiziranim uzorcima fecesa (Slika 1).



**Slika 1.** Prikaz rezultata dobivenih multipleks PCR reakcijom. 1 – DNK biljeg; 2 – netoksogeni soj bakterije *C. difficile* (A-B-), 3 – toksogeni soj bakterije *C. difficile* (A+B-); 4 – toksogeni soj bakterije *C. difficile* (A+B+) korišten kao pozitivna kontrola.

Svaki uzorak u kojem je multipleks PCR metodom utvrđena prisutnost *tpi* gena te gena za toksine A i B bakterije *C. difficile* podvrgnut je jednostrukoj PCR metodi u kojoj je umnožen svaki gen pojedinačno, u svrhu provedbe sekvenciranja kojom se sa sigurnošću potvrdila njihova prisutnost u uzorku.

Od sveukupno 116 analiziranih uzoraka fecesa pasa, u njih 5,2% (6/116) utvrđena je prisutnost *tpi* gena, a u njih 2,6% (3/116) *tcdA* gena. Unutar skupine zdravih pasa, prisutnost *tpi* gena utvrđena je u 4% (2/49) uzoraka fecesa, a ni u jednom od uzoraka fecesa zdravih pasa nije utvrđena prisutnost ni *tcdA* niti *tcdB* gena za toksine A i B, čime je utvrđena prisutnost netoksogenog soja bakterije *C. difficile* (A-B-). Unutar skupine pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, u 6% (4/67) uzoraka fecesa utvrđena je prisutnost *tpi* gena, čime je utvrđena prisutnost bakterije *C. difficile* u navedenim uzorcima. U njih 75% (3/4) istovremeno je utvrđena prisutnost i *tcdA* gena, što ukazuje na prisutnost toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-) u uzorcima (Tablica 7 i Tablica 8).

**Tablica 7.** Prikaz prisutnosti *tpi* gena za bakteriju *C. difficile* i gena za toksine *tcdA* i *tcdB* utvrđenih metodom multipleks lančane reakcije polimerazom u uzorcima fecesa zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava.

Skupina pasa	<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>
<b>Zdravi</b>	4% (2/49)	0% (0/49)	0% (0/49)
<b>S kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava</b>	6% (4/67)	4,5% (3/67)	0% (0/67)
<b>Ukupno</b>	5,2% (6/116)	2,6% (3/116)	0% (0/116)

**Tablica 8.** Prikaz prisutnosti različitih sojeva bakterije *C. difficile* u analiziranim uzorcima fecesa zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava dobivenih utvrđivanjem prisutnosti *tpi*, *tcdA* i *tcdB* gena.

Skupina pasa	A-B-	A+B-	A+B+
	netoksogeni soj	toksogeni soj	toksogeni soj
<b>Zdravi</b>	4% (2/49)	0% (0/49)	0% (0/49)
<b>S kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava</b>	1,5% (1/67)	4,5% (3/67)	0% (0/67)
<b>Ukupno</b>	2,6% (3/116)	2,6% (3/116)	0% (0/116)

Od 116 uzorkovanih pasa uključenih u ovo istraživanje, 62 psa bila su mlađa od godinu dana, od čega je njih devet pripadalo skupini zdravih, a 53 skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. U 6,5% (4/62) pasa mlađih od godinu dana utvrđena je prisutnost *tpi* gena bakterije *C. difficile*, od čega je u njih 4,9% (3/62) utvrđena prisutnost *tcdA* gena, odnosno toksogenog soja (A+B-). U njih 1,6% (1/62) utvrđena je prisutnost jedino *tpi* gena te nisu utvrđeni ni *tcdA* niti *tcdB* gen, čime je utvrđen netoksogeni soj (A-B-). Svi su pripadali skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. Skupinu pasa starosti od jedne do deset godina činilo je 47 pasa, od čega je 36 pasa pripadalo skupini zdravih, a 11 pasa skupini s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. U pasa starosti od jedne do deset godina, u njih 4,3% (2/47) utvrđena je prisutnost jedino *tpi* gena bakterije *C. difficile*, te nisu utvrđeni ni *tcdA* niti *tcdB* gen, čime je utvrđen netoksogeni soj (A-B-). Svi su pripadali skupini zdravih pasa. Pasa starijih od deset godina ukupno je u istraživanju bilo sedam, te ni u jednog od njih nije utvrđena prisutnost gena bakterije *C. difficile*.

Od ukupnog broja pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, za vrijeme uzorkovanja fecesa njih 87% (58/67) bilo je na antimikrobnoj terapiji, dok 13% (9/67) pasa nisu bili liječeni antimikrobnim pripravcima. Od pasa na antimikrobnoj terapiji, u njih 6,9% (4/58) utvrđena je prisutnost *tpi* gena bakterije *C. difficile*, pri čemu je u njih 1,7% (1/58) utvrđena prisutnost jedino *tpi* gena, a nije utvrđena prisutnost *tcdA* i *tcdB* gena, čime je potvrđen



netoksogeni soj ove bakterije (A-B-). U 5,2% (3/58) pasa na antimikrobnoj terapiji utvrđena je prisutnost toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-).

#### **4.4. Podaci o psima kod kojih je utvrđena prisutnost gena za različite sojeve bakterije *C. difficile* u fecesu**

Od sveukupno šest pasa kod kojih je utvrđena prisutnost *tpi* gena za bakteriju *C. difficile* u fecesu, dva psa bila su zdrava (pas 1 i 2) te je kod njih utvrđena prisutnost jedino *tpi* gena a nisu ni *tcdA* niti *tcdB* gen, odnosno utvrđen je netoksogeni soj bakterije *C. difficile* (A-B-). Pas 1 bio je ženskog, a pas 2 muškog spola, oboje mješanci, starosti između jedne i deset godina te nisu liječeni antimikrobnim pripravcima.

Četiri psa pripadala su skupini pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. Uzorak br. 3 bio je od psa mješanca, ženskog spola, mlađeg od godinu dana koji je bio na antimikrobnoj terapiji i na stacionarnom liječenju osam dana te je kod njega utvrđena prisutnost jedino *tpi* gena, odnosno netoksogenog soja bakterije *C. difficile* (A-B-). Nije imao apetit, imao je krvavi proljev, povraćao je više od tri puta dnevno te je bio dehidriran 7%. Od antimikrobnih pripravaka provedena je intravenska terapija kombinacijom ampicilina tijekom sedam dana i enrofloksacina tijekom pet dana. Osim toga, kod ovog psa utvrđena je prisutnost *cpe* gena bakterije *C. perfringens* te je vođen pod dijagnozom bolesti uzrokovane bakterijom *C. perfringens* (engl. *C. perfringens-associated disease*, CPAD). Uzorak br. 4 potjecao je od njemačkog ovčara, uzorak br. 5 od mješanca i uzorak br. 6 od tornjaka kod kojih je utvrđena prisutnost osim *tpi* gena i gena za toksin *tcdA*, odnosno toksogeni soj bakterije *C. difficile* (A+B-). Bili su muškog spola, mlađi od godinu dana te su primali antimikrobnu terapiju.

**Tablica 9.** Prikaz podataka o psima u čijim je uzorcima fecesa potvrđena prisutnost gena za različite sojeve bakterije *C. difficile*.

Broj uzorka fecesa	Skupina	Pasmina	Spol	Starost	Gen	Soj	Antimikrobna terapija
1	zdrav	mješanac	ženka	1-10	<i>tpi</i>	A-B-	ne
2	zdrav	mješanac	mužjak	1-10	<i>tpi</i>	A-B-	ne
3	bolestan	mješanac	ženka	< 1	<i>tpi</i>	A-B-	da
4	bolestan	njemački ovčar	mužjak	< 1	<i>tpi, tcdA</i>	A+B-	da
5	bolestan	mješanac	mužjak	< 1	<i>tpi, tcdA</i>	A+B-	da
6	bolestan	tornjak	mužjak	< 1	<i>tpi, tcdA</i>	A+B-	da

#### 4.5. Klinički znakovi bolesti u pasa u kojih je utvrđena prisutnost toksogenih sojeva bakterije *C. difficile* (A+B-)

Sva tri psa u čijem je fecesu utvrđena prisutnost toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-) pokazivala su kliničke znakove bolesti probavnog sustava te su stoga bila stacionirana na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pas 4 bio je stacioniran sedam dana, pas 5 četiri dana, a pas 6 sedam dana. Pas 4 imao je blago promijenjen apetit, pas 5 uredan, a kod psa 6 bio je u potpunosti odsutan. Svi su imali vodeni proljev. Pas 4 i 5 povraćali su dva do tri puta dnevno, dok je pas 6 povraćao više od tri puta dnevno. Stupanj dehidracije bio je u rasponu od 5 do 10% (Tablica 10).

**Tablica 10.** Klinički znakovi bolesti probavnog sustava u pasa u čijem je fecesu utvrđena prisutnost *tcdA* gena za toksin odnosno toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-).

PARAMETAR	Pas 4	Pas 5	Pas 6
<b>Zdravstveno stanje</b>	stacioniran 7 dana	stacioniran 4 dana	stacioniran 7 dana
<b>Apetit</b>	blago promijenjen	uredan	odsutan
<b>Konzistencija fecesa</b>	vodeni proljev	vodeni proljev	vodeni proljev
<b>Povraćanje</b>	2-3 x dnevno	2-3 x dnevno	> 3 x dnevno
<b>Dehidracija</b>	5%	7%	7%

Sva tri psa u čijem je fecesu utvrđena prisutnost toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-) bila su na antimikrobnoj terapiji. Pas 4 bio je na supkutanoj terapiji amoksicilin-klavulanskom kiselinom tijekom četiri dana i trimetoprim sulfametoksazolom tri dana. Pas 5 bio je na intravenskoj terapiji ampicilinom u trajanju od sedam dana te nakon toga na peroralnoj terapiji amoksicilin-klavulanskom kiselinom u trajanju od pet dana. Pas 6 bio je istovremeno na intravenskoj terapiji ampicilinom tijekom sedam i enrofloksacinom u trajanju od pet dana.

## 5. RASPRAVA

Bakterija *C. difficile* još sredinom prošlog stoljeća prepoznata je kao važan enteropatogen koji uzrokuje različite probavne poremećaje u ljudi, od čega su najteži oblik pseudomembranozni kolitis i fulminantni kolitis s mogućim smrtnim ishodom. Osim kliničke slike bolesti probavnog sustava, zabilježeni su i asimptomatski slučajevi, naročito u novorođenčadi (ROSSEAU i sur., 2012.). U novije vrijeme, sve više istraživanja usmjereno je na ulogu izravnog i neizravnog kontakta s životinjama na nastanak infekcije u ljudi, s obzirom da je u fecesu brojnih zdravih i bolesnih domaćih i divljih vrsta životinja potvrđena prisutnost ove bakterije (KNETSCH i sur., 2014.; AVBERŠEK, 2017.; JANEŽIČ i sur., 2018.; ALAM i sur., 2019.; LIM i sur., 2019.). Zbog opasnosti od mogućeg nastanka probavnih poremećaja u ljudi i mnogih vrsta životinja uzrokovanih njezinim toksogenim sojevima, od velike je važnosti uvrstiti infekciju ovom bakterijom na listu diferencijalnih dijagnoza u slučaju nastanka znakova bolesti probavnog sustava.

Prisutnost toksina bakterije *C. difficile* (TcdA, TcdB i CDT) utvrđena je različitim dijagnostičkim metodama u fecesu brojnih vrsta životinja. Njihovo enteropatogeno djelovanje naročito je značajno u prašćića i ždrjebadi kod kojih mogu uzrokovati enterokolitis, proljev i smanjen prirast (AVBERŠEK, 2017.). Nadalje, prisutnost ove bakterije utvrđena je i u fecesu pasa, međutim njezinu ulogu u nastanku enteritisa te predisponirajuće čimbenike koji pogoduju CDI tek treba razjasniti. S obzirom da je u dosadašnjim istraživanjima utvrđena u zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, još uvijek nije razjašnjeno je li njezina prisutnost u fecesu tek slučajan nalaz, posljedica kolonizacije crijeva netoksogenim sojevima ili je ona zapravo primarni uzročnik kliničkih znakova bolesti probavnog sustava, koji mogu varirati od blagih proljeva do teških oblika hemoragičnih gastroenteritisa te u konačnici rezultirati sepsom i smrtnim ishodom (MARKS i sur., 2011.). Stoga je cilj ovog istraživanja bio ustanoviti prisutnost gena *tcdA* i *tcdB* za toksine bakterije *Clostridioides difficile* u fecesu zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava te utvrditi njihovu ulogu u nastanku probavnih poremećaja u pasa.

U ovom istraživanju, od ukupno 116 analiziranih uzoraka fecesa zdravih i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, u njih 5,2% utvrđena je prisutnost *tpi* gena bakterije *C. difficile* metodom multipleks lančane reakcije polimerazom, što je slično rezultatima koji su dobili WETTERWICK i sur. (2013.). Naime, oni su prisutnost ove bakterije utvrdili u 5,7% analiziranih uzoraka fecesa koristeći pri tome kulturnu metodu uzgoja.

U ranije provedenim istraživanjima, bakterija *C. difficile* utvrđena je u fecesu zdravih pasa u do 6% slučajeva (STRUBLE i sur., 1994.; LEFEBVRE i sur., 2008.; LEFEBVRE i sur., 2009.; SCHNEEBERG i sur., 2012.; RABOLD i sur., 2018.). U ovom istraživanju, u 4% pasa iz skupine zdravih životinja utvrđena je prisutnost *tpi* gena bakterije *C. difficile*, odnosno netoksogenog soja (A-B-) ove bakterije. Iste rezultate dobili su WETTERWICK i sur. (2013.) također koristeći metodu multipleks lančanu reakciju polimerazom ali prethodno uzgajajući bakteriju *C. difficile* u selektivnom mediju. Općenito, uloga bakterije *C. difficile* u nastanku kliničkih znakova bolesti probavnog sustava u pasa je nerazjašnjena upravo iz razloga što se toksogeni sojevi i toksini ove bakterije mogu naći i u fecesu zdravih pasa, što upućuje na to da zdravi psi mogu biti subklinički inficirani odnosno imati toksine A i B prisutne u probavnom sustavu bez kliničkih znakova bolesti (SILVA i sur., 2013.) U ovom istraživanju u zdravih životinja utvrđen je jedino *tpi* gen odnosno netoksogeni soj (A-B-), za kojeg se prema dosadašnjim istraživanjima smatra da ne dovodi do razvoja kliničkih znakova probavnog sustava (MARKS i sur., 2011.; AVBERŠEK, 2017.). Naime, pojedina istraživanja navode da ukoliko netoksogeni soj kolonizira sluznicu crijeva zdravih ljudi, pasa i svinja znatno se smanjuje rizik od infekcije toksogenim sojem ove bakterije i posljedičnog razvoja proljeva (CLOOTEN i sur., 2008.; SILVA i sur., 2013.).

S druge strane, u nekim od ranije provedenih istraživanja, u pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava prisutnost bakterije *C. difficile* utvrđena je u rasponu od 19 do 22% slučajeva, pri čemu je bakterija izdvojena uzgojem na hranjivoj podlozi iz obrisaka rektuma, a prisutnost njezinih gena za toksine u fecesu utvrđena je PCR metodom (STRUBLE i sur., 1994.; CLOOTEN i sur., 2008.). Nadalje, nakon uzgoja bakterije u kulturi korištenjem PCR metode prisutnost ove bakterije utvrđena je u 6,7%, odnosno 25% uzoraka fecesa (KOENE i sur., 2012.; ANDRES-LASHERAS i sur., 2018.), dok je izravnim izdvajanjem DNK iz uzoraka fecesa utvrđena u čak 93,1% slučajeva (SAMIR i sur., 2021.). U ovom istraživanju, u svega 3,5% uzoraka fecesa utvrđena je prisutnost gena bakterije *C. difficile* u pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava što je znatno niže u odnosu na prethodno spomenuta istraživanja. HUSSAIN i sur. (2015.) tumače da su razlike u rezultatima dobivene u istraživanjima posljedica korištenja različitih dijagnostičkih metoda, brojnosti istraživane skupine pasa i njihovih dobnih kategorija te provođenje uzorkovanja u različitim geografskim područjima.

U ovom istraživanju, od četiri uzorka fecesa u kojima je utvrđena prisutnost bakterije *C. difficile* iz skupine pasa s kliničkim znakovima probavnog sustava, u tri psa (75%) potvrđena je prisutnost *tcdA* gena, odnosno toksogenog soja bakterije *C. difficile* koji proizvodi toksin A (A+B-). MARKS i sur. (2002.) su u približno jednakom broju uzoraka (70,6%) utvrdili

prisutnost toksogenog soja, međutim onog koji proizvodi oba toksina (A+B+), jednako kao i GHAVIDEL i sur. (2015.) u čijem je istraživanju 66,6% izolata bilo toksogeno (A+B+). U odnosu na ukupan broj pasa uključenih u istraživanje (zdravih i s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava), u ovom istraživanju utvrđena je prisutnost toksogenog soja (A+B-) u 2,6% pasa, dok su primjerice ANDRES-LASHERAS i sur. (2018.) RFLP metodom utvrdili 4,4% toksogenih sojeva (A+B+) u istraživanoj skupini životinja, a HUSSAIN i sur. (2015.) utvrdili su prisutnost toksogenog soja u 8,5% uzoraka (A+B+). Također, u ovom istraživanju ustanovljeno je da je vjerojatnost prisutnosti toksogenog soja bakterije *C. difficile* bila 4,5 puta veća u pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava u odnosu na zdrave pse, što je slično rezultatima koje su dobili DINIZ i sur. (2018.) koji su utvrdili 5 puta veću vjerojatnost.

SILVA i sur. (2013.) imunoenzimnim testom utvrdili su prisutnost toksina A i B bakterije *C. difficile* u 36,8% uzoraka fecesa pasa, od čega je njih 28% imalo proljev, a 8,8% imalo je formiranu stolicu te su utvrdili statistički značajnu povezanost prisutnosti toksina ove bakterije s pojavom proljeva. U ovom istraživanju, sva tri psa iz skupine pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava u kojih je utvrđen *tcdA* gen odgovoran za proizvodnju toksina A odnosno toksogeni soj bakterije *C. difficile* (A+B-) imala su vodeni proljev. U ranije provedenim istraživanjima, prisutnost proljeva povezana je s prisutnošću toksogenog soja bakterije *C. difficile* u fecesu pasa, pri čemu se spominje i krvavi proljev s mogućim nastankom sepse i letalnim ishodom (WEESE i sur., 2001.; CAVE i sur., 2002.; MARKS i sur., 2002.; MARKS i sur., 2011.). Osim toga, RAMOS i sur. (2021a) su nastanak krvavog proljeva prilikom CDI povezali s alergijom na hranu utvrđenu u jednog psa i primjenom antimikrobne terapije u drugog. Također, u sva tri psa u kojih je utvrđena prisutnost *tcdA* gena bakterije *C. difficile*, odnosno toksogenog soja bakterije *C. difficile* A (A+B-) u ovom istraživanju, zabilježena je prisutnost povraćanja dva do tri ili više od tri puta dnevno i stupanj dehidracije u rasponu od 5 do 10%. Međutim, kod jedne životinje iz skupine pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava utvrđena je prisutnost jedino *tpi* gena, odnosno netoksogenog soja bakterije *C. difficile* (A-B-) unatoč prisutnim kliničkim znakovima gastroenteritisa, pri čemu je navedena životinja imala krvavi proljev, nije imala apetit te je povraćala više od tri puta dnevno. Krvavi proljev moguć je nalaz prilikom CDI, međutim u fecesu ovog psa utvrđena je prisutnost i *cpe* gena bakterije *C. perfringens* odgovornog za sintezu enterotoksina, stoga je vjerojatnije da je njome uzrokovana takva klinička slika, a ne netoksogenim sojem bakterije *C. difficile*. DINIZ i sur. (2018.) opisali su koinfekcije tokogenim sojevima bakterije *C. difficile* i *C. perfringens* tipom A koji proizvodi enterotoksin u deset pasa. Dosadašnja istraživanja opisivala su koinfekcije s ove dvije bakterije te nekim drugim enteropatogenima u pasa s proljevom,

međutim u svim slučajevima bila je riječ o toksogenom soju bakterije *C. difficile* (SILVA i sur., 2013.; DINIZ i sur., 2016.; DINIZ i sur., 2018.).

Nadalje, ovakav nalaz u suprotnosti je s rezultatima istraživanja koja su proveli SILVA i sur. (2013.) i ALVAREZ-PEREZ i sur. (2015.), gdje je prisutnost netoksogenih sojeva utvrđena samo u zdravih pasa. WETTERWICK i sur. (2013.) utvrdili su prisutnost *tcdA* gena samo u pasa s proljevom, dok u fecesu zdravih životinja on nije bio prisutan. Nasuprot tome, u ovom istraživanju *tcdA* gen također je pronađen isključivo u pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. Međutim, potrebno je napomenuti da su navedeni autori utvrdili prisutnost *tcdA* gena PCR metodom genetskog materijala bakterije dobivene kulturnim uzgojem iz uzoraka fecesa.

Predisponirajući čimbenici za koje se pretpostavlja da su povezani s razvojem CDI u pasa su brojni, no nijedan od njih nije još u potpunosti razjašnjen zbog različitosti rezultata dobivenih u provedenim istraživanjima. Neki autori utvrdili su da su stacioniranje životinja i antimikrobna terapija statistički značajni kao predisponirajući čimbenici za razvoj CDI u pasa (DUIJVESTIJN i sur., 2016.; VIEGAS i sur., 2020.; RAMOS i sur., 2021a). Tako SILVA i sur. (2014.) i HUSSAIN i sur. (2015.) navode da je antimikrobna terapija predisponirajući čimbenik za razvoj CDI, dok STRUBLE i sur. (1994.) i CAVE i sur. (2002.) tvrde suprotno. U ovom istraživanju, psi kod kojih je utvrđena prisutnost toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-) bili su na terapiji antimikrobnim pripravcima: pas 4 bio je na terapiji amoksisilin-klavulanskom kiselinom i sulfametoksazolom, pas 5 ampicilinom i amoksisilin-klavulanskom kiselinom, a pas 6 ampicilinom i enrofloksacinom. S obzirom da je 87% pasa u ovom istraživanju bilo na antimikrobnoj terapiji, a samo u njih 5% utvrđena je prisutnost toksogenog soja ove bakterije (A+B-), vrlo je vjerojatno da primjena antimikrobnih pripravaka nije imala utjecaj na pojavnost toksogenih sojeva bakterije *C. difficile* i kliničkih znakova bolesti probavnog sustava. Također, u istraživanju koje su proveli DINIZ i sur. (2018.) utvrđeno je da je samo jedna životinja kod koje je utvrđen toksogeni soj (A+B+) bakterije *C. difficile* bila na terapiji trimetoprim-sulfametoksazolom. Liječenje CDI provodi se metronidazolom, antimikrobnim pripravkom koji se dosada pokazao učinkovitim u liječenju ove infekcije. Međutim, u istraživanju koje su proveli WETTERWICK i sur. (2013.) kod jednog soja bakterije *C. difficile* utvrđena je rezistencija na metronidazol, stoga je izrazito važno ispitivati antimikrobnu osjetljivost ovog uzročnika ne samo u svrhu provođenja učinkovite antimikrobne terapije već i zbog njihovog zoonotskog potencijala te pojave sve većeg broja rezistentnih sojeva u humanoj medicini (FINSTERWALDER i sur., 2022.).

Dobna predispozicija navodi se u drugih vrsta životinja, primjerice svinja i konja, kod kojih se CDI češće javlja u mlađih životinja u odnosu na starije (AVBERŠEK i sur., 2017.), međutim u pasa još uvijek nije razjašnjena. USUI i sur. (2014., 2018.) nisu utvrdili značajnu razliku u prisutnosti toksina bakterije *C. difficile* u odraslih pasa u odnosu na štenad, kao i WEESE i sur. (2001.), HUSSAIN i sur. (2015.) i GHAVIDEL i sur. (2015.). S druge strane, ALVAREZ-PEREZ i sur. (2015.) i SAMIR i sur. (2021.) utvrdili su da su toksogeni sojevi češće prisutni u starijih pasa u odnosu na mlađe pse. U ovom istraživanju, iako su sva tri psa u kojih je utvrđen toksogeni soj bakterije *C. difficile* bila mlađa od godinu dana, teško je govoriti o dobnoj predispoziciji s obzirom da je u svega 2,6% uzoraka fecesa utvrđen toksogeni soj.

S obzirom na mali broj pasa u kojih je utvrđena prisutnost toksogenog soja bakterije *C. difficile* (A+B-) u odnosu na ukupan broj životinja u ovom istraživanju te utvrđene prisutnosti drugih dobro poznatih enteropatogena u pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, poput parvovirusa i bakterije *C. perfringens*, ne može se utvrditi uloga ove bakterije u nastanku kliničkih znakova bolesti ali niti isključiti mogućnost koinfekcije. Uz navedeno, zbog same kompleksnosti epizootiologije, kliničke slike bolesti i dijagnostike ovog uzročnika potrebna su daljnja istraživanja u svrhu rasvjetljavanja njezine uloge u nastanku gastroenteritisa pasa.

Ovo je prvo istraživanje o prisutnosti bakterije *C. difficile* u fecesu pasa u Republici Hrvatskoj te doprinosi rastućim dokazima o prisutnosti netoksogenih i toksogenih sojeva bakterije *C. difficile* u fecesu pasa i ukazuje na potrebitost opsežnijih studija kako bi se utvrdila konkretna uloga ove bakterije u nastanku različitih kliničkih znakova bolesti probavnog sustava u pasa. Osim navedenog, uputno je provoditi dijagnostiku CDI u pasa, naročito zbog njezinog zoonotskog potencijala te sve većeg javnozdravstvenog značaja u veterinarskoj medicini.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Od 116 analiziranih uzoraka fecesa pasa, u njih 5,2% utvrđena je prisutnost *tpi* gena odnosno bakterije *C. difficile*. U 2,6% utvrđena je prisutnost *tcdA* gena, odnosno toksogenog soja bakterije *C. difficile* koji proizvodi toksin A (A+B-), a ostalih 2,6% bili su netoksogeni sojevi bakterije *C. difficile* (A-B-).
2. U zdravih životinja utvrđena je prisutnost jedino *tpi* gena, odnosno netoksogeni soj bakterije *C. difficile* (A-B-).
3. U tri psa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava u kojih je utvrđena prisutnost bakterije *C. difficile* bio je prisutan *tcdA* gen za toksin A, odnosno toksogeni soj (A+B-), što ukazuje na moguću povezanost toksogenih sojeva s nastankom kliničkih znakova bolesti probavnog sustava, dok je u jednog psa utvrđena prisutnost netoksogenog soja (A-B-).
4. U ovom istraživanju multipleks lančana reakcija polimerazom pokazala se kao dobar izbor metode u svrhu utvrđivanja prisutnosti *tpi*, *tcdA* i *tcdB* gena bakterije *C. difficile*.
5. Imajući u vidu patogenost bakterije *C. difficile* i njezin zoonotski potencijal, izrazito je važno provoditi dijagnostiku CDI u pasa u veterinarskoj praksi te nastaviti daljnja istraživanja o njezinoj ulozi u nastanku bolesti probavnog sustava u pasa.

## 7. LITERATURA

AL SAIF, N., J. S. BRAZIER (1996): The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J. Med. Microbiol. 45, 133-137.

ALBUQUERQUE, C., D. PAGNOSSIN, K. LANDSGAARD, J. SIMPSON, D. BROWN, J. IRVINE, D. CANDLISH, A. E. RIDYARD, G. DOUCE, C. MILLINS (2021): The duration of antibiotic treatment is associated with carriage of toxigenic and nontoxigenic strains of *Clostridioides difficile* in dogs. PLoS One. 16, 1-13.

ALLENSPACH, K. (2015): Diagnosis of small intestinal disorders in dogs and cats. Clin. Lab. Med. 35, 521-534.

ALVAREZ-PEREZ, S., J. L. BLANCO, T. PELAEZ, M. P. LANZAROT, C. HARMANUS, E. KUJIPER, M. E. GARCIA (2015): Faecal shedding of antimicrobial resistant *Clostridium difficile* strains by dogs. J. Small Anim. Pract. 56, 190–195.

ANDRES-LASHERAS, S. I. MARTIN-BURRIEL, R. C. MAINAR-JAIME, M. MORALES, E. KUIJPER, J. L. BLANCO, M. CHIRINO-TREJO, R. BOLEA (2018): Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. BMC Vet. Res. 14, 1-8.

ANIS, E., D. BARNARD, A. BARNARD, D. J. KELLY, L. E. REDDING (2021): Performance of commercial PCR assays to detect toxigenic *Clostridioides difficile* in the feces of puppies. Vet. Med. Sci. 1-6.

ARROYO, L.G., S. A. KRUTH, B. M. WILLEY, H. R. STAEMPFLI, D. E. LOW, J. S. WEESE (2005): PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J. Med. Microbiol. 54, 163-166.

AVBERŠEK, J. (2017): Laboratory detection of *Clostridium difficile* in animals: a review. Veterinarska stanica. 48, 465-476.

AWAD, M. M., P. A. JOHANESEN, G. P. CARTER, E. ROSE, D. LYRAS (2015): *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. Gut Microbes. 5, 579-593.

BARTLETT, J. G. (1990): *Clostridium difficile*: Clinical considerations. Rev. Infect. Dis. 12, 243-251.

- BAVERUD, V. (2002): *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. Vet. Quart. 24, 203-219.
- BERRY, A. P., P. N. LEVETT (1986): Chronic diarrhoea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. Vet. Rec. 118, 102-103.
- BOYANTON, B. L. JR., P. SURAL, C. R. LOOMIS, C. PESTA, L. GONZALEZ-KRELLWITZ, B. ROBINSON-DUNN, P. RISKAL (2012): Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *Clostridium difficile* detection. J. Clin. Microbiol. 50, 640-645.
- BRAZIER, J. S., S. P. BORRIELLO (2000): Microbiology, epidemiology and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Ct Microbiology. 250, 1-33.
- BUSCH K., J. S. SUCHODOLSKI, K. A. KUHNER, Y. MINAMOTO, J. M. STEINER, R. S. MUELLER, K. HARTMANN, S. UNTERER (2015): *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. Vet. Rec. 176, 253.
- CARTER, G. P., J. I. ROOD, D. LYRAS (2012): The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. Trends Microbiol. 20, 21-29.
- CARVALHO, G. M., C. P. RAMOS, F. C. F. LOBATO, R. M. C. GUEDES, P. R. GIARETTA, R. O. S. SILVA (2022): Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. Anaerobe. 75, 1-5.
- CAVE, N. J., S. L. MARKS, P. H. KASS, A. C. MELLI, M. A. BROPHY (2002): Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. JAVMA. 221, 52-59.
- CHADRASEKARAN, R., D. B. LACY (2017): The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. FEMS Microbiol. Rev. 41, 723-750.
- CHOUICHA, N., S. L. MARKS (2006): Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. J. Vet. Diagn. Invest. 18, 182-188.
- CLOOTEN, J. K., S.A. KRUTH, J. S. WEESE (2003): Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. J. Vet. Intern. Med. 17, 123.

COHEN, S. H., D. N. GERDING, S. JOHNSON, C. P. KELLY, V. G. LOO, L. C. MCDONALD, J. PEPIN, M. H. WILCOX (2010): Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the Infectious diseases society of America (IDSA). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 31, 431-455.

CROBACH, M. J. T., J. J. VERNON, V. G. LOO, L. Y. KONG, S. PECHINE, M. H. WILCOX, E. J. KUIJPER (2018): Understanding *Clostridium difficile* colonization. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1-29.

DEL PRETE, R., L. RONGA, G. ADDATI, R. MAGRONE, A. ABBASCIANO, M. DECIMO, G. MIRAGLIOTTA (2019): *Clostridium difficile*. A review on an emerging infection. *Clin. Ter.* 170, 41-47.

DI BELLA, S., P. ASCENZI, S. SIARAKAS, N. PETROSILLO, A. DI MASI (2016): *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins.* 8, 134.

DINIZ, A. N., F. M. COURA, M. RUPNIK, V. ADAMS, T. L. STENT, J. I. ROOD, C. A. de OLIVEIRA JR., F. C. F. LOBATO, R. O. SILVEIRA SILVA (2018): The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe.* 49, 58-62.

DIONNE, L. L., F. RAYMOND, J. CORBEIL, J. LONGTIN, P. GERVAIS, Y. LONGTIN (2013): Correlation between *Clostridium difficile* bacterial load, commercial Real-Time PCR cycle thresholds, and results of diagnostic tests based on enzyme immunoassay and cell culture cytotoxicity assay. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3624-3630.

DUIJVESTIJN, M. L. MUGHINI-GRAS, N. SCHURMAN, W. SCHIJF, J. A. WAGENAAR, H. EGBERINK (2016): Enteropathogen infections in canine puppies: (Co-)occurrence, clinical relevance and risk factors. *Vet. Microbiol.* 195, 115–122.

FEKETY, R., J. SILVA, R. TOSHNIWAL, M. ALLO, J. ARMSTRONG, R. BROWNE, J. EBRIGHT, G. RIFKIN (1979): Antibiotic-associated colitis: Effects of antibiotics on *Clostridium difficile* and the disease in hamsters. *Rev. Infect. Dis.* 1, 386-397.

FINSTERWALDER, S. K., I. LONČARIĆ, A. CABAL, M. P. SZOSTAK, L. M. BARF, M. MARZ, F. ALLERBERGER, I. A. BURGNER, A. TICHY, A. T. FELER, S. SCHWARZ, S. MONECKE, R. EHRICHT, W. RUPPITSCH, J. SPERGSER, F. KUNZEL (2022): Dogs as

carriers of virulent and resistant genotypes of *Clostridioides difficile*. *Zoonoses Public Hlth.* 00, 1-9.

GEORGE, W. L., V. L. SUTTER, D. CITRON, S. M. FINEGOLD (1979): Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 9, 214-219.

GHAVIDEL, M., H. SALARI SEDIGH, J. RAZMYAR (2015): Isolation of *Clostridium difficile* and molecular detection of binary and A/B toxins in faeces of dogs. *Iran. J. Vet. Res.* 17, 273-276.

GOUDARZI, M., S. S. SEYEDJAVADI, H. GOUDARZI, E. MEHDIZADEH AGHDAM, S. NAZERI (2014): *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, pathogenesis, risk factors, and therapeutic options. *Scientifica.* 1-9.

GREENE, C. E. (2015): *Infectious diseases of the dog and cat*, 4th ed., Saunders Elsevier. 395-398.

GRIFFITHS, D., W. FAWLEY, M. KACHRIMANIDOU, R. BOWDEN, D. W. CROOK, R. FUNG, T. GOLUBCHIK, R. M. HARDING, K. J. M. JEFFERY, K. A. JOLLEY, R. KIRTON, T. E. PETO, G. REES, N. STOESSER, A. VAUGHAN, A. S. WALKER, B. C. YOUNG, M. WILCOX, K. E. DINGLE (2009): Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 770-778.

GUMERLOCK, P. H., Y. J. TANG, J. B. WEISS, J. SILVA Jr. (1993): Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 31, 507-511.

HALL I., O'TOOLE, E. (1935): Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am. J. Dis. Child.* 49, 390-402.

HAMMOND, G. A., J. L. JOHNSON (1995): The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb. Pathog.* 19, 203-213.

HUI, L., K. ZANG, M. WANG, F. SHANG, G. ZHANG (2018): Coculture with *Clostridium difficile* promotes apoptosis of human intestinal microvascular endothelial cells. *J. Int. Med. Res.* 46, 4731-4739.

HUSSAIN, I., R. K. SHARMA, P. BORAH, S. RAJKHOWA, I. HUSSAIN, L. M. BARKALITA, D. HASIN, M. CHAUDHURY, M. RUPNIK, N. K. DEKA, G. K. SAIKIA (2015): Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from pet dogs in Assam, India. *Anaerobe.* 36, 9-13.

- JANEŽIČ, S., M. RUPNIK (2010): Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: Pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Method. Mol. Microbiol.* 4, 55-65.
- JANEŽIČ, S., M. OCEPEK, V. ZIDARIČ, M. RUPNIK (2012): *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiol.* 12, 48.
- JANEŽIČ, S., S. MLAKAR, M. RUPNIK (2018): Dissemination of *Clostridium difficile* spores between environment and households: Dog paws and shoes. *Zoonoses Public Hlth.* 65, 669-674.
- JOSHI, L.T., D. S. PHILLIPS, C. F. WILLIAMS, A. ALYOUSEF, L. BAILLIE (2012): Contribution of spores to the ability of *Clostridium difficile* to adhere to surfaces. *Appl. Environ. Microb.* 78, 7671-7679.
- KATO, N., C. Y. OU, H. KATO, S. L. BARTLEY, C. C. LUO, G. E. KILLGORE, K. UENO (1993): Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 167, 455-458.
- KINK, J. A., J. A. WILLIAMS (1998): Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. *Infect. Immun.* 66, 2018–2025.
- KNETSCH, C.W., T. R. CONNOR, A. MUTREJA, S. M. van DROP, I. M. SANDERS, H. P. BROWNE, D. HARRIS, L. LIPMAN, E. C. KEESSEN, J. CORVER, E. J. KUIJPER, T. D. LAWLEY (2014): Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveill.* 19, 1-24.
- KNIGHT, D. R., M. M. SQUIRE, T. V. RILEY (2013): Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3856–3862.
- KOENE, M. G., D. MEVIUS, J. A. WAGENAAR, C. HARMANUS, M. P. HENSGENS, A. M. MEETSMA, F. F. PUTIRULAN, M. A. VAN BERGEN, E. J. KUIJPER (2012): *Clostridium difficile* in Dutch animals: Their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 778–784.
- LAWSON, P. A., D. M. CITRON, K. L. TYRRELL, S. M. FINEGOLD (2016): Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prevot 1938. *Anaerobe.* 40, 95-99.

LEFEBVRE, S. L., R. J. REID-SMITH, P. BOERLIN, J. S. WEESE (2008): Evaluation of the risks of shedding *Salmonellae* and other potential pathogens by therapy dogs fed raw diets in Ontario and Alberta. *Zoonoses Public Health*. 55, 470–480.

LEFEBVRE, S. L., R. J. REID-SMITH, D. WALTNER-TOEWS, J. S. WEESE (2009): Incidence of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, and other health-care-associated pathogens by dogs that participate in animal-assisted interventions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 1404–1417.

LEMEE L., A. DHALLUIN, S. TESTELIN, M. A. MATTRAT, K. MAILLARD, J. F. LEMELAND, J. L. PONS (2004): Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (toxin A), and *tcdB* (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5710–5714.

LIM, S. C., D. R. KNIGHT, T. V. RILEY (2019): *Clostridium difficile* and one health. *Clin. Microbiol. Infect.* 1-22.

MARKS, S. L., E. J. KATHER, P. H. KASS, A. C. MELLI (2002): Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 533–540.

MARKS, S. L., E. J. KATHER (2003): Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet. Microbiol.* 94, 39–45.

MARKS, S. L., S. C. RANKIN, B. A. BYRNE, J. S. WEESE (2011): Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 1195–1208.

METCALF, D., B. P. AVERY, N. JANECKO, N. MATIC, R. REID-SMITH, J. S. WEESE (2011): *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*. 17, 85-86.

NAKAMURA, S., S. NAKASHIO, M. MIKAWA, K. YAMAKAWA, S. OKUMURA, S. NISHIDA (1981): Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* from different sources. *Microbiol. Immunol.* 26, 25-30.

- NORMAN, K. N., R. B. HARVEY, H. M. SCOTT, M. E. HUME, K. ANDREWS, A. D. BRAVLEY (2009): Varied prevalence of *Clostridium difficile* in an integrated swine operation. *Anaerobe*. 15, 256-260.
- OFOSSU, A. (2016): *Clostridium difficile* infection: a review of current and emerging therapies. *Annals of gastroenterology : Quarterly publication of the Hellenic society of gastroenterology*. 29, 147-154.
- O'NEILL, G., J. E. ADAMS, R. A. BOWMAN, T. V. RILEY (1993): A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. *Epidemiol. Infect.* 111, 257-264.
- PERSSON, S., M. TORPDAHL, K. E. P. OLSEN (2008): New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 1057–1064.
- POPOFF, M. R. (2017): *Clostridium difficile* and *Clostridium sordellii* toxins, proinflammatory versus anti-inflammatory response. *Toxicon*. 149, 54-64.
- RABOLD, D., W. ESPELAGE, M. ABU SIN, T. ECKEMANN, A. SCHNEEBERG, H. NEUBAUER, N. MOBIUS, K. HILLE, L. H. WIELER, C. SEYBOLDT, A. LUBKE-BECKER (2018): The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. *PLoS One*. 13, 1-12.
- RAMOS, C. P., E. O. LOPES, C. A. OLIVEIRA JR., A. N. DINIZ, F. C. F. LOBATO, R. O. S. SILVA (2020): Immunochromatographic test and ELISA for the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and A/B toxins as an alternative for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile*-associated diarrhea in foals and neonatal piglets. *Braz. J. Microbiol.* 51, 1459–1462.
- RAMOS, C. P., A. N. DINIZ, M. G. RIBEIRO, C. L. DE PAULA, E. A. COSTA, L. SONNE, S. T. PEREIRA, C. E. BASTOS LOPEZ, M. C. RENNO, R. O. S. SILVA (2021a): Enteric organisms detected in feces of dogs with bloody diarrhea: 45 cases. *Journal pre-proof*. 45, 1-38.
- RAMOS, C. P., A. N. DINIZ, S. M. LEITE, F. C. F. LOBATO, S. T. PEREIRA, M. C. RENNO, E. de OLIVIERA FERREIRA, R. O. S. SILVA (2021b): Evaluation of an immunochromatographic test for the detection of glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in dogs. *Braz. J. Microbiol.* 52, 2555-2558.



RIEGELER, M., R. SEDIVY, C. POTHOUKAKIS, G. HAMILTON, J. ZACHERL, G. BISCHOF, E. COSENTINI, W. FEIL, R. SCHIESSEL, J. T. LAMONT (1995): *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. J. Clin. Invest. 95, 2004-2011.

RODRIGUEZ, C., B. TAMINIAU, J. VAN BROECK, M. DELMEE, G. DAUBE (2016): *Clostridium difficile* in food and animals: A comprehensive review. Adv. Exp. Med. Microbiol. 65-92.

RODRIGUEZ, C., B. TAMINIAU, L. BOUCHAFA, S. ROMIJN, J. VAN BROECK, M. DELMEE (2019): *Clostridium difficile* beyond stools: dog nasal discharge as a possible new vector of bacterial transmission. Heliyon. 5, 1-5.

RODRIGUEZ-PALLARES, S., P. FERNANDEZ-PALACIOS, E. JURADO-TARIFA, F. ARROYO, M. A. RODRIGUEZ-IGLESIAS, F. GALAN-SANCHEZ (2022): Transmission of toxigenic *Clostridiodes difficile* between a pet dog with diarrhea and a 10-month-old infant. Anaerobe. 74, 1-10.

ROUSSEAU, C., I. POILANE, L. DE PONTUAL, A. C. MAHERAULT, A. LE MONNIER, A. COLLIGNON (2012): *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. Clin. Infect. Dis. 55, 1209-1215.

RUPNIK, M., S. JANEŽIČ (2016): An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. J. Clin. Microbiol. 54, 13–18.

SCHNEEBERG, A., M. RUPNIK, H. NEUBAUER, C. SEYBOLDT (2012): Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. Anaerobe. 18, 484–488.

SCHORA, D. M., L. PETERSON, E. A. USACHEVA (2018): Immunological stability of *Clostridium difficile* toxins in clinical specimens. Infect. Cont. Hosp. Ep. 39, 434-438.

SILVA, S. R. O., R. L. R. SANTOS, P. S. PIRES, L. C. PEREIRA, S. T. PEREIRA, M. C. DUARTE, R. A. DE ASSIS, F. C. F. LOBATO (2013): Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. Braz. J. Microbiol. 44, 133-137.

SILVA, R. O. S., M. L. D'ELIA, E. P. T. TEIXEIRA, P. L. L. PEREIRA, D. F. M. SOARES, A. R. CAVALCANTI, A. KOCUVAN, M. RUPNIK, A. L. Q. SANTOS, C. A. OLIVEIRA

JR., F. C. F. LOBATO (2014): *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe*. 28, 207-211.

SILVA, R. O., C. A. de OLIVEIRA JR., D. S. BLANC, S. T. PEREIRA, M. C. RENNO, A. VASCONCELOS, F. C. F. LOBATO (2018): *Clostridioides difficile* infection in dogs with chronic-recurring diarrhea responsive to dietary changes. *Anaerobe*. 51, 50-53.

SMITS, W.K., D. LYRAS, D. B. LACY, M. H. WILCOX, E. J. KUIJPER (2016): *Clostridium difficile* infection. *Primer*. 2, 1-20.

SONG, Y. H. Y. SHAO, X. CHENG, Y. GUO (2021): First case of periprosthetic joint infection due to *Clostridioides difficile* in China. *BMC Infect. Dis*. 21, 1-5.

STONE, N. E., L. C. SIDAK-LOFTIS, J. W. SAHL, A. J. VAZQUEZ, K. B. WIGGINS, J. D. GILLECE, N. D. HICKS, J. M. SCHUPP, J. D. BUSCH, P. KEIM, D. M. WAGNER (2016): More than 50% of *Clostridium difficile* isolates from pet dogs in Flagstaff, USA, carry toxigenic genotypes. *PLoS One*. 11, 1-21.

STRUBLE, A. L., Y. J. TANG, P. H. KASS, P. H. GUMERLOCK, B.R. MADEWELL, J. SILVA JR. (1994): Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *J. Vet. Diagn. Invest*. 6, 342–347.

UNTERER, S., K. BUSCH (2021): Acute hemorrhagic diarrhea syndrome in dogs. *Vet. Clin. Small. Anim*. 13, 1-14.

USUI, M., Y. NANBU, K. OKA, M. TAKASHI, T. INAMATSU, T. ASAI, S. KAMIYA, Y. TAMURA (2014): Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol*. 5, 513.

USUI. M., M. HARADA, F. KAWABATA, T. SATO, H. HIGUCHI, Y. TAMURA (2018): Prevalence of *Clostridium difficile* in Japanese cows and calves. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc*. 71, 261-265.

VIEGAS, F. M., C. P. RAMOS, R. G. C. XAVIER, E. O. LOPES, C. A. OLIVEIRA JR., R. M. BAGNO, A. N. DINIZ, F. C. F. LOBATO, R. O. SILVEIRA SILVA (2020): Fecal shedding of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *Clostridioides difficile* in dogs fed raw meat-based diets in Brazil and their owners' motivation. *PLoS One*, 15, 1-13.

- VOTH D. E., J. D. BALLARD (2005): *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. Clin. Microbiol. Rev. 18, 247–263.
- WEESE, J. S., H. R. STAEMPFLI, J. F. PRESCOTT, S. A. KRUTH, S. J. GREENWOOD, H. E. WEESE (2001): The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. J. Vet. Intern. Med. 15, 374–378.
- WEESE, J. S., T. WAKEFORD, R. REID-SMITH, J. ROUSSEAU, R. FRIENDSHIP (2010): Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. Anaerobe. 16, 501-504.
- WEESE, J. S. (2011): Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 41, 287–309.
- WEESE, J. S. (2020): *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. J. Vet. Diagn. Investig. 32, 213-221.
- WEI, Y., M. SUN, Y. ZHANG, J. GAO, F. KONG, D. LIU, H. YU, J. DU, R. TANG (2019): Prevalence, genotype and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates from healthy pets in Eastern China. BMC Infect. Dis. 19, 1-7.
- WETTERWICK, K., G. TROWALD-WIGH, L. FERNSTROM, K. KROVACEK (2013): *Clostridium difficile* in faeces from healthy dogs and dogs with diarrhea. Acta Vet. Scand., 55, 1-4.

## 8. SAŽETAK

Magda Kamber

Primjena multipleks lančane reakcije polimerazom za dokazivanje *tcdA* i *tcdB* gena za toksine bakterije *Clostridioides difficile* u fecesu pasa

*Clostridioides difficile* je gram-pozitivna, anaerobna, štapićasta, sporulirajuća bakterija koja proizvodi glavna dva toksina: toksin A i toksin B čija je sinteza kodirana *tcdA* odnosno *tcdB* genom. Smatra se da toksogeni sojevi dovode do nastanka različitih kliničkih znakova bolesti probavnog sustava, od blagih samoograničavajućih proljeva pa sve do teških oblika hemoragičnih gastroenteritisa. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost gena *tcdA* i *tcdB* za toksine bakterije *Clostridioides difficile* u fecesu zdravih pasa i pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava koristeći multipleks lančanu reakciju polimerazom te njihovu ulogu u nastanku probavnih poremećaja u pasa. U ovom istraživanju analizirano je 116 uzoraka fecesa pasa, odnosno 49 uzoraka fecesa zdravih pasa te 67 uzoraka fecesa pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. U 5,2% uzoraka utvrđena je prisutnost *tpi* gena bakterije *C. difficile*, od kojih je u 2,6% utvrđen toksogeni soj (A+B-), a u njih 2,6% netoksogeni soj (A-B-). U zdravih životinja utvrđena je prisutnost *tpi* gena, odnosno netoksogeni soj bakterije *C. difficile* (A-B-). U tri psa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava utvrđena je prisutnost *tcdA* gena za toksin A, odnosno toksogeni soj (A+B-), što ukazuje na moguću povezanost toksogenih sojeva s nastankom kliničkih znakova bolesti probavnog sustava, dok je u jednog psa iz te skupine utvrđen netoksogeni soj (A-B-). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potrebu daljnjeg rasvjetljavanja prisutnosti i uloge bakterije *C. difficile* u nastanku bolesti probavnog sustava u pasa.

**Ključne riječi:** *Clostridioides difficile*, *tcdA* i *tcdB* geni za toksine A i B, multipleks lančana reakcija polimerazom, pas, bolesti probavnog sustava

## 9. SUMMARY

Magda Kamber

Performance of multiplex polymerase chain reaction for detection of *tcdA* and *tcdB* genes of *Clostridioides difficile* toxins in feces of dogs

*Clostridioides difficile* is a gram-positive, anaerobic, rod-shaped, sporulating bacterium that produces two main types of toxins: toxin A and toxin B whose production is encoded by the *tcdA* and *tcdB* genes. Toxigenic strains are thought to lead to the occurrence of various gastrointestinal symptoms, ranging from mild self-limiting diarrhea to severe forms of hemorrhagic gastroenteritis. The aim of this study was to determine the presence of the *tcdA* and *tcdB* genes for *C. difficile* toxins in the feces of healthy dogs and dogs with symptoms of gastrointestinal disease using multiplex polymerase chain reaction, and to determine their role in the development of digestive disorders in dogs. In this study, 116 dog fecal samples were analyzed, i.e., 49 fecal samples from healthy dogs and 67 fecal samples from dogs with gastrointestinal symptoms. The *tpi* gene was detected in 5.2% of the fecal samples, with the toxigenic strain (A+B-) detected in 2.6%, and the non-toxigenic strain (A-B-) detected in 2.6% of the samples. In healthy animals, only the *tpi* gene was detected, i.e., a non-toxigenic strain of *C. difficile* (A-B-). In three dogs with symptoms of gastrointestinal disease the *tcdA* gene of toxin A was detected, i.e., a toxigenic strain (A+B+), indicating a possible association between toxigenic strains and the occurrence of gastrointestinal symptoms, while the sample of one dog from this group was identified as a non-toxigenic strain (A-B-). The results of this study indicate that further research is needed on the presence and role of *C. difficile* in the occurrence of gastrointestinal disease in dogs.

**Key words:** *Clostridioides difficile*, *tcdA* and *tcdB* genes for toxins A and B, multiplex polymerase chain reaction, dog, gastrointestinal disease

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. kolovoza 1996. u Dubrovniku, gdje sam pohađala Osnovnu školu Marina Getaldića i Umjetničku školu Luke Sorkočevića, smjer violina. Nakon završetka osnovnih škola, 2011. godine upisala sam Gimnaziju Dubrovnik, smjer Opća gimnazija, koju sam završila 2015. godine. Iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Posljednje dvije godine studija volontirala sam na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta, gdje sam imala priliku steći dodatna iskustva u kliničkom radu. Tijekom akademske godine 2021./22. bila sam demonstrator na kolegiju „Specijalna mikrobiologija“ na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom.

U sklopu Erasmus+ programa provela sam dva mjeseca na Veterinarskom sveučilištu u Budimpešti, gdje sam stekla osnovna znanja i vještine u laboratorijskoj dijagnostici zaraznih bolesti domaćih životinja iz područja virologije i bakteriologije.

Sudjelovala sam u pisanju rada „Infekcija virusom mačje imunodeficijencije“ kao glavni autor, koji je 2022. godine objavljen u časopisu „Veterinar“.

Stručnu praksu na šestoj godini studija odradila sam u specijalističkoj ambulanti za male životinje „Vetiva“ u Zagrebu. Sudjelovala sam na Šestom Hrvatskom kongresu veterinaru male prakse u Rovinju i Devetom međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“ u Zagrebu.