

## Možnosti laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných *Clostridium difficile*

Martina Krehelová, Eva Sinajová

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s., Košice

*Clostridium difficile* s produkciou toxínov je najčastejším pôvodcom nozokomiálnych črevných infekcií. Kolitída vyvolaná *C. difficile* je infekčné ochorenie s rôznym stupňom závažnosti, môže prebiehať ako obyčajné hnačkové ochorenie, pseudomembranózna kolitída, ale tiež ako stav ohrozujúci život, sprevádzaný paralytickým ileom prechádzajúcim do sekundárnej sepsy. Ochorenie vzniká najčastejšie v súvislosti s liečbou širokospektrálnymi antibiotikami, ktoré eliminujú normálnu črevnú flóru. Prenos *C. difficile* sa uskutočňuje pomocou spór fekálno-orálnou cestou. Včasná diagnostika infekcií vyvolaných *C. difficile* je dôležitá z dôvodu začatia adekvátnej terapie a tiež protiepidemických opatrení zamedzujúcich ďalšiemu šíreniu spór v nemocničnom prostredí.

**Kľúčové slová:** infekcie vyvolané *Clostridium difficile*, pseudomembranózna kolitída, laboratórna diagnostika, glutamátdehydrogenáza, toxigénny kmeň

### Laboratory diagnostic possibilities for *Clostridium difficile* infections

*Clostridium difficile* with toxin production is the most common cause of nosocomial gastrointestinal infections. *Clostridium difficile* infection can manifest as mild diarrhea, pseudomembranous colitis but also as a life-threatening illness accompanied by paralytic ileus developing into secondary sepsis. The disease is generated in relation with a broad-spectrum antibiotic therapy which eliminates normal gut microbiota. Transmission of *Clostridium difficile* is done by spores following the faecal-oral route. Early diagnosis of *Clostridium difficile* infections is essential for proper initiation of an antibiotics therapy and also for anti-epidemic measures which prevent spore spreading in hospitals.

**Keywords:** *Clostridium difficile* infections, pseudomembranous colitis, laboratory diagnostics, glutamátdehydrogenase, toxigenic strain

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 86 – 90

### Úvod

*Clostridium difficile* je grampozitívna anaeróbna baktéria (**obrázky 1, 2**) bežne sa vyskytujúca v prírode, povrchových a odpadových vodách a s rôznou frekvenciou tiež v tráviacom trakte ľudí a zvierat. Za nepriaznivých podmienok tvorí metabolicky inaktívne formy – spóry, ktoré sú výrazne odolné proti vysokým teplotám a ďalším fyzikálnym vplyvom, taktiež proti väčšine dezinfekčných prostriedkov (vrátane alkoholových preparátov používaných na dezinfekciu plôch, povrchov a rúk). To zvyšuje riziko ich dlhodobého pretrvávania v prostredí, ďalšieho šírenia a pravdepodobnosť kolonizácie nemocničných pacientov, ktorá môže byť nasledovaná rozvojom infekcie. *C. difficile* nepatrí medzi invazívne patogény, na začiatku ochorenia iba adheruje na sliznicu hrubého čreva. Jeho patogenita vyplýva zo schopnosti tvoriť veľmi účinné exotoxíny považované za hlavné faktory virulencie. Toxigénne kmene produkujú vo vegetatívnej fáze termolabilné proteínové toxíny A a B, ktoré sa do prostredia uvoľňujú rozpadom buniek. Obidva toxíny pôsobia synergicky a ich produkcia je spojená s poškodením epitelu čreva i hlbších štruktúr črevnej steny. Gény kódujúce toxín A (gén *tcdA*) a toxín B (gén *tcdB*) sú umiestnené na tzv. lokuse patogenity (pathogenity locus – *PaLoc*) s veľkosťou 19,6 kb, a to spolu s tromi ďalšími génmi regulujúcimi expresiu toxínov. Toxín A je enterotoxín, vyvoláva apoptózu enterocytov a aktivuje zápalovú reakciu. Toxín B je cytotoxín, spôsobuje deštrukciu buniek poškodených toxínom A. Okrem toxínov A a B produkujú niektoré kmene aj tretí, tzv. binárny to-

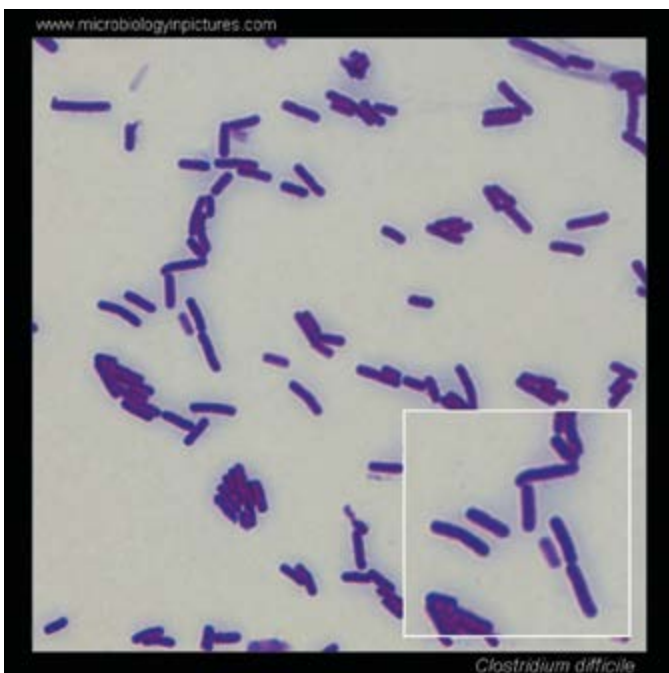
xín. Gény kódujúce binárny toxín (géны *cdtA* a *cdtB*) sú umiestnené mimo *PaLoc* lokus<sup>(8)</sup>. Jeho úloha v patogenéze ochorenia nie je zatiaľ celkom objasnená, ale prítomnosť toxínov A a B súčasne s binárnym toxínom zhoršuje priebeh ochorenia a sťažuje jeho liečbu (väčšina epidemických PCR ribotypov produkuje aj binárny toxín). Netoxigénne kmene *C. difficile* (neprodukujúce toxín A a B) sú nepatogénne a nepredstavujú ohrozenie ani pre vnímavého jedinca<sup>(9)</sup>.

### Patogenéza ochorenia

Infekcie vyvolané *C. difficile* (*Clostridium difficile* infections – CDI) vykazujú široké spektrum klinických prejavov od miernej hnačky cez pseudomembranóznu kolitídu až po toxický megakolon s úmrtnosťou 30 – 50 %<sup>(1)</sup>. Ochorenie najčastejšie vzniká v súvislosti s liečbou širokospektrálnymi antibiotikami (ATB), ktoré eliminujú normálnu črevnú flóru, príp. aj ako nozokomiálna infekcia. Na prepuknutie CDI sú potrebné dve podmienky: strata ochrannnej črevnej flóry (tzv. kolonizačná rezistencia) a infekcia toxigénnymi kmeňmi *C. difficile*. Mechanizmus účinku oboch toxínov na bunky črevného epitelu je odlišný. Toxín A (TcdA) je typický enterotoxín, ktorý poškodzuje bunky črevného epitelu a spôsobuje kumuláciu tekutín v čreve, čo má za následok vznik vodnatých, niekedy hemoragických hnačiek. Toxín B (TcdB) svojím cytotoxickým účinkom vedie k nekróze napadnutých buniek. Na črevnej sliznici vznikajú početné, typické ostrovčekovité (mapovité) ulcerácie pokryté plablanami, dobre viditeľné pri

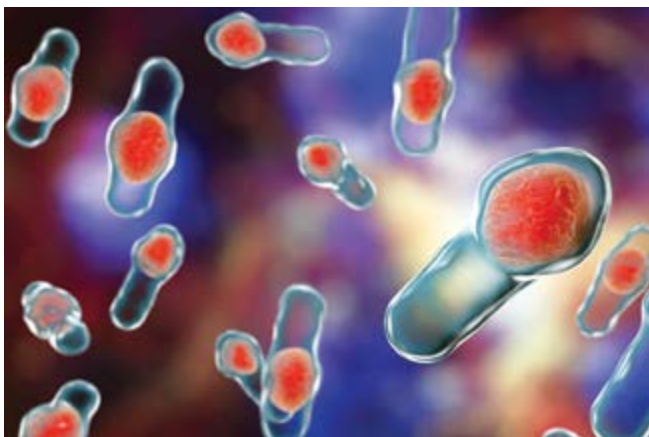
endoskopickom vyšetrení<sup>(17)</sup>. Pôsobením toxínu B na hladkú svalovinu a vegetatívne nervstvo v stene hrubého čreva dochádza k spomaleniu až zastaveniu peristaltiky a rozvoju ilea, čím zároveň vzniká ideálne prostredie na množenie mikroorganizmov. Takéto poškodenie môže vyústiť až do perforácie čreva. Terminálne štádium choroby sa vyznačuje enormnou distenziou hrubého čreva (megakolon) a postupnou stratou bariérovej funkcie črevnej sliznice s následným prienikom črevných baktérií do hlbších tkanív a potom do krvi. Vzniká sepsa, najčastejšie gramnegatívna, s rýchlym rozvojom septického šoku s vysokou úmrtnosťou<sup>(1)</sup>. Diagnóza tohto ochorenia sa stanovuje na základe anamnézy, klinického obrazu, endoskopického nálezu pseudomembranózneho kolitídy a laboratórneho dôkazu toxínov *C. difficile* v stolici.

**Obrázok 1.** *Clostridium difficile* – farbenie podľa Grama



**zdroj:** <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/clostridium-difficile.jpg>

**Obrázok 2.** *Clostridium difficile* – spóry

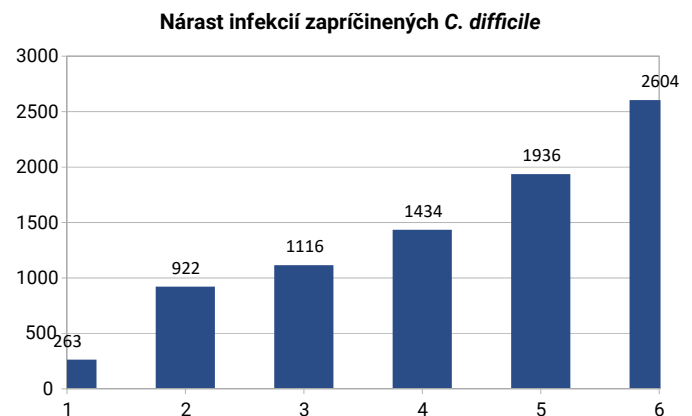


**zdroj:** [https://www.google.com/search?q=clostridium+difficile+photos&client=firefox-b&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj-hu63jwvPbAhXqZpoKHZBSB8QQ\\_AUICigB&biw=1908 &bih=959#imgrc=z\\_Jz6gXYgAU4xM](https://www.google.com/search?q=clostridium+difficile+photos&client=firefox-b&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj-hu63jwvPbAhXqZpoKHZBSB8QQ_AUICigB&biw=1908 &bih=959#imgrc=z_Jz6gXYgAU4xM)

## Epidemiológia ochorenia

CDI majú celosvetovo a rovnako na Slovensku narastajúcu tendenciu výskytu. Asi 90 % všetkých foriem CDI vzniká v nadväznosti na predchádzajúcu alebo súbežnú antimikrobiálnu terapiu, hlavne systémovo podávanými antibiotikami. Ich nárast súvisí aj s vyšším vekom pacientov (nad 65 rokov), polymorbiditou, dlhodobou hospitalizáciou, častým užívaním antisekrecčných liekov a inhibítorov protónovej pumpy, so zámkami na hrubom čreve, s hypomobilitou čreva a mnohými ďalšími faktormi. O narastajúcej incidencii svedčia aj údaje poskytnuté Úradom verejného zdravotníctva SR (**graf 1**). Kým v roku 2011 bolo v SR hlásených 136 prípadov ochorení vyvolaných *C. difficile*, v roku 2017 ich počet stúpol na 2 604 prípadov. Reálny výskyt infekcií je však vyšší. Mnoho prípadov je nezachytených alebo poddiagnostikovaných, chýba štandardizácia poskytovaných údajov. Z uvedeného vyplýva dôležitosť venovať patričnú pozornosť diagnostike CDI. *C. difficile* je bežnou súčasťou črevného mikrobiómu u 50 % detí do 2 rokov a u 2 – 5 % bežnej populácie. Je najčastejším vyvolávateľom nozokomiálnej hnačky. Veľká časť infikovaných pacientov zostáva asymptomatických a stáva sa najväčším rezervoárom mikróba<sup>(4)</sup>. Odhaduje sa, že 7 – 11 % hospitalizovaných pacientov, 5 – 7 % pacientov sociálnych zariadení a menej ako 2 % ambulantných pacientov sú nosičmi kmeňov *C. difficile* produkujúcich toxíny. Na zvyšujúcej sa incidencii ochorení spôsobených *C. difficile* sa podieľa vysoká preskripcia antibiotík, ako aj objavenie sa hypervirulentných kmeňov<sup>(5)</sup>. Na prelome rokov 2002 – 2003 boli v Severnej Amerike opísané epidémie CDI vyvolané kmeňom 027/NAP1/B1. Tento hypervirulentný kmeň je charakteristický vysokou produkciou toxínov (A aj B), schopnosťou tvoriť viac spór ako kontrolné kmene (ľahšie šírenie v nemocničnom prostredí) a rezistenciou na fluorochinolóny<sup>(1)</sup>. Spomínaný ribotyp (RT) 027 sa následne rozšíril aj do západnej Európy. V Spojenom kráľovstve v rokoch 2008 – 2009 spôsobil až polovicu všetkých nozokomiálnych CDI. Následne boli opísané ďalšie epidemické RT, napr. RT 001, 014, 017, 078, 176. Podľa výsledkov celogenómového sekvenovania je RT 176 (označovaný ako 027-like) geneticky blízky príbuzný hypervirulentnému RT 027 a vykazuje aj podobné fenotypové vlastnosti<sup>(16)</sup>. Produkuje binárny toxín považovaný za prognostický marker pre vznik

**Graf 1.** Výskyt hnačkovitých ochorení vyvolaných *C. difficile*. Podľa údajov ÚVZ SR



**zdroj:** [www.uvzs.sk](http://www.uvzs.sk)

rekurentných epizód CDI<sup>(15)</sup> a klinický priebeh ochorenia vyvolaný týmto RT je rovnako závažný ako pri RT 027<sup>(10)</sup>. Identifikácia izolátov *C. difficile* a znalosť lokálnej epidemiologickej situácie je dôležitá pre zavedenie opatrení zamedzujúcich šíreniu epidemiologicky významných kmeňov v rámci nemocníc, resp. oddelení.

### Terapia

Liečebné postupy CDI sú zakotvené v slovenských odporúčaniach na diagnostiku a liečbu kolitídy spôsobenej *C. difficile*<sup>(7)</sup>. Všeobecné odporúčania v liečbe ľahkých foriem CDI sú: ukončenie ATB liečby, ktorá infekciu vyvolala (ak je to možné), rehydratácia, bezzvyšková diéta. Pri nízkej hladine albumínu u pacienta je potrebná jeho parenterálna substitúcia. Lieky tlmiace črevnú peristaltiku (spazmolytiká, opiáty) sú kontraindikované. Na liečbu stredne ťažkých, ťažkých foriem a rekurentných foriem CDI sa odporúča medikamentózna antibiotická liečba: metronidazol, vankomycín a nové makrocyclické antibiotikum fidaxomicín. Ako ďalšie možnosti podpornej liečby sa využívajú probiotiká a v poslednom období aj tzv. fekálna bakterioterapia. Transplantácia stolice je oficiálne odporúčanou metódou pri liečbe viacpočetných rekurencií CDI s vysokým percentom úspešnosti, ktorým prekonáva aj existujúce antibiotické režimy<sup>(13)</sup>.

### Laboratórna diagnostika CDI

Na mikrobiologickú diagnostiku CDI sa dnes využíva viacero metód. Každá z nich má inú mieru citlivosti a špecificity, preto sa odporúča ich kombinácia. Cielené mikrobiologické vyšetrenie stolice je indikované u pacientov s klinickým podozrením na CDI. Naopak, nie je indikované u pacientov s formovanou stolicou a bežne sa nerobí ani u detí do 1 – 2 rokov veku.

### Dôkaz antigénu *C. difficile*

Glutamátdehydrogenáza (GDH) je špecifický antigén – exoenzým, produkovaný všetkými kmeňmi *C. difficile* (toxigénnymi aj netoxigénnymi). Dôkaz antigénu je možný priamo zo stolice, špecifickosť testu je 80 – 100 %. Má vysokú negatívnu prediktívnu hodnotu (NPV), t. j. negatívny výsledok s veľkou pravdepodobnosťou vylučuje možnosť klostrídiovej infekcie. Test však neodlíši toxigénne kmene od netoxigénnych. Jeho nevýhodou je aj možnosť skříženej reakcie s inými druhmi *Clostridium spp.* prítomnými v stolici (falošne pozitívny výsledok v 20 %). GDH môže byť stanovená samostatne alebo je súčasťou testov dokazujúcich zároveň toxíny *C. difficile*.

### Dôkaz toxínov *C. difficile* (A/B)

Na dôkaz toxínov A/B sa používajú diagnostické súbory založené na princípe enzýmovej imunoanalýzy alebo imunochromatografie. Na trhu je v súčasnosti k dispozícii celý rad komerčných súprav s rôznou citlivosťou a špecifickosťou. Ich výhodou je cenová dostupnosť, rýchlosť, vysoká špecifickosť, jednoduché vyhotovenie s jednoznačnou interpretáciou dôkazu toxigenity kmeňa. Test má vysokú pozitívnu prediktívnu hodnotu (PPV), t. j. pozitívny výsledok s veľkou pravdepodobnosťou dokazuje klostrídióvu infekciu. Nevýhodou je relatívne nízka citlivosť (90 %), čo v niektorých prípadoch vedie k falošne negatívnym výsledkom.

### Anaeróbna kultivácia

Anaeróbna kultivácia *C. difficile* je pomerne náročná a zdĺhavá (2-3 dni). Na kultiváciu sa používajú selektívne pôdy s obsahom cefoxitínu a cykloserínu, ktoré potláčajú sprievodnú flóru. Konfirmácia kultivačného nálezu je možná mikroskopicky (orientačne), biochemicky (komerčnými anaerotestami), latexovým aglutinačným testom, príp. použitím novších techník (PCR – polymerase chain reaction, MALDI TOF MS – matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). Kultivačné vyšetrenie sa považuje za nevyhnutné pri všetkých vzorkách stolice, pri ktorých bola potvrdená pozitivita GDH vrátane toxín-negatívnych stolíc. Na dôkaz toxínov z narastenej kultúry možno použiť imunochémické testy alebo PCR. Výhodou kultivačného vyšetrenia je jeho vysoká výťažnosť, možnosť uloženia izolovaných kultúr, stanovenia citlivosti na antibiotiká (ATB), príp. molekulárna typizácia (epidemiologické účely).

### Dôkaz cytotoxicity na tkanivových kultúrach

Dôkaz cytotoxicity na tkanivových kultúrach má skôr historický význam. Táto metóda je náročná na čas, laboratórne vybavenie a interpretačné skúsenosti, jej nevýhodou je aj riziko falošnej positivity. Senzitivita sa uvádza 94 – 100 %. Cytotoxín možno dokázať v stolici alebo z izolovaného kmeňa *C. difficile* na tkanivových kultúrach fibroblastov, kde dochádza k cytopatickému efektu.

### PCR – dôkaz génov toxicity

Zavedenie PCR metód, či už ako skriningových alebo konfirmačných metód, do diagnostiky CDI je európsky trend. Vyznačujú sa vysokou citlivosťou (99 – 100 %) a špecifickosťou, významne skracujú čas získania výsledku. Hodnota PPV je tu paradoxne znížená, pretože PCR je taká citlivá, že vo vzorke dokáže i malé množstvo toxigénnych *C. difficile* prítomných pri bežnej kolonizácii, nerozlíši teda kolonizáciu od infekcie<sup>(14)</sup>. Dnes máme k dispozícii komerčné súbory (na princípe realtime PCR) na dôkaz génu pre tvorbu toxínu B, génu pre binárny toxín, súbory na detekciu delécií typických pre niektoré epidemické PCR ribotypy (napr. 027, 176). PCR má význam najmä pri verifikácii ťažkých foriem CDI a pri potvrdení nejasných výsledkov predchádzajúcich testov.

### Typizácia *C. difficile* na epidemiologické účely

Medzi metódy nadstavbovej diagnostiky patrí ribotypizácia a toxinotypizácia, ktorých základom je PCR a makroreštrikčná analýza pulznou gélovou elektroforézou<sup>(2)</sup>. Pri ribotypizácii *C. difficile* dochádza k amplifikácii úseku medzi génmi pre 16S a 23S rRNA (tzv. Intergenic Spacer Region). Medzi jednotlivými ribotypmi je rozdiel v počte prítomných alel týchto génov aj v dĺžkach úsekov medzi alelami<sup>(6)</sup>. Každý RT tvorí špecifický elektroforetický profil, podľa ktorého je následne identifikovaný. Na určenie konkrétneho RT sú získané elektroforeogramy porovnávané s rakúskou webovou databázou <https://webribo.ages.at/>. Celkovo bolo objavených viac než 800 PCR ribotypov a 24 toxinotypov.

### Odporúčaný diagnostický postup

Základný diagnostický algoritmus vychádza z dôkazu GDH alebo dôkazu génu/génov pre produkciu toxínov pomocou PCR a v prípade positivity následnej detekcie toxínov A/B

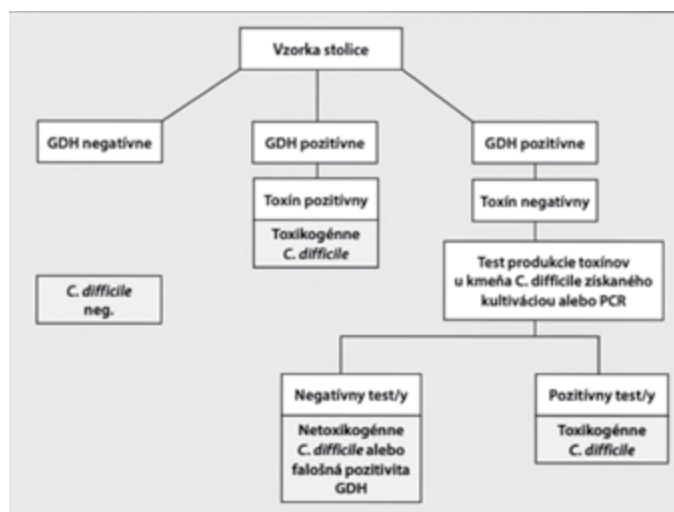


imunoenzymatickou metódou (EIA)<sup>(3)</sup>. Hovoríme o tzv. 2-stupňovom diagnostickom algoritme. GDH negatívne vzorky možno interpretovať ako definitívne negatívne na prítomnosť *C. difficile* a nie je potrebné ich ďalej testovať. Ak je test GDH pozitívny, je nutné potvrdiť alebo vylúčiť toxigenitu kmeňa *C. difficile* (dôkaz toxínov). V prípade pozitivity GDH a negativity toxínov A/B je interpretácia nejednoznačná. Môže ísť o prítomnosť netoxigénneho kmeňa alebo falošne negatívny výsledok podmienený obmedzenou senzitivitou metódy na dôkaz toxínov. V tomto prípade sú potrebné ďalšie laboratorné vyšetrenia ako PCR alebo kultivácia s následným overením toxigenity izolovaného kmeňa. Hovoríme o tzv. 3-stupňovom diagnostickom algoritme. Vzhľadom na rozdielnu citlivosť rôznych používaných metód je podľa súčasných odporúčaní preferovaná kombinácia minimálne dvoch alebo viacerých testov. Hlavným cieľom použitia doplnujúcich metód je získanie čo najspoľahlivejšieho výsledku, teda vylúčenie alebo potvrdenie prítomnosti toxikogénneho kmeňa *C. difficile*. Príklad algoritmu kombinujúceho rôzne metodiky je uvedený v **schéme 1**<sup>(7)</sup>. Pri závažných formách CDI a z epidemiologických dôvodov je vhodná kultivácia stolice a následná molekulárna typizácia izolovaného kmeňa. Interpretáciu laboratorných nálezov treba vždy hodnotiť v súvislosti s klinickým nálezom u konkrétneho pacienta, s aktuálnou epidemiologickou situáciou a ostatnými laboratornými parametrami.

## Materiál a metodika

Naša štúdia prebiehala od mája do septembra 2017. Celkovo 481 hnačkovitých stolíc bolo vyšetrených 3-stupňovým diagnostickým algoritmom. V prvom kroku boli všetky vzorky testované na prítomnosť GDH kvalitatívnym imunochromatografickým testom Rapid-Viditest *C. difficile* Ag (Vidia). V druhom kroku boli všetky GDH pozitívne vzorky analyzované na prítomnosť toxínov A/B pomocou imunochromatografického testu RIDA®QUICK *Clostridium difficile* Toxin A/B (R-Biopharm). Vo všetkých GDH pozitívnych vzorkách stolice bola zároveň založená anaeróbna kultivácia po predchádzajúcom „alkoholovom šoku“: vzorka stolice zmiešaná s 96 % etanolom v pomere 1 : 1, po dôkladnom premiešaní na vortexe je inkubovaná pri laboratornej teplote asi 30 minút až

**Schéma 1.** Príklad 3-stupňového algoritmu pri dôkaze *C. difficile* v stolici



1 hodinu. Následne sa 1-2 kvapky suspenzie inokulujú na selektívny agar pre *C. difficile* (Brazier, Oxoid) a v anaeróbnej atmosfére kultivujú 48 – 72 hodín pri teplote 35 – 37 °C. Vykultivované suspektné kolónie *C. difficile* boli identifikované pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF MS. Izoláty *C. difficile* vykultivované z GDH pozitívnych a toxín-negatívnych vzoriek boli znovu testované na prítomnosť toxínov A/B (toxigénna kultivácia – TC) rovnakým imunochromatografickým testom ako v prípade stanovenia toxínov v stolici (3. diagnostický stupeň). Molekulárna analýza kmeňov identifikovaných ako *C. difficile* bola vykonaná v spolupráci s Ústavom lekárskej mikrobiológie FN v Motole v Prahe, Česká Republika. Zahŕňala stanovenie génov pre produkciu toxínov A/B (*tcdA/tcdB*), binárneho toxínu (*cdtA, cdtB*) a ribotypizáciu izolátov *C. difficile*. Prítomnosť génov pre produkciu toxínov bola stanovená pomocou multiplex PCR<sup>(12)</sup>.

## Odber biologického materiálu a transport do laboratória

Na mikrobiologické vyšetrenie stolice na prítomnosť *C. difficile* je potrebné odobrať minimálne 2 ml stolice do sterilnej nádoby. Stolica má byť spracovaná a vyšetrená do dvoch hodín, pretože toxíny sú pomerne nestabilné, rýchlo sa rozpadávajú a výsledkom môže byť falošná negativita. Ak nemožno vyšetriť stolicu hneď po odbere, je vhodné vzorku uchovať pri chladničkej teplote (asi 5 °C), vtedy je stabilita toxínu zabezpečená na 48 hodín. Na dlhodobé uchovávanie vzoriek treba vzorku stolice hlboko zmraziť na –70 °C.

## Výsledky

V priebehu 5 mesiacov bolo vyšetrených celkovo 481 hnačkovitých stolíc z 3 nemocníc. Prehľad jednotlivých oddelení, z ktorých pochádzali vyšetované vzorky, je uvedený v **tabuľke 1**. Z celkového počtu vyšetrených stolíc bolo 104 vzoriek GDH pozitívnych (21,6 %). Po odstránení neúspešne kultivovaných, duplicitných, resp. triplicitných vzoriek ostalo

**Tabuľka 1.** Prehľad oddelení, z ktorých pochádzali vyšetované vzorky stolíc

máj – september 2017	Celkový počet vyšetrených stolíc
<b>FNsP J.A. Reimana Prešov</b>	
Interné odd. (vrátane JIS)	88
Odd. dlhodobo chorých	43
Odd.klinickej onkológie (vrátane onkoamb.)	22
Detské odd. (vrátane JIS)	16
Infekčné odd. (vrátane infektolog.amb.)	59
gastroambulancia FNsP	60
<b>Letecká vojenská nemocnica Košice</b>	
Odd. dlhodobo chorých	27
GeriatRIA	6
gastroambulancia LVN	24
<b>Detská fakultná nemocnica Košice:</b>	
Klinika detí a dorastu	64
Infekčné odd.	1
Detská onkológia	4
gastroambulancia DFN	21
<b>Ostatné:</b>	
Iné oddelenia	17
ambulancie	29
<b>Spolu:</b>	<b>481</b>

v súbore 66 vzoriek (66 pacientov). Izoláty *C. difficile* z týchto stolíc boli podrobené molekulárnej typizácii. Z počtu 66 vzoriek bolo 58 (87,9 %) toxigénnych (prítomné gény *tcdA* a *tcdB*), z nich 6 izolátov malo navyše gény pre binárny toxín (*cdtA*, *cdtB*). Zvyšných 8 vzoriek zo súboru (12,1 %) bolo netoxigénnych, t. j. nebola v nich preukázaná prítomnosť žiadneho z génov pre produkciu toxínov. Pomocou 3- stupňového diagnostického algoritmu a kombináciou ďalších metód (imunochromatografické stanovenie toxínov a detekcia toxigenity metódou PCR) bolo zistené, že z počtu 58 toxínovo pozitívnych stolíc malo 35 vzoriek pozitívny toxín priamo zo stolice a v 23 vzorkách (toxín-negatívnych zo stolice) až toxigénna kultivácia potvrdila pozitívitu toxínov (**tabuľka 2**).

## Záver

Rýchla a včasná diagnostika *C. difficile* je dôležitá nielen pre liečbu samotného pacienta, ale aj z dôvodu prevencie nozokomiálnych nákaz. Aj keď je mikrobiologické vyšetrenie pre konfirmáciu CDI kľúčové, neslúži na kontrolu účinnosti liečby ani ako argument pre izolačné opatrenia, ak už u pacienta nie je hnačka prítomná. Hlavným kritériom vyliečenia CDI je ústup klinických príznakov, nie negatívita mikrobiologického vyšetrenia. Pozitívne výsledky klasických a molekulárnych vyšetrení môžu pretrvávajúť dlhodobo po ukončení liečby (kolonizácia *C. difficile*) a nie sú dôvodom na ďalšiu ATB terapiu. Aj v tomto prípade je dôležitý klinický stav pacienta. Neodporúča sa ani opakované vyšetrenie v intervale kratšom ako 7 dní u pacientov, u ktorých predchádzajúce

**Tabuľka 2.** Sumár výsledkov vyšetřovaného súboru vzoriek (n=66)

Počet vzoriek	GDH	Toxín zo stolice	Toxín z kultivácie	Gény toxicity
66	+			
35	+	+		+
23	+	-	+	+
8	+	-	-	-

vyšetrenie na *C. difficile* bolo negatívne, s výnimkou situácií, ak dôjde k progresii ochorenia a boli vylúčené aj iné príčiny<sup>(3)</sup>. Naše výsledky ukazujú, že ani 2-stupňový diagnostický algoritmus nie je v mnohých prípadoch postačujúci. Takmer 40 % GDH pozitívnych vzoriek v našom súbore bolo určených ako toxigénne až použitím 3-stupňového diagnostického algoritmu. Preto je potrebné zvážiť jeho zavedenie a/alebo kombináciu viacerých metód aj do rutínnej laboratórnej praxe. Riešenie problematiky CDI v nemocničných zariadeniach si vyžaduje komplexný prístup vrátane adekvátnej špecifickej ATB terapie zameranej na redukciu najrizikovejších skupín ATB (chinolóny, širokospektrálne cefalosporíny, potenciované aminopenicilíny), správnu indikáciu laboratórneho vyšetrenia, dodržiavanie hygienicko-epidemiologických opatrení na zamedzenie šírenia spór, dôslednú izoláciu všetkých infikovaných pacientov s CDI, ale hlavne dôsledné dodržiavanie bariérovej ošetrovateľskej techniky všetkými zainteresovanými zdravotníckymi pracovníkmi.

## LITERATÚRA

1. Beneš J, Husa P, Nyč O, a spol. Doporučený postup diagnostiky a liečby kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. Klin Mikrobiol Infekc Lek 2014; 20: 56-66.
2. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41: 47-57.
3. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2016; 22(4): 63-81.
4. Gerding DN. *Clostridium difficile* – associated diarrhea and colitis. Infect Control Hosp Epidemiol 1995; 16(8): 459-477.
5. Hedge DD. New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection. Ther Clin Risk Manag 2008; 4(5): 949-964.
6. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 11): 1377-1382.
7. Jarčuška P, Bátorový M, Drgoňa L, a spol. Odporúčaný postup diagnostiky a liečby kolitidy spôsobenej *Clostridium difficile*. Via pract 2015; 1: 1-12.
8. Lesa FC, Gould CV, Macdonald LC. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. Clin Infect Dis 2012; 55: 65-70.
9. Natarajan M, Walk ST, Young VB, et al. A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. Anaerobe 2013; 22(8): 1-5.

10. Nyč O, Pituch H, Matějková J, a spol. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. Lancet 2011; 377(9775): 1407.
11. O'Connor, et al. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. Gastroenterology 2009; 136: 1913-1924.
12. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP. 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(11): 1057-1064.
13. Polák P, Freibergrová M, Husa P, et al. Fekální bakterioterapie v léčbě rekurentní kolitidy způsobené *Clostridium difficile* na klinice infekčních chorob fakultní nemocnice Brno v letech 2010 – 2014 – prospektivní studie. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2015; 64: 232-5.
14. Surawicz ChM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol 2013; 108(4): 478-498.
15. 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.
16. Valiente E, Dawson LF, Cairns MD, et al. Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. J Med Microbiol 2012; 61: 49-56.
17. Voth ED, Ballard DJ, Jimmy D. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. Clinical Microbiology Reviews 2005; 18(2): 247-263.

**RNDr. Martina Krehelová**

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s.  
Magnezitárska 2/C, 040 01 Košice  
e-mail: martina.krehelova@medirex.sk