

První výsledky molekulární typizace *Clostridium difficile* v ČR

First results of molecular typing of Clostridium difficile in the Czech Republic

Marcela Krůtová, Jana Matějková, Otakar Nyč

Souhrn

Clostridium difficile je závažným nozokomiálním patogenem současnosti uváděným hlavně v souvislosti s post-antibiotickými průjmy. Bližší určení klinicky významných izolátů *C. difficile* přispívá ke zmapování epidemiologické situace v ČR. Celkem 624 izolátů *C. difficile* z 11 mikrobiologických pracovišť bylo typizováno pomocí ribotypizace založené na kapilární elektroforéze. Celkem bylo identifikováno 75 různých ribotypů. 40% izolátů příslušelo k ribotypu 176. Dalšími častěji se opakujícími ribotypy byly: 001, 012, 014, 017, 020 a 078.

Clostridium difficile is a major nosocomial pathogen reported mainly in the context of post-antibiotic diarrhoea. Further identification of clinically significant isolates of *C. difficile* contributes to the mapping of the epidemiological situation in the Czech Republic. A total of 624 *C. difficile* isolates from 11 microbiological centres were characterized using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. Forty percent of the isolates belonged to ribotype 176. Other frequently identified ribotypes were: 001, 012, 014, 017, 020, and 078.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2013; 22(12): 399–401.

Klíčová slova: *Clostridium difficile*, ribotypizace, kapilární elektroforéza, surveillance
Keywords: *Clostridium difficile*, ribotyping, capillary electrophoresis, surveillance

ÚVOD

Clostridium difficile je významným nozokomiálním patogenem vyvolávajícím střevní infekce, které se manifestují širokým spektrem klinických projevů, od průjmu po pseudomembranósní kolitidu s rizikem závažných komplikací včetně sepse. Hlavním rizikovým faktorem CDI (*Clostridium difficile* infection) je předchozí nebo souběžná antibiotická léčba. Nejohroženější skupinou jsou pacienti nad 65 let s komorbiditami [1]. Výjimkou nejsou ovšem ani infekce v mladších věkových skupinách [2]. Incidence onemocnění vyvolaných *C. difficile* má v Evropě vzrůstající charakter [3]. V České republice není prozatím jednotný systém surveillance a bližší data o izolátech *C. difficile* chybí. Surveillance, prevence a kontrola výskytu onemocnění vyvolaného *C. difficile*, patří mezi priority národní surveillance infekcí spojených se zdravotní péčí v ČR [4].

V polovině roku 2013 byl zahájen projekt: *Clostridium difficile*: genotypizace a fenotypizace klinicky významných izolátů – mapování epidemiologické situace v ČR (NT/14209) financovaný Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví. Jedná se o tříletý projekt, jehož cílem je jednak bližší molekulární analýza izolátů *C. difficile*, tak i testování citlivosti izolovaných kmenů k antibiotikům volby.

METODIKA

PCR ribotypizace

PCR ribotypizace založená na kapilární elektroforéze je metoda doporučená a používaná v Evropě k typizaci kmenů *C. difficile*. Tato metoda využívá variability v ISR (Inter-

genic Spacer Region), a to konkrétně úseku mezi geny pro 16S a 23S rRNA. Mezi jednotlivými kmeny *C. difficile* jsou rozdíly jak v počtu, tak i délce těchto úseků. Detekce amplifikovaných fragmentů pomocí fragmentační analýzy provedené pomocí kapilární elektroforézy má vynikající rozlišovací schopnost ve srovnání s dříve používanou gelovou elektroforézou [5]. Další výhodou je získání elektronických dat, které lze snadno sdílet s evropskými referenčními centry. PCR ribotypizace byla provedena podle SOP ECDIS-net (European *Clostridium difficile* infection surveillance network) Leiden, Netherland.

Pro určení konkrétního ribotypu jsou získané elektroforeogramy porovnány s rakouskou webovou databází Web-ribo: <https://webribo.ages.at/>.

Hodnocení kvality metody

Externí hodnocení kvality proběhlo v rámci projektu ECDIS-net. Sada 10 slepých lyofilizovaných vzorků obsahovala kmeny *C. difficile* cirkulující v loňském roce v Evropě. Naše laboratoř dosáhla 100% shody výsledků v ribotypizaci kmenů.

Multiplexová PCR reakce

Detekce přítomnosti genů pro produkci toxinů je prováděna multiplexovou PCR reakcí s následnou vizualizací na agarovém gelu s dříve publikovanými primery a podmínkami [6]. Touto metodou detekujeme přítomnost genu pro produkci toxinu A (*tcdA*), genu pro produkci toxinu B (*tcdB*) a dalších dvou genů pro produkci binárního toxinu (*cdtA/cdtB*).

MATERIÁL

K ribotypizaci byly zaslány kmeny *C. difficile* vykultivované z tekutých/neformovaných stolic hospitalizovaných pacientů s podezřením na CDI. Věková hranice pacientů nebyla stanovena. Anaerobní kultivace byla provedena u stolic vykazujících pozitivitu *C. difficile* Glutamát dehydrogenázy a současnou pozitivitu nebo negativitu *C. difficile* toxinů A/B po předchozím testování diagnostickým setem *C. difficile* Quik Chek Complete® (Techlab, USA). Kmeny *C. difficile* pocházely z 11 mikrobiologických pracovišť: Hlavní město Praha: (5), Středočeský kraj: (3), Plzeňský kraj (1), Jihomoravský kraj (1), Kraj Vysočina (1).

VÝSLEDKY

Celkem byla ribotypizace provedena u 624 (427 externích a 197 motolských) kmenů *C. difficile* vykultivovaných v roce 2013 na 11 mikrobiologických pracovištích v ČR.

Celkem bylo identifikováno 75 různých ribotypů. Podle výsledků multiplexové PCR reakce 53 ribotypů vykazovalo pozitivitu genu pro produkci toxinů A, B, 10 ribotypů zároveň pozitivitu genů pro binární toxin, 12 ribotypů bylo netoxigenních. 251 (40 %) kmenů *C. difficile* příslušelo k ribotypu 176. *C. difficile* ribotyp 176 byl identifikován ve všech spolupracujících zařízeních. Dalšími opakujícími se ribotypy jsou: 014 (51 izolátů; 8,2 %), 012 (36 izolátů; 5,8 %), 001 (24 izolátů; 3,9 %), 017 (32 izolátů; 5,1 %), 020 (17 izolátů; 2,7 %), 078 (15 izolátů; 2,4 %). Ostatní identifikované ribotypy se v našem souboru izolátů častěji neopakovaly.

DISKUZE

PCR ribotyp 176 tvoří 40 % našeho souboru izolátů *C. difficile*. Ve sledovaném souboru není homogenně zastoupena celá ČR, nicméně vzorek z 11 pracovišť lze považovat za významnou informaci dokumentující epidemiologickou situaci. Ribotyp 176 byl prozatím identifikován v tak četném zastoupení pouze v ČR a Polsku [7], v ostatních zemích je detekován zcela výjimečně. Závažná je skutečnost, že podle výsledků celogenomového sekvenování je tento geneticky blízce příbuzný nejjobávanějšímu hypervirulentnímu ribotypu *C. difficile* 027 [8] a vykazuje i podobné fenotypové vlastnosti [9]. Ribotyp 176 také produkuje binární toxin, který je považován za prognostický marker pro vznik rekurentních epizod onemocnění [10, 11]. *C. difficile* ribotypy 001, 012, 014, 017, 020, 078 patří mezi toxigenní ribotypy běžně se vyskytující v Evropě [3]. Podle procentuálního zastoupení lze předpokládat, že se jedná o kmeny především nemocničního původu, tak jako je tomu u ribotypu 176.

ZÁVĚR

Výsledky získané za první rok řešení našeho projektu potvrzují, že ribotyp 176 se zřejmě významnou měrou podílí na výskytu infekcí vyvolaných *Clostridium difficile* v ČR. Jeho blízká příbuznost hypervirulentnímu ribotypu 027 může znamenat reálné ohrožení vnímavé populace nemocničních pacientů.

Děkujeme všem mikrobiologickým pracovištím za zaslání izolátů *C. difficile* k dalším podrobnějším molekulárním analýzám. Jmenovitě: Fakultní Thomayerova nemocnice, Nemocnice Na Bulovce, Nemocnice Na Homolce,

Citylab spol. s r.o. – Nemocnice Na Františku, Oblastní nemocnice Příbram, Oblastní nemocnice Kladno, Nemocnice Rudolfa a Stefanie Benešov, Nemocnice Havlíčkův Brod, Fakultní nemocnice Plzeň, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Fakultní nemocnice v Motole.

Informace o zasílání kmenů *C. difficile* k molekulární typizaci a další lze nalézt na stránkách: www.cdilab.cz

Podpora: PCR Ribotypizace byly podpořeny granty: MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203 a IGA NT/14209.

LITERATURA

1. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT. (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 1067–1079.
2. Enoch DA, Butler MJ, Pai S, Aliyu SH et al. *Clostridium difficile* in children: colonisation and disease. *J Infect*. 2011; 63(2):105–113. doi: 10.1016/j.jinf.2011.05.016. Epub 2011 Jun 12.
3. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS et al. ECDIS Study Group. (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 2011; 377(9759):63–73. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61266-4.
4. Jindrák V, Hedlová D, Pratingerová J. Koncepce národní surveillance infekcí spojených se zdravotní péčí v České republice. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2013; 22(4): 134–138.*
5. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 11): 1377–1382. doi: 10.1099/jmm.0.47714-0.
6. Persson, S., Torpdahl, M. and Olsen, K. E. P. (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. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 1057–1064. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x
7. Nyč O, Pituch H, Matějková J, Obuch-Woszczatynski P et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. *Lancet* 2011; 377(9775):1407. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60575-8.
8. Knetsch CW, Hensgens MP, Harmanus C, van der Bijl MW et al. Genetic markers for *Clostridium difficile* lineages linked to hypervirulence. *Microbiology*. 2011; 157(Pt 11): 3113–3123.
9. Valiente E, Dawson LF, Cairns MD, Stabler RA et al. Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. *J Med Microbiol*. 2012; 61(Pt 1): 49-56.
10. Stewart DB, Berg AS, Hegarty JP. Single Nucleotide Polymorphisms of the *tcdC* Gene and Presence of the Binary Toxin Gene Predict Recurrent Episodes of *Clostridium difficile* Infection. *Ann Surg*. 2013 Dec 26.
11. Stewart DB, Berg A, Hegarty J. Predicting recurrence of *C. difficile* colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. *J Gastrointest Surg*. 2013; 17: 118–125.

Marcela Krůtová, Jana Matějková, Otakar Nyč
Ústav lékařské mikrobiologie,
2. lékařská fakulta univerzity Karlovy
a Fakultní nemocnice Motol, Praha.

Korespondující autor: Mgr. Marcela Krůtová
Ústav lékařské mikrobiologie
2. LF UK a FN v Motole
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
marcela.krutova@seznam.cz
+420 732 532 499