

## INFORMACE Z PRACOVIŠŤ MIMO SZÚ

### EXTRAMURAL CONTRIBUTIONS

# Současné přístupy v laboratorní diagnostice střevních infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*

## Current approaches to the laboratory diagnosis of intestinal infection caused by *Clostridium difficile*

Otakar Nyč a pracovní skupina pro *Clostridium difficile*

### Souhrn • Summary

Laboratorní průkaz střevních infekcí vyvolaných *C. difficile* má zásadní důležitost pro odpovídající a včasnou diagnostiku závažných infekcí. V současnosti vyžaduje komplexní přístup, který zahrnuje kombinaci minimálně dvou různých testů. V článku jsou rekapitulovány základní požadavky na rutinní diagnostiku s poukazem na některá úskalí, které týkající se senzitivity a specifity jednotlivých metod.

*Laboratory detection of Clostridium difficile plays a crucial role in early diagnosis of severe cases of gastrointestinal infection. A comprehensive approach is currently needed, combining at least two different assays. The standard requirements for routine diagnosis are summarized and some drawbacks of various methods concerning the sensitivity and specificity are pointed out.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(9): 334–337.

**Klíčová slova:** *Clostridium difficile*, epidemické robotypy, laboratorní diagnostika, doporučení  
**Keywords:** *Clostridium difficile*, outbreak robotypes, laboratory diagnosis, guidelines

### A. Úvod

Téměř po čtyřech letech přistupujeme k aktualizaci obecných doporučení zaměřených k laboratorní diagnostice *Clostridium difficile* (Cd). Důvodem neutuchajícího zájmu o tuto bakterii je skutečnost, že Cd je v nemocničním prostředí nejčastějším původcem střevních infekcí CDI (*Clostridium difficile* infection) a jedním z nejvýznamnějších nozokomiálních patogenů současnosti vůbec. Navíc začíná v některých zemích významně narůstat incidence i komunitních CDI [1].

V návaznosti na narůstající problémy s Cd, také laboratorní diagnostika CDI doznává poměrně významných změn. Na jedné straně je například stále více zpochybňována užitečnost ELIA testů k průkazu toxinů (jsou-li použity jako test jediný), na druhé straně je obava, že vysoká citlivost molekulárních metod může být na úkor specifity vyšetření (detekují gen, nikoli toxin) [2,3,4].

Je nesporné, že přesný a včasný laboratorní průkaz toxigenního Cd je klíčový pro adekvátní léčbu, možnost uplatnění účinné kontroly těchto infekcí, stejně jako získání validních epidemiologických dat. V laboratorní diagnostice CDI je dostupná řada metod. Některé testy se ukazují podle současných poznatků, a to především vzhledem k výskytu závažných forem onemocnění, nedostatečně citlivé. Právě proto doporučení vycházejí z protokolů, které kombinují minimálně dvě, případně i více různých laboratorních metod [5,6,7,8,9,10].

Následující text se pokouší shrnout současné trendy a přístupy, které se uplatňují hlavně v běžné rutinní diagnostice.

### B. Indikace laboratorního vyšetření na průkaz Cd

1. Tři a více průjemovitých stolic denně zejména u hospitalizovaného pacienta
2. Epidemický výskyt CDI na oddělení  
U dětí do dvou let, u kterých je známo vysoké procento kolonizace, je toto vyšetření indikováno zcela výjimečně.

### C. Principy odběru, transportu a základní laboratorní metody

Principy odběru, transportu a základní laboratorní metody jsou uvedeny v tabulce 1.

### D. Kultivační vyšetření – metodika

1. Smísení cca 0,5 ml (0,5 g) stolice s 0,5 ml 95% etanolu
2. Inkubace 30–60 min. hodinu při pokojové teplotě
3. Inokulace povrchu pevně selektivní půdy pro kultivaci Cd (CCFA, CDC brucella krevní agar, Brazierova půda – CCEY agar ... v poslední době je dostupná i chromogenní půda) dvěma kapkami suspenze.
4. Inkubace 48–72 hodin v anaerobní atmosféře při teplotě 37 °C (striktní anaerobióza je nezbytnou podmínkou kultivačního průkazu). Cd vyrůstá ve formě plochých bělavých nebo šedobílých kolonií s nerovnými okraji bez hemolýzy.
5. Konfirmace narostlých kolonií Cd: mikroskopicky (Gramovo barvení) – orientačně nález gram pozitivních tyčí se sporama, biochemicky komerčními testy, komerčním latex aglutinačním testem nebo pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF).

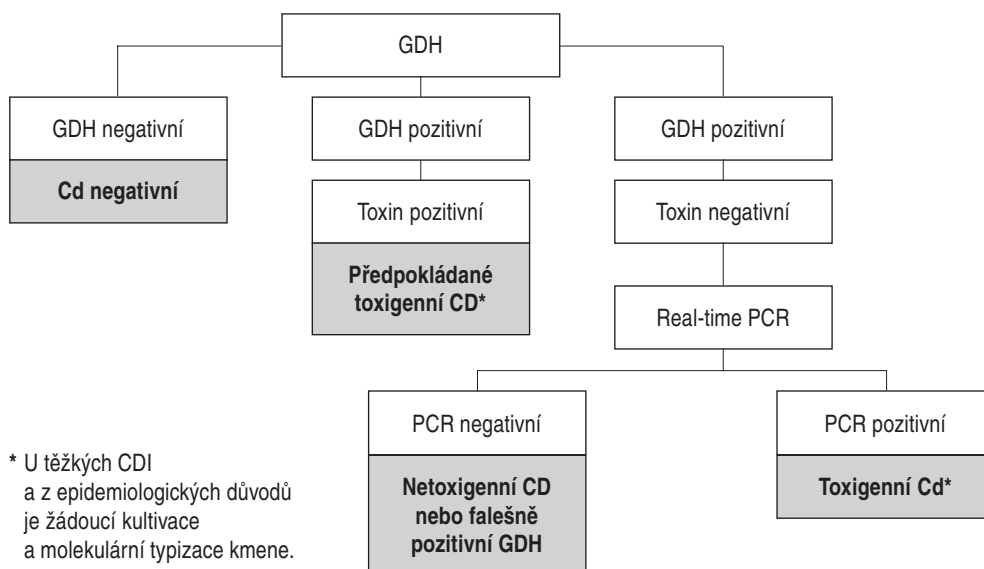
Tabulka 1: PRINCIPY ODBĚRU, TRANSPORTU A ZÁKLADNÍ LABORATORNÍ METODY

<b>Odběr a transport materiálu</b>	Vyšetření přítomnosti Cd a jeho toxinů se provádí ze stolice odebrané do sterilního kontejneru, minimálně 2 ml nebo 2 g.
<b>Uchování materiálu</b>	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 při teplotě 5 °C a vyšetřit nejpozději do 72 hodin. Zmrazení na teplotu – 20 °C vede k rychlé ztrátě cytotoxické aktivity, zejména pokud je vzorek opakovaně rozmrazován. Alternativou pro dlouhodobé zachování aktivity toxinů je hluboké zmrazení na -70 °C.
<b>Průkaz CPE na tkáňových kulturách a neutralizační test</b>	Metoda je považována za zlatý standard, jedná se ale o specializované vyšetření náročné na laboratorní vybavení, které mimo jiné vyžaduje také interpretační zkušenost. Je tedy spíše vyhrazena pro specializované a referenční pracoviště.
<b>Průkaz toxinů A,B</b>	Nejednodušší, nejlépe dostupná a rychlá metoda, optimálně se prokazují oba toxiny, A i B. K dispozici je řada komerčních kitů s různou citlivostí, nicméně <b>citlivost těchto testů není obecně postačující</b> . Toxiny je možno detekovat komerčními ELISA testy nebo imunochromatograficky.
<b>Glutamát dehydrogenáza</b>	GDH je enzym vysoce specifický pro Cd, je může být stanoven samostatně nebo je součástí testů k průkazu toxinů (ELISA)
<b>Kultivace</b>	Kultivační vyšetření by mělo být prováděno vždy nebo alespoň u toxin pozitivních vzorků nebo u vzorků pacientů s těžkými projevy střevní infekce včetně toxin negativních stolic. Popis kultivace viz dále. Kmeny izolované zejména od pacientů s těžkým klinickým průběhem infekce nebo tam, kde se jedná o epidemický výskyt, je potřebné archiovat pro další molekulární typizaci.
<b>PCR</b>	Může sloužit k verifikaci těžkých forem CDI a u nejasných výsledků jiných testů. K dispozici jsou komerční kity – real time PCR k průkazu genů ( <i>tcdB</i> , <i>tcdC</i> ...) případně k detekci delecí charakteristických pro některé epidemické PCR ribotypy (027, 176...).

Tabulka 2: CITLIVOST JEDNOTLIVÝCH LABORATORNÍCH METOD POUŽÍVANÝCH V DIAGNOSTICE CDI

Diagnostický test	Trvání testu	Citlivost	Výhody	Omezení
<b>Anaerobní kultivace</b>	2–3 dny	99–100 %	Možnost další molekulární typizace	Primárně nerozliší toxigenní a netoxigenní kmeny, dlouhá časová prodleva
<b>Průkaz CPE na tkáňových kulturách a neutralizační test</b>	2 dny	94–100 %	Zlatý standard, průkaz včetně toxin A negativních kmenů	Riziko falešné positivity, náročnost provedení, dlouhá časová prodleva
<b>Cd specifický antigen GDH – (glutamát dehydrogenáza)</b>	15–45 minut	90–100 %	Jednoduchost testu. Vysoká NPV*	Nerozliší toxigenní a a netoxigenní kmeny, možnost zkřížené reakce s jinými mikroby
<b>ELISA – průkaz A,B toxinů</b>	2 hod.	60–80 %	Jednoduchost testu, rychlost	Nedostatečná citlivost
<b>Real- time PCR (komerční sety)</b>	cca 60 min.	99–100 %	Vysoká citlivost	Interpretace - rozlišení kolonizaci od infekce. Nízká PPV**

\* NPV – negativní prediktivní hodnota; \*\* PPV – pozitivní prediktivní hodnota.

Schéma 1: PŘÍKLAD ALGORITMU PRŮKAZU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

### E. Citlivost jednotlivých laboratorních metod používaných v diagnostice CDI

Přehled jednotlivých metod používaných v diagnostice CDI a jejich citlivost je prezentována v tabulce 2.

### F. Strategie laboratorního vyšetření a interpretace

Vzhledem k výše uváděné rozdílné citlivosti různých metod, je podle současných doporučení preferováno užití dvoj i více stupňových algoritmů [5,6,7,8,9,10]. Určení GDH je vesměs považováno jako optimální test pro vyřazení Cd negativních vzorků. V případě positivity tohoto testu je třeba dalších doplňujících vyšetření, jako průkaz toxinů, kultivace, případně PCR s cílem co nejspolehlivějšího průkazu či vyloučení toxigenního kmene Cd. Příklad algoritmu kombinujícího několik metod je uveden ve schématu č. 1.

S ohledem na ekonomickou náročnost lze akceptovat jako nejjednodušší přístup pro rutinní testování využití kombinovaného testu (GDH + toxiny – membránová EIA) s kultivací. V každém případě by i toto vyšetření mělo být doplněno cílenou kultivací Cd a to minimálně u sporných výsledků (pozitivní GDH, negativní toxin...) a u těžkých forem CDI (možnost molekulární typizace, vyšetření citlivosti apod.). Kultivace je stále považována při dodržení základních kultivačních podmínek za jednu z nejcitlivějších metod, která navíc umožňuje prokázat přítomnost toxinů z narostlé kultury.

Interpretaci laboratorních nálezů je třeba vždy vztáhnout ke konkrétnímu pacientovi, jeho klinickému stavu a dalším laboratorním výsledkům, případně aktuální epidemiologické situaci.

V případě negativních výsledků se nedoporučuje vyšetření v krátké době po sobě opakovat.

Pozitivita testů po přeléčení CDI antibiotiky není důvodem k další terapii, kolonizace může přetrvávat i po klinicky účinné terapii. Rozhodující je klinický stav, případně laboratorní nálezy jako počet leukocytů, hodnota kreatininu a další markery.

### ZÁVĚR

Současná laboratorní diagnostika CDI prochází dílčími změnami a hledáním optimálních přístupů s maximální výtěžností. Zatím se nepodařilo nalézt mezi odborníky konsensus jaké testy, případně jaké algoritmy jsou ty nevhodnější. Problémem je i ekonomická náročnost vyšetření, především jsou-li použity molekulární metody, byť pouze výběrově ke confirmaci výsledků.

Cílem této informace bylo upozornit na některá úskalí v laboratorní diagnostice CDI vzhledem k pravděpodobnému nárůstu těchto infekcí.

### POUŽITÉ ZKRATKY

Cd – *Clostridium difficile*  
 CDI – *Clostridium difficile* infection  
 CPE – cytopatický efekt  
 GDH – glutamát dehydrogenáza

### LITERATURA

1. Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; Jan 15; 46 Suppl 1: S4-11
2. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 606-608.
3. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8: 777-784.
4. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 1053-1066.
5. Kvach EJ, Ferguson D, Riska PF, Landry ML. Comparison of BD GeneOhm Cdiff real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 109-114.
6. Quinn CD, Sefers SE, Babiker W, He Y, Alcabasa R, Stratton CW, Carroll KC, Tang YW. *C. Diff* Quik Chek complete enzyme immunoassay provides a reliable first-line method for detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 603-605.
7. Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of tcdB real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 124-130.
8. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, Weissfeld A. *Clostridium difficile* Testing in the Clinical Laboratory by Use of Multiple Testing Algorithms. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 889-893.
9. Matějková J, Nyč O, Melter O. Zkušenosti s novými testy v laboratorní diagnostice *Clostridium difficile*. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2010; 16(3): 90-92.
10. Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, Carroll KC. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 3601-3605.

Za Pracovní skupinu pro *Clostridium difficile*

MUDr. Otakar Nyč

Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN  
 Motol

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

e-mail: otakar.nyc@lfmotol.cuni.cz, tel.: 224435353