

Principy laboratorní diagnostiky *Clostridium difficile*

Principles of laboratory diagnosis of Clostridium difficile

Pracovní skupina pro Clostridium difficile při NRL pro antibiotika: Markyta Bártová, Eliška Běbrová, Lenka Geigerová, Eva Chmelařová, Petr Ježek, Roman Jirsa, Jana Matějková, Otakar Nyč

A. ÚVOD

Clostridium difficile (CD) s produkcí toxinů je nejčastějším původcem nozokomiálních střevních infekcí (průjmy, kolitida...) a primární patogen pseudomembranózní kolitidy (PMC). Extraintestinální formy vyvolané CD (abscesy, rané infekce, sepse apod.) jsou velmi vzácné.

Asymptomatická kolonizace CD není výjimečná zejména u nemocničních pacientů. U novorozenců obecně dosahuje kolonizace CD včetně toxických kmenů až 70 % s minimálním výskytem infekční symptomatologie.

Včasná diagnostika toxických kmenů CD se stává zejména u infekcí s těžkým průběhem nezbytnou součástí rutinní bakteriologické diagnostiky především v nemocnicích také v souvislosti s měnící se epidemiologií a závažností infekcí vyvolaných CD. V severní Americe a řadě evropských zemích je zaznamenán zvýšený výskyt závažných infekcí způsobených CD, konkrétně epidemickým kmenem s vysokou produkcí toxinů (A i B), který je na molekulární úrovni charakterizován jako **ribotyp 027**.

Přehled základních metod pro vyšetření CD ve stolici je uveden v **tabulce 1**.

B. PRINCIPY A STRATEGIE ZÁKLADNÍHO LABORATORNÍHO VYŠETŘENÍ CD

1. Odběr, transport a uchování vzorku

Vyšetření CD se provádí ze stolice odebrané do kontejneru. Z důvodu postupného úbytku aktivity toxinů by stolice měla být zpracována optimálně do dvou hodin po odběru, pokud to není možné, je třeba ji uložit po dobu nezbytně nutnou při teplotě 5° C (zmrazení na teplotu – 20 °C vede k rychlé ztrátě cytotoxické aktivity). Pro delší uchování vzorků určených k vyšetření toxinu je nutné uchování při teplotě -70 °C.

2. Stanovení toxinů a specifického antigenu

Vzhledem k rychlosti a dostupnosti vyšetření je základní metodou **průkaz toxinů**, optimálně A i B. (podíl toxin A negativních kmenů v naší republice není znám, v zahraničních pramenech se udává v průměru 5 %, v závislosti na lokalitě, ale může dosahovat podstatně vyšších hodnot). Toxiny je možno detekovat ELISA testem nebo imunochromatograficky. Druhý jmenovaný test je rychlejší a jednodušší, ale obecně vykazuje nižší citlivost (viz tabulka).

Metodika stanovení toxinů a interpretace výsledků je vždy záležitostí jednotlivých vyšetřovacích souprav a je třeba vycházet z doporučení výrobců eventuálně výsledků konkrétních studií.

Vzhledem k tomu, že citlivost stanovení toxinů komerčním testy není absolutní (viz tabulka), je potřebné, zejména u klinicky závažných případů, vyšetření opakovat.

Průkaz toxinů CD amplifikačními metodami výrazně zvyšuje citlivost vyšetření, metoda zatím není dostupná ve formě komerčního testu a je spíše předmětem dalšího výzkumu a následné standardizace.

Průkaz GDH, glutamát dehydrogenáza, lze považovat za orientační test, jehož pozitivita znamená významnou suspekci na přítomnost CD, ale také nelze vyloučit zkříženou reaktivitu s *Clostridium* spp. obecně. Pozitivní nálezy je nutné doplnit průkazem toxinů a/nebo kultivací.

3. Kultivace a uchování CD

Kultivace by měla být prováděna optimálně vždy nebo alespoň u toxin pozitivních vzorků, u vzorků s pozitivním testem GDH nebo u vzorků pacientů s těžkými projevy střevní infekce včetně toxin negativních stolic.

Kmeny izolované zejména od pacientů s těžkým klinickým průběhem infekce nebo tam, kde se jedná o epidemický výskyt, je potřebné archivovat pro další molekulární typizaci.

C. KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ

1. Smísení cca 0,5 ml (0,5g) stolice s 0,5 ml 95 % etanolu
2. Inkubace 30–40 min. při pokojové teplotě
3. Inokulace (optimální je použít sediment po centrifugaci 5–10 min při 2500–3000 ot./min) povrchu pevné selektivní půdy pro kultivaci CD (CCFA – cykloserin-cefoxitin-fruktózový agar, CDC brucella krevní agar...) dvěma kapkami suspenze
4. Inkubace 48–72 hodin v anaerobním prostředí při teplotě 37 °C. CD vyrůstá ve formě plochých bělavých nebo šedobílých kolonií s nerovnými okraji bez hemolýzy.
5. Konfirmace narostlých kolonií CD: orientačně mikroskopicky – nález gram pozitivních tyček se sporami, biochemicky – komerčními testy (ANAEROTest 24...)
6. U klinicky významných kmenů, stejně jako izolátů z rekurentních infekcí nebo z důvodů epidemiologických je vhodné ověřit citlivost *in vitro* k metronidazolu případně vankomycinu, optimálně E- testem.

Tabulka 1: PŘEHLED ZÁKLADNÍCH LABORATORNÍCH METOD URČENÝCH K PRŮKAZU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*
(upraveno podle CDC) [1]

Č.	Diagnostický test	Trvání testu	Citlivost	Výhody	Omezení
1	Anaerobní kultivace	2–3 dny	85–100 %	Možnost další molekulární typizace	Primárně nerozliší toxické a netoxické kmeny
2	Průkaz CPE na tkáňových kulturách a neutralizační test	2 dny	94–100%	Zlatý standard, průkaz včetně toxin A negativních kmenů	Falešná pozitivita, náročnost provedení
3	CD specifický antigen – GDH (glutamát dehydrogenáza)	15–45 minut	58–92 %	Jednoduchost testu, průkaz toxin A negativních kmenů	Nerozliší toxické a netoxické kmeny, možnost zkřížené reakce s jinými anaeroby
4	ELISA (toxin A i B)*	2 hod.	80–95 %	Jednoduchost testu, rychlost, průkaz obou toxinů	Jednoduchost testu, rychlost,
5	Imunochromatografická metoda (toxin A i B)*	<1 hod.	60–58 %	průkaz obou toxinů	Vyšší riziko omezené citlivosti
6	PCR (průkaz tox.genů)			Vysoká citlivost	Chybí standardizace, interpretace

* některé testy detekují pouze toxin A, což může vést kmenů, které produkují pouze toxin B, k falešně negativním výsledku

POUŽITÁ LITERATURA

1. Suneshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile* –Associated Disease. *Cleveland Journal of Medicine* 2006; 73:187-179 (materiály CDC)
2. Wilcox TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* Testing- after 20 years, still challenging. *Journal of Clinical Mikrobiology* 2003; 41:531-534
3. Mundy LS, Shanholtzer CJ, Willard KE et al.. Laboratory detection of *Clostridium difficile*. *Clinical Mikrobiology and Infectious Disease* 1995; 103:52-56

4. *Clostridium difficile* as a Pathogen Involved in Antimicrobial Agent – Associated Diarrhoea, Colitis, and Pseudomembranous Colitis in 2007. Update: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd Edition, ASM Press 2007

Za Pracovní skupinu pro *Clostridium difficile*
při NRL pro antibiotika

Otakar Nyč
Ústav lékařské mikrobiologie FN Motol
a 2. LF UK
otakar.nyc@lfmotol.cuni.cz