

SMJERNICE ZA MIKROBIOLOŠKU DIJAGNOSTIKU INFEKCIJA PROBAVNOG SUSTAVA

Verzija 1.0

otvoreno za komentare do 1.3.2019.

Vuković D¹, Antolović Požgain A^{1,2}, Roksandić Križan I^{1,2},
Ružman N³, ZujčićAtalić V^{1,2}, Bogdan M^{1,2}, Drenjančević D^{2,4}

¹ Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek

² Medicinski fakultet Osijek, Osijek

³ UniversityHospital North Tees, North TeesandHartlepool NHS Foundation Trust

⁴ Klinički bolnički centar Osijek, Osijek

Vuković D, Antolović Požgain A, Roksandić Križan I, Ružman N, ZujčićAtalić V, Bogdan M, Drenjančević D. Smjernice za mikrobiološku dijagnostiku infekcija probavnog sustava: smjernice za mikrobiološku dijagnostiku Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju Hrvatskog liječničkog zbora. Zagreb: Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju; 2018.

SADRŽAJ

PREDGOVOR

1. UVOD

1.1. Definicije

1.2. Mikrobiološki dijagnostički postupak

1.2.1. Osnovna bakteriološka pretraga

1.2.2. Dodatna bakteriološka pretraga

1.2.3. Proširene bakteriološke, virološke i parazitološke pretrage

1.3. Uzorci

1.3.1. Stolica

1.3.1.1. Transport i skladištenje

1.3.1.2. Nasađivanje uzorka

1.3.2. Rektalni bris

1.3.2.1. Transport i skladištenje

1.3.2.2. Nasađivanje uzorka

1.3.3. Sadržaj duodenuma, kolostome ili ileostome

1.3.3.1. Transport i skladištenje

1.3.3.2. Nasađivanje uzorka

1.3.4. Kriteriji za odbacivanje uzoraka

1.4. Evaluacija tijekom bolesti / kontrolni uzorci stolice

2. BAKTERIJSKE INFEKCIJE PROBAVNOG SUSTAVA

2.1. Kultivacija

2.2. Algoritmi postupanja u rutinskoj i dodatnoj dijagnostici bakterijskih uzročnika probavnih infekcija

2.3. Identifikacija najvažnijih uzročnika infekcija probavnog sustava

2.3.1. Identifikacija *Salmonella* spp.

2.3.2. Identifikacija *Campylobacter* spp.

2.3.3. Identifikacija *Shigella* spp.

2.3.4. Identifikacija *Escherichia coli* koja proizvodi Shiga toksin – STEC/VTEC

2.3.5. Identifikacija dijarogenih *Escherichia coli*- DEC

2.4. Identifikacija ostalih uzročnika infekcija probavnog sustava

- 2.4.1. Identifikacija *Vibrio* spp.
- 2.4.2. Identifikacija *Yersinia* spp.
- 2.4.3. Identifikacija *Helicobacter pylori*
 - 2.4.3.1. Kultivacija bioptičkih uzoraka i identifikacija *Helicobacter pylori*
 - 2.4.3.2. Detekcija antigena u stolici
- 2.5. Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove
- 2.6. Izdavanje nalaza
- 2.7. *Clostridium difficile* infekcije
 - 2.7.1. Definicija CDI
 - 2.7.2. Indikacije za testiranje na CDI
 - 2.7.3. Mikrobiološka dijagnostika CDI
- 3. VIRUSNE INFEKCIJE PROBAVNOG SUSTAVA
 - 3.1. Uvod
 - 3.2. Uzročnici virusnih gastroenteritisa/gastroenterokolitisa
 - 3.2.1. Rotavirus
 - 3.2.2. Adenovirus
 - 3.2.3. Norovirus
 - 3.2.4. Astrovirus
 - 3.2.5. Sapovirus
 - 3.3. Metode detekcije
 - 3.3.1. Uzorci, skladištenje i transport
 - 3.3.2. Dijagnostika virusnih gastroenteritisa
 - 3.4. Izdavanje nalaza
- 4. PARAZITARNE INFEKCIJE PROBAVNOG SUSTAVA
 - 4.1. Uzročnici
 - 4.1.1. Protozoa
 - 4.1.2. Flagelati
 - 4.1.3. Ciliati
 - 4.1.4. Coccidia
 - 4.1.5. Cryptogregaria
 - 4.1.6. Nematoda

4.1.7. Trematode

4.1.8. Cestode

4.2. Prikupljanje, transport i obrada uzoraka

4.2.1. Uzorci

4.2.1. Obrada uzoraka i metode dijagnostike

4.2.1.1. Direktni preparat svježe stolice

4.2.1.2. Specifična bojanja

4.2.1.3. Metode koncentracije

4.2.1.4. Perianalni otisak

4.2.1.5. Slanje uzoraka u referentni parazitološki laboratorij

4.3. Izdavanje nalaza

5. DIJAGNOSTIKA TROVANJA HRANOM

PREDGOVOR

Velik broj virusa, bakterija i parazita može uzrokovati dijarealne bolesti no od posebnog značaja su oni uzročnici koji imaju potencijal uzrokovati tešku kliničku sliku ili pokazuju veliki epidemijski potencijal. Kod blagih kliničkih slika izvan epidemije identifikacija uzročnika nije bitna i više od 80% proljeva ostaje nedokazane etiologije što ne utječe na algoritam kliničkog postupanja s bolesnikom. S obzirom na relativno lagan prijenos uzročnika hranom i vodom, dijarealne bolesti i danas predstavljaju jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu. Uzročnici poput šigela, koji i u malom broju mogu uzrokovati bolest, lako se šire i interhumanim prijenosom pogotovo u uvjetima prenapučenosti i loše higijene. Kao i u drugim područjima zaraznih bolesti učestalost pojedinih uzročnika se mijenja s vremenom. Prije nekoliko desetljeća enteropatogene *Escherichia coli* su uzrokovale teške kliničke slike u dojenčadi i male djece, no u razvijenim zemljama njihova je pojavnost danas tako rijetka da se u mnogim zemljama, a prema ovim smjernicama i u Hrvatskoj, više ne preporuča rutinsko testiranje na ove patogene. Pretragom na dijarogene *E.coli* kao i mnoge druge neuobičajene uzročnike treba, međutim, uključiti u analizi epidemija, kod teških kliničkih slika i kod sve češćih slučajeva dijareje u putnika. Osim povećane mobilnosti ljudi i prehrambenih proizvoda i shodno tome veće izloženosti neočekivanim patogenima, današnje doba obilježeno je i promjenom u incidenciji i kliničkoj slici izazvanoj toksinima *Clostridioides difficile*. Posebno poglavlje ovih smjernica posvećeno je dijagnostici *C. difficile* infekcije koje se zasniva na trenutnim preporukama Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti no zbog izuzetne dinamike u razvoju dijagnostičkih testova na ovom području za očekivati su moguće revizije u budućnosti. Pojava hipervirulentnih sojeva *C. difficile* i njihovo sve izraženije širenje u bolničkoj sredini skrenulo je pažnju mikrobiologa, kliničara i epidemiologa na bolničku sredinu kao poprište epidemija crijevnih infekcija za razliku od tradicionalnog doživljaja epidemija dijarealnih bolesti kao pretežno izvanbolničkog problema.

Ove smjernice su dobar putokaz mikrobiolozima kroz raznoliku dijagnostiku crijevnih infekcija no i za kliničare i epidemiologe predstavljaju dobar izvor informacija o paleti uzročnika uključenih u standardno testiranje i mogućnostima dodatnih testiranja u specifičnim kliničkim i epidemiološkim prilikama. Smjernice obuhvaćaju sve faze pretrage; predanalitičku fazu postavljanja indikacije, uzimanja i transporta uzorka, analitičku fazu laboratorijskog testiranja i postanalitičku fazu izdavanja i interpretacije nalaza. Kao i uvijek izvođenje i rezultat pretrage su najbolji kad postoji uska suradnja između mikrobiologa, kliničara i epidemiologa.

Prof.dr.sc. Arjana Tambić Andrašević, dr.med.
Predsjednica HDKM

1. UVOD

1.1. Definicije

Proljev ili dijareja je pasaža barem tri tekuće ili slabo formirane stolice na dan, pri čemu je bitna konzistencija, a ne frekvencija stolice tako da više od tri stolice na dan koje su formirane ne čine proljev(1). Često je popraćen s drugim simptomima kao što su grčevi u abdomenu, mučnina, slabost, povraćanje, vrućica i dehidracija (2).

Razlikujemo kliničke tipove proljeva:

-**Akutni proljev** traje kraće od 14 dana. Može biti voden ili krvav (dizenterija).

-**Perzistentni proljev** koji traje 14 dana ili duže(1)

Proljev je česta klinička manifestacija akutnog gastroenteritisa. Uzročnici mogu biti bakterije, virusi i paraziti no 60% akutnih proljeva nisu posljedica infekcije mikroorganizmima. Zarazni proljev je najčešće samoograničavajući i uzrokovan virusom, stoga antibiotska terapija nije potrebna, a samim tim ni dijagnostika. Zimi najčešće nije potrebno dokazivati uzročnika u vanbolničkih pacijenata (3). Većinu pacijenata ne treba testirati. Dijagnostička obrada potrebna je u bolesnika kod kojih proljev traje više od jednog dana, a povezan je s krvavo-služavom stolicom, vrućicom, jakim bolovima u abdomenu, simptomima sepse, dehidracijom, nedavnom uporabom antibiotika, u imunokompromitiranih, djece mlađe od 5 godina, starijih osobe tekada je identifikacija važna iz perspektive javnog zdravstva npr. osobe koji rade s hranom, odgajatelji u vrtiću, korisnici usluga u staračkim domovima i sličnim ustanovama tj. osobe koje imaju visok potencijal prenošenja infekcije na druge (1-4).

Prije započinjanja dijagnostičkih postupaka u obzir treba uzeti kliničke znakove i detaljne epidemiološke podatke (nedavno putovanje, slični simptomi u ostalih ukućana i/ili radnog kolektiva, vrsta zanimanja), dob, stanja bolesnika (trudnoća). Zabilježiti jesu li bolesnici febrilni, imaju li primjesa krvi u stolici, jesu li u posljednja 2-3 tjedna uzimali antibiotike, odnosno jesu li imunokompromitirani.

Kod djece <3 mj., osoba sa znakovima sepse ili crijevne groznice, bolesnika sa znacima generalizacije infekcije, imunokompromitiranih bolesnika, bolesnika sa visokorizičnim stanjima poput hemolitične anemije i osoba s pozitivnom epidemiološkom anamnezom za crijevnu groznicu, treba uzeti uzorak krvi za hemokulturu.

Crijevnom (enteričnom) groznicom smatra se febrilna osoba (sa ili bez dijareje) koja je putovala u područja gdje su uzročnici tog sindroma (*S. typhi*, *S. paratyphi*) endemični, ili febrilna osoba koja je bila u kontaktu s ljudima koji su nedavno bili izloženi tim uzročnicima ili su dokazani kliconoše. Osim uzimanja hemokulture dodatni uzorci mogu biti urin, dudenalna tekućina, punktati koštane srži.

1.2. Mikrobiološki dijagnostički postupak

- Svaki uzorak je u laboratoriju potrebno makroskopski pregledati (prisutnost krvi, gnoja sluzi, ličinki parazita; konzistencija i količina uzorka).
- Konzistencija uzorka stolice procjenjuje se prema bristolskoj skali (Bristol Stool Scale) pri čemu se uzorke stolice klasificira u 7 tipova. Proljevasta stolica definirana je tipom 6 i 7 (5, 6), odnosno, u rutini se proljevasta stolica često definira kao uzorak koji poprima oblik transportne posude.
- Prisutnost fekalnih leukocita i detekcija laktoferina u stolici ima ograničenu dijagnostičku vrijednost, i nije neophodna u dijagnostičkom postupku. U ovom trenutku nema dovoljno podataka za procjenu značaja pozitivnog nalaza fekalnog kalprotektina u uzorku stolice tijekom infektivne dijareje(4).

1.2.1. Osnovna bakteriološka pretraga

- Trenutna strategija je raditi minimalnu standardnu bakteriološku pretragu gdje se traže najčešći uzročnici(2).
- Uzorak stolice treba testirati na slijedeće patogene: *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Campylobacter* spp. (3).

1.2.2. Dodatna bakteriološka pretraga

Dodatne pretrage se trebaju naznačiti od strane kliničara ili mikrobiologa ukoliko ima dovoljno podataka o pacijentu.

- Pretrage na EHEC u slučaju krvavo-sluzavog proljeva, HUS-a, TTP-a, epidemije, putničke dijareje i u djece mlađe od 5 godina. U slučaju perzistentnog proljeva (> 14 dana) u djece <2 godine, septikemija odnosno teže kliničke slike, krvavo-sluzave stolice, epidemija odnosno u bolesnika s putničkom dijarejom, indicirano je učiniti i pretrage na DEC.
- Pretrage na *Yersinia* spp. treba raditi u bolesnika s perzistentnim abdominalnim bolovima (posebice u djece školske dobi koja se žale na abdominalne bolove u donjem desnom kvadrantu, tipične za apendicitis) te u bolesnika s vrućicom i pozitivnom epidemiološkom anamnezom za jersiniozu (izlaganje sirovim ili nedovoljno kuhanim svinjskim produktima).
- Pretrage na *Vibrio* spp. treba raditi u bolesnika s obilnim i učestalim „voluminoznim stolicama koje izgledaju poput rižine vode“, kod bolesnika koji su jeli morske plodove ili koji su se vratili s putovanja u područja u kojima je kolera endemična.
- Pretragom na *Clostridium difficile* se testiraju bolesnici stariji od 2 godine koji imaju dijareju nakon uzimanja antibiotika tijekom posljednjih 4-12 tjedana, osobe koje imaju

dijareju stečenu u zdravstvenoj ustanovi (proljevanje povezano s zdravstvenom skrbi), bolesnici s perzistentnom dijarejom. Za testiranje je dovoljno uzeti jedan uzorak proljevaste stolice (dokazuje se prisutnost GDH antigena i *C. difficile* toksina imunokromatografskim i /ili molekularnim testovima).

1.2.3. Proširene bakteriološke, virološke i parazitološke pretrage

- Preporučene su tijekom svih epidemija crijevnih bolesti, neovisno o težini kliničke slike, a prema dogovoru s kliničarom odnosno epidemiološkom službom. Epidemijske izolate potrebno je potvrditi u javnozdravstvenom laboratoriju i/ili Nacionalnom referentnom centru i arhivirati.

1.3. Uzorci

1.3.1. Stolica

- Optimalnim uzorkom za mikrobiološke pretrage kod infektivne dijareje smatra se svježi uzorak dijarealne stolice
- Uzorkovati je potrebno čim prije nakon pojave simptoma jer se količina patogena s vremenom smanjuje, te prije antimikrobne terapije
- U odraslih jedna stolica je dovoljna za detekciju većine bakterijskih patogena no slanjem drugog uzorka se povećava osjetljivost za 20%(3, 7). Slanje dva uzorka je dovoljno za detekciju >98% bakterijskih patogena (8, 9).
- Kod djece u prvom uzorku detektira se 98% enteropatogena(9).
- Ukoliko je poslano više od jednog uzorka oni moraju biti uzeti različitog dana
- Uzorak je optimalno uzeti u prva 72h od početka simptoma bolesti
- Uzorak se treba dati u čistu, suhu, noćnu posudu ili posudu stavljenju na toalet za tu prigodu (plastična kutija za hranu ili papir tj. plastična foliju stavljenju na toalet)iz koje se prebacuje u posudu s čepom na navoj koji onemogućuje izlijevanje sadržaja.
 - Posuda se odlaže u zatvorenu plastičnu vrećicu. Potrebno je prebaciti minimalno 5 ml proljevaste stolice ili 1-2g (veličine lješnjaka).
- Uzorak je neadekvatan ako u posudi ima ostatka sapuna, deterdženta ili dezinficijensa.
- Ne koristiti WC papir za uzimanje stolice jer neki imaju barijeve soli koje inhibiraju rast pojedinih uzročnika.
- Uzorak stolice treba biti tekuć ili poluformirani (poprima oblik spremnika) –Bristol skala tip 6 i 7.

1.3.1.1. Transport i skladištenje

- Uzorke treba transportirati i obrađivati u najkraćem mogućem roku.
- Uzorak je potrebno dostaviti u laboratorij unutar 2h ili do dostave čuvati na +4°C ne duže od 24h. Uzorci stariji od 24h smatraju se neadekvatnima.
- Ukoliko je dostava u laboratorij odgođena, preporuča se uzorak dostaviti u transportnoj podlozi (npr. Cary-Blair transportni medij) (10).

1.3.1.2. Nasađivanje uzorka

- Štapićem ili pipetom nanijeti jedan dio/kap fekalnog materijala na trećinu ili četvrtinu površine hranilišta, a potom za izolaciju pojedinačnih kolonija, raširiti inokulum sterilnom ezom.
- Alternativno mogu se koristiti automatizirani sustavi za nasađivanje ploča (plate streaker).
- Nasaditi uzorak veličine graška ili nekoliko kapi fekalnog materijala u tekuću podlogu za obogaćivanje. Nakon inkubacije, subkultivirati pomoću sterilne eze na odgovarajuće podloge.

1.3.2. Rektalni bris

- Uzorak uzeti iznimno, u slučaju kada se ne može uzorkovati stolica.
- Uzorkovati 2.5 cm iza analnog sfinktera. Rotirajućim pokretima pažljivo obrisati analne kriptе i izvući bris.

1.3.2.1. Transport i skladištenje

- Bris dostaviti u Cary-Blair transportnom mediju (2, 10).

1.3.2.2. Nasađivanje uzorka

- Vidi 1.3.1.2.

1.3.3. Sadržaj duodenuma, kolostome ili ileostome

- Uzorak staviti u sterilnu posudu (spremnik) s čepom na navoj koji onemogućuje izlivanje sadržaja.

1.3.3.1. Transport i skladištenje

- Vidi 1.3.1.1.

1.3.3.2. Nasađivanje uzorka

- Vidi 1.3.1.2.

1.3.4. Kriteriji za odbacivanje uzoraka

- Odbaciti stolice koje nisu pravilno pohranjene ili dostavljene jer nastaju promjene koje su štetne za *Shigella spp.*(2).
- Ukoliko ponovno uzimanje nije moguće, a liječnik inzistira da se uzorak obradi, u nalazu izdati napomenu: "**Odgoda dostave uzorka u laboratorij može kompromitirati izolaciju patogena**"
- Ukoliko je uzorak u transportnom mediju stariji od 3 dana na 4°C ili više od 24h na 25°C, tražiti novi uzorak.
- Odbaciti rutinsko testiranje pacijenata koji je hospitaliziran > 3 dana, osim ako pacijent ima HIV ili se radi o nozokomijalnoj infekciji.
- Obavijestiti ako je transportna posudica prepunjena.
- Ne obrađivati čvrste, tvrde stolice koje se teško inokuliraju.
- Ne obrađivati suhe briseve.
- Ne obrađivati stolice sa barijem.
- Proporuča se odbaciti više od 3 stolice od pacijenta unutar perioda od 3 tjedna ili više od jednog uzorka u danu.
- Za parazitološku obradu ne treba koristiti uzorke poslane u transportnim podlogama (4, 10).

1.4. Evaluacija tijeka bolesti / kontrolni uzorci stolice

- Praćenje kliconoštva, tj. ponavljanje bakterioloških pretraga stolice indicirano je kod bolesnika koji su imali dokazanu *S.typhi*, *S.paratyphi* ili netifusne salmoneloze za koje je procijenjeno da su od javnozdravstvenog značaja (epidemijski izolati, izolati kod osoba koje rade u prodaji, posluživanju i proizvodnji hrane, dječjim vrtićima, školskim kuhinjama, staračkim domovima, hospicijima ili ostalim zdravstvenim ustanovama) tj. u svim slučajevima kada to zatraži epidemiološka služba.

2. BAKTERIJSKE INFEKCIJE PROBAVNOG SUSTAVA

2.1. Kultivacija

- Podloge za kultivaciju, uvjeti i organizmi prikazani su u Tablici 2. i 3.

Tablica 2. Osnovne pretrage

Klinički detalji	uzorak	Standardna podloga	Inkubacija			Čitanje kultura (h)	Ciljni organizam
			Temp (°C)	Atmosfera	Vrijeme (h)		
Za rutinsko testiranje uzorke	Stolica	Campylobactersel ektivni agar	39-42	mikro- aerobno	≥48	≥40	<i>Campylobacter</i> spp.
		XLDagar/SS	35-37	zrak	16-24	≥16	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.
		ChauHuang onda presadi na: XLD ili SS	42	zrak	48	24-48	<i>Salmonella</i> spp.
		Manitol-selenit bujon/Rappaport onda presadi na: XLD ili SS	35-37 35-37	zrak zrak	8-12 16-24	≥16	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.

CCEY – Cikloserin cefokstin žumanjčani agar, CIN – Cefsulodin irgasan novobiocin agar, MTSB - Modificirani tripton soja bujon, SMAC - SorbitolMacConkey agar, TCBS – Tiosulfat citrat saharozni agar sa žučnim kiselinama, XLD – Ksilozna lizin deoksikolatni agar, SS – Salmonella Shigella agar, CSA - Campilobacter selektivni agar

Tablica 3. Dodatne pretrage

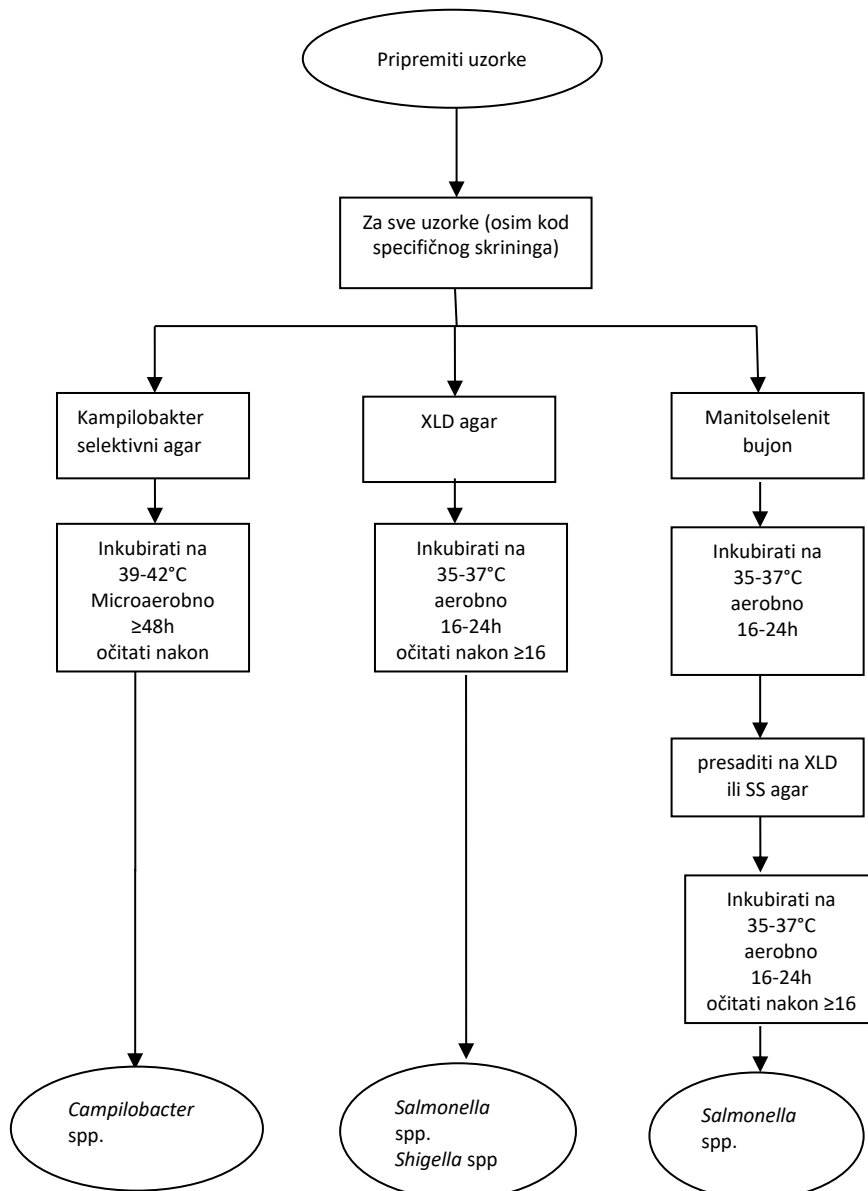
Klinički detalji	uzorak	Standardna podloga	Inkubacija			Čitanje kultura(h)	Ciljni organizam
			Temp °C	Atmosfera	Vrijeme (h)		
Krvavo sluzav proljev (poluformirane ili tekuće stolice) Djeca ispod 5 godina Putnički proljev Epidemije Na zahtjev uz težu kliničku sliku	stolica	Detekcija verotoksina SMAC agar EMBA, ENDO agar, plava ploča (moguće obogaćivanje- MTSB)	35-37	zrak	16-24	>16	VTEC/STEC (<i>E.coli</i> O157 / <i>E.coli</i> non- O 157)
Produljena dijareja u djece <2 godine Djeca s težom kliničkom slikom Putnička dijareja Epidemije Krvavo sluzav proljev Imunosuprimirani	stolica	Molekularna dijagnostika je metode izbora					Dijarogene <i>E.coli</i> (DEC) (EPEC, EIEC, ETEC, EAEC..)
		EMBA, ENDO agar, plava ploča	35-37	zrak	16-24	>16	
Kultivacija <i>C. difficile</i>	stolica	CCEY ili CCFA	35-37	anaerobno	40-48	≥40	<i>C. difficile</i> Hipervirulentni soj
Sumnja na koleru ili na infekciju s <i>V. parahaemolyticus</i> , konzumiranje morske hrane ili nedavno putovanje (2-3tjedna) u područje s kolerom	stolica	TCBS agar	35-37	zrak	16-24	≥16	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>
Kod sumnje na izbijanje infekcije s <i>Vibriom</i>	stolica	Alkalna peptonska voda Onda presadi na: TCBS agar	35-37 35-37	zrak zrak	5-8 16-24	 ≥16	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>
Apendicitis Mesenteričnimfadenitis Terminalni ileitis Reaktivni artritis	stolica	CIN agar Tris-puferirani 1% pepton (pH 8.0) onda presadi na: CIN agar	28-30 8-10 ili 28-30 28-30	zrak zrak zrak	24-48 7d ili 24-48 24-48	≥24 ≥24	<i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudo-tuberculosis</i> <i>Yersinia</i> spp.

CCEY – Cikloserin cefokstin žumanjčani agar, CCFA- cikloserin cefoksitin fruktoza žumanjčani agar, CIN – Cefsulodin irgasan novobiocin agar, EMBA – eosin methylene blue agar, MTSB - Modificirani tripton soja bujon, SMAC - SorbitolMacConkey agar, TCBS – Tiosulfat citrat saharozni agar sa žučnim kiselinama, XLD – Ksilozna lizin deoksikolatni agar, SS – Salmonella Shigella agar, CSA - Campilobacter selektivni agar

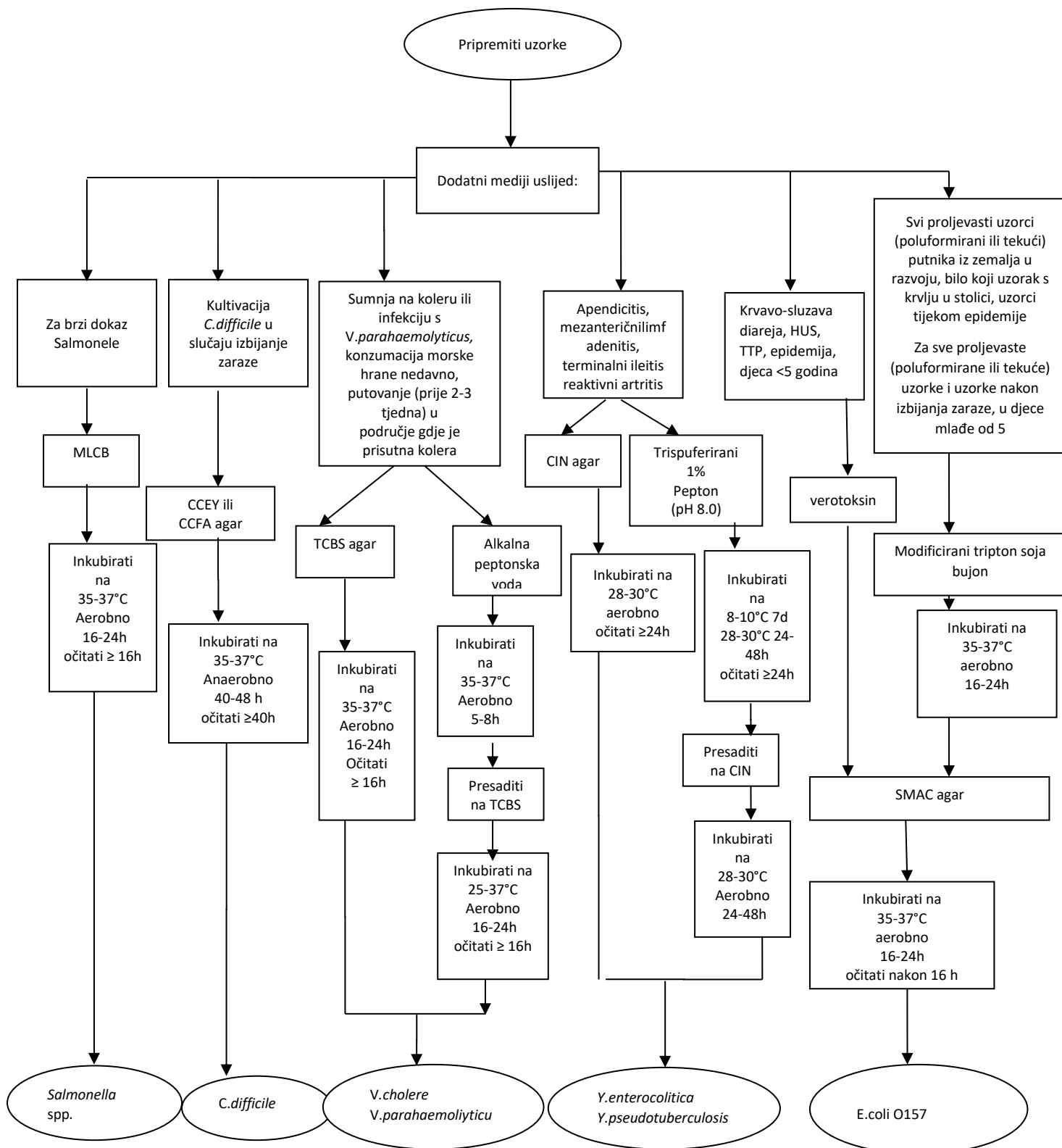
2.2. Algoritmi postupanja u rutinskoj i dodatnoj dijagnostici bakterijskih uzročnika probavnih infekcija

- Slike 1 i 2. prikazuju rutinsku i dodatnu obradu uzoraka iz probavnog trakta

Slika 1. Rutinsko istraživanje fekalnih uzoraka za bakterijske patogene



Slika 2. Dodatno ispitivanje fekalnih uzoraka za bakterijske patogene



2.3. Identifikacija najvažnijih uzročnika infekcija probavnog sustava

- Identifikacija se vrši sukladno uobičajenim laboratorijskim postupcima kao i tehničkim mogućnostima identifikacije u pojedinom laboratoriju

2.3.1. Identifikacija *Salmonella* spp.

- Do nedavno najčešći uzročnici proljeva povezanih s hranom u razvijenim zemljama(10, 11).
- Sve su pronađene među životinjama – ogroman animalni rezervoar infekcije !
- Humane infekcije općenito povezane s (2):
 - Konzumacijom hrane životinjskog porijekla
 - Izravnim prijenosom s čovjeka na čovjeka, naročito u lošijim higijenskim uvjetima
 - Pijenjem vode koju su zagađile životinje
- **Princip identifikacije:**
 - Makromorfološki izgled kolonija
 - Biokemijske osobine
 - Serotipizacija
 - Serotipizacija salmonela je nužna za potvrdu *Salmonella* spp.
 - Provodi se detekcijom somatskih i flagelarnih antigena (4).
 - Detaljna serotipizacija potrebna je za humane epidemijske izolate i izolate iz hrane što je u nadležnosti javnozdravstvenih mikrobioloških laboratorija i Nacionalnog referentnog centra za salmonele HZJZ.
- **Izdavanje nalaza:**
 - Kod infekcija salmonelama, rezultat testa osjetljivosti izdaje se: u hospitaliziranih bolesnika, djece mlađe od 2 godine, imunokompromitiranih, bolesnika s težom kliničkom slikom, kod bolesnika starije životne dobi s izoliranom *S.typhi*(12).
 - Po zavšetku identifikacije, usmeno izvijestiti telefonom liječnika, o preliminarnom rezultatu pretrage.

2.3.2. Identifikacija *Campylobacter* spp.

- Najčešći bakterijski uzročnik kojeg se rutinski dokazuje(2).
- U 90% slučajeva izoliran je *C.jejuni*(2)
- Vrste koje su povezane s proljevima kod ljudi većinom su termofilne, rasti će na 42°C i na 37°C ali ne i na 25°C
- Kulturama se, ukoliko je potrebno, inkubacija može produljiti na 72h
- **Princip identifikacije:**
 - Rast na selektivnom hranilištu u mikroaerofilnim uvjetima
 - Makromorfološki izgled kolonija
 - Mikromorfologija bojanjem po Gramu
 - Pozitivan test citokrom oksidaze
 - Diferencijacija do razine vrstevrši s reakcijom hidrolize hipurata, indoxyl-acetatnim testom i temeljem fenotipske osjetljivosti na antimikrobne lijekove
- Ukoliko je potrebno, moguć je transport na podlozi za anaerobe u referentni laboratorij na dodatnu identifikaciju (razina vrste)
- Po zavšetku identifikacije, usmeno izvijestiti telefonom liječnika, o preliminarnom rezultatu pretrage.

2.3.3. Identifikacija *Shigella* spp.

- Endemska i epidemijska dizenterija u zemljama u razvoju obično je uzrokovana *Shigella dysenteriae* serotip 1 (Sd1)(11, 13).
- Dizenteriju odlikuju učestale stolice malog volumena s primjesama krvi, sluzi i gnoja
- **Identifikacija:**
 - Makromorfološki izgled kolonija
 - Biokemijske osobine
 - Serotipizacija
 - Fagotipizacija
 - u referentnom laboratoriju
- **Izdavanje nalaza:**
 - Po zavšetku identifikacije, usmeno izvijestiti telefonom liječnika, o preliminarnom rezultatu pretrage.

2.3.4. Identifikacija *Escherichia coli* koja proizvodi Shiga toksin – STEC/VTEC

- Stopa prijavljenih VTEC u Republici Hrvatskoj u 2017.godini je <0,2/100 000 stanovnika, odnosno <10 bolesnika godišnje(14).
- Prema ECDC,1/3 prijavljenih VTEC izolata odnosno 2/3 prijavljenih HUS-a zabilježeno je u djece u dobi do 4 godine, (15).
- Najčeće izolirani serotipovi su: O157, O 26, O103, O91, O145 koji predstavljaju gotovo 70% prijavljenih VTEC infekcija u 2017. godini (14).
- **Detekcija VTEC/STEC preporuča se u:**
 - Bolesnika s krvavo-sluzavom stolicom
 - Djece <5 godina
 - Slučaju putničkog proljeva
 - Epidemija
 - Bolesnika s HUS-om i TTP-om
 - Na zahtjev uz težu kliničku sliku
- **Dijagnostički algoritam podrazumijeva:**
 - detekciju verotoksina (ICT, EIA ili molekularnom metodom) i
 - kultivaciju i serotipizaciju uz poseban osvrt na biosigurnosne uvjete rada (BSL2).

2.3.5. Identifikacija dijarogenih *Escherichia coli* – DEC

EPEC se još uvijek smatra značajnim uzročnikom dijareje kod djece u zemljama u razvoju (16, 17), a klinička slika može varirati od blagih tegoba do krvavih dijareja, dok se EHEC sojevi povezuju s krvavim dijarejama i komplikacijama poput TTP i HUS-a. Pojedine O-serogrupe su zajedničke EPEC i EHEC sojevima (17, 18). Tri serotipa O103, O111, O145 su pokazala sposobnost lučenja verotoksina i ne mogu se sasvim razlikovati od EHEC skupine(2).

Budući da enteropatogene *E.coli* (EPEC) imaju potencijal za izazivanje teških proljeva u dojenčadi i male djece, tradicionalno su bile uključene u osnovnu paletu patogena koji se traže u proljevastim stolicama male djece.

Konvencionalnom kultivacijom uz serotipizaciju može doći do precjenjivanja (pretjeranog dijanosticiranja) stvarnog broja klinički značajnih izolata(19). Molekularno testiranje i detekcija činitelja virulencije DEC je dijagnostička metoda izbora(16, 19, 20) iako nije dostupna većini laboratorija, u svijetu pa tako i kod nas. Klinički neopravdano i nepotrebno je svaku proljevastu stolicu testirati molekularnim metodama na EPEC jer je većina nastalih infekcija samoograničavajuća. Ipak, u djece u određenim kliničkim indikacijama kao što su

teži klinički slučajevi, bolnička ili izvanbolnička epidemija odnosno krvava dijareja, treba razmotriti i DEC (uključujući i EPEC) kao uzročnika nastale infekcije(19).

Ne preporuča se rutinska identifikacija serotipiziranjem u kliničkim laboratorijima, osim kao dio dijagnostike u slučaju epidemije(19)

Za kultivaciju potrebno je odabrati podlogu koja omogućuje rast većine O serogrupa, npr: SMAC; EMB ili ENDO agar. Naime, kultivacijom na kromogenoj podlozi O:157 omogućuje se rast sojeva serogrupe O:157, ali ne i ostalih non O:157 serogrupa koje prevladavaju u Europi(18).

- **Detekcija DEC preporuča se u:**

- U slučaju perzistentnog proljeva (> 14 dana) u djece <2 godine, indicirano je učiniti pretragu na DEC (EPEC i EAEC) (21).
- Djece s težom kliničkom slikom
- Septikemija odnosno teže kliničke slike
- Krvavo-sluzava stolica
- Imunkompromitirani
- Bolesnika s putničkom dijarejom
- Epidemije

- **Preporučeni dijagnostički algoritam podrazumijeva:**

- Detekciju činitelja virulencije molekularnim metodama (u Referentnom centru)
- Kultivaciju uz serotipizaciju u slučaju epidemija

2.4. Identifikacija ostalih uzročnika infekcija probavnog sustava

- Infekcije najčešće povezane s putovanjima u endemska područja (Azija, Afrika, Južna Amerika), a nastaju uslijed ingestije kontaminirane vode ili morskih plodova(2, 22).
- Poseban zahtjev – dio dodatne palete pretraga
- Ne preporuča se rutinska detekcija ostalih rijetkih uzročnika poput *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas species*, *Edwardsiella tarda*, *Laribacter hongkongensis*, *Clostridium septicum* te *Arcobacter species*(2).

2.4.1. Identifikacija *Vibrio* spp.

- **Kultivacija i inkubacija:**

- Kultivacija na TCBS agar, inkubacija 35-37 ° C/ 16-24 h.
- Kultivacija u alkalnoj peptonskoj vodi koja se inkubira 5 do 8 sati, potom subkultivacija na TCBS agar
- **Identifikacija:**
 - Biokemijskim testovima
 - Serotipizacija suspektnih kolonija
- **Izdavanje nalaza:**
 - Po zavšetku identifikacije, usmeno izvijestiti telefonom liječnika, o preliminarnom rezultatu pretrage.

2.4.2. Identifikacija *Yersinia spp.*

- **Kultivacija i inkubacija:**
 - CIN agar, inkubacija 28-30 ° C/24-48 h
 - fosfatni pufer/tris-puferirani 1 % pepton pH 8, inkubacija 8-10 ° C/7 dana ili 28-30 °C/24-48 h, subkultivacija na CIN agar, inkubacija 28-30 ° C/24-48 h
- **Identifikacija:**
 - Biokemijskim testovima
 - Serotipizacija suspektnih kolonija
- **Izdavanje nalaza:**
 - Po zavšetku identifikacije, usmeno izvijestiti telefonom liječnika, o preliminarnom rezultatu pretrage.

2.4.3. Identifikacija *Helicobacter pylori*

- Prepoznat kao uzročnik akutnog ili kroničnog gastritisa, peptičkog ulkusa, neulkusne dispepsije, gastroezofagealnog refluksa, a posljedično MALT limfoma i karcinoma želuca, visoke prevalencije diljem svijeta(3, 23).

- **Dijagnostičke mogućnosti**

- Invazivni postupci:
 - Kultivacija bioptata
- Neinvazivni postupci:
 - Detekcija antigena u stolici
 - Urea izdisajni test
 - Detekcija protutijela u serumu

2.4.3.1. Kultivacija bioptičkih uzoraka i identifikacija *H.pylori*

- Uzorkuju se bioptati sluznice koje je potrebno dostaviti u laboratorij unutar 3 h od uzorkovanja u 1 ml modificiranog Cary-Blair transportnog medija ili u fiziološkoj otopini na ledu
- Žurna dostava u laboratorij za homogenizaciju i obradu uzorka je iznimno važna
- **Kriteriji za odbacivanje**
 - Za kultivaciju ne prihvaćati uzorke iz formalina
 - Uzorcima koji nisu obrađeni (za kultivaciju) unutar 3 h od uzorkovanja, u nalazu dodati komentar „Odgođena dostava uzorka, kvaliteta može biti kompromitirana“
 - Ispirak/ aspirat želuca nije prikladan uzorak za kultivaciju
- **Mikrobiološka obrada uključuje**
 - Test ureaze
 - Inokulaciju hranilišta- za najbolje rezultate koristiti po jedno selektivno i neselektivno hranilište
 - **Neselektivna hranilišta:** KA, BHI s dodatkom 7% krvi konja, brucela agar ili ČA
 - **Selektivna hranilišta:** modificirani Thayer Martin ,Campy-CVA ili CEYE (Columbia agar s 10% emulzije žumanjka, 1% Vitox-a, 40 mg 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida po litri uz dodatak cefsulodin, trimetoprima, vankomicina i amfotericina B)(10).
- Postupak inokulacije:
 - Nježno homogenizirati tkivo (ovaj postupak obrade rezultira težom izolacijom mikroorganizma u odnosu na mljevenje uzorka ili direktnu inokulaciju uzorka.
 - Uzorak obojati po gramu i pregledati na prisustvo gram negativnih štapića ili oblika galebovih krila

- Staviti nekoliko komadića bioptata u medij s ureom i inkubirati aerobno na 35 °C. Inokuliranu ureu pregledati nakon 30 min, 4 h i 24 h od inokulacije, ovisno o uputi proizvođača
- Inokulirati hranilište i inkubirati u mikroaerofilnim uvjetima na 35 °C. Ukoliko se koriste lonci (posude), na dno posude staviti navlaženu gazu ili vatu. Ploče inkubirati na temperaturi 35 do 37 °C kroz 3 do 5 dana. Nekim sojevima inkubaciju primarnih hranilišta potrebno je produžiti i do 7 dana.
- Dodatno inokulirati ČA inkubirati aerobno uz 5% CO₂
- Pregledavanje hranilišta:
 - Kolonije *H.pylori* su male, sivkaste i prozirne. Neki izolati mogu na hranilištima u mikroaerofilnim uvjetima imati β-hemolizu
 - Od suspektih kolonija napraviti preparat i obojiti ga po gramu. Sa krutog hranilišta *H.pylori* izgleda poput lagano zavijenih štapića
 - Sumnjivim kolonijama ispitati test oksidaze, katalaze i ureaze kojisu pozitivni za *H.pylori*.

2.4.3.2. Detekcija antigena u stolici:

- U inficiranih osoba dokazana je prisutnost bakterijskih antigena u stolici(24).
- Preporuča se neinvazivno testiranje bolesnika mlađih od 50 godina, bez alarmantnih simptoma (mršavljenje, disfagija, znakovi gastrointestinalnog krvarenja, palpatorna rezistencija u trbuhu, sideropenična anemija), a u svih pozitivnih provođenje liječenja(24).
- Za detekciju antigena koristi se **formirana stolica**.
 - Optimalno: prikupljen uzorak stolice za detekciju antigena u stolici čuvati pri 4°C do najdulje 72 h ili na -4°C do testiranja. Ne zamrzavati/ odmrzavati više od dva puta.
 - Dostupna su dva testa:
 - Laboratorijski ELISA test (monoklonski test)
 - Brzi imunokromatografski test
 - Procjena uspjeha terapije moguća je nakon preporučenog pouzdanog intervala od najmanje 4 tjedna nakon provedene antimikrobne terapije i 2 tjedna nakon prekida terapije inhibitorima protonske pumpe(IPP) da bi se izbjegli lažno negativni rezultati(24, 25).

U nalazu naznačiti:

- Imunokromatografskim testom/enzimskim imunoesej testom *H.pylori* antigen - pozitivan/negativan

2.5. Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se sukladno smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCASTA-a (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

2.6. Izdavanje nalaza

- Kao rezultat izdati napomenu za:

Negativan nalaz: "Traženi mikroorganizam nije izoliran"

Pozitivan nalaz: "Izoliran je (ime mikroorganizma)"

- izdavanje antibiograma na nalazu samo na zahtjev infektologa ili dugog nadležnog liječnika (teža klinička slika, starije osobe i djeca, imunokompromitirani bolesnici).
- Po zavšetku identifikacije, usmeno izvijestiti telefonom liječnika, o preliminarnom rezultatu pretrage.

2.7. Clostridium difficile infekcije (CDI)

2.7.1. Definicija CDI

- akutna dijarealna bolest uzrokovana dokazanim toksinogenim sojem *C. difficile*, dokazanim toksinima uz odsutnost drugih mogućih uzročnika(26).
- Kliničke manifestacije CDI javljaju se u rasponu od blagih ili umjerenih dijareja do fulminantnih pseudomembranoznih kolitisa koji mogu imati fatalni završetak(27).
- Povezuju se uz 20-30% postantimikrobnih dijareja, 50-70% slučajeva kolitisa te uz više od 90% slučajeva pseudomembranoznog kolitisa(28).
- Nosilaštvo *C.difficile* prisutno u 5-15% zdravih odraslih osoba te kod 57% osoba smještenih u stacionarne ustanove(29).
- *C.difficile* je dio normalne flore kod djece < 2 god; nosilaštvo je prisutno u oko 37% zdrave novorođenčadi, u 30% dojenčadi do 6 mj starosti (30), po nekim navodima i znatno više, do 85% u navedenoj dobnoj skupini(29).
- **Rekurentna CDI** podrazumijeva povratak CDI simptoma unutar 8 tjedana nakon početka prve epizode, a nakon što su se simptomi prve epizode povukli uz odgovarajuću terapiju(31).
- Neposredno **izlječenje** se definira kao izostanak proljeva tijekom dva uzastopna dana. Dugoročno izlječenje se definira kao izostanak CDI simptoma kroz 12 tjedana(31). Izlječenje se procjenjuje na osnovi kliničke slike a ne negativizacije nalaza CD toksina u stolici, jer se toksini mogu naći i do 6 tjedana nakon rezolucije simptoma.
- Uzimanje kontrolnih uzoraka stolice nakon provedene terapije i izlječenja treba obeshrabrivati (32) jer je kliconoštvo nakon uspješno provedene terapije očekivano i nalaz ne bi trebao utjecati na produljenje terapije ili mjera izolacije(32).

2.7.2. Indikacije za testiranje na CDI

Obrađuju se samo **proljevasti uzorci stolica po Bristolskoj skali tip 6 i 7** (5, 6) (uzorci koji poprimaju oblik transportne posude) u:

1. hospitaliziranih bolesnika dobi > 2 godine kod kojih se javila dijareja >3 dana od primitka u bolnicu
2. Izvanbolničkih pacijenti dobi >65 god
3. Izvanbolničkih pacijenata dobi < 65 god ako postoji klinička sumnja za dijareju povezanu s upotrebom antibiotika (antibiotic associated diarrhea) koja se može javiti i nakon > 8 tjedana (4-12 tjedana) po završetku liječenja antibioticima
4. bolesnikas perzistentnom dijarejom sa i bez poznatih rizičnih čimbenika

5. u djece mlađe od 2 godine uzorci se obrađuju samo iznimno (npr. novorođenčad s Hirsprungovom bolesti ili pri sumnji na epidemiju) s obzirom na učestalo klicooštvo *C.difficile* u toj dobi.

Iznimno se može obraditi i **bris rektuma** kod sumnje na slučajeve «silent CDI» kao što su ileus, toksični megakolon ili pseudomembranoznikolitis bez znakova proljeva - u dogovoru s gastroenterologom ili abdomnalnim kirurgom(9). Zbog malog inokuluma na brisu, bris rektuma se ne može prihvatiti kao uzorak za dokaz toksina. Bris rektuma je moguć (iako manje vrijedan od stolice) uzorak za molekularnu dijagnostiku (NAAT). U nalazu naglasiti: „Infekcija moguća, ali nije sigurna.“

Uz uporabu suvremenih testova zadovoljavajuće osjetljivosti uzorke nije porebno ponavljati, dovoljan je jedan uzorak po pacijentu.

Kod sumnje na epidemiju uzorci se čuvaju za dokaz toksina na +4°C do tri dana ili smrzavaju na -80°C. Za molekularnu dijagnostiku se čuvaju na -20°C. Za kultivaciju uzročnika uzorak je najbolje nasaditi unutar 2 h od uzimanja. U slučaju pohranjivanja stolice za naknadnu kultivaciju poželjno je uzorku dodati PBS pufer (phosphatebufferedsaline(33) i pohraniti na -20°C(34)

2.7.3. Mikrobiološka dijagnostika CDI

Referentne metode za dokazivanje CDI su:

- Test neutralizacije citotoksičnosti (engl. „Cell Cytotoxicity Neutralization Assay, CCNA“)
 - Stolica se inokulira na kulturu stanica (Vero stanice, HeLa stanice...) i promatra pojava citopaskog učinka nakon 24 h i 48 h. Toksin se dokazuje neutralizacijom citopatskog učinka monoklonalnim protutijelima
 - Test dokazuje *in vivo* prisutnost slobodnog toksina
 - Smatra se pravim standardom mikrobiološke dijagnostike CDI
- Kultura toksinogenog soja (engl. „Toxigenic Culture, TC“)
 - Stolica se nasadi na selektivnu podlogu, po mogućnosti uz prethodnu obradu alkoholom (radi redukcije kontaminirajuće mikrobiote) i /ili obogaćivanje u tekućem hranilištu te inkubira 24 h do 48 h u anaerobnim uvjetima. Kolonije se identificiraju uobičajenim testovima (biokemijskim reakcijama, lateks aglutinacijom, MALDI ToF). U susepnziji kolonija se dokazuje *invitro* prisutnost toksina (CCNA testom, EIA testom, molekularnim metodama).
 - Test dokazuje u stolici prisutnost toksinogenog soja, ne nužno i slobodnog toksina (lošije korelira s kliničkom slikom nego CCNA) (32).
 - Indikacija za kultivaciju je teža klinička slika

Zbog dugotrajnog postupka niti jedna od referentnih metoda se ne primjenjuje u rutinskoj dijagnostici CDI (32).

U rutinskoj dijagnostici se primjenjuju sljedeće metode:

- EIA test za dokaz GDH (glutamate dehydrogenase) u stolici
 - GDH je enzim koji luče svi (toksigeni i netoksigeni) sojevi *C.difficile*
 - Test ima visoku osjetljivost i visoku negativnu prediktivnu vrijednost pa je pogodan za probirno testiranje u prvom koraku
 - Negativan nalaz testa pouzdano isključuje CDI
 - Pozitivan nalaz testa zahtjeva drugi korak u testiranju, primjenu testa veće specifičnosti

- Molekularni testovi (engl. „Nucleic Acid Amplification tests, NAAT“) za dokaz gena koji kodiraju toksine (*tcdB, tcdA*) u stolici
 - Testovi imaju visoku osjetljivost i visoku negativnu prediktivnu vrijednost pa se mogu koristiti kao probirni test u prvom koraku testiranja umjesto GDH testova.
 - Negativni test pouzdano isključuje CDI.
 - Testovi nemaju visoku specifičnost jer detektiraju genetski potencijal za proizvodnju toksina, ali ne nužno i prisutnost slobodnih toksina.
 - Pozitivan test treba provjeriti specifičnijim testom (EIA test za dokaz slobodnog toksina) u prvom koraku testiranja NAAT pozitivnih izolata.

- EIA test za dokaz toksina A i/ili B u stolici
 - Današnji testovi moraju imati mogućnost detekcije oba toksina A i B (neki mogu i diferencirati radi li se o A ili B, ali to nije ključno).
 - Testovi imaju nedovoljnu osjetljivost te se ne mogu pouzdano koristiti kao samostalni testovi; imaju nižu negativnu prediktivnu vrijednost od GDH testova
 - Negativni test ne isključuje pouzdano CDI
 - Testovi pokazuju visoku specifičnost, veću i od molekularnih testova jer dokazuju slobodni toksin te se preporučuju kao povrdni testovi u drugom koraku testiranja GDH pozitivnih uzoraka.
 - Pozitivan test pouzdano dokazuje CDI.

Preporučeni dijagnostički algoritam:

Dokaz prisutnosti *C.difficile* u uzorcima stolice temelji se na algoritmu u dva stupnja koji uključuju dokaz antigena i dokaz toksina A i B *C.difficile*(32). (Tablica 4. i 5.)

Tablica 4. Algoritamske opcije dijagnostičkog postupka detekcije CDI

MOGUĆNOST A		
1.KORAK – test visoke osjetljivosti GDH/EIA ili NAAT		
rezultat testa POZITIVAN ↓	rezultat testa NEGATIVAN ↓ CDI nije prisutna Nije potrebno daljnje testiranje	
2.KORAK test visoke specifičnosti dokaza toksina A&B/EIA		
rezultat testa POZITIVAN ↓ Velika vjerojatnost prisutnosti CDI	rezultat testa NEGATIVAN	
	Klinička evaluacija: – CDI neg.: nosilaštvo toksinogenog (u slučaju da je NAAT pozitivan) ili netoksigenog CD soja – CDI lažno neg zbog niske osjetljivosti toksin/EIA testa-CDI poz.	⇒ 3.KORAK kultivacija ili NAAT (u slučajevima kad je 1.korak GDH test) Treći korak je neobavezan, radi se ako je potrebno nakon konzultacije s kliničarem Neg. nalaz: isključuje CDI Poz. nalaz: -prisutnost toksinogenog CD / postoji vjerojatnost prisutne CDI
MOGUĆNOST B		
1.KORAK: istovremeno test visoke osjetljivosti GDH i test visoke specifičnosti Toksin A/B EIA		
Oba testa NEGATIVNA	GDH test POZITIVAN Toksin A/B NEGATIVAN	Oba testa POZITIVNA
CDI nije prisutna Nije potrebno daljnje testiranje	2. KORAK Kultivacija/NAAT	prisutnost CDI Nije potrebno daljnje testiranje
	NEGATIVAN	POZITIVAN
	CDI vjerojatno nije prisutna	Klinička evaluacija: prisutnost toksinogenog CD, postoji vjerojatnost prisutne CDI

Sobzirom da niti jedan test sam ne posjeduje dovoljnu osjetljivost i specifičnost potrebno je koristiti barem dva, a u iznimnim situacijama i tri testa sukladno algoritmu prikazanom u Tablici 4.

Interpretacija rezultata je nepouzdana kod pozitivnog GDH ili NAAT i negativnog EIA toksin testa (Tablica 5). Crobach i sur. sugeriraju da se u takvim situacijama napravi i treći test NAAT ili TC. Treba imati na umu da je glavni razlog izmjena algoritma u smjernicama za dijagnostiku CDI 2016.g. (32) bila upravo činjenica da klinička slika bolje korelira s dokazom slobodnog toksina (dokazljivo EIA testovima) negoli dokazom toksinogenog soja (dokazljivo NAAT testovima) i da korištenje samo NAAT testa kao samostalnog testa kreira lažno pozitivne rezultate uz nepotrebno liječenje i primjenu mjera izolacije. Primjenom testiranja u dva ili tri koraka mogućnost lažno pozitivnih nalaza je smanjena, ali ako je zadnji potvrdni test NAAT ili TC onda nije posve uklonjena.

Kako negativna (NPV) i pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) svakog testa ovisi i o prevalenciji uzročnika u populaciji, sredine s niskom prevalencijom (5-10%) CD mogu očekivati povećanje osjetljivosti i bolji učinak EIA toksin testova pa možda ne moraju primjenjivati treći korak potvrde NAAT ili TC testom. Obrnuto, sredine s većom prevalencijom CD pri čemu raste specifičnost testa se mogu osloniti više na NAAT testove. U svakom slučaju i mikrobiolozi i kliničari moraju prihvatiti da u određenom postotku uzoraka testovi za CDI mogu biti lažno pozitivni i lažno negativni te da se kod razmimoilaženja laboratorijskih i kliničkih nalaza treba prikloniti kliničkoj slici.

Tablica 5. Interpretacija rezultata testiranja antigena i toksina *C. difficile*

Rezultat testiranja	interpretacija	Prijava bolničkom timu za kontrolu bolničkih infekcija
GDH EIA (ili NAAT) POZITIVAN Toxin A&B EIA POZITIVAN	Prisutnost CDI CD toksin pozitivan	da
GDH EIA (ili NAAT) POZITIVAN Toxin A&B EIA NEGATIVAN	*	*
GDH EIA (ili NAAT) NEGATIVAN Toxin EIA NEGATIVAN	CDI nije prisutna	ne

* u sredinama s niskom prevalencijom CD izdati nalaz **CD toksin negativan** uz opasku: Iako je u uzorku prisutan *C.difficile*, slobodni toksini nisu dokazani te se vjerojatno ne radi o CDI. U sredini s visokomprevalencijom CD učiniti dodatno testiranje NAAT i prema njemu izdati nalaz:

- Ako su oba testa (EIA toksin i NAAT) negativna: **CD toksin negativan**

- Ako je EIA toksin negativna, a NAAT pozitivan: u uzorku nisu dokazani slobodni toksini no prisutan je toksinogeni soj *C.difficile*, pa je CDI moguća, ali ne sigurna.
- Zbog velikog broja kontrolnih uzoraka koji pristižu u laboratorij nakon provedene terapije za CDI preporučuje se uz pozitivan nalaz dopisati opasku:
„Nakon provedenog liječenja nije potrebno slati kontrolni uzorak“.

3. VIRUSNE INFEKCIJE PROBAVNOG SUSTAVA

3.1. Uvod

- virusi su zastupljeni u 30-40% od ukupnog broja infekcija probavnog sustava
- ubikvitarne infekcije, javljaju se neovisno o godišnjem dobu dok je kod nekih uzročnika uočena sezonska pojavnost
- u svim dobnim skupinama, no češće su infekcije u ranoj dječjoj dobi te kod starije populacije.
- Smatra se da je velik broj infekcija asimptomatski.
- Put prijenosa je fekalno-oralnim putem, putem hrane i vode, a opisuje se i respiratorni put prijenosa.
- Neki od uzročnika su izrazito kontagiozni zbog vrlo niske infektivne doze kao i otpornosti na dezinficijense
- Drugi virusi koji se povezuju s AIP su: koronavirusi, torovirus, parvovirus, pestivirusi, enterovirus, HAV, HEV.
 - Za neke od njih nema pouzdanih dokaza da su uzročnici proljeva (3).

3.2. Uzročnici virusnih gastroenteritisa/gastroenterokolitisa

3.2.1. Rotavirus

- Najznačajniji uzročnik AIP kod djece u dobi od 6 mjeseci do 2 godine
 - čest uzročnik bolničkih infekcija na dječjim odjelima i epidemija u dječjim vrtićima.
 - Javlja se u zimskom mjesecima.
- Ne preporuča se detekcija rotavirusa u sadržaju povraćanja

3.2.2. Adenovirus

- Drugi po važnosti iza rota virusa kao uzročnici AIP kod djece.
- Infekcije vezane za tipove 40 i 41 (grupa F adenovirusa).

3.2.3. Norovirus

- Uzrokuju epidemijske proljeve kod starije djece i u odrasloj dobi tijekom cijele godine.

- Epidemije vezane uz boravak većeg broja ljudi na ograničenom prostoru.
 - Vrlo je kontagiozan; infektivna doza niska (<100virusnih čestica).
 - Nakon ozdravljenja virus se izlučuje stolicom još dva tjedna (35).

3.2.4. Astrovirus

- uzrokuju 5-8% AIP kod djece mlađe od 7 godina, rjeđe kod starije populacije.
 - Infekcije češće za hladnijih mjeseci.

3.2.5. Sapovirus

- Sapovirusi su non-noroviruskalicivirusi vezani sa gastrointestinalnim simptomima
- Kod djece i starijih osoba
 - Incidencija infekcija povećana u zimskom mjesecima.

3.3. Metode detekcije

3.3.1. Uzorci, skladištenje i transport

- Detekcija u uzorcima stolice unutar 48-72 h od nastanka simptoma (najveća ekskrecija virusa)
- Skladištenje uzoraka
 - 2-3 tjedna na 4°C
 - >3 tjedna smrzavati na -20°C ili -70 °C
 - U adekvatno zamrznutom uzorku norovirus je moguće detektirati najmanje 5 godina
- Transportirati uzorake zamrznute u nepropusnoj, polistirenskoj ambalaži

3.3.2. Dijagnostika virusnih gastroenteritisa

- dokaz virusnih antigena: brzi imunoenzimni (EIA) i imunokromatografski (ICT) komercijalni testovi visoke specifičnosti i osjetljivosti. Molekularni testovi koji su sve dostupniji, za neke uzročnike (noro, astrovirusi) su metoda izbora.
- OSNOVNE PRETRAGE: Rotavirus, Adenovirus- dokaz antigena EIA/ICT testovima
- PROŠIRENE PRETRAGE : prema kliničkoj i epidemiološkoj indikaciji
 - Detekcija Norovirusa

- Metoda izbora: RT-qPCR assay - visoka osjetljivost (detektira 10-100 norovirusnih kopija po reakciji)
- Detekcija virusnog antigena metodom EIA - niska osjetljivost (50%)
- ne preporuča se korištenje za dokazivanje norovirusnih infekcija u sporadičnim slučajevima
- Može se koristiti za preliminarnu identifikaciju u slučajevima epidemija kada se testira veliki broj uzoraka.
- Negativan rezultat potrebno je potvrditi koristeći druge tehnike (RT-qPCR) (35)

3.4. Izdavanje nalaza

- Kao rezultat izdati napomenu za:

Negativan nalaz: "Uzorak stolice NEGATIVAN na prisutnost (imevirusnog uzročnika) "

Pozitivan nalaz: "Uzorak stolice POZITIVAN na prisutnost (ime detektiranog virusnog uzročnika)"

4. PARAZITARNE INFEKCIJE PROBAVNOG SUSTAVA

Uzorci stolice se najčešće uzimaju za dokaz parazitarne infekcije, iako i neki drugi uzorci dolaze u obzir. Za dokaz parazitarne infekcije potrebno je uzeti stolicu na pravilan način, transportirati je adekvatno, imati opremu koja je redovito validirana, posebno mikroskopi, te kompetentno i educirano laboratorijsko osoblje koje vrši analize.

Posebnu pažnju treba posvetiti dobrim uputama za pacijenta o načinu prikupljanja i donošenja uzoraka za parazitološku analizu.

4.1. Uzročnici

4.1.1. Protozoa

- u probavnog sustava čovjeka se mogu identificirati patogena *Entamoebahistolytica*,
 - i apatogene vrste: *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* i *Iodamoeba butschlii*.
 - *E. histolytica* i *E. dispar* se morfološki ne mogu razlikovati svjetlosnim mikroskopom.
 - Razlikovanje je moguće imunoesajskim testom ili PCR metodom.
 - *E. histolytica* se može širiti i izvan crijeva, najčešće u jetru stvarajući apsces. Može izazvati i perforaciju kolona, toksični megakolon i perianalne ulceracije.

4.1.2. Flagelati

- Najčešći predstavnik je *Gardia lamblia* (proljev, epidemije zaraženom vodom, kronični oblik, steatoreja i malapsorpcija)
 - dokazivanje mikroskopijom (ciste i trofozoiti), imunoesajem ili PCR-om iz stolice
 - dokazuje se i iz duodenalnog sadržaja, aspirata ili bioptata
- *Dientamoeba fragilis* je upitnog kliničkog značaja (povezuje s neinvazivnim proljevima i kod infekcija pacijenata s HIV-om)
 - dokazivanje bojanjem stolice s trikromom, Giemsom ili bojanjem po Fieldsu.
 - Nema cističnog stadija

4.1.3. Ciliati

- *Balantidium coli* može kolonizirati ljudski probavni sustav (vodeni proljeve i akutni dizenterični sindrom kodaklorhidrije i pothranjenosti)
 - Dokazuje se mikroskopijom u svježoj stolici: veliki trofozoiti koji se brzo kreću

4.1.4. Coccidia

- *Cyclospora cayatanensis* vezana je uz tropske zemlje (pijenje zaražene vode ili ingestiju zaražene hrane, salata, svježe bilje i povrće i bobičasto voće)
 - Dokazuje se u nativnom preparatom, metodom koncentracije, te modificiranim Ziehl-Neelsen bojanjem
- *Cyclospora (Isospora) belli* rijetko izaziva infekcije
 - Kod imunokompromitiranih osoba
 - Dokazuje se mikroskopijom iz uzorka stolice ili crijevne sluzi metodom koncentracije stolice.

4.1.5. Cryptogregaria

- *Cryptosporidium* spp. (najčešće *Cryptosporidium parvum* i *Cryptosporidium hominis*)
 - profuzni vodenaste proljeve kod ljudi, veže se uz loše higijenske uvjete i ima sezonsku pojavnost (proljeće).
 - Teške infekcije izaziva kod imunokompromitiranih osoba, čak i kao holangitis, pankreatitis i hepatitis.
 - Dijagnostika je na temelju bojanog preparata (modificirani Ziehl-Neelsen), imunoesejem ili PCR dijagnostikom.
- *Blastocystishominis* je upitnog značaja u ljudskoj patologiji
 - veliki broj (više od 5 u vidnom polju) smatra potrebnim za izvješćivanje
 - dokazuje se mikroskopiranjem nakon koncentracije stolice

4.1.6. Nematoda

- Dijagnostika nematoda temelji se na dokazu adulta, larvi i jaja pojedinih uzročnika:
 - makroskopska i
 - mikroskopska (nativni preparat i metodu koncentracije stolice)
- *Enterobius vermicularis* - dokazujemo je otiskom ljepljivom prozirnom trakom preko analne regije – perianalni otisak po Grahamu (dokaz jaja)

- *Trichuris trichiura*- dokazuju se jaja iz stolice metodama koncentracije
- *Ascaris lumbricoides* - dokazuju se jaja metodama koncentracije uključujući flotaciju i sedimentaciju jaja
- *Ancylostoma duodenale* i *Necator americanus* - okazuju se direktnom mikroskopijom ili metodom koncentracije u stolici
 - ove dvije vrste ne mogu razlikovati mikroskopijom.
- *Strongyloides stercoralis* - dijagnoza se postavlja direktnom mikroskopijom i metodom koncentracije nalaz rabsitoidnih ličinki
 - PCR je koristan kod potvrde kronične infekcije (referentni laboratorij)

4.1.7. Trematode

- *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* i *Schistosoma mekongi*
 - Laboratorijska dijagnostika intestinalne shistosomijaze postavlja se pregledom nativnog preparata ili metodom koncentracije stolice.
 - Kod *S.haematobium* uzorci još mogu biti urin i sperma
- *Fasciola hepatica*- dokazuje se nalazom jaja u stolici ili u žuči.
- *Paragonimus westermani* - plućni metilj - Jaja se mogu detektirati u sputumu i stolici.

4.1.8. Cestode

- Vrste: *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*
 - Dijagnostika trakavica se postavlja mikroskopijom iz uzorka stolice
 - Jaja se mogu vidjeti u nativnom uzorku ili metodom koncentracije.
 - Adulti trakavice se mogu vidjeti u stolici rijetko, a ako se nađu tada se mogu identificirati pregledom pod lupom ili stisnuti između dva predmetna stakalca.
- *Echinococcus granulosus* - dostupni su serološki testovi
 - moguće je mikroskopski pregledati tekućinu iz hidatidne ciste i tražiti protoskolekse

4.2. Prikupljanje, transport i obrada uzoraka

4.2.1. Uzorci

- Uzorak stolice uzeti prije započete terapije u čistu posudu širokog grla u količini čajne žlice ili, lješnjaka, bez primjese urina ili vode iz toaleta.
- Brzi transport do laboratorija, čuvati u hladnjaku (izuzetak kod strongliidoze)
 - U roku 30 minuta od defekacije, ako se žele identificirati trofozoiti protozoa i ako je stolica proljevasta
 - u roku od 60 minuta ako je stolica kašasta
 - u istom danu ako je stolica formirana.
- Potrebno je uzeti minimum 3 stolice u razmaku od 7 dana.
 - Infekcije s *E.hystolitica* i *G.lambliia* zahtijevaju i do šest uzoraka stolice.
- **Kod izolirane epizode proljeva ne treba ponavljati uzorke stolice.**
- Kontrolni pregledi stolice:
 - 3-4 tjedna nakon terapije protozoarne infekcije
 - 5-6 tjedana nakon terapije helmintoza, posebno kod tenijaze
- Kriteriji za odbacivanje uzorka:
 - stolica koja curi iz posude
 - neoznačeni uzorak,
 - više uzoraka od istog dana – obraditi samo jedan
 - prisutnost urina , vode ili drugi znak kontaminacije,
 - prisutnost barijeve kaše,
 - uzimanje lijekova protiv proljeva, laksativa , ulja- u zadnjih tjedan dana
 - antimikrobna terapija u zadnjih tjedan dana
- Rad na siguran način:
 - Svaki uzorak treba smatrati infektivnim
 - MIFC metoda koncentriranja: rad s formalinom, eterom i mertiolatom se smatra opasnim - potreban je biokabinet (fumehood).
 - Potrebna je pravilno odbacivanje toksičnih tvari.

4.2.2. Obrada uzoraka i metode dijagnostike

- Metode koje laboratorij mora moći izvesti - nativni preparat i MIFC
- Dodatno:
 - Salinična provokacija

4.2.2.1. Direktni preparat svježe stolice

- Dodati uz kap stolice i kap fiziološke ili lugolove otopine
- Gledati pod objektivom 10x
- Sumnjive strukture na 40x
- Tehnika mikroskopiranja:
 - Pregledati cijeli preparat na najmanjem povećanju (10x)
 - Sumnjive strukture pogledati objektivom 40x
 - Najmanje trećinu preparata pogledati na 40x
 - Najmanje 10 min po preparatu

4.2.2.2. Specifična bojanja

- Trajni preparati
- Primarno služe za identifikaciju trofozoita i cista
 - Hematoxylin bojanje-protozoa
 - Modificirani Zhiel-Neelsen –kokcidije-kriptosporidija, isospora, ciklospora i sarkocistis
 - Trichrom bojanje- mikrosporidije

4.2.2.3. Metode koncentracije

- Sedimentacija
- Flotacija
- MIFC – mertiolat, jod, formalin i centrifugiranje
- Mikroskopiranje MIFC-a:
 - Pregledati cijeli preparat na najmanjem povećanju (10x)
 - Sumnjive strukture pogledati objektivom 40x
 - Najmanje trećinu preparata pogledati na 40x
 - Najmanje 10 min po preparatu
 - Nalaz gljiva i *Blastocystis*- kontrola dobre koncentracije
 - Komercijalni testovi loše koncentriraju stolicu
 - Te se u tim preparatima rijetko vide gljive i blastociste

4.2.2.4. Perianalni otisak

- Dati dobre upute pacijentu.
- Uzorak donijeti u plastičnoj ili papirnoj vrećici, dobro zatvorenoj.

- vrlo infektivan uzorak.

4.2.2.5. Slanje uzoraka u referentni parazitološki laboratorij

- Svaki uzorak u kojem ne možemo potvrditi o kojem se parazitu radi, a uočili smo njegovo prisustvo
 - Helminte treba slati u fiziološkoj otopini, ako transport neće trajati duže od 5 dana (alkohol)
 - Člankonošce i kukce slati u suhom, žive.
- Mikroskopska stakla u kartonskim ili plastičnim kontejnerima za predmetnice

4.3. Izdavanje nalaza

- Oociste *Cryptosporidium spp*, *Isospora belli* i *Cyclospora spp*. ne mogu biti potvrđene bez specifičnih bojanja
- Izdati leukocite i eritocite, ali ne kvantitativno.
- Ne izdavati gljive.

5. DIJAGNOSTIKA TROVANJA HRANOM

- Trovanje hranom je rezultat ingestije vode ili različite hrane kontaminirane patogenim mikroorganizmima i toksinima koje ti mikroorganizmi izlučuju (Tablica 6)(36).
- Sumnja pri pojavi akutnog gastroenteritisa ili neuroloških manifestacija kod dvije ili više osoba koje su konzumirale istu hranu unazad 72 sata.

Tablica 6. Uzročnici infekcija prenesenih hranom

1. INVAZIVNE INFEKCIJE koje invadiraju tkiva i organe, uzrokuju ih virusi, paraziti i invazivne bakterije (opisano u 2-4 poglavljima)	2. TOKSIKOINFEKCIJE koje uzrokuju patogeni koji imaju sposobnost umnažanja, kolonizacije i izlučivanja toksina u probavnom sustavu <i>Vibrio cholerae,</i> <i>Bacillus cereus</i> (dijarealni tip), <i>C. botulinum</i> (dojenački botulizam), <i>C. perfringens</i> , <i>E. coli O157:H7</i> i drugi.	INTOKSIKACIJE HRANOM (eng. <i>Foodborne intoxications</i>) uzrokovane toksinima koje izlučuju patogene bakterije prisutne u dovoljnom broju u različitoj hrani. Intoksikacija se manifestira kratko vrijeme nakon konzumacije kontaminirane hrane. <i>C. botulinum,</i> <i>B. cereus</i> (emetični tip) i <i>Staphylococcus aureus</i>
---	---	--

- Uzročnici intoksikacije i njihovi toksini dokazuju se **prvenstveno u uzorcima hrane** (Tablica 7)(36).
 - Dokazivanje uzročnika u bolesničkim uzorcima nije standardizirano - upitna vrijednost mikrobiološkog nalaza.
 - **Dijagnostika mogućih uzročnika trovanja hranom je u nadležnosti specijaliziranih laboratorija akreditiranih za analizu hrane.**

Tablica 7. Uzročnici, patogeneza, kliničke osobitosti i dijagnostikatoksoinfekcija i intoksikacija hranom

UZROČNIK	INKUBACIJA	ZNACI BOLESTI	TRAJANJE BOLESTI	DIJAGNOSTIKA
<p><i>Bacillus cereus:</i> 1.dijarealni tip toksikoinfekcija/ termolabilni toksin</p> <p>2.emetični tip intoksikacija/ termostabilni toksin</p>	<p>8-16h</p> <p>1-5h</p>	<p>Dijarealni tip: akutna dijareja, mučnina i bolovi u trbuhu</p> <p>Emetični tip: mučnine, povraćanje, bolovi u trbuhu, ponekad proljevaste stolice</p>	<p>24-48h</p>	<p>1.kultivacija Tryptikaza soja bujon sa polimiksinom (Trypticsoyabrothwithpolymyxin) MEYP agar (mannitol, eggolk, polymyxin B) PEMBA(Polymyxin,eggolk, mannitol,bromthymolblue agar)</p> <p>2..detekcija enterotoksina (EIA, PCR,biološki test)</p> <p><i>Završetak epidemije:</i></p> <p>1.identificiran izvor u hrani 2.nema novih slučajeva u zadnjih 48h</p>
<p><i>Clostridium perfringens/</i> termostabilne spore</p>	<p>6-24h</p>	<p>Vodenaste stolice,mučni na,abdominalni grčevi, Povraćanje i temp.rijetko</p>	<p>24-48h</p>	<p><i>C.perfringens</i> prisutan u stolici zdravih ljudi u broju < 10⁴-10⁵ po gramu Izolacija 10⁶mikroorganizama /gr hrane/stolice Izolirani soj mora pokazati produkciju enterotoksina ili Dokazivanje enterotoksina /enterotoksin gena (cpe) (EIA/PCR)</p> <p><i>Završetak epidemije</i></p> <p>1.identificiran izvor u hrani 2.nema novih slučajeva u zadnjih 48h</p>

<p><i>Staphylococcus aureus</i>/ termostabilni enterotoksin</p>	<p>2-6h</p>	<p>Nagli nastanak mučnine i povraćanja, rijetko praćeni proljevastim stolicama</p>	<p>12-48h</p>	<p>Dokazivanje enterotoksina u ostacima konzumirane hrane (EIA/PCR)</p> <p>Izolacija 10⁵ bakterija / gr ostataka konzumirane hrane Podudarnost fagotipaizolata iz uzorka stolice i uzorka inkriminirane hrane</p>
<p><i>Clostridium botulinum</i>/ Botulizam prenesen hranom</p>	<p>12-36h (4h do 8 dana)</p>	<p>Gastrointest. simptomi kod 1/3 bolesnika, kod ostalih odmah mišićna slabost, klijenut mišića, glavobolja, izrazita suhoća sluznice usta i optipacija</p>		<p>Dijagnostički pokazatelj: povezanost neuromuskularne slabosti i konzumacije inkriminirane hrane Istodobna pojava bolesti u barem dva bolesnika koji su jeli istu hranu.</p> <p>Postupak:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Oduzeti četiri epruvete pune krvi (30ml) i odvojiti serum Prije aplikacije anti-toksina 2. Sakupiti suspektne uzorke hrane i kliničke uzorke (stolica, povraćeni sadržaj) 3. Transportirati što je brže moguće u laboratorij <p>Potvrda: dokaz toksina <i>C.botulinum</i> u serumu i stolici /izolacija bakterije. Pronalaskom toksina u uzorcima inkriminirane hrane potvrđuje se izvor.</p>

LITERATURA

1. World Health Organization. The treatment of diarrhea: A manual for physicians and other health workers, (2005).
2. Public Health England(2014) Investigation of Fecal Specimens for Enteric Pathogens. UK Standards for Microbiology Investigation.B 30 Issue 8.1.
3. Bonacorsi S, Garbarg-Chenon A, Kortbeek L. Gastroenteritis. In: Cornaglia G, Courcol R, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Villa J, editors. European manual of clinical microbiology. 1 ed. Basel: European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2012. p. 171-8.
4. Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017;65(12):e45-e80. Epub 2017/10/21.
5. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1997;32(9):920-4. Epub 1997/09/23.
6. Caroff DA, Edelstein PH, Hamilton K, Pegues DA. The Bristol stool scale and its relationship to *Clostridium difficile* infection. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(9):3437-9. Epub 2014/07/18.
7. Ethelberg S, Olsen KE, Gerner-Smidt P, Molbak K. The significance of the number of submitted samples and patient-related factors for faecal bacterial diagnostics. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007;13(11):1095-9. Epub 2007/08/31.
8. Valenstein P, Pfaller M, Yungbluth M. The use and abuse of routine stool microbiology: a College of American Pathologists Q-probes study of 601 institutions. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1996;120(2):206-11. Epub 1996/02/01.
9. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, Jr., et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(4):e22-e121. Epub 2013/07/13.

10. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2 ed. New York (NY): ASM Press; 2004.
11. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. In: Murray PR, editor. Manual of Clinical Microbiology Textbook. 8 ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 654-71.
12. Microbiology Procedures/Guidelines 2010; 35]. Available from:
http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Daneshkadaha/pezeshki/microb/file_amuzeshi/Lab_QA_Microbiology_QA.pdf.
13. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory Methods for Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera. Atlanta, Georgia 1999 [cited 2018 20/11]; Available from:
<https://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Epidemic-Dysentery-and-Cholera.pdf>.
14. European Center for Disease Control and Prevention (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Available from: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>.
15. European Center for Disease Control and Prevention(ECDC). Shigatoxin/verocytotoxin-producing Escherichia coli (STEC/VTEC) infection. ECDC; Available from:
<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/stec/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx>.
16. Spina A, Kerr KG, Cormican M, Barbut F, Eigentler A, Zerva L, et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. 2015;21(8):719-28. Epub 2015/04/25.
17. Hu J, Torres AG. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2015;21(8):729-34. Epub 2015/03/03.
18. Diarrhoeagenic E. Coli 2000-2012. Statens Serum Institut; 2014; Available from:
<https://www.ssi.dk/English/News/EPI-NEWS/2014/No%2010%20-%202014.aspx>.
19. Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic escherichia coli infection in children. Curr Opin Infect Dis. 2011;24(5):478-83. Epub 2011/08/23.
20. Knutton S, Shaw R, Phillips AD, Smith HR, Willshaw GA, Watson P, et al. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated Escherichia coli isolated from children in the United Kingdom. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2001;33(1):32-40. Epub 2001/08/02.

21. Acute Diarrhea in Adults and Children: A Global Perspective. World Gastroenterology Organisation; 2012 [cited 2018 21/11]; Available from: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/acute-diarrhea/acute-diarrhea-english>.
22. World Health Organization. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. 2004. p. 141-59.
23. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of Helicobacter pylori infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2018;47(7):868-76. Epub 2018/02/13.
24. Katicic M, Duvnjak M, Kanizaj TF, Krznaric Z, Marusic M, Mihaljevic S, et al. [Croatian guidelines for diagnostics and treatments of Helicobacter pylori infection]. *Lijecnicki vjesnik*. 2014;136(1-2):1-17. Epub 2014/04/12. Hrvatski postupnik za dijagnostiku i terapiju infekcije Helicobacterom pylori.
25. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. *The American journal of gastroenterology*. 2017;112(2):212-39. Epub 2017/01/11.
26. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 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). *Infection control and hospital epidemiology*. 2010;31(5):431-55. Epub 2010/03/24.
27. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England journal of medicine*. 2002;346(5):334-9. Epub 2002/02/01.
28. Sunenshine RH, McDonald LC. Clostridium difficile-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2006;73(2):187-97. Epub 2006/02/16.
29. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. *The American journal of gastroenterology*. 2013;108(4):478-98; quiz 99. Epub 2013/02/27.

30. Jangi S, Lamont JT. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(1):2-7. Epub 2010/06/01.
31. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20 Suppl 2:1-26. Epub 2013/10/15.
32. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22 Suppl 4:S63-81. Epub 2016/07/28.
33. Freeman J, Wilcox MH. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *Journal of clinical pathology*. 2003;56(2):126-8. Epub 2003/02/01.
34. Scottish Microbiology & Virology Network. Recommended protocol for testing for *Clostridium difficile* and subsequent culture. Health Protection Scotland; 2016.
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus. [cited 2018 20/11/2018]; Available from: <https://www.cdc.gov/norovirus/lab/diagnosis.html>.
36. Centers for Disease Control and Prevention. Guide to Confirming an Etiology in Foodborne Disease Outbreak; [cited 2018 20/11]; Available from: https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/confirming_diagnosis.html.