

OBSAH

	SOUHRN	3
1	ÚVOD.....	5
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1	Historie	7
2.2	Morfologie.....	7
2.3	Kultivace.....	8
2.4	Klinická manifestace, patogeneze a epidemiologie.....	8
2.5	Toxiny <i>C. difficile</i>	10
2.6	Nový hypervirulentní kmen 027/NAP1.....	11
2.7	Rizikové faktory pro vznik CDAD.....	11
2.8	Význam předchozí antibiotické léčby	12
2.9	Diagnostika.....	12
2.9.1	Kultivace	12
2.9.1.1	Anaerobní kultivace.....	13
2.9.2	Průkaz toxigenity	14
2.9.2.1	Latexová aglutinace.....	14
2.9.2.2	Imunoreakce se značenými protilátkami - enzymová imunoanalýza.....	15
2.9.3	Typizace kmenů	15
2.9.3.1	Polymerázová řetězová reakce – PCR.....	16
2.9.3.1.1	PCR – ribotypizace kmenů <i>C.difficile</i>	17
2.9.4	Detekce toxinů z klinického materiálu.....	18
2.9.4.1	Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA.....	19
2.9.5	Citlivost na antibiotika	20
2.10	Prevence	21
2.11	Terapie.....	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Odběr vzorků	24
3.2	Uchovávání vzorků a transport do laboratoře.....	25
3.3	Diagnostika.....	25
3.3.1	Průkaz toxinů <i>C.difficile</i>	25
3.3.1.1	Průkaz toxinu A – <i>C.difficile</i> toxin A Kit (firma OXOID).....	25
3.3.1.2	Průkaz toxinu A i B – Ridascreen <i>C.difficile</i> Toxin A/B (C 0801).....	26
3.3.2	Kultivace	27
3.3.3	Biochemická identifikace	28
3.3.4	Testování citlivosti na antibiotika.....	29
3.3.4.1	Difúzní diskový test.....	29
3.3.4.2	Test ATB Ana.....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	31
5	ZÁVĚR.....	33
6	LITERATURA.....	34
6.1	Literatura – obrázky, tabulky.....	38

7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	40
8	PŘÍLOHY	41
8.1	Materiál	41
8.1.1	Použité reagensy	41
8.1.2	Přístroje a pomůcky	41
8.2	Tabulky	42
8.3	Grafy	43

SOUHRN

Práce se zabývá převážně problematikou diagnostiky kmenů *Clostridium difficile*. V úvodu je tato bakterie stručně charakterizována a v dalším textu jsou pak uvedené její obecné vlastnosti, příčiny a projevy onemocnění, které způsobuje a současné možnosti laboratorní diagnostiky v lékařské mikrobiologii.

Praktická část se zabývá vyšetřením průkazu toxinů *C.difficile* ve stolici, které bylo v případě pozitivního výsledku doplněno kultivací. Kultivace a následné stanovení citlivosti na antibiotika není prováděna rutinně v každé laboratoři. Relativně novou metodou, dostupnou zatím jen na některých pracovištích, se stala PCR ribotypizace kmenů.

Celkem bylo v laboratoři Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol vyšetřeno 195 pacientů s cílem prokázat přítomnost toxinů *C.difficile* ve stolici. Z tohoto počtu bylo 30 vzorků stanoveno jako pozitivní na přítomnost těchto toxinů. Vzorky s pozitivním nálezem byly následně kultivovány na speciálních půdách určených pro kultivaci *C.difficile*. Po získání čisté kultury kmene byla stanovena citlivost k metronidazolu.

Klíčová slova: *Clostridium difficile*, průkaz toxinů, kultivace, antibiotika

SUMMARY

This thesis mainly describes the question of *Clostridium difficile* diagnostic service. The first part briefly describes the characteristic of this bacterium. Further, the paper outlines common properties of the bacterium, the causes and manifestations of the diseases that it implicates and current opportunities of the laboratory service.

The practical part of bachelors work deals with examination of toxin detection *C.difficile* in stool specimens, which was in case of positive result completed by cultivation. The cultivation and following Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) is not routine task carried out in every clinical laboratory. PCR ribotyping is relatively new method that is provided rarely on the present.

Generally, 195 patients have been tested in laboratory of Department of Medical Microbiology in Motol for *Clostridium difficile* toxin inherency in stool. Overall 30 samples have been tested as positive. The positive samples have been cultivated on special soil just for *Clostridium difficile* to acquire a clean culture. After that, the metronidazole susceptibility has been obtained from these gained isolates.

Key words: *Clostridium difficile*, toxin detection, cultivation, antibiotics

1 ÚVOD

Clostridium difficile je grampozitivní bakterie kolonizující běžně střevní sliznici zdravých lidí. V důsledku léčby širokospektrými antibiotiky dochází k potlačení střevní mikroflóry a pomnožení *C.difficile*. Pomnožení této bakterie na střevní sliznici způsobuje onemocnění různé závažnosti, od průjmů až po životu nebezpečnou pseudomembranózní enterokolitidu. Onemocnění, která *C.difficile* způsobuje, se označují zkratkou CDAD (*Clostridium difficile* – associated diarrhoea/disease). Pojmenována byla podle své nesnadné kultivovatelnosti, neboť „*difficile*“ v překladu z latiny znamená „obtížný“. Kultivace *C.difficile* se provádí na speciálních diagnostických půdách. Dalším rutinně prováděným vyšetřením je průkaz klostridiálních toxinů ve stolici. *C.difficile* produkuje dva různé typy toxinů. Toxin A je typický enterotoxin a toxin B působí jako cytotoxin. Toxin B je mnohonásobně toxičtější, ale původcem způsobujícím průjmy a další symptomy CDAD se považuje toxin A. V případě pozitivního průkazu toxinů ve stolici je jako nejvhodnější terapie udávána léčba metronidazolem a vankomycinem, ke kterým *C.difficile* prozatím nevykazuje rezistenci. V relativně nedávné době byl však v Kanadě popsán nový, hypervirulentní kmen *C.difficile*, jenž se na základě diagnostiky označuje 027/NAP1. Tento kmen vykazuje hypertoxigenitu, což znamená, že v porovnání s ostatními kmeny je produkce toxinů několikanásobně vyšší. V České republice nebyl výše zmiňovaný kmen dosud diagnostikován.

C.difficile je patogen se schopností snadno se epidemicky šířit, což je způsobeno převážně vysokou rezistencí k běžně podávaným antibiotikům a odolností spor vůči mnoha dezinfekčním prostředkům. Problematika výskytu a šíření *C.difficile* je v poslední době často diskutovaným tématem.

Cíle mé práce jsou tyto:

- zhodnocení vzorků, u kterých bylo provedeno vyšetření na průkaz toxinů *C.difficile* –
- statistika počtu pozitivních a negativních vzorků

- posouzení výskytu pozitivních výsledků v jednotlivých věkových skupinách a odděleních nemocnice
- stanovení citlivosti *C.difficile* k metronidazolu

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie

Clostridium difficile bylo poprvé izolováno Hallem a O'Toolem v roce 1935 z mekonia a stolic 40% vyšetřovaných novorozenců a o 2 roky později bylo nalezeno Snyderem ve stolici 15% dětí do jednoho roku. V roce 1971 prokázali Georges a Symonds, že ve stolici osob, u kterých se po aplikaci antibiotik vyvinula pseudomembranózní enterokolitida, je přítomen toxin neutralizovatelný sérem proti *Clostridium sordellii*. V roce 1978 Bartlett a spol. a George a spol. izolovali při tomto onemocnění *C.difficile* a prokázali, že produkuje toxin neutralizovatelný sérem proti toxinu *C.sordellii*. V příštím roce tento toxin zmínění autoři purifikovali a stanovili jeho základní vlastnosti. *C.difficile* se vyskytuje ve stolici lidí, odkud se může dostat do peritoneálních i jiných exsudátů¹.

Zpočátku byl za původce pseudomembranózní enterokolitidy považován *Staphylococcus aureus*, ale později bylo prokázáno, že kolitidu způsobují toxiny uvolněné právě z *C.difficile*².

Podle současně uváděných statistik se předpokládá, že asi 10 až 25 % postantibiotických průjmů, 50 až 75 % postantibiotických kolitid a 90 až 100 % pseudomembranózních kolitid je způsobeno toxigenními kmeny *Clostridium difficile*³.

2.2 Morfologie

Tyčinky *C. difficile* se vyskytují ve 2 formách: jako štíhlé, rovné grampozitivní tyčinky s cylindrickými, tyčinku málo vydouvajícími sporami (asi $0,6 \times 4-6\mu\text{m}$) a jako robustní tyčinky, rozměrů asi $1,2-1,6 \times 6-16 \mu\text{m}$, tvořící subterminální spory. Mají sklon k autolýze, která v některých buňkách postihuje nejdříve polární sporangium. Pak spora

vypadá jako terminální. Ve střevě *C. difficile* sporuluje vydatně, in vitro je sporulace máločetná, ale zvýší se přidávkem žlučových solí a žoutku. Spory jsou málo termorezistentní. Teplo poškozuje jejich lytický germinační enzym, ale pokud jej nahradíme lysozymem, poškozené spory vyklíčí^{4,20}.



Obr. 1: *Clostridium difficile*¹

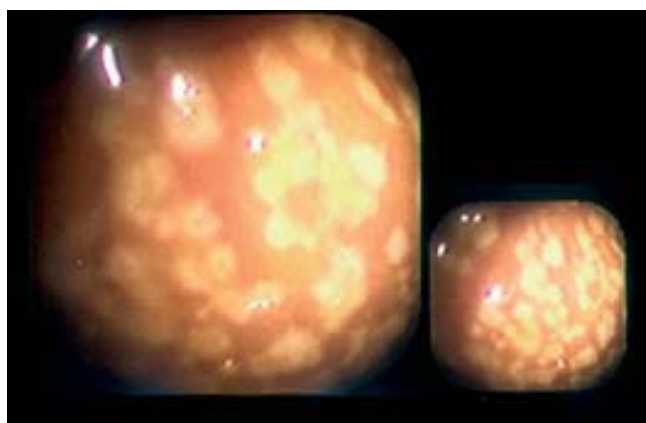
2.3 Kultivace

C.difficile bylo charakterizováno nesnadnou kultivovatelností, ale díky moderní kultivační technice a používání selektivních půd k jeho izolaci ze stolice, v nichž je cefoxitin a cykloserin inhibitory průvodní flóry, se kultivuje relativně dobře a jeho název už není oprávněný. Kolonie jsou hladké, ploché, našedlé až nažloutlé, vroubkovaných i hladkých okrajů, o průměru 3-5 mm po 2-3 dnech. Nehemolyzují, v UV světle žlutě fluoreskují. Mikrob je striktně anaerobní, proto musí jeho kultivace probíhat v anaerostatu^{1,20}.

2.4 Klinická manifestace, patogeneze a epidemiologie

Clostridium difficile je přítomno zhruba u 5 – 10 % zdravé populace. V případě, že se jedná o dlouhodobě hospitalizované pacienty, může tato hodnota dosáhnout až 25%. Onemocnění vyvolaná *C.difficile* se označují akronymem CDAD (*C.difficile*-associated diarrhoea/disease) a nejčastěji jsou spojena s užíváním širokospektrálních antibiotik.

Při opakovaném užívání antibiotik dochází k redukci až k úplné eliminaci přirozené střevní mikroflóry. Pokud je *C.difficile* přítomno ve střevě pacienta léčeného antibiotiky, může se díky své rezistenci k většině antibiotik ve střevě pomnožit a vyvolat tak CDAD. Tato onemocnění provází široké spektrum obtíží, od mírných průjmů, přes středně vážné nemoci s vodnatým průjmem, bolestmi břicha a nevolností, až po život ohrožující a v některých případech smrtelnou pseudomembranózní enterokolitidu (PME) (viz.obr.2). PME může být provázena toxickým megakolon, někdy také perforací střeva a její smrtnost může být až 45%. Řada případů CDAD ale probíhá atypicky. Ne vždy má pacient průjem, někdy je přítomna jen horečka a vzestup zánětlivých markerů, meteorismus a různě silné bolesti břicha. Ze zánětlivých ukazatelů je nejvýraznější leukocytóza, která běžně dosahuje hodnot nad 20.000/mm³. Podle studie kanadských lékařů vzrostla incidence CDAD z 35,6/100 000 obyvatel v r. 1991 na 156,3/100 000 v r. 2003. Paralelně stoupla i 30-denní mortalita z 4,7% na 13,8% (p < 0,001). Vzestup incidence byl nejvýraznější ve věkové skupině nad 65 let, ale nově zjištěnou rizikovou skupinou osob jsou těhotné ženy, kde zřejmě k rozvoji onemocnění přispívá omezení pohybu střev, možná i horší prokrvení střeva. V Evropě byl v letech 2003-2005 hlášen výskyt epidemií CDAD v mnoha nemocnicích ve Velké Británii, Nizozemí, Belgii, severní Francii a severozápadním Německu. Výskyt CDAD však není vázán jen na prostředí nemocnic, podle amerických i evropských studií vzniká až třetina onemocnění v běžné komunitě^{5,6,7,8}.



Obr. 2: Pseudomembranózní enterokolitida, endoskopie¹¹

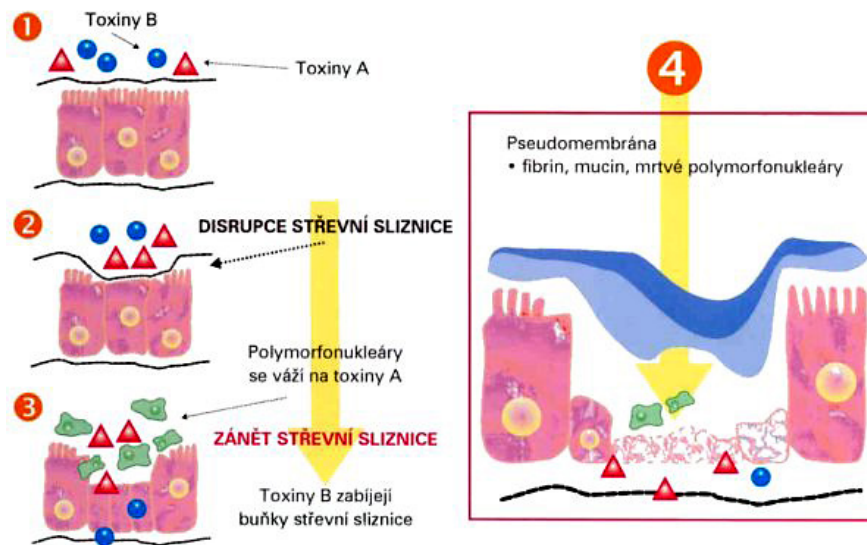
2.5 Toxiny *C. difficile*

Clostridium difficile produkuje dva typy toxinů, které jsou zodpovědné za vznik symptomů PME:

- a) Toxin A (TcdA) – mol. hmotnost: 308 kDa
- b) Toxin B (TcdB) - mol. hmotnost: 269 kDa

Oba toxiny se řadí mezi klasické exotoxiny. Toxin A se chová jako typický enterotoxin, toxin B jako cytotoxin. Toxin A vyvolává kumulaci tekutin ve střevním epitelu hostitele. Toto hromadění tekutiny není kumulací vody, ale vazké viskózní tekutiny krevního původu. Toxin A tedy zapříčiňuje dysfunkci buněk střevního epitelu, které nemohou z důvodu velkého množství viskózní tekutiny v buňkách dál optimálně zabezpečovat kontrolu pohybu vody. Toxin A je pravděpodobnou příčinou průjmů, které jsou prvním symptomem PME. Toxin B nevykazuje enterotoxickou aktivitu, zabíjí však jak buňky ve tkáňových kulturách, tak i buňky střevního epitelu. Je zhruba 100 – 1000x toxičtější než toxin A. Vzhledem k jeho vysoké cytotoxicitě je neutralizace cytotoxické aktivity specifickým antisérem „zlatým standardem“ pro diagnostiku onemocnění. Zajímavé je, že i přesto není toxin B zodpovědný za většinu symptomů PME. Toxin A a toxin B jsou produkovány během vegetativního růstu. Jejich tvorba není na rozdíl od botulotoxinů a tetanotoxinu spřažena se sporulací buněk. Pouze jedna buňka *C. difficile* ze sta produkuje oba druhy toxinů. Toxin A se vyznačuje výraznou chemotaxí k polymorfonukleárům (PMN) a je tudíž zodpovědný za zánětlivou reakci buněk střevního epitelu, která je prvním symptomem rozvíjející se PME. Toxin A je toxický pro většinu buněk imunitního systému, protože vyvolá disrupci cytoskeletálních komponent. Buňky střevní sliznice jsou zničeny jen v případě, že jsou přítomny oba druhy toxinů. Toxin A zničí povrchové struktury buněk střevní sliznice a zároveň odstíní případný preventivní účinek PMN. Tím umožní molekulám toxinu B úspěšně zaútočit na buňky střevního epitelu. Toxin B zabíjí buňky střevního epitelu jen tehdy, jsou-li porušeny její povrchové struktury a buňky jsou postiženy dysfunkcí transportu vody. Na střevní sliznici vznikají rozsáhlé ulcerace - nekrotické útvary, pseudomembrány – konglomeráty zničených buněk střevního epitelu, uhynulých PMN, fibrinu a mucinu ve tvaru květákovitě zduřelých, žlutě zbarvených krust, které lze poměrně snadno endoskopicky detekovat^{8,9}.

Toxiny Clostridium difficile



Obr. 3: Vliv toxinů *C.difficile* III

2.6 Nový hypervirulentní kmen 027/NAP1

V současné době se diskutuje o změnách výskytu a průběhu CDAD, který způsobuje nový kmen, poprvé detekovaný v Anglii. Na základě PCR ribotypizace je charakterizován jako ribotyp 027. Onemocnění způsobené tímto kmenem bylo poprvé popsáno v Kanadě a USA. Při diagnostice založené na pulzní gelové elektroforéze (PFGE) vytváří tento kmen specifický sled linií, označovaný zkratkou NAP1 (North American Pulsovar 1). Třetím způsobem identifikace je typizace pomocí PCR-REA (restriction endonuclease analysis) a podle výsledků tohoto vyšetření jsou kmeny 027/NAP1 řazeny do toxinotypu III. Tento nový hypervirulentní kmen se vyznačuje ztrátovou mutací v regulačním genu, který za normálních okolností brzdí tvorbu toxinů. V důsledku toho tedy dochází k mnohanásobně větší tvorbě klostridiálních toxinů^{7,8}.

2.7 Rizikové faktory pro vznik CDAD

Uváděnými rizikovými faktory jsou vysoký věk, onkologická onemocnění, ulcerózní kolitida, malnutrice, imunosuprese, hemodialýza a dlouhodobá hospitalizace. Rizikové

faktory pro rekurenci onemocnění jsou podobné: vysoký věk, přetrvávání původní antibiotické léčby, pobyt na JIP a přítomnost závažné základní choroby. Výskyt rekurencí se udává v 8-50% případech CDAD ⁷.

2.8 Význam předchozí antibiotické léčby

Hlavním rizikovým faktorem pro vznik CDAD je jednoznačně antibiotická léčba podávaná v časovém intervalu 6-8 týdnů před rozvojem onemocnění. Tato podmínka je splněna u více než 90% nemocných. Příčinou enterokolitidy je kolonizace a pomnožení *C.difficile* ve střevě po aplikaci především linkomycinových antibiotik, ale i cefalosporinů všech generací a aminopenicilinů (s inhibitorem β -laktamázy i bez něho). Ke vzniku CDAD může dojít prakticky po užití všech antiinfektiv (snad s výjimkou glykopeptidů), ale i po terapii některými antitumorózními chemoterapeutiky, která mají určitou antibiotickou aktivitu. Nově je udáván častý výskyt CDAD po léčbě fluorochinolony, např. gatifloxacinem, ale i levofloxacinem a ciprofloxacinem. Rozvoj CDAD je naopak vzácný po léčbě amonoglykosidy, kotrimoxazolem, penicilinem, karbapenemy a tetracyklinovými antibiotiky, a to navzdory faktu, že *C.difficile* je k těmto antibiotikům zcela nebo částečně rezistentní ^{7,11}.

2.9 Diagnostika

2.9.1 Kultivace

Kultivace vzorků stolice probíhá na selektivním médiu obsahujícím cykloserin-cefoxitin-fruktózu a vaječné žloutky (CCFA – cycloserine-cefoxitin-fructose agar). Pro potlačení průvodní flóry jsou do půdy přidávána antibiotika cykloserin a cefoxitin. Růst *C.difficile* na tomto médiu se projeví vznikem charakteristických kolonií, které se vyznačují typickým žlutým zbarvením a fluorescencí pod UV světlem. Žluté zbarvení kolonií je dáno zkvašováním fruktózy obsažené v agaru. Inkubace probíhá 40-48 hodin v anaerobních

podmínkách. Kultivace je velmi sensitivní, ale málo specifická a vzhledem k poměrně dlouhé době inkubace i relativně pomalá. Semikvantitativní hodnocení počtu kolonií na plotně je následující: ‘+’ označuje množství kolonií menší než 10, ‘++’ počet mezi 10 až 25 a ‘+++’ počet, který přesáhl 25 (lit.12,13,29).



Obr. 4: Kolonie *C.difficile* vyrostlé na CCFA po 48 hod ^{IV}

2.9.1.1 Anaerobní kultivace

Vzhledem k tomu, že *C.difficile* je striktně anaerobní, je třeba dodržovat určité zásady kultivace. Anaerobního prostředí lze dosáhnout za současného dodržení těchto podmínek:

- zabráněním vniknutí kyslíku do média
- nahrazení kyslíku v atmosféře jiným plynem
- vyvázáním kyslíku chemickými nebo biologickými reakcemi

Půdy, které se užívají k anaerobní kultivaci obsahují redukční činidla, jež snižují redox potenciál. Vzduch, který obsahuje asi 20% kyslíku, je nutné nahradit nějakým jiným plynem. Kultivace za anaerobních podmínek se dá snadno dosáhnout v tzv. anaerostatech. Anaerostat je válcovitá nádoba z odolného materiálu s víkem, do které se vkládá až 12 Petriho misek, dále sáček s vhodnými chemikáliemi a katalyzátor. Chemickou reakcí vzniká vodík a oxid uhličitý. Vodík se za přítomnosti katalyzátoru sloučí s kyslíkem a vzniká voda. Katalyzátor

obsahující paladium se ukládá v podobě kovového polštářku pod víko anaerostatu. Nejběžněji používané anaerostaty u nás jsou od firmy Oxoid a Merck¹⁹.

2.9.2 Průkaz toxigenity

K průkazu toxigenity z narostlé kultury se užívá EIA (enzyme immunoassay) nebo latexová aglutinace, kdy je na nosič (latexová partikule) navázána specifická protilátka, která v případě, že je ve vzorku antigen, proti kterému je zaměřena, aglutinuje a klesá na dno reakční jamky, kde tvoří charakteristickou, okem viditelnou sraženinu. Tato metoda je nenáročná, rychlá a levná, avšak poměrně málo citlivá. Dříve byla za nejcitlivější metodu pro detekci toxinu ze vzorku považována zkouška cytotoxicity (CYTA cytotoxicity assay), ale ta je velmi náročná a vyžaduje inkubaci až 48 hodin. Komerčně dostupná EIA je založena na přímé detekci toxinu A a toxinu B pomocí dvou monoklonálních protilátek (antitoxin-A a antitoxin-B), jimiž je potažena mikrotitrační destička. Toto vyšetření však v praxi není vždy k dispozici a navíc může poskytnout falešně negativní výsledky, zejména vyšetřuje-li se jen přítomnost jednoho z obou toxinů. Dle jedné prezentované studie mělo vyšetřování samotného toxinu A sensitivitu pouhých 66%, zatímco vyšetřování toxinů A + B mělo sensitivitu 89%^{7,14,15,16}.

2.9.2.1 Latexová aglutinace

Aglutinace na nosičích je aglutinace, při které mají obě složky v reakci koloidní povahu, s tím rozdílem, že jedna je navázána na inertní partikuli. Jako nosič protilátky se nejčastěji používá právě částice latexu. Suspenze latexových partikulí senzibilizovaných protilátkou je stejněměrně zkalená. Poté, co se smíchá se vzorkem, jenž obsahuje hledaný antigen, dojde ke vzájemnému pospojování latexových částic molekulami antigenu. To se pak projeví v původně homogenní suspenzi tvorbou viditelných shluků (aglutinátů).

Test se dá využít též k průkazu protilátek. Je-li antigen navázaný na částice nebo v případě přítomnosti nativního antigenu na těle usmrčené bakterie a jsou-li ve zkoumaném vzorku přítomny protilátky, pak dojde také ke vzniku sraženiny. Aglutinují však pouze

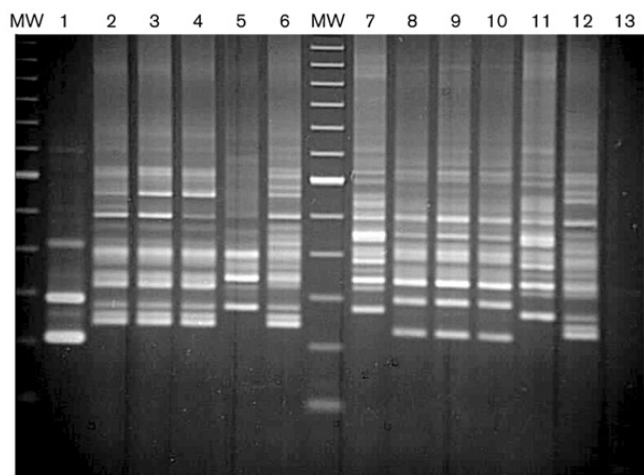
protilátky třídy IgG a IgM. Nevýhodou této metody je i fakt, že částice s navázanou protilátkou nebo antigenem mají tendenci se při skladování shlukovat. Metoda rovněž klade vysoké nároky na zkušenosti odečítajícího – jako výsledek se obvykle udává nejvyšší ředění séra (titr), které ještě vyvolalo vznik viditelné sraženiny^{16,18}.

2.9.2.2 Imunoreakce se značenými protilátkami - enzymová imunoanalýza

Podstatou této metody je opět reakce antigen-protilátka. Historicky nejstarší jsou radioizotopové metody, které se dodnes považují za „zlatý standard“ v imunochemické diagnostice, neboť jejich citlivost a reprodukovatelnost je skutečně vysoká. Ovšem nevýhodou je fakt, že vyžadují protilátku značenou radioizotopem, izotopové pracoviště, proškolený personál, speciální měřicí techniku a v neposlední řadě produkují izotopový odpad. To je také důvod, proč jsou nahrazovány jinými metodami. Velký zvrat v laboratorní diagnostice nastal s objevem možnosti navázat k molekule specifické protilátky enzym. Nejprve byly prováděny pokusy s křenovou peroxidázou a posléze s alkalickou fosfatázou. Faktory, které hrají důležitou roli, jsou velikost molekuly a možnost pevné vazby se specifickým místem na molekule protilátky. V současnosti se technologickými postupy podařilo vytvořit vazby mezi specifickou protilátkou a enzymem tak pevné, že křenová peroxidáza ovládla prakticky většinu běžných firemních souprav¹⁶.

2.9.3 Typizace kmenů

Zásadní průlom v typizaci kmenů představují postupy molekulárně epidemiologické, především postupy založené na vyšetření DNA. Stále více je pro molekulárně epidemiologickou analýzu *C.difficile* užívána PCR ribotypizace. Tato metoda je relativně rychlá, snadná a zdá se být robustní genotypizační metodou. Otázkou však je, jaký typ primerů použít, aby byly co nejvhodnější pro budoucí studie. Za „zlatý standard“ v genotypizaci byla považována pulzní gelová elektroforéza (PFGE), ale kvůli intenzivní degradaci DNA u některých kmenů, se dává přednost jiným metodám^{17,18}.



Obr. 5: Příklad PCR ribotypu *C.difficile* izolovaného z člověka a domácích zvířat. 1-sporadický psí ribotyp D; 7 a 11- sporadický psí ribotyp G; 2,3,4- ribotyp A z člověka, koně a psa; 5- ribotyp O izolovaný z koní a lidí; 6 a 12- ojedinělý psí ribotyp I; 8, 9, 10- ribotyp B psího a koňského původu; 13- negativní kontrola ^V

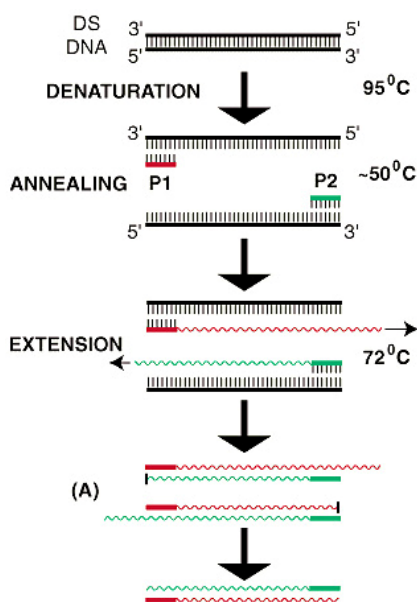
2.9.3.1 Polymerázová řetězová reakce – PCR

Polymerázová řetězová reakce byla vyvinuta v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Zavedení této metody bylo umožněno izolací termostabilní DNA-polymerázy z bakterií žijících v horkých pramenech (*Thermophilus aquaticus*).

Jeden cyklus PCR sestává ze tří základních kroků:

- a) denaturace vyšetřované DNA působením zvýšené teploty - zpravidla 92 – 96°C
- b) hybridizace nebo-li tzv. annealing primerů, tj. komplementární navázání primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA probíhá při teplotě 40 – 65°C. Místa vazby primerů vymezují oblast genomu, která bude v dalších cyklech PCR amplifikována.
- c) prodlužování nebo-li elongace nukleotidových řetězců působením DNA-polymerázy probíhá při teplotě 70 – 74°C. Na 3'OH- konce navázaných primerů nasedá DNA-polymeráza, která k primerům připojuje nové nukleotidy a tím prodlužuje řetězec ve směru 5'→ 3'. Tak se vytváří základ budoucího fragmentu DNA, který chceme získat. Doba elongace závisí na délce amplifikovaného úseku DNA. Amplifikace fragmentů o délce do jedné kb trvá

zpravidla 0,5 – 1 minutu, k syntéze delších úseků (6-10kb) je třeba dobu elongace prodloužit až na 15 minut. Následuje postupně dalších 30-40 cyklů, umožněných termostabilitou použité DNA-polymerázy. Během proběhlých cyklů dojde k namnožení příslušného úseku DNA, a tím je možná jeho detekce. Důležitým krokem je zvolení optimální teploty hybridizace primerů a počet cyklů k dosažení nejvyšší specifčnosti reakce. Jednou z možností, jak tuto optimální teplotu vysledovat, je na začátku reakce použít vyšší teplotu a postupně ji v průběhu dalších cyklů mírně snižovat až na empiricky stanovené optimum („touch-down“ PCR). Zkušenosti s PCR poukázaly na nutnost zavedení technik, které minimalizují kontaminaci ampikonem (produktem PCR) z předchozích reakcí. Při provádění PCR metod je nutné používat interní kontrolu kvality, která zahrnuje negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a kontrolu inhibice polymerázy^{25,26,31}.



Obr. 6: Schéma PCR^{VI}

2.9.3.1.1 PCR – ribotypizace kmenů *C.difficile*

PCR – ribotypizace umožňuje přímou detekci *C.difficile* ve stolici. V jedné z variant k průkazu *C.difficile* pomocí PCR metody se užívá jako upstream primer sekvence identická s kódovanou oblastí (segment I) 16S rRNA genu *C.difficile* a jako downstream primer sekvence identická s vysoce konzervativní oblastí (segment II) eukaryotického genomu 16S

rRNA. Tyto primery se používají k amplifikaci cílového fragmentu DNA *C.difficile* skládající se z 270 bází. Pomocí této techniky je možné detekovat řádově 10 buněk *C.difficile* mezi 10⁶ buňkami *E. coli* ve vyšetřovaném vzorku stolice. Citlivost této metody je stonásobně vyšší než citlivost rutinně používaných metod průkazu tohoto agens.

	Oligonukleotid	Sekvence
Downstream primer	B	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT +
Upstream primer	PG - 48	CTCTTGAAACTGGGAGACTTGA
Sonda	PG - 49	ACTGAGAGTAGCTTAA

Tabulka 1: Sekvence primerů používaných k amplifikaci genu 16S rRNA *C.difficile*^A

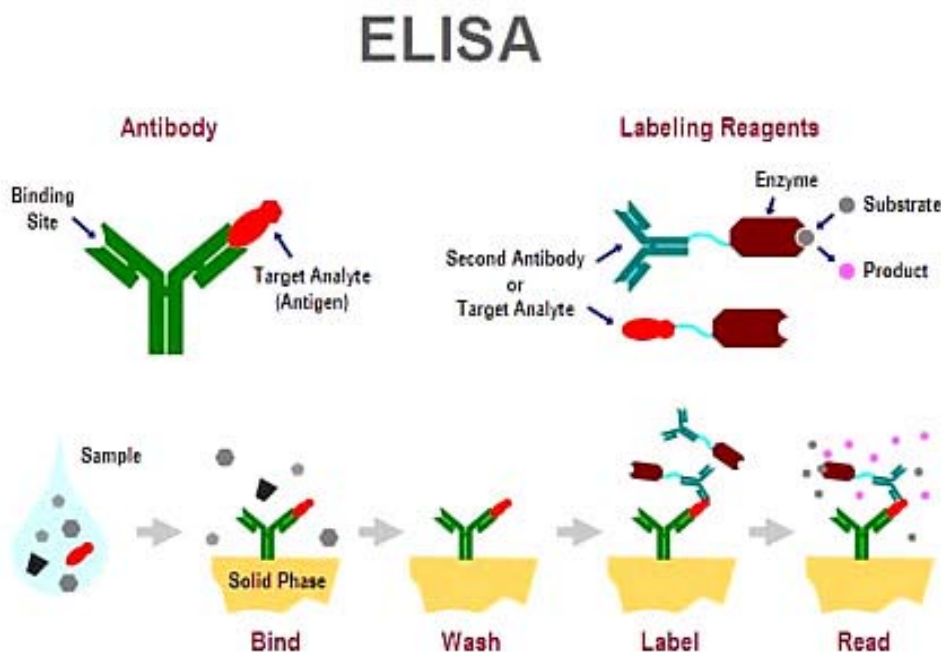
Amplikony, nebo-li produkty amplifikace, jsou elektroforeticky separovány a vizualizovány ethidium bromidem. Pro charakterizaci markerů jednotlivých amplikonů je používán 123 bp DNA marker ladder. Dokumentace je prováděna fotograficky pod UV světlem³⁰.

2.9.4 Detekce toxinů z klinického materiálu

K průkazu přítomnosti toxinů ve stolici pacienta musí laboratoř nabídnout dostatečně senzitivní test, který lze provádět statimově, protože včasnost diagnostiky má u fulminantní formy CDAD zásadní význam. Rychlost vyšetření splňuje test na principu imunochromatografie, ale jeho nevýhodou je nižší citlivost. Test navíc často vykazuje nízkou falešnou pozitivitu, a proto je nutno jej konfirmovat průkazem antigenu *C.difficile*, čili dalším vyšetřením. Poměrně vzácně je ve vyšetřovaném materiálu přítomno tolik bakteriálního toxinu, že jej lze prokázat jako antigen. Příkladem je průkaz toxinů *C.difficile* ve stolici metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Reakce probíhá tak, že protilátka je navázána na pevnou fázi a po kompetitivní reakci s antigenem se v neznámém vzorku ustaví rovnováha. Nenavázaný konjugát je odstraněn z reakční směsi promytím a konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a změřen^{7,16,18}.

2.9.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA

Metoda ELISA využívá kombinace enzymaticky značené protilátky s adsorpcí některé reakční složky na vhodný povrch, např. jamka sérologické destičky. Princip metody ELISA je takový, že na polystyrenovou mikrotitrační destičku o 96 jamkách je na stěny jamek navázána protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Může být navázána pouhou absorpcí, ale většina protilátek je navázána chemicky pomocí různých vazeb (např. kovalentních). Místa na polystyrenu, která nejsou obsazena, se blokují inertní bílkovinou (např. albuminem). Do jamky se přidá naředěný vzorek, jenž obsahuje antigen a určitou dobu se nechá inkubovat. Poté se nenavázané složky odmyjí a přidá se tzv. druhá protilátka s navázaným enzymem (konjugát). Opět se inkubuje a promývá a na závěr se reakce vizualizuje přidáním substrátu, který je štěpen enzymem navázaným na druhou protilátku. Nakonec se vzniklá barevná reakce fotometricky změří. K dispozici jsou soupravy k důkazu protilátek takřka proti všem mikrobům, a to v jednotlivých třídách imunoglobulinů. Výhodou metod ELISA je dostatečná citlivost, specifičnost a reprodukovatelnost. Současné systémy umožňují automatizaci. Příznivá je i dlouhá expirační doba souprav a také cena, nevýhodou zůstává relativní nákladnost přístrojového vybavení^{16,18}.



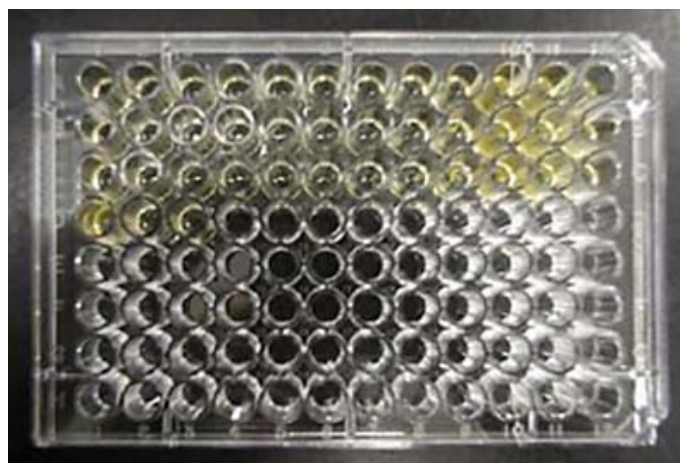
Obr.7: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{VII}

2.9.5 Citlivost na antibiotika

Pro anaerobní bakterie lze volit kvantitativní vyšetření citlivosti, kdy lze pomocí dilučních metod přesně stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) daného antibiotika. Ke stanovení MIC se užívá většinou mikrodiluční metoda. Provádí se v sérologických mikrodestičkách, jejichž jamky jsou naplněny médiem obsahující různé koncentrace vhodných antibiotik. Z vyšetřovaného kmene se potom předepsaným způsobem připraví standardní inokulum, což je v podstatě naředěná suspenze bujónové kultury, a jehlovým inokulátorem se naočkuje do jamek. Následující den se odečítá, zda bujón v důlcích zůstal čirý, nebo zda vykazuje známky růstu kmene (zákal nebo sediment). MIC je obvykle udávána v mg/l nebo $\mu\text{g/l}$. Jedná se o nejnižší koncentraci dané antimikrobiální látky, která je ještě schopna testovaný kmen bakterie zastavit v růstu.

Další metodou stanovení MIC je vysoce standardizovaná agarová diluční metoda, která se provádí na agarových půdách, obsahujících potřebnou koncentraci antimikrobiálních látek. Většinou se testuje 12-15 koncentrací jedné látky, která je ředěná dvojnásobně geometrickou řadou. Standardní inokulum vyšetřovaného kmene se naočkuje na misky s agarem a po uplynutí určité inkubační doby se hodnotí nejmenší koncentrace testované látky, která ještě inhibuje růst kmene.

Pro vyšetření citlivosti je také možno použít E-test, který v sobě kombinuje principy difúzního testu a dilučních metod. Principem je přiložení dlouhého kalibrovaného proužku, obsahujícího diskontinuitní gradient koncentrací antibiotika, na agar s naočkovanou bakteriální kulturou. Po přilnutí se difúzí vytvoří kontinuální gradient podél proužku a kolmo směrem od něj. Na proužku je znázorněna stupnice s hodnotami MIC. Vzniklá inhibiční zóna má tvar protáhlé kapky a svým ostrým koncem zasahuje do místa, kde se koncentrace antibiotika rovná MIC. Metoda je však finančně poměrně nákladná^{18,19,20}.



Obr. 8: Test minimální inhibiční koncentrace (MIC). Žluté jamky vpravo značí bakteriální růst. Jamky nalevo jasně naznačují potlačení růstu kmene antibiotikem. ^{VIII}

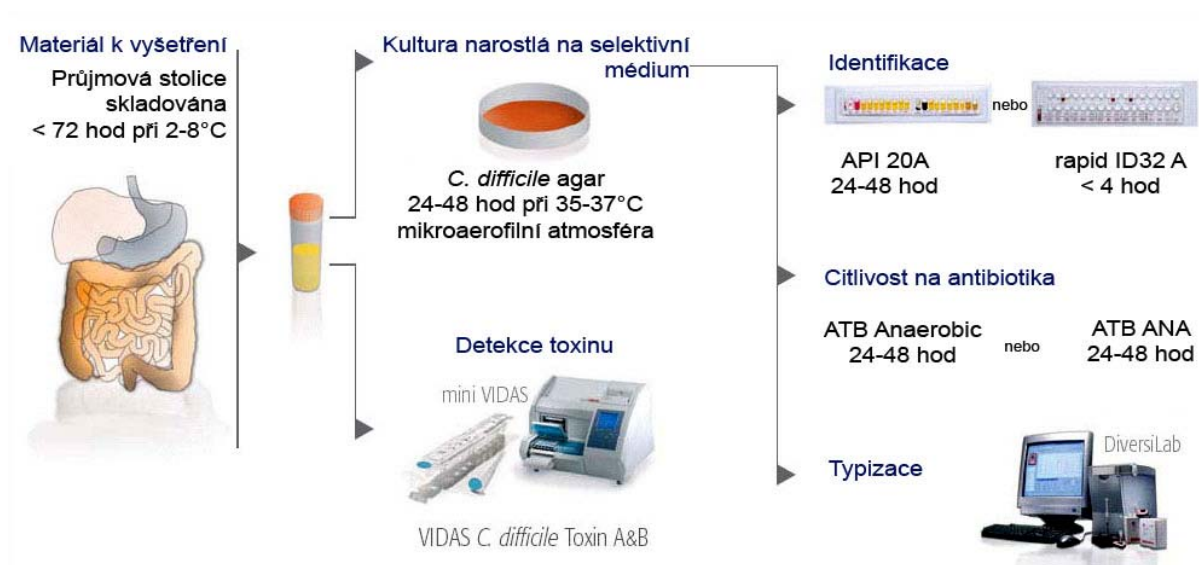


Schéma 1: Možnosti vyšetření *C.difficile* - www.biomerieux.com

2.10 Prevence

Hlavní body, které je nezbytné dodržovat při prevenci infekci způsobené *C.difficile*:

- zamezit zbytečnému nadužívání antibiotik

- neužívat širokospektrá antibiotika, pokud je patogen způsobující infekci znám
- se zvýšenou opatrností předepisovat antibiotika pacientům, kteří v nedávné době prodělali infekci způsobenou *C.difficile*, jelikož je u těchto pacientů zvýšené riziko relapsu onemocnění
- provádět důsledné mikrobiologické kontroly v nemocnicích a léčebnách dlouhodobě nemocných, neboť v těchto zařízeních je obzvláště dlouhá životaschopnost spór *C.difficile*
- dodržovat hygienické zásady při kontaktu s pacientem
- zabránit kontaminaci vybavení a pomůcek, které by mohly šířit nákazu (např. stetoskopy, tlakoměry atd.)
- zajistit dostupnost privátních koupelen nakaženým pacientům
- vyškolit zdravotnický personál o mechanismech přenosu nákazy a využití příslušných preventivních opatření ^{20,21,22,23}

2.11 Terapie

Nejdůležitější je na onemocnění pomyslet. Pokud pacient trpí průjmovým onemocněním nejasného původu, zejména při současné léčbě antibiotiky, je třeba vzít v úvahu možnost infekce způsobené toxiny *C.difficile*.

Okamžitě je nutno přerušit antibiotickou léčbu, pokud lze předpokládat, že byla spouštěcím faktorem. Standardní léčbou při CDAD je podání metronidazolu nebo vankomycinu (viz tab.2).

<i>Druh antibiotika</i>	<i>Léčebný režim</i>
Metronidazol	4 x 250-500 mg (p.o. nebo i.v.), 10-14 dní
Vankomycin	4 x 125 mg (p.o.), 10-14 dní

Tabulka 2: Terapie metronidazolem a vankomycinem^B

Zatím je naprostá většina kmenů *C.difficile* velmi dobře citlivá k těmto antibiotikům, počet rezistentních kmenů je dle různých autorů asi 0-3%. Pokud se jedná o lehčí průběh onemocnění, dává se přednost spíše metronidazolu, jelikož je levnější a nepodporuje šíření vankomycin-rezistentních enterokoků. Naopak při závažnějším průběhu onemocnění se doporučuje podat vankomycin p.o., protože tato terapie je zřejmě účinnější než metronidazol. Pokud má onemocnění rekurentní průběh, je vhodné léčbu vankomycinem p.o. prodloužit až na 3 týdny. Také vankomycin v kombinaci s rifampicinem se ukázal být účinný při rekurentním onemocnění *C.difficile*. Pokud je pacient nosičem *C.difficile*, ale nejeví žádné příznaky onemocnění, není důvod k jakékoli terapii. Kolektomie je vhodná v případě, že pacient je ve věku nad 75 let nebo u osob s leukocytózou 20.000-50.000/ μ l a naopak u pacientů s leukocytózou nad 50.000 a laktatemií nad 5 mmol/l již operace nevedla ke snížení mortality. Při lehčím průběhu onemocnění nebo po antibiotické léčbě lze k prevenci relapsů podávat probiotika. V neposlední řadě je velmi důležité doplňovat množství tekutin, neboť průjemy mohou způsobit vážnou dehydrataci, doprovázenou ztrátou důležitých živin

7,21,22,23,24

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Odběr vzorků

K obecným zásadám při odběru materiálu patří především přesná a jednoznačná identifikace biologického materiálu. Je nezbytné řádně označit vzorek (čárový kód, štítek apod.). Ke každému vzorku pro vyšetření musí být přiložena žádanka, která obsahuje informace postačující pro identifikaci pacienta i oprávněného žadatele a odpovídající klinické údaje.

Základní identifikační znaky požadované na žadance:

- jednoznačná identifikace pacienta (příjmení a jméno pacienta, číslo pojištěnce, kód pojišťovny pojištěnce)
- identifikace objednatele (jméno a adresa pracoviště lékaře oprávněného požadovat vyšetření včetně IČZ a kódu odbornosti pracoviště, příp. telefon)
- druh primárního vzorku (materiál)
- požadované vyšetření
- příslušné klinické informace o pacientovi nutné pro volbu vhodných vyšetřovacích metod a interpretaci výsledku vyšetření
- datum a čas odběru
- identifikace osoby provádějící odběr (podpis)^{25,27}

Obecná pravidla pro správný odběr vzorků biologického materiálu pro mikrobiologické vyšetření:

- odběr dostatečného množství materiálu
- provedení odběru vzorku za aseptických podmínek do sterilních nádob
- provedení odběru pokud možno před zahájením terapie antibiotiky nebo chemoterapeutiky
- co nejrychlejší transport do laboratoře
- spolehlivé označení každého vzorku²⁸

3.2 Uchovávání vzorků a transport do laboratoře

Odběrové soupravy s biologickým materiálem musí být zasílány uzavřené, co nejdříve po odběru, jinak je nutno počítat s možným zkreslením výsledků vyšetření. Pro průkaz toxinů *C.difficile* je potřeba větší množství stolice, minimálně 1ml/5g. Odebírá se do sterilního kontejneru opatřeného lopatičkou. Při pokojové teplotě je třeba doručit vzorek do laboratoře nejdéle do 2 hodin po odběru, při chladničkové teplotě nejpozději do 3 dnů. Není-li možno zajistit rychlé doručení vzorku, musí být zmrazen na -70°C^{27} .

3.3 Diagnostika

3.3.1 Průkaz toxinů *C.difficile*

Vzorky, u kterých byl požadavek na vyšetření průkazu toxinů *C.difficile*, byly zpracovány jednou z těchto metod:

3.3.1.1 Průkaz toxinu A – *C.difficile* toxin A Kit (firma OXOID)

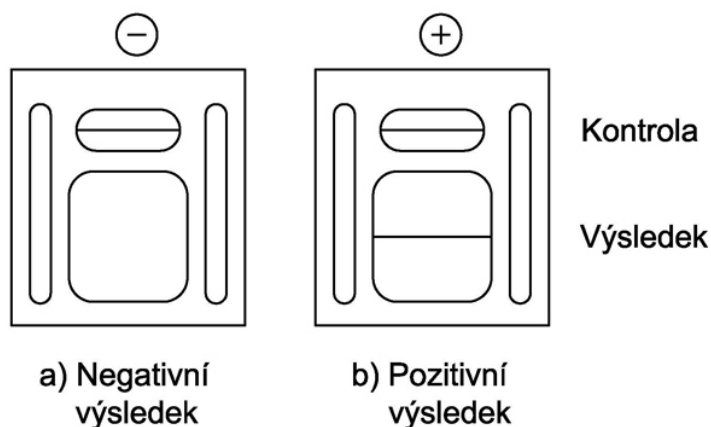
C.difficile toxin A test slouží jako kvalitativní stanovení pro detekci toxinu A ve vzorcích stolice. Obsahuje monoklonální protilátky k toxinu A. Materiálem pro toto vyšetření je plná stolice, nikoliv výtěr. Transport a uchování vzorku viz. kapitola 3.2.

Vlastní provedení testu:

- všechny potřebné reagentie se nechají stát asi 30 min při pokojové teplotě
- zpracování materiálu
 - a) tekutá stolice – napipetuje se 1 ml ředidla, jež je součástí testovací soupravy, do víčka filtrační kapsle a k tomu se přidá 100 μl stolice
 - b) tuhá stolice – napipetuje se 1 ml ředidla do víčka filtrační kapsle a pomocí plastové bakteriologické kličky se přidá kulička stolice o průměru asi 5mm
- pomocí kličky či pipety se vzorek zhomogenizuje
- do víčka filtrační kapsle se zasune tělo filtru, stlačí se a ponechá se asi 1 minutu ve vertikální poloze, aby sedimentovaly neresuspendované částičky stolice

- poté se znovu zatlačí tělo kapsle proti víčku
- nakonec se nakape 6 kapek filtrátu do testovacího rámečku a nechá se 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě

Poté se provede kontrola kvality, pomocí přiložené pozitivní kontroly. Provádí se s každou nově otevřenou šarží testu (viz. příbalový leták firmy OXOID)



Obr.9: a) negativní výsledek testu na průkaz toxinu A *C.difficile*, b) pozitivní výsledek ^{IX}

3.3.1.2 Průkaz toxinu A i B – Ridascreen *C.difficile* Toxin A/B (C 0801)

Tento test se užívá ke kvalitativnímu důkazu toxinů A a B *C.difficile* ve vzorcích stolice. Test je založen na principu testu ELISA, hodnotí se fotometricky při 450 nm a porovnává se s pozitivní a negativní kontrolou. Provádí se dle příbalového letáku výrobce s tímto postupem:

- mikrotitrační deska i s činidly je temperována na laboratorní teplotu
- promývací pufr se zředí destilovanou vodou v poměru 1:10
- vzorek stolice se zředí v poměru 1: 11 zkušebním pufrem
- do uchycovacího rámu se vsadí mikrotitrační proužky
- naplní se 100 µl pozitivní kontroly, negativní kontroly nebo vzorku
- inkubuje se 60 minut při pokojové teplotě
- následně se 5x propláchně promývací pufrem
- naplní se 1 kapkou nebo 50 µl konjugátu

- inkubuje se dalších 30 minut
- 5x se propláchně promývacím pufrem
- naplní se 2 kapkami nebo 100 µl substrátu
- inkubuje se 15 minut při laboratorní teplotě
- přidá se 1 kapka či 50 µl stop činidla
- fotometricky se vyhodnocuje při 450 nm

Test proběhl správně, je-li extinkční hodnota negativní kontroly při 450 nm menší než 0,2 a hodnota pozitivní kontroly při 450 nm větší než 0,8. Pokud se nedosáhne očekávaných předepsaných hodnot, je třeba test zopakovat.

Vyhodnocení:

- výpočet mezní hodnoty
cut off = extinkční hodnota negativní kontroly + 0,15
- výsledek testu:
 - ◆ *pozitivní* – vzorky, u nichž extinkční hodnota překročí více než o 10% vypočítanou mezní hodnotu
 - ◆ *vzorky s mezní hodnotou* – jejich extinkční hodnota se nachází v oblasti 10% nad a pod mezní hodnotou; test je třeba opakovat a pokud se naměří opět hodnota v oblasti mezní hodnoty, je třeba vzorek vyhodnotit jako negativní
 - ◆ *negativní* – vzorky, u kterých se extinkční hodnota nachází více než o 10% pod vypočítanou mezní hodnotou (viz. příbalový leták firmy OXOID)

3.3.2 Kultivace

Vzorky s pozitivním průkazem toxinů *C.difficile*, se naočkowały na Schaedlerův agar a kultivovaly v anaerostatu (CONCEPT 400) při 37°C 48-96 hodin. Narostlé kolonie se přeočkowały na Columbia agar, který byl kultivován v termostatu při 37°C. Kultivace na Columbia agaru sloužila pouze ke kontrole růstu v aerobním prostředí. Pokud byl detekován růst kolonií na Columbia agaru, nejednalo se o anaerobní bakterii. Paralelně se suspektní kolonie přeočkowały i na Schaedlerův agar a kultivace probíhala v anaerostatu, opět při 37°C. Schaedlerův agar slouží ke kultivaci všech anaerobů, proto je velmi vhodné použít ke kultivaci *Clostridium difficile* selektivní půdy obsahující antibiotika k potlačení

průvodní flóry, např. *Clostridium difficile* Selective Medium. Využití selektivních půd výrazně zkracuje celkovou dobu identifikace. Pro zvýšení kultivačního záchytu *C.difficile* se používají tepelné nebo alkoholové šoky, které slouží k „oživení spór“.

Všechny půdy určené ke kultivaci anaerobů musí mít tzv. záporný redoxpotenciál, což je záporné elektrické napětí na povrchu půdy. Na půdách s kladným redoxpotenciálem anaeroby neporostou, i kdyby kultivace probíhala za anaerobních podmínek²⁹.



Obr. 10: *C.difficile* na agarové plotně^x

3.3.3 Biochemická identifikace

K biochemické identifikaci se používají 2 typy komerčně dodávaných testů, Anaerotest 23 firmy Lachema a Api 20A firmy BioMérieux:

a) Souprava Anaerotest 23 umožňuje provést identifikaci kmenů pomocí dvaceti tří biochemických testů. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky. Vždy tři řady po osmi jamkách obsahují testy pro identifikaci jednoho kmene. Provedení testu se řídí příbalovým letákem. Identifikace se provádí pomocí identifikační tabulky nebo pomocí Diagnostického seznamu pro soupravu Anaerotest 23 (viz. příbalový leták firmy Lachema).

Řádek 1								Řádek 2								Řádek 3							
IND	GLU	MLT	FRU	GAL	LAC	MLZ	URE	NIT	SUC	SAL	TRE	MAN	RHA	NAG	bGL	ESL	MNS	RAF	CEL	XYL	ARA	SOR	CON
-	+	-	+	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	+	-	(-)	-	+	d	-	-	-	-	-	-

Tabulka 3: Výsledek biochemického testu *C.difficile*^c

IND-indol, GLU-glukóza, MLT-maltóza, FRU-fruktóza, GAL-galaktóza, LAC-laktóza, MLZ-melezitóza, URE-ureáza, NIT-nitráty, SUC-sacharóza, SAL-salicin, TRE-trehalóza, MAN-manitol, RHA-rhamnóza, NAG-N-acetyl- β -glukosamidáza, bGL- β -glukosidáza, ESL-eskulín, MNS-mannoza, RAF-raffinóza, CEL-cellobióza, XYL-xylóza, ARA-arabinóza, SOR- sorbitol, CON-kontrola růstu

+ = pozitivní reakce; (+) = většinou pozitivní reakce; (-) = většinou negativní reakce;

□ = negativní reakce; d = variabilní reakce

b) Souprava Api 20A se skládá z 20 mikrozkušavek obsahujících dehydratované substráty. Tyto testy se inokulují bakteriální suspenzí. Během inkubace vyvolává metabolismus bakterií barevné změny, které jsou buď spontánní nebo se zviditelní přidáním činidel. Reakce se odečítají podle odečítací tabulky. Mikroorganismy, které mají být identifikovány, je nutno napřed izolovat na vhodném kultivačním médiu podle standardních mikrobiologických technik (viz. příbalový leták firmy BioMérieux).



Obr. 11: Api 20A^{XI}

3.3.4 Testování citlivosti na antibiotika

3.3.4.1 Difúzní diskový test

Tento test pro anaerobní bakterie není v ČR referenční laboratoří pro antibiotika standardizován.

3.3.4.2 Test ATB Ana

Souprava ATB Ana umožňuje stanovit citlivost přísně anaerobních bakterií na antibiotika v polotuhém médiu za podmínek podobných referenční agarové diluční nebo mikrodiluční metodě. Testovací proužek v soupravě ATB Ana obsahuje 16 párů jamek, přičemž první pár jamek neobsahuje žádné antibiotikum a používá se jako pozitivní růstová kontrola. Následujících 14 párů obsahuje antibiotika v jedné nebo několika koncentracích a poslední pár je prázdný. Připraví se suspenze testované bakterie, která se následně přenesse do kultivačního média a inokuluje se do testovacího proužku. Inkubuje se a poté se odečítá, buď vizuálně, nebo automaticky pomocí ATB Instrument nebo mini API. Dle výsledku je pak kmen označen jako citlivý, středně citlivý nebo rezistentní.

Vzhled jamek		Výsledky		Kmen je:	
c	C	c	C		
čirý	čirý	-	-	S	senzitivní
zakalený	čirý	+	-	I	středně citlivý
zakalený	zakalený	+	+	R	rezistentní

Tabulka 4: Interpretace testu ATB Ana pro antibiotika testovaná ve dvou koncentracích^D

Vzhled jamky	Výsledek	Kmen je:	
čirý	-	S	senzitivní
zakalený	+	R	rezistentní

Tabulka 5: Interpretace testu ATB Ana pro antibiotika testovaná v jedné koncentraci^E

Tuto soupravu je možné použít jen k testování citlivosti k metronidazolu, neboť vankomycin není v nabídce od výrobce. Hraniční koncentrace podle doporučení francouzských odborníků pro metronidazol je 4 mg/l (viz. příbalový leták firmy BioMérieux).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Současným celosvětovým zdravotnickým problémem je narůstající rezistence bakterií vůči antimikrobním látkám. Tento závažný stav je způsoben masivním a nesprávným nadužíváním antibiotik. Ve velkém procentu případů bývají antibiotika indikována i na léčbu infekcí virové etiologie. Dalším problémem je předepisování širokospektrých antibiotik bez identifikace původce a nedodržení správného dávkování.

V České republice je zavedena síť tzv. antibiotických středisek, což jsou specializované laboratoře mikrobiologických pracovišť, které slouží k prosazování antibiotické politiky. Náplní jejich činnosti jsou např. speciální mikrobiologická vyšetření, sbírání údajů o rezistenci na antibiotika, vydávání příslušných přehledů rezistence a řízení racionální antibiotické terapie v příslušné oblasti. Za tímto účelem spolupracují s lékaři na klinikách, pořádají odborné semináře a také poskytují konzultace, a to jak telefonické, tak u lůžka, a posuzují oprávněnost požadavků kliniků na vázaná antibiotika¹⁸.

Důležitým aspektem je často bezdůvodně opakované podávání širokospektrých antibiotik, což vede k redukci přirozené střevní mikroflóry a následnému pomnožení patogenních mikroorganismů ve střevě. Tímto způsobem se ve střevě pomnoží i *C.difficile*, a tak se zvyšuje incidence onemocnění vyvolaných toxiny této bakterie.

Onemocnění způsobená *C.difficile* jsou v posledních letech problémem zejména v zemích západní Evropy a severní Ameriky. Vzhledem k tomu, že tento patogen může způsobit urgentní život ohrožující infekce, je velmi důležitá včasnost a správné stanovení diagnózy. Kultivace *C.difficile* je nezbytná pro validní diagnostiku a následnou typizaci kmenů, je to však metoda poměrně náročná a zdouhavá. Proto je hlavním pilířem při diagnostice průkaz produkce toxinu(ů) *C.difficile*. Tato metoda je díky možnosti včasného provedení a dobré citlivosti doporučována pro rutinní vyšetření. Stanovení citlivosti *C.difficile* k antibiotikům není běžně prováděno. V České republice nebyl dosud diagnostikován žádný kmen rezistentní k metronidazolu a vankomycinu.

U všech vzorků bylo provedeno vyšetření na průkaz toxinu(ů) dvěma komerčně dodávanými soupravami (na průkaz toxinu A a na průkaz toxinů A i B). Ze 195 vzorků byla produkce alespoň jednoho toxinu zjištěna u 30-ti vzorků. 28 vzorků mělo pozitivní produkci toxinů A i B, současně byla zjištěna produkce pouze toxinu A. U dvou pacientů byl pozitivní nález toxinů A i B, avšak negativní toxin A, z čehož vyplývá, že onemocnění bylo způsobeno

pouze toxinem B. Tyto nálezy jsou ojedinělé, ale z literatury známé. Patogeneze těchto onemocnění není zatím objasněna. Vzorky s pozitivním průkazem toxinu(ů) *C.difficile* byly následně kultivovány. Ze 30 kultivovaných vzorků se jen v 9-ti případech podařilo kultivací získat čistý kmen *C.difficile*. Kultivaci je bezpodmínečně nutné provádět v anaerobním prostředí bez přístupu kyslíku. Úspěšnost kultivace je závislá na kvalitě anaerostatu, kultivačních médiích a dostatečných zkušenostech laboratorních pracovníků. Z čistých izolovaných kultur byla pomocí komerčních souprav stanovena citlivost k metronidazolu, nikoliv k vankomycinu. Test není obsažen v soupravě běžně užívané v mikrobiologických laboratořích. Citlivost k vankomycinu jako léku volby je možno ověřit pouze E-testem. V dohledné době však bude dostupný v nabídce komerčně dodávaných souprav.

V současné době je ve fázi optimalizace relativně nová metoda, a to PCR ribotypizace kmenů *C.difficile*.

V této práci byla zmapována incidence onemocnění způsobených toxiny *C.difficile* u jednotlivých věkových skupin pacientů a také četnost výskytu pozitivních nálezů na různých odděleních ve FN Motol v období prosinec 2007-březen 2008.

V odborné literatuře je udáváno, že největší záchyt pozitivních nálezů toxinů *C.difficile* se objevuje u lidí starších 65 let. Z výsledků mé práce je patrné, že podobně postižena je i věková skupina 0-1 rok. Tento poznatek lze pravděpodobně přičíst velkému procentu dětských pacientů s vážným primárním onemocněním. Oddělení, která se výraznou měrou podílejí na výskytu toxinopozitivních kmenů jsou jednoznačně jednotka intenzivní péče a oddělení chronické a resuscitační intenzivní péče. Zde se léčí pacienti, kteří tvoří nejrizikovější skupinu.

Výsledky jsou shrnuty v tabulkách a grafech v příloze.

5 ZÁVĚR

V této práci byla probána problematika onemocnění, které způsobuje *Clostridium difficile*. Důraz byl kladen na současné možnosti laboratorní diagnostiky, a to jak klasické kultivace, tak průkazu toxinů. V Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol jsem vyšetřila 125 pacientů. Do sledovaného souboru jsem z důvodu jeho rozšíření zařadila také výsledky 70-ti již dříve vyšetřených pacientů. Tato data mi byla poskytnuta mojí školitelkou, MUDr. Janou Matějkovou. Ze vzorků stolic bylo provedeno vyšetření na průkaz toxinů *C.difficile* a u pozitivních vzorků bylo toto vyšetření doplněno kultivací. Z čistých izolátů byla stanovena citlivost k metronidazolu. Výsledky jsem zpracovala formou tabulek a grafů (viz.příloha).

6 LITERATURA

1. ZÁVADOVÁ, M. *Anaerobní bakterie a anaerobní infekce*. Praha : Avicenum, 1986.
2. JOYCE, Ann Marie, BURNS, David L. Recurrent *Clostridium difficile* colitis : Tackling a tenacious nosocomial infection. *POSTGRADUATE MEDICINE* [online]. 2002, vol. 112, no. 5 [cit. 2008-01-03], s. 53-65. Dostupný z WWW: <http://www.postgradmed.com/issues/2002/11_02/joyce3.shtml>.
3. MUDr. NYČ, Otakar, RNDr. URBÁŠKOVÁ, Pavla, CSc., MUDr. JINDRÁK, Vlastimil. *Clostridium difficile - aktuální hrozba blízké budoucnosti?* [online]. 2007 [cit. 2007-12-05]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.medical-tribune.cz/archiv/mtr/167/4655>>.
4. http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_difficile.php [online]. 2000 [cit. 2007-12-05]. Český. Dostupný z WWW: <[1.http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_difficile.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_difficile.php)>.
5. BORRIELLO, S.P.. *Pathogenesis of Clostridium difficile infection* [online]. 1998 [cit. 2007-12-05]. Anglický. Dostupný z WWW: <http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/41/suppl_3/13>.
6. FORDTRAN, John S.. *Colitis due to Clostridium difficile toxins: underdiagnosed, highly virulent, and nosocomial* [online]. 2006 [cit. 2007-12-06]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1325276>>.
7. BENEŠ, J., SÝKOROVÁ, B. Kolitida vyvolaná *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* [online]. 2006, roč. 12, č. 6 [cit. 2007-12-07], s. 213-260. Dostupný z WWW: <<http://kmil.trios.cz/kmil06069c.htm>>.
8. *Management, prevention and surveillance of Clostridium : Interim findings from a national survey of NHS acute* [online]. 2005 [cit. 2007-12-10]. Anglický. Dostupný z WWW: <http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/clostridium_difficile/InterimReport05.pdf>.

9. *Toxiny Clostridium difficile* [online]. [cit. 2007-12-10]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab15.php>>.

10. TUCKER, Kenneth D., CARRIG, Pauline E., WILKINS, Tracy D. Toxin A of *Clostridium difficile* Is a Potent Cytotoxin. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* [online]. 1990, vol. 28, no. 5 [cit. 2007-12-10], s. 869-871. Dostupný z WWW: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/28/5/869?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORM AT=&fulltext=clostridium+difficile+toxin&searchid=1&FIRSTINDEX=10&fdate=1/1/1986 &resourtype=HWCIT>>

11. HAVLÍK, Jiří. *Infekční nemoci*. Praha : Galén, 2002. 186 s.

12. DELMÉE, Michel, et al. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2005, vol. 54 [cit. 2007-12-15], s. 187-191. Dostupný z WWW: <<http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/54/2/187>>.

13. KNOOP, Floyd C., OWENS, Michaela, CROCKER, Caroline. *Clostridium difficile*: Clinical Disease and Diagnosis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* [online]. 1993, vol. 6, no. 3 [cit. 2007-12-15], s. 251-265. Dostupný z WWW: <<http://cmr.asm.org/cgi/reprint/6/3/251>>.

14. MUSHER, Daniel M., et al. Detection of *Clostridium difficile* Toxin: Comparison of Enzyme Immunoassay. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* [online]. 2007, vol. 45, no. 8 [cit. 2007-12-15], s. 2737-2739. Dostupný z WWW: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/45/8/2737.pdf>>.

15. LOZNIIEWSKI, Alain, et al. Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* [online]. 2001, vol. 39, no. 5 [cit. 2007-12-17], s. 1996-1998. Dostupný z WWW: <<http://jcm.highwire.org/cgi/reprint/39/5/1996>>.

- 16.** Prof.MUDr. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, DrSc., RNDr. PAULÍK, Milan., Csc., *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha : Grada, 2005. 176 s.
- 17.** VAN DEN BERG, Renate J., et al. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *Journal of clinical microbiology* [online]. 2004, vol. 42, no. 3 [cit. 2007-12-17], s. 1035-1041. Dostupný z WWW: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=356898>>.
- 18.** VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno : Neptun, 2005. 351 s.
- 19.** VOTAVA, Miroslav, et al. *Lékařská mikrobiologie II. : Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno : Masarykova univerzita, 2000. 256 s.
- 20.** BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie virologie parazitologie*. Praha : Marvil, 1996. 558 s.
- 21.** *Clostridium Difficile Infection : Prevention and Management* [online]. 1994 [cit. 2007-12-19]. Anglický. Dostupný z WWW: <http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/clostridium_difficile/C_diff_report_1994.pdf>.
- 22.** JOYCE, Ann Marie, BURNS, David L. Recurrent *Clostridium difficile* colitis : Tackling a tenacious nosocomial infection. *POSTGRADUATE MEDICINE* [online]. 2002, vol. 112, no. 5 [cit. 2008-01-03], s. 53-65. Dostupný z WWW: <http://www.postgradmed.com/issues/2002/11_02/joyce3.shtml>.

23. GREENWOOD, David, et al. *Lékařská mikrobiologie : Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha : Grada Publishing, 1999. 690 s.
24. *Clostridium difficile* [online]. 2006 [cit. 2008-01-03]. Anglický. Dostupný z WWW: <http://www.hpa.org.uk/factsheets/pdf_files/clostridium.pdf>.
25. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galén, 2007. 728 s.
26. RACEK, Jaroslav, et al. *Klinická biochemie*. Praha : Galén, 2006. 329 s.
27. BÍLKOVÁ-FRÁNKOVÁ, Hana, FRÁNKOVÁ, Jana, NIEMCZYKOVÁ, Jana. *Manuál pro odběry vzorků : Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, pracoviště Karviná Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie (CMPI) Odbor MPI Karviná (OMPI)* [online]. 2006 [cit. 2008-01-07]. Dostupný z WWW: <http://www.zuova.cz/home/man_cmpika.pdf>.
28. *Mikrobiologická, parazitologická a imunologická vyšetření : Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. 2008 [cit. 2008-01-21]. Dostupný z WWW: <http://www.zuova.cz/home/kat_omp.pdf>.
29. VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno : Mortus, 2000. 408 s.
30. *Přímá detekce Clostridium difficile ve stolici pomocí PCR : Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. 2007 [cit. 2008-02-22]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab06.php>>.
31. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno : [s.n.], 2007. 218 s.

6.1 Literatura – obrázky, tabulky

Obr.I: *Inquiry ordered into deadly bug* [online]. 2005 [cit. 2007-12-16]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://news.bbc.co.uk/1/hi/health/4092866.stm>>.

Obr.II: *Empowering clinical decisions in the fight against HAI* [online]. [cit. 2007-12-15]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/LivretCDAD.pdf>>.

Obr.III: *Toxiny Clostridium difficile* [online]. [cit. 2007-12-10]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab15.php>>.

Obr.IV: *C. difficile epidemic continuing to spread : Strains similar to those in the United States are now showing a presence in Europe.* [online]. 2006 [cit. 2008-01-12]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.infectiousdiseaseneews.com/200609/spread.asp>>.

Obr.V: *PCR ribotyping of Clostridium difficile isolates originating from human and animal sources* [online]. 2005 [cit. 2008-01-12]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/full/54/2/163>>.

Obr.VI: *CGDP - DNA Amplification* [online]. 2006 [cit. 2008-01-15]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>>.

Obr.VII: *Klinické laboratoře : Nový Jičín* [online]. 2006 [cit. 2008-01-16]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.onkologickecentrum.cz/laboratore/vysetreni-mesice/2006/listopad-autoprotilatky-proti-tyrozinofataze.aspx>>.

Obr.VIII: *Review of Antibacterial Drugs Used For Treatment of Ocular Infections* [online]. 2006 [cit. 2008-01-16]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://opt.pacificu.edu/ce/catalog/13036-AS/Antibiot.html>>.

Obr. IX: Viz. příbalový leták firmy OXOID

Obr.X: *Empowering clinical decisions in the fight against HAI* [online]. [cit. 2007-12-15]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/LivretCDAD.pdf>>.

Obr.XI: *Empowering clinical decisions in the fight against HAI* [online]. [cit. 2007-12-15]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/LivretCDAD.pdf>>.

Schéma 1: www.biomerieux.com

Tabulka 1-A: *Přímá detekce Clostridium difficile ve stolici pomocí PCR : Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. 2007 [cit. 2008-02-22]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab06.php>>.

Tabulka 2-B: JOYCE, Ann Marie, BURNS, David L. Recurrent Clostridium difficile colitis : Tackling a tenacious nosocomial infection. *POSTGRADUATE MEDICINE* [online]. 2002, vol. 112, no. 5 [cit. 2008-01-03], s. 53-65. Dostupný z WWW: <http://www.postgradmed.com/issues/2002/11_02/joyce3.shtml>.

Tabulka 3-C: viz. příbalový leták testu ANAEROTest 23 firmy Lachema

Tabulka 4-D: viz. příbalový leták testu ATB Ana firmy Biomérieux

Tabulka 5-E: viz. příbalový leták testu ATB Ana firmy Biomérieux

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CCFA	cycloserine-cefoxitin-fructose agar
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> -associated diarrhoea/disease
CYTA	cytotoxicity assay
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GASTRO	gastroenterologie
HO	hematoonkologické oddělení
CHIR	chirurgické oddělení
INF	infekční oddělení
JIP	jednotka intenzivní péče
LDN	léčebna dlouhodobě nemocných
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NJIP	jednotka intenzivní péče – novorozenci
OCHRIP	oddělení chronické a resuscitační intenzivní péče
ORT	ortopedie
PCR	polymerase chain reaction
PCR-REA	polymerase chain reaction-restriction endonuclease analysis
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PK	pediatrická klinika
PME	pseudomembranózní enterokolitida
PMN	polymorfonukleáry
RATE	oddělení radioterapie
TcdA	toxin <i>Clostridium difficile</i> A
TcdB	toxin <i>Clostridium difficile</i> B
TRANSPL	transplantační oddělení
UV	ultraviolet

8 PŘÍLOHY

8.1 Materiál

8.1.1 Použité reagensy

Clostridium difficile Toxin A test – výrobce OXOID

RIDASCREEN *Clostridium difficile* Toxin A/B – výrobce OXOID

Clostridium difficile Selective Medium – výrobce OXOID

Columbia agar – složení: proteosový pepton, játrový hydrolyzát, kvasničný extrakt, NaCl, agar, 7% sterilní beranní krve - výrobce OXOID

Schaedler agar – složení: trypto-kasein-sójový bujon, polypepton, glukosa, kvasničný extrakt, tris(hydrosymethyl)aminomethan, hemin, L-cystein, agar - výrobce OXOID

ANAERObtest 23 – výrobce Lachema

Api20A – výrobce BioMérieux

ATB Ana – výrobce BioMérieux

8.1.2 Přístroje a pomůcky

anaerobní stanice CONCEPT 400 – výrobce Jouan, distribuce Trigon-plus

Incubator MIR-262 (termostat) - výrobce SANYO Electric Co, Ltd.

pipety, jednorázové bakteriologické kličky, zkumavky, vortex

8.2 Tabulky

1) Přehled vyšetření toxinů *Clostridium difficile*

celkem vyšetřeno pacientů	195
toxin pozitivní	30
toxin negativní	165

2) Přehled vyšetření vzorků u pacientů s pozitivním nálezem toxinů *Clostridium difficile*

toxin A/B pozitivní	30
toxin A pozitivní	28
toxin A negativní	2

3) Úspěšnost kultivace kmenů *Clostridium difficile* u pozitivních pacientů

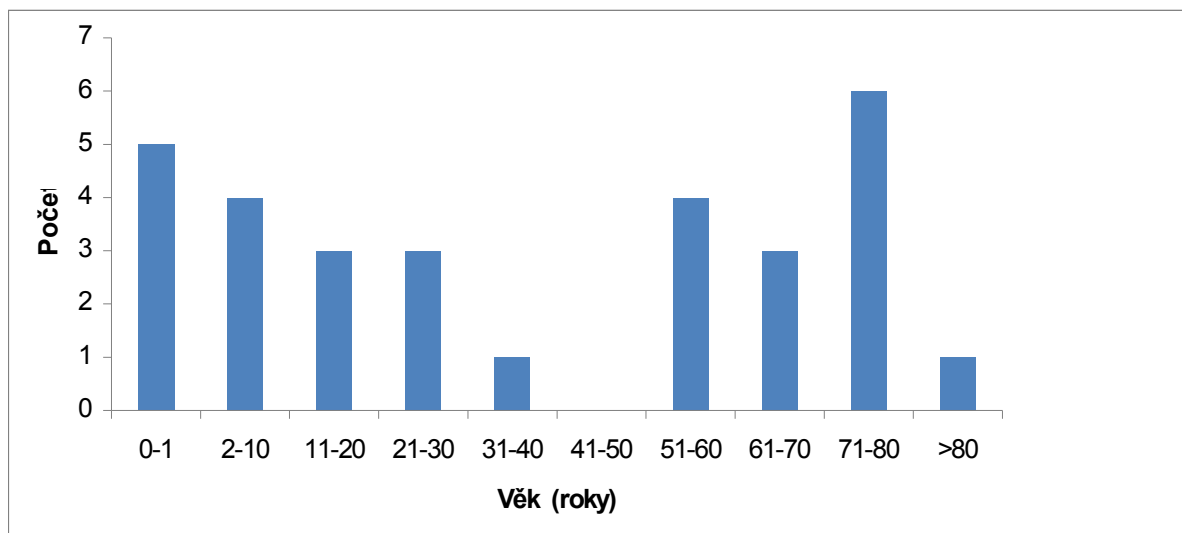
toxin pozitivní	30
kultivací prokázáno	9
kultivací neprokázáno	21

4) Citlivost *Clostridium difficile* k metronidazolu

Metronidazol	
citlivý	rezistentní
30	0

8.3 Grafy

1) Pozitivní nález toxinů *C.difficile* u různých věkových kategorií



2) Výskyt pozitivních nálezů *C.difficile* v jednotlivých odděleních nemocnice

