

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské mikrobiologie

Barbora Petržilková

**Možnosti laboratorní diagnostiky
toxigenních kmenů *Clostridium difficile*
a jejich typizace, srovnání citlivosti
různých metod**

bakalářská práce

Praha 2011

Autor práce: **Barbora Petržilková**

Vedoucí práce: **MUDr. Jana Matějková**

Oponent práce: **MUDr. Otakar Nyč, PhD.**

Datum obhajoby: **2011**

Bibliografický záznam

PETRŽILKOVÁ, Barbora. *Možnosti laboratorní diagnostiky toxigenních kmenů Clostridium difficile a jejich typizace, srovnání citlivosti různých metod*. Praha: Karlova univerzita, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, 2011. 57 s. Vedoucí diplomové práce MUDr. Jana Matějková.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá problematikou laboratorní diagnostiky kmenů *Clostridium difficile* a porovnáním citlivosti metod, které se při diagnostice používají. Úvodní teoretická část popisuje charakteristické vlastnosti bakterie, příčiny a projevy onemocnění, které *C. difficile* může způsobit. Jsou zde zmíněny možnosti laboratorní diagnostiky a metody detekce bakterie. Teoretická část také zahrnuje možnosti prevence a léčby.

Následující praktická část je zaměřena na konkrétní detekční metody. Jsou zde popsány metody kultivace a citlivosti k antibiotikům. Zabývá se průkazem přítomnosti toxinů *C. difficile* ve vzorcích stolice pacientů. V případě toxigenních kmenů popisuje metodiku jejich rozlišení - toxinotypizaci a následné určení ribotypu.

Závěrečná část shrnuje výsledky provedených metod a je zhodnocena jejich citlivost.

Klíčová slova: *Clostridium difficile*, kultivace, toxiny, toxinotypizace, ribotypizace

Abstract

Bachelor thesis deals with the laboratory diagnostics of *Clostridium difficile* strains and comparing the sensitivity of the methods that are used for diagnostics. Preliminary theoretical part describes the characteristics of bacteria, causes and symptoms of the diseases, which may cause *C. difficile*. There are discussed possibilities of the laboratory diagnostics and methods for detection bacteria. The theoretical part also includes the possibilities of prevention and treatment.

The following practical part focuses on the specific detection methods. There are described methods of cultivation and susceptibility to antibiotics. It deals with the evidence of the presence of *C. difficile* toxins in the stool samples of patients. In case of toxigenic strains describes the methodology of its differentiation – toxin typization and the subsequent determination of ribotypes.

The final section summarizes the results of the methods and evaluated their sensitivity.

Keywords: *Clostridium difficile*, cultivation, toxins, toxin typization, ribotyping

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením MUDr. Jany Matějkové, uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 28. 4. 2011

Barbora Petržilková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Janě Matějkové za ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla při psaní této práce. Dále děkuji MUDr. Otakaru Nyčovi, PhD. a všem pracovníkům Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Motole za podporu a pomoc. Také bych chtěla poděkovat mé rodině, za podporu během studia.

OBSAH

1 ÚVOD	str. 12
2 TEORETICKÁ ČÁST	str. 14
2.1 Historie <i>C. difficile</i>	str. 14
2.2 Morfologie <i>C. difficile</i>	str. 15
2.2.1 Zařazení kmene <i>C. difficile</i>	str. 15
2.2.2 Mikroskopie	str. 15
2.2.3 Biochemické vlastnosti <i>C. difficile</i>	str. 16
2.2.4 Toxiny <i>Clostridium difficile</i>	str. 16
2.2.4.1 Toxin A	str. 17
2.2.4.2 Toxin B	str. 17
2.2.4.3 Binární toxin	str. 17
2.3 Nový hypervirulentní kmen	str. 18
2.4 Molekulární mechanismus toxigenních kmenů CD	str. 18
2.5 Výskyt <i>C. difficile</i>	str. 19
2.6 Onemocnění a těžká CDAD	str. 19
2.6.1 Pseudomembranózní kolitida	str. 20
2.6.2 Vymezení těžké CDAD	str. 20
2.7 Rizikové faktory CDAD	str. 21
2.8 Léčba CDAD	str. 21
2.8.1 Vankomycin	str. 21
2.8.2 Metronidazol	str. 22
2.9 Rezistence <i>C. difficile</i> na antibiotika	str. 22
2.9.1 Ribotyp 027, proč virulence vzrůstá?	str. 22

2.10	Detekce <i>C. difficile</i>	str. 23
2.10.1	Stanovení toxinů <i>C. difficile</i>	str. 23
2.10.2	Kultivace <i>C. difficile</i>	str. 23
2.10.3	Biochemická identifikace <i>C. difficile</i>	str. 24
2.10.4	Citlivost <i>C. difficile</i> na antibiotika	str. 24
2.10.5	Typizace toxinů kmene <i>C. difficile</i>	str. 25
2.10.6	Ribotypizace	str. 25
2.11	Prevence CDAD a infekční profylaxe	str. 25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	str. 27
3.1.	Stanovení toxinů <i>C. difficile</i> ve vzorku stolice	str. 27
3.1.1.	Enzymoimunoanalytické testy	str. 27
3.1.2	RT-PCR	str. 28
3.2	Provedení testů přítomnosti toxinů <i>C. difficile</i>	str. 29
3.2.1	Test <i>C. diff.</i> Quick Chek Complete Techlab®	str. 29
3.2.2	Test ELISA	str. 30
3.3	Kultivace	str. 30
3.4.	Identifikace	str. 32
3.4.1	Vzhled kolonií na Brazierově půdě	str. 32
3.4.2	Vzhled kolonií na Schaedler agaru	str. 33
3.5	Stanovení biochemických vlastností	str. 33
3.6	Stanovení citlivosti na antibiotika	str. 35
3.7	Toxinotypizace a ribotypizace	str. 36
3.7.1	Izolace DNA	str. 38
3.7.2	Toxinotypizace	str. 38

3.7.3	Detekce binárního toxinu	str. 42
3.7.4	Ribotypizace	str. 43
3.7.5	RT-PCR Systém GeneXpert PCR, Cepheid®	str. 44
3.8	Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)	str. 45
4	VÝSLEDKY PRÁCE	str. 46
4.1	Fenotypová charakteristika	str. 46
4.2	Genotypová charakteristika	str. 49
5	DISKUZE	str. 51
6	ZÁVĚR	str. 52
7	POUŽITÁ LITERATURA	str. 53

Seznam použitých zkratk

bp	- páry bází
CD	- <i>Clostridium difficile</i>
CDAD	- <i>Clostridium difficile</i> Associated Disease
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
EIA	- enzymová imunoanalýza
ELISA	- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GDH	- glutamát dehydrogenáza
kDa	- kilodalton
kb	- kilobáze
MIC	- minimální inhibiční koncentrace
PCR	- polymerázová řetězová reakce
PCR-REA	- PCR-restriction enzyme analysis
PFGE	- pulzní gelová elektroforéza
POCT	- Point of care testing (testování v místě péče o pacienta)
VL	- viande levure (z francouzštiny) – obsahuje masovo-kvasnicový extrakt

1 ÚVOD

Klostridiové infekce řadíme mezi infekce anaerobní, které mohou zapříčinit exogenní i endogenní onemocnění různých závažností. *Clostridium difficile* může kolonizovat střevní sliznici zdravých lidí jako součást běžné mikroflóry. Pod vlivem mnohých rizikových faktorů může dojít k potlačení mikrobiální rovnováhy ve střevě a k následnému přemnožení bakterií *C. difficile*. K rizikovým faktorům CDAD (*Clostridium difficile* Associated Disease) patří mimo jiné časté užívání širokospektrých antibiotik.

Clostridium difficile patří mezi primární patogeny, které mohou způsobit průjemové onemocnění infekčního původu, dále pak kolitidu až pseudomembranózní kolitidu. Toxigenní kmeny *Clostridium difficile* jsou nejčastějšími původci nozokomiálních střevních infekcí. U nemocničních pacientů není asymptomatická kolonizace *C. difficile* nic výjimečného. Novorozenci jsou často kolonizováni i toxickými kmeny, jsou však bez klinických projevů. (<http://www.szu.cz>)

Kultivace *C. difficile* byla dříve poměrně náročná, proto byla tato bakterie pojmenovaná latinským slovem *difficile* – obtížný. Dnes se kultivace provádí na speciálních půdách v anaerobním prostředí. Stále častější je testování přítomnosti toxinů *C. difficile*. Jestliže jsou toxiny prokázány, indikuje se léčba antibiotiky volby (vankomycin nebo metronidazol).

Výskyt infekcí vyvolaných *C. difficile* se v posledních letech strmě zvýšil, hlavně z důvodu šíření vysoce virulentních klonů. Jako první byl popsán ribotyp 027 a poté i další ribotypy, např. 078, 017. Infekce jsou tak častěji spojené s těžším průběhem a vyšší mortalitou. (NYČ, 2010)

Hlavním cílem mé práce je zpracování vzorků stolice pacientů různými metodami, které se využívají jak pro rutinní vyšetření, tak i v méně častých případech. A následné srovnání citlivosti použitých metod.

Mezi mé další cíle patří tyto:

- Detekce toxigenních kmenů *C. difficile* ze vzorků stolice pacientů.
- Kultivace vzorků na selektivních půdách, jejich biochemická identifikace a stanovení citlivosti na antibiotika.
- Provedení toxinotypizace a ribotypizace pomocí metody PCR.
- Štěpení vzniklých fragmentů PCR pomocí restričních enzymů.
- Zařazení výsledných štěpných produktů k odpovídajícím toxinotypům.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie *C. difficile*

Původní bakterie *Bacillus difficilis*, dnes již známá jako *Clostridium difficile* byla prvně izolována v roce 1935 Hallem a O'Toolem ze stolic vyšetřovaných novorozenců. V roce 1937 bylo *C. difficile* identifikováno ve stolici 15% dětí do jednoho roku. Na konci 80. let 20. století, Bartlett a spol. a George a spol. prokázali, že ve stolici pacientů, kteří trpěli pseudomembranózní enterokolitidou po léčbě antibiotiky, je toxin, který je možno neutralizovat sérem proti toxinu *Clostridium sordelii*. O rok později tento toxin purifikovali a stanovili jeho základní vlastnosti. (ZÁVADOVÁ, 1986)

Teprve po sedmi letech se jim podařilo izolovat kmen *C. difficile* a prokázat produkci toxinu, který je zodpovědný za klinické příznaky. U zdravých osob byla později prokázána přítomnost protilátek proti bakterii. (ZÁVADOVÁ, 1986)

Bakterie *C. difficile* byla primárně izolována ze stolice pacientů, kteří podstoupili léčbu klindamycinem. (<http://www.cmr.asm.org>)

Bakterie je přítomna asi u 5-10% zdravé populace. Novorozenci bývají kolonizováni až v 70%. (<http://www.zuova.cz>)

2.2 Morfologie *C. difficile*

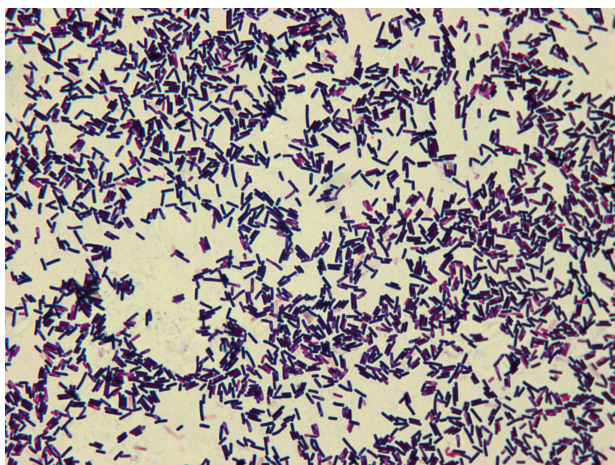
2.2.1 Zařazení kmene *C. difficile*

„*Clostridium difficile* patří mezi středně striktní klostridie“ (BEDNÁŘ et al., 1994, s. 65). *C. difficile* je grampozitivní sporulující anaerobní tyčinka. Tyčinky CD (*Clostridium difficile*) mají sklon k autolýze postihující nejdřív polární sporangium. Jadernou hmotu a cytoplasmu spór obklopuje několik obalů, díky nim jsou spóry značně rezistentní na vyschnutí, záření a dezinfekční prostředky. (BEDNÁŘ et al., 1994)

2.2.2 Mikroskopie

Na základě mikroskopického preparátu barveného podle Grama rozlišujeme dvě formy tyčinek:

- grampozitivní štíhlé rovné tyčinky, obsahující cylindrické spóry, rozměry bakterie jsou asi 0,6 x 4-6 μm
- robustní tyčinky, obsahující subterminální, někdy až terminální spóry, rozměry bakterie jsou asi 1,2-1,6 x 6-16 μm (BEDNÁŘ et al., 1994)



Obrázek 1. Tyčinky *C. difficile*, Gramovo barvení, po 24 hodinové kultivaci (foto B. Petržílková)

2.2.3 Biochemické vlastnosti *C. difficile*

C. difficile kvasí velkou škálu sacharidů. Z bílkovin hydrolyzuje jen želatinu. *C. difficile* roste na kultivačních půdách v plochých okrouhlých koloniích s nepravidelnými okraji a nezpůsobují změnu agaru obsahujícího krev ani nepozorujeme změnu na žloutkovém agaru. Na půdách obohacených vitamínem K a hemínem pod UV světlem zeleně fluoreskují. Tvorba spór *C. difficile* in vitro není příliš četná, zvýší se přidáním žloutku a žlučových solí. (BEDNÁŘ et al., 1994)

2.2.4 Toxiny *C. difficile*

Bakterie produkuje dva proteinové toxiny, toxin A a toxin B. Tyto toxiny byly intenzivně studovány, neboť byly prvotně uznány jako hlavní faktory virulence. Toxiny A i B patří mezi největší bakteriální toxiny a jsou hlavními markery pro diagnostiku onemocnění způsobené *C. difficile*. Toxiny jsou detekovány ve stolici pacienta. (<http://cmr.asm.org>)

Toxiny jsou inaktivovány v prostředí kyselého i alkalického pH. Toxiny jsou produkovány v klostridiové buňce a do prostředí se uvolňují po jejím rozpadu – autolýze. Toxiny nemají aktivitu lecitinázovou, lipázovou ani proteázovou a nehemolyzují. Jsou kapilarotoxické a ve střevě působí na membrány enterocytů. (ZÁVADOVÁ, 1986)

Toxiny se produkují během pozdní log fáze a stacionární fáze růstu bakterií. Hladiny imunoglobulinu G proti toxinu A odpovídají ochraně před onemocněním po kolonizaci. Protilátková odpověď na toxin A je dostačující na ochranu před onemocněním spojeným s *C. difficile*. Znaky pseudomembranózní kolitidy, včetně hromadění tekutiny, zánětu a poškození buněk, mohou být vyvolány toxinem A. Role toxinu B není tak dobře prozkoumána, ale studie prokázaly, že toxin B nebyl schopen iniciovat choroby bez přítomnosti toxinu A. Toxin B může přispět k nemoci, a spolu s toxinem A můžeme zjistit molekulární mechanismy tohoto toxinu. (<http://cmr.asm.org>)

2.2.4.1 Toxin A

Toxin A řadíme mezi enterotoxiny, jeho molekulová hmotnost je 308 kDa (kilodalton). Vyvolává vodnaté až mírně hemorrhagické průjmy. Za produkci toxinu A zodpovídá gen na chromozomu DNA (deoxyribonukleová kyselina). (BEDNÁŘ et al., 1994)

Toxin A způsobuje kumulaci vazké tekutiny krevního původu ve střevě hostitele a způsobuje tím dysfunkci epitelových buněk střeva. Buňky nemohou z důvodu přítomnosti velkého množství viskózní tekutiny zabezpečit kontrolu pohybu vody. Toxin A ničí struktury buněk na povrchu střevní sliznice a odstraní preventivní účinek polymorfonukleárů, je toxický pro většinu buněk imunitního systému. Je zodpovědný za zánětlivou reakci epitelových buněk střeva, která signalizuje rozvíjející se pseudomembranózní enterokolitidu. (<http://www.zuova.cz>)

2.2.4.2 Toxin B

Toxin B řadíme mezi nekrotizující cytotoxiny, který může být až 1000x toxičtější než toxin A. Toxin B zabíjí buňky střevního epitelu jen tehdy, jsou-li poškozeny její povrchové struktury toxinem A. K destrukci epitelových střevních buněk je tudíž nutná přítomnost obou toxinů. V důsledku působení obou toxinů dochází na střevní sliznici ke vzniku typických erozí a ulcerací. (<http://www.zuova.cz>)

2.2.4.3 Binární toxin

Další toxin, který může být některými toxigenními kmeny *C. difficile* produkován je binární toxin, který je tvořen dvěma geny *cdtA* a *cdtB*. Byl popsán v roce 1988 a jeho role není zatím úplně objasněna. Patogenita binárního toxinu nebyla dosud prokázána, ale předpokládá se, že zhoršuje průběh onemocnění. Byly popsány kmeny produkující pouze binární toxin při

současné absenci toxinu A a B. Jeho přítomnosti se využívá při toxinotypizaci.
(<http://www.solen.cz>)

2.3 Nový hypervirulentní kmen

V letech 2002-2003 se poprvé nový hypervirulentní kmen objevil v USA, v Pittsburghu. Kmen dostal označení BI/NAP/027. Ribotypizací byl kmen označen jako ribotyp 027, tento ribotyp byl poprvé izolován ve Francii roku 1988. Pomocí pulzní gelové elektroforézy byl označen NAP1 (North American Pulsovar type 1) a metodou PCR-REA (PCR-restriction enzyme analysis) je kmen NAP/027 ještě zařazen do skupiny BI, protože produkuje binární toxin.
(<http://kmil.trios.cz>)

Ribotyp 027 je v Evropě jeden z nečastěji vyskytujících se ribotypů, jsou však velké lokální rozdíly. Např. v Polsku se nejvíce vyskytuje ribotyp 017, v Maďarsku převládá typ 014 a ve Velké Británii se nyní rozšiřuje typ 002.
(<http://kmil.trios.cz>)

2.4 Molekulární mechanismus toxigenních kmenů CD

Toxin A je kódován genem *tcdA*, toxin B je kódován genem *tcdB*. V blízkosti těchto toxinů je lokalizován gen *tcdR*, který pozitivně reguluje produkci toxinů. Pozitivní produkci však brzdí gen *tcdC*.
(<http://www.vnitrnilekarstvi.cz>)

Gen *tcdC* kóduje protein C a tento protein zajišťuje supresi genů pro toxiny A i B. Kmen BI/NAP/027 obsahuje deleční mutaci nukleotidu v pozici 117 na *TcdC* genu, suprese genů pro oba toxiny je porušena a kmen produkuje 16krát více toxinu A a 23krát více toxinu B. (<http://kmil.trios.cz>)

Zmíněné geny, včetně genu *tcdE* spolu sousedí na jednom chromozomu a tvoří funkční komplex zvaný PaLoc – patogenity locus.

(<http://www.vnitrnilekarstvi.cz>)

2.5 Výskyt *C. difficile*

C. difficile se přirozeně vyskytuje v půdě, vodních tocích a ve střevech zvířat i lidí. Bakterii v sobě přenášejí až dvě třetiny zdravých malých dětí, aniž by se u nich rozvinuly typické příznaky onemocnění. U zdravých dospělých osob je míra kolonizace mnohem nižší. (<http://www.medicina.bloguje.cz>)

Existuje několik vysvětlení proč se výskyt onemocnění způsobené *C. difficile* zvyšuje:

- Lepší detekční metody přispěly k většímu počtu hlášených případů infekcí spojených s *C. difficile*.
- Stále častější užívání antibiotik a chemoterapeutik zvyšuje pravděpodobnost získání onemocnění spojených s *C. difficile*.
- Frekvence onemocnění se zvýšila, nemocnice jsou kontaminované spórami *C. difficile*, takže infekce vnímavých pacientů je pravděpodobnější. (<http://cmr.asm.org>)
- Výskyt nových hypervirulentních kmenů *C. difficile* – např. ribotypy 027, 078.

2.6 Onemocnění a těžká CDAD

C. difficile je bakteriální kmen, který se běžně vyskytuje v normální střevní flóře lidského organismu. Rozšíření bakterií a následná gastrointestinální onemocnění bývají zapříčiněna užíváním antibiotik. Antibiotika likvidují nebo zabíjejí mnohé bakterie, které normálně žijí v tlustém střevě a brání přerůstání toxigenních kmenů *C. difficile*. Přemnožená populace *C. difficile* zřejmě následně produkuje vysoká kvanta toxinů, která podmiňují poškození tlustého střeva u vnímavého jedince. (<http://www.medicinenet.com>)

2.6.1 Pseudomembranózní kolitida

Ve vážnějších případech, mohou toxiny destruovat vnitřní výstelku tlustého střeva, a tkáň tak odpadává. Tkáň se poté smíchává s bílými krvinkami (hnis) a dává vzhled bílých membranózních příštipků, pokrývajících výstelku tlustého střeva. Tato těžká forma *C. difficile* se nazývá pseudomembranózní kolitida, protože příštipky se objeví jako membrány. (<http://cmr.asm.org>)



Obrázek 2. Střevo postižené pseudomembranózní kolitidou (ZDROJ: <http://www.solen.cz>)

2.6.2. Vymezení těžké CDAD

Vymezení těžké nebo komplikované CDAD není zcela jasné a systémy v tomto určení nejsou vždy jednotné. Existují významné faktory, které charakterizují těžkou CDAD. Mezi tyto faktory patří:

Věk nad 60 let, horečka nad 38,3°C, hypoalbuminémie < 25 g/l

a leukocytóza > 15 000 mm³. Komplikovanou CDAD můžeme stanovit, pokud jsou splněny minimálně dva z uváděných bodů nebo v případě, je-li prokázána pseudomembranózní kolitida. (NYČ, 2010)

2.7 Rizikové faktory CDAD

Jeden z rizikových faktorů pro vznik onemocnění může být vyšší věk pacientů – nad 65 let. Dále mezi hlavní rizikové faktory řadíme imunodeficit, nasogastrickou sondu a již zmíněnou antibiotickou léčbu. Zejména dlouhodobé užívání širokospektrých antibiotik přispívá k vzniku a rozvoji infekce vyvolané *C.difficile*. (<http://www.solen.cz>)

V poslední době se CDAD objevuje u pacientů, kteří byli dříve považováni za méně rizikové, především mohou být postiženy mladé osoby, děti včetně kojenců a ženy po porodu. Onemocnění se může vyvinout i bez předchozího podání antibiotika, přispívající okolností CDAD může být například cytostatická terapie. (<http://kmil.trios.cz>)

2.8 Léčba CDAD

Mezi základní léčebné přípravky s antibakteriálním účinkem patří metronidazol a vankomycin. Kromě podání těchto kauzálních léků je důležité zajistit dostatečný přísun tekutin a minerálů. (NYČ, 2010)

U průjemových onemocnění platí, že „Iniciální terapie je vždy shodná: úprava vodního a minerálního metabolismu. Při toxinfekcích a lehčím průběhu infekcí, vždy stačí perorální rehydratace“ (HAVLÍK et al., 2002, s. 68). U pacientů s antibiotickou léčbou, je vhodné její okamžité ukončení. U těžkých forem CDAD může být přínosem intravenózní aplikace imunoglobulinů. (NYČ, 2010)

2.8.1 Vankomycin

Vankomycin se při podání per os téměř nevstřebává a ve stolici je ve vysoké koncentraci, proto nejlepší cestou je perorální podání. Parenterální aplikace je pro dosažení účinných hladin neefektivní. Doporučovaná běžná dávka je 125 mg po 6 hodinách. (NYČ, 2010)

2.8.2 Metronidazol

Metronidazol se při perorálním podání rychle a kompletně absorbuje a jeho antibakteriálně aktivní metabolity jsou zpětně vyloučeny do stolice v 5 - 16%. Přípravek podán intravenózně dosahuje ve stolici podobných koncentrací. Přínosným je stupeň vylučování metronidazolu do střevního lumen. Na počátku léčby u vodnaté stolice byly sledovány vyšší koncentrace (9 µg/g), ale po té, při klinickém zlepšení u formované stolice se koncentrace snížily (1 µg/g). (NYČ, 2010)

V léčbě CDAD se může uplatnit užívání probiotik. Probiotika jsou „zdravé“ mikroorganismy, které jsou perorálně podávány. Některé studie zjistily, že probiotika mírně zkrátily trvání průjmu v souvislosti s antibiotiky. Nicméně však studie, které měly konkrétně posoudit, zda probiotika mohou předcházet nebo pomoci při CDAD, byly neprůkazné. V tomto důsledku se probiotika k léčbě průjmu související s *C.difficile* rutinně nedoporučují. (<http://www.uptodate.com>)

2.9 Rezistence *C. difficile* na antibiotika

Nové kmeny CD se obecně vyznačují nižší citlivostí na antibiotika. (<http://kmil.trios.cz>)

2.9.1 Ribotyp 027, proč virulence vzrůstá?

1. Další virulentní faktory; kromě přítomnosti toxinů A i B, je u ribotypu 027 často zjištěna ještě přítomnost binárního toxinu.
2. Neaktivní supresor genů pro tvorbu toxinů; delece a bodové mutace, vedou k inaktivaci proteinu tcdC. Ztráta negativní regulační funkce vede ke zvýšené produkci toxinů a virulence.

3. Selhání léčby; u pacientů infikovaných ribotypem 027, je více pravděpodobné, že nebudou reagovat na léčbu metronidazolem.
(<http://www.cfz>)

2.10 Detekce *C. difficile*

2.10.1 Stanovení toxinů *C. difficile*

Laboratorní diagnostika *C. difficile* se opírá o stanovení přítomnosti toxinů ve vyšetřovaném vzorku. Jako rutinní metoda pro průkaz toxinů se používá ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Slouží k průkazu jednoho (A, B) či obou toxinů (A i B). Tyto testy jsou rychlé a snadné. (MATĚJKOVÁ, NYČ, MELTER, 2010)

Průkaz glutamát dehydrogenázy

Imunoenzymatický test je založen na detekci glutamát dehydrogenázy. GDH (glutamát dehydrogenáza) je enzym charakteristický pro všechny kmeny *C. difficile*. Průkaz tohoto enzymu slouží jako citlivá vyhledávací metoda. U GDH negativních vzorků je možno s určitostí vyloučit, že se jedná o kmen *C. difficile*. U GDH pozitivních vzorků je třeba současně stanovit toxigenitu. (MATĚJKOVÁ, NYČ, MELTER, 2010)

2.10.2 Kultivace *C. difficile*

Vzorky určené ke kultivaci je vhodné vystavit alkoholovému nebo tepelnému šoku. Alkoholový nebo tepelný šok zvyšuje možnost úspěšné kultivace.

Alkoholový šok: Vzorek je smíchán ve stejném poměru s 95% lihem a krátce vortexován. Poté se nechá zkumavka stát při pokojové teplotě cca 40 minut. Tepelný šok se v naší laboratoři FN Motol nevyužívá.

Kultivace *C. difficile* se provádí například na vysoce selektivní Brazierově půdě. Obsahuje přísady ke snadnější izolaci a diferenciaci kmenů *C. difficile* z klinických vzorků. (www.oxid.com)

Kyselina cholová podporuje klíčení spór po inkubaci vzorku v alkoholu. P-hydroxyfenyloctová kyselina zlepšuje produkci p-cresolu, rozlišovací metabolit kmene *C. difficile*. Selektivity je dosaženo přidáním cefoxitinu, amphotericinu a neutrální červeně. Žloutková emulze se přidává k rozlišení kmenů *C. difficile* od laktóza pozitivních klostridií. (www.oxid.com)

Ke kultivaci je možno použít také Schaedler agar. Schaedler agar s ovčí krví je výživné médium, které se využívá při kultivaci anaerobních bakterií, jako jsou např. laktobacily, streptokoky a klostridia. Schaedler, Dubos, a Costello popsali složení základního agaru. Dále byly popsány úpravy složení podle Mata, Carrillo, a Villatoro. Úpravy zahrnují snížení obsahu dextrózy k zabránění narušení hemolytické reakce. Snížení obsahu kvasničného extraktu omezuje barevné změny média. Upraveny byly také koncentrace chloridu sodného a dusíku. (<http://www.jsunitech.com>)

Ke kultivaci *C. difficile* dále může sloužit tekutá půda, tzv. VL (viande-levure) agar. Kultivace vždy probíhá v anaerobním prostředí po dobu 24 – 72 hodin.

2.10.3 Biochemická identifikace *C. difficile*

Kolonie *C. difficile* se identifikují podle jejich morfologie a ověřují se biochemicky pomocí testu – Anaerotest 23, Pliva – Lachema®.

2.10.4 Citlivost *C. difficile* na antibiotika

Stanovení citlivosti *C. difficile* na antibiotika se provádí metodou E test. Plastikový proužek, který je vkládán na povrch agaru inokulovaného testovaným kmenem, má stabilní antibiotický gradient. E test umožňuje detekci

rezistentních kmenů *C. difficile* na antibiotika. Metoda je vhodná pro dosažení optimálních výsledků stanovení citlivosti. Kromě metody E test, se k stanovení citlivosti může použít agarová diluční metoda, která je s E testem srovnatelná, ale pro rutinní laboratoř je velmi náročná. (CHMELARŮVÁ, ŠKAPOVÁ, 2010)

2.10.5 Typizace toxinů kmene *C. difficile*

Jedná se o genotypové metody, které umožňují odlišit jednotlivé kmeny jednoho bakteriálního druhu.

- Přímé genotypové metody – zahrnují sekvenování DNA a jeho modifikace.
- Nepřímé genotypové metody – sledují polymorfní úseky určitého znaku, markeru. Jako marker se může použít genová i negenová oblast nebo restrikční místo. Výsledkem je fingerprint odpovídající danému kmenu. (ŠTĚPÁN, 2004)

2.10.6 Ribotypizace

DNA organismu je „rozstříhána“ restrikčními enzymy, jednotlivé fragmenty se hybridizují s rRNA próbou. Výsledkem jsou unikátní restrikční profily, které odpovídají jednotlivým organismům, respektive kmenům. (<http://www.molbio.upol.cz>)

2.11 Prevence CDAD a infekční profylaxe

Spóry vytvořené bakteriemi *C. difficile* jsou vysoce odolné vůči zevním vlivům a usnadňují přežití patogenu v okolí nemocných osob. Pacienti, kteří jsou postiženi průjmem v souvislosti s CDAD vylučují ohromné množství spór patogenu se stolicí. Spóry se přenáší fekálně orální cestou, a tak velice častými zdroji infekce jsou právě znečištěné ruce pacientů a personálu. Pro prevenci epidemického šíření infekce zejména v nemocnicích a pečovatelských institucích je důležité, aby byla dodržována všeobecná hygienická pravidla.

Také snížené užívání širokospektrých antibiotik může předejít nebezpečí propuknutí infekce. Pokud je podezření na propuknutí infekce CDAD, měla by být zavedena následující ochranná opatření: izolace infikovaných osob, používání ochranných rukavic, dodržování hygieny rukou a povrchů, správná likvidace kontaminovaného odpadu a zamezení střídání zdravotnického personálu různých nemocničních oddělení. (<http://www.zdn.cz>)

Základním pilířem infekční profylaxe je důkladná dezinfekce zařízení, povrchů a rukou. K usmrcení spor bakterie *C. difficile* je nutno používat sporicidní prostředky. Přípravky, které mají sporicidní vlastnosti jsou na bázi aldehydů, aktivního kyslíku a obsahují sloučeniny chloru. Při správném dávkování a odpovídající době působení tyto látky dokážou usmrtit spory *C. difficile*. K dezinfekci povrchů a přístrojů se používají zejména prostředky na bázi aktivního kyslíku a aldehydů. Užití prostředků na bázi chloru je omezené z důvodů jejich ohraničené materiálové snášenlivosti. (<http://www.zdn.cz>)

Dezinfekce rukou je nesmírně důležité hygienické opatření zajišťující profylaxi infekcí. Sporicidní přípravky nejsou pokožkou dobře snášeny, proto se k dezinfekci rukou používají prostředky na bázi alkoholu. (<http://www.zdn.cz>)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Stanovení toxinů *C. difficile* ve vzorku stolice

3.1.1 Enzyμοimunoanalytické testy

C. diff. Quick Chek Complete Techlab[®]

K průkazu přítomnosti *C. difficile* a jeho toxinů ve stolici se rutinně využívá test na enzyμοimunoanalytickém principu. *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab[®]. Test je laboratorně i časově nenáročný, výsledek je dostupný do 30 minut. Souběžně prokazuje přítomnost glutamát dehydrogenázy (GDH), enzymu, který produkují všechny kmeny CD a přítomnost toxinu. (MATĚJKOVÁ, NYČ, MELTER, 2010)

Ve výsledku zjistíme:

- zda je přítomna pouze GDH, pak se jedná se o přítomnost *C. difficile*
- zda je pozitivní GDH a toxin, pak se jedná o toxigenní kmen *C. difficile* (MATĚJKOVÁ, NYČ, MELTER, 2010)

ELISA

Principem nekompetitivní imunoanalýzy je vychytávání antigenu ze vzorku mezi dvě protilátky, které jsou v reakční směsi v přebytku. Jako značka se zde využívá enzym, proto stanovení nazýváme enzyμοimunoanalýza. Měření velikosti signálu závisí na produktu konečné enzymové reakce. Nejčastější produkty konečné enzymové reakce jsou barevné produkty, někdy se používá i měření fluorescence. Pevný nosič, který se v enzyμοimunoanalýze nejčastěji používá je mikrotitrační destička, pak se jedná o stanovení zvané ELISA. (ŠTERN et al., 2007)

Na průkaz CD ve vzorku může být využita metoda ELISA. Protilátka je navázána na pevnou fázi (např. stěna zkumavky). Poté se přidá antigen, který interaguje s navázanými protilátkami, nenavázaný antigen se promyje. Následně přidáme druhou enzymem značenou protilátku a po jejím navázání stanovujeme aktivitu enzymu.

Mezi nejčastější enzymy, které se ke značení používají, patří: alkalická fosfatáza, peroxidáza, glukózo-oxidáza a β -galaktosidáza. (www.biomikro.vscht.cz)

Pokud je vyšetření toxinu metodou ELISA negativní, je dobré provést PCR detekci genu pro toxin. Velké množství kmenů, které byly metodou ELISA určeny jako toxin negativní, poté metodou PCR byly určeny jako toxin pozitivní. (DŽUPOVÁ, 2008)

3.1.2 RT-PCR

K detekci toxigenních kmenů CD se může využít i jedna z modifikací metod PCR a to RT-PCR neboli PCR v reálném čase.

Pro provedení RT-PCR musíme zajistit způsob, aby byl produkt detekován v okamžiku jeho vzniku, a ne až po proběhnutí reakce a následné vizualizaci v gelu. Způsob, kterým detekci provedeme, je přidání barviva do PCR směsi, které fluoreskuje po navázání na dvouřetězcovou DNA. (ŠMARDA at al, 2008)

Systém GeneXpert PCR, Cepheid[®] na principu RT-PCR detekuje geny pro produkci toxinu B, geny binárního toxinu a geny pro ribotyp 027. Tento systém detekuje delecí nukleotidu 117 v genu, který reguluje produkci toxinů. Plně integrovaný a vysoce specifický systém je časově nenáročný a může být zařazen mezi POCT (Point of care testing) vyšetření, vyšetření v místě péče pacienta. Výsledek informuje o přítomnosti CD s produkcí toxinu. V případě positivity toxigenního kmene je konečná informace specifikována, zda se jedná o ribotyp 027. (MATĚJKOVÁ, NYČ, MELTER, 2010)

Z důvodu finanční náročnosti se stanovení vzorků systémem GeneXpert PCR, Cepheid® rutinně neprovádí.

3.2 Provedení testů přítomnosti toxinů *C. difficile*

3.2.1 Test *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab®

Nejprve jsem vzorky řádně označila a homogenizovala, k 25 µl vzorku stolice jsem přidala 750 µl diluentu. Do každé zkumavky jsem přidala kapku konjugátu a protřepala na vortexové třepačce. Poté jsem pipetou přenesla 500 µl vzorku do jamky s označením Tox na destičce. Po 15 minutové inkubaci jsem do velké odečítací jamky na destičce napipetovala 300 µl cash bufferu. Do stejné jamky jsem přikápla 2 kapky substrátu a nechala jsem 10 minut inkubovat. Pak jsem odečetla výsledky.



Obrázek 3. Test *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab®, vlevo – test negativní, nejedná se o toxigenní kmen *C. difficile*, vpravo – test pozitivní, je přítomen antigen i toxin, kmen *C. difficile* je toxigenní (foto B. Petržilková)



Obrázek 4. *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab[®], antigen pozitivní test (foto B. Petržílková)

3.2.2 Test ELISA

Před provedením testu jsem uvedla mikrotitrační destičku na teplotu 20 – 25 °C. Na ředila jsem si promývací pufr destilovanou vodou v poměru 1:10 a vzorek jsem naředila diluentem v poměru 1:11. Napipetovala jsem 100 µl pozitivní kontroly – Control + a negativní kontroly – Diluent. Nechala jsem inkubovat 60 minut při teplotě 20 – 25 °C. Poté jsem pětkrát propláchla 300 µl promývacím pufrům a naplnila jsem jamky 50 µl konjugátu, následovala inkubace 30 minut, při teplotě 20 – 25 °C. Opět jsem pětkrát propláchla 300 µl promývacím pufrům, přidala jsem 2 kapky substrátu a nechala jsem inkubovat 15 minut, teplota 20 – 25 °C, ve tmě. Kápla jsem 1 kapku stop činidla a fotometricky jsem vyhodnocovala při vlnové délce 450 nm.

3.3 Kultivace

Vzorky stolice jsem vystavila alkoholovému šoku. K 1 ml 95% lihu jsem přidala přibližně stejné množství stolice, promíchala a vortexovala na třepačce. Poté jsem nechala vzorky 40 minut inkubovat při pokojové teplotě. Pak jsem vzniklou suspenzi naočkovała mikrobiologickou kličkou na Brazierovu a Schaedlerovu půdu a nechala jsem vzorky kultivovat v anaerobním prostředí anaerostatu po dobu 48 hodin. V běžné rutinní praxi se používá pouze Brazierova půda.

Složka	Jednotky [g/l]
Peptonový mix	23
Chlorid sodný	5
Rozpustný škrob	1
Zaživací soda	0,4
Glukóza	1
Sodný pyruvát	1
Cystein HCl	0,5
Hemín	0,01
Vitamín K	0,001
L-arginin	1
Rozpustný pyrofosfát	0,25
Medrol	0,5
Kyselina cholová	1
p-Hydroxyfenyloctová kys.	1
Cefoxitin	0,008
D-Cykloserin	0,25
Amfotericin	0,008
Neutrální červeň	0,03
Agar	12
Vaječný žloutek	40 [ml]
Defibrinovaná koňská krev	10 [ml]

Tabulka 1. Složení Brazierovy půdy (ZDROJ: <http://www.oxid.cz>)

Složka	Jednotky [mg/l]
Tryptofanový sojový bujón	10
Pepton	5
Kvasinkový extrakt	5
Glukóza	5
Cystein HCl	0,4
Hemín	0,01
Tris pufr	0,75
Agar	13,5
pH = 7,6 ± 0,2, t = 25 °C	

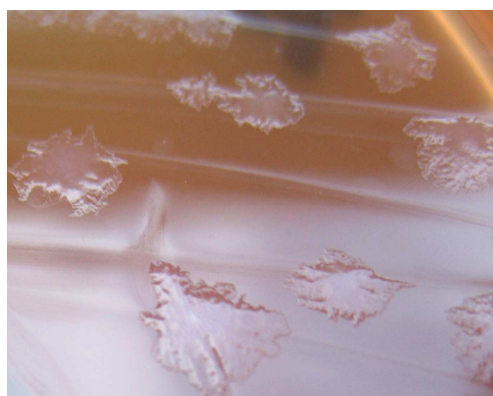
Tabulka 2. Složení Schaedlerova agaru (ZDROJ: <http://www.oxid.cz>)

3.4 Identifikace

Identifikaci *C. difficile* jsem provedla po 48 hodinové kultivaci na Brazierově půdě.



Obrázek 5. Kolonie *C. difficile* po 48 hodinové kultivaci na Brazierově půdě (foto B. Petržilková)



Obrázek 6. Detail kolonií *C. difficile* po 48 hodinové kultivaci na Brazierově půdě (foto B. Petržilková)

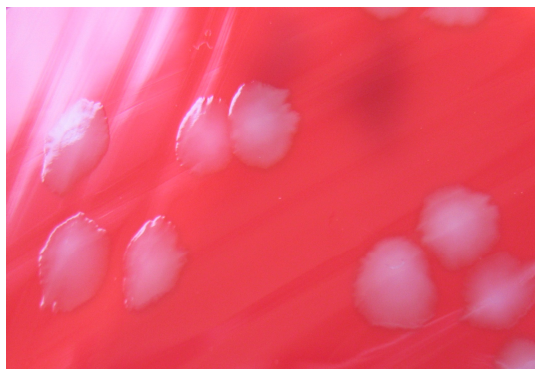
3.4.1 Vzhled kolonií na Brazierově půdě

Kolonie jsou neprůhledné, šedě zbarvené, kruhového tvaru s tendencí prodlužovat se ve směru šíření. Kolonie jsou lesklé, mají nepravidelné okraje a vzhledem připomínají broušené sklo. Inkubace, která je delší než 48 hodin, může mít za následek světle šedé až bílé zbarvení středu kolonie. Velikost kolonií je cca 5 mm. Lecitinázová reakce je negativní. Je přítomen fenolický zápach, jelikož se tvoří p-cresol. Zápach připomíná pach koňské stáje. Kolonie zeleno-žlutě fluoreskují pod UV světlem.

Identifikace *C. difficile* - Schaedlerův agar



Obrázek 7. Kolonie *C. difficile* po 48 hodinové kultivaci na Schaedler agaru (foto B. Petržilková)



Obrázek 8. Detail kolonie *C. difficile* po 48 hodinové kultivaci na Schaedler agaru (foto B. Petržilková)

3.4.2 Vzhled kolonií na Schaedler agaru

Kolonie jsou lesklé ploché s nepravidelnými okraji, mají bíložedou barvu s výraznějšími bílými středy. Velikost kolonií je cca 0,5 cm. Je přítomen typický nasládlý zápach.

3.5 Stanovení biochemických vlastností

Po 72 hodinách kultivace v anaerostatu jsem kolonie narostlé na Schaedler agaru identifikovala pomocí testu Anaerotest 23, Pliva - Lachema[®]. Pomocí vatového tampónu jsem odebrala narostlé kolonie z pevné půdy, tampón jsem vložila do suspenzního média pro Anaerotest a vytvořila jsem požadovaný zákal. 150 μ l suspenze jsem napipetovala do každé jamky. Do jamky pro indol (políčko H1) jsem přidala 1 kapku parafínového oleje. Poté jsem destičku vložila do anaerostatu a nechala jsem kultivovat 48 hodin. Po kultivaci jsem přidala 2 kapky činidla pro indol (políčko H1) a 1 kapku činidla pro nitráty (políčko H2). Odečetla jsem výsledky Anaerotestu podle identifikační tabulky

a zapsala do štítku. Podle zjištěných pozitivních a negativních vlastností jsem sestavila číselný kód a porovнала jeho hodnotu s dekódovací knihou.

Vysvětlivky zkratk Anaerotestu 23, Pliva - Lachema®. (viz. Obrázek 10.) :

1. řádek	2. řádek	3. řádek
IND – produkce indolu z tryptofanu	NIT – redukce nitrátů	ESL – hydrolyza eskulinu
GLU – fermentace glukózy	SUC – fermentace sacharózy	MNS – fermentace mannozy
MLT – fermentace maltózy	SAL – fermentace salicinu	RAF – fermentace raffinózy
FRU – fermentace fruktózy	TRE – fermentace trehalózy	CEL – fermentace cellobiózy
GAL – fermentace galaktózy	MAN – fermentace manitou	XYL – fermentace xylózy
LAC – fermentace laktózy	RHA – fermentace rhamnózy	ARA – fermentace arabinózy
MLZ – fermentace melezitózy	NAG – produkce N-acetyl-β-glukosamidázy	SOR – fermentace sorbitolu
URE – rozklad ureázy	bGL – přítomnost β-glukosidázy	NOC – kontrola růstu



MIKROTEST®		ANAEROTest 23		Datum/Datum/Data		Zprac./Зprac./Рез. /Монит. процесс		PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Karásek 1 621 33 Brno, CZ	
Kmen č./Клещ. №/Strain No./Но. анализа				Poznámky/Notes/Отмети					
25 095									
	H	G	F	E	D	C	B	A	
1	IND	GLU	MLT	FRU	GAL	LAC	MLZ	URE	
	—	+	—	+	—	—	—	—	
2	NIT	SUC	SAL	TRE	MAN	RHA	NAG	bGL	
	—	—	(+)	—	+	—	(-)	—	
3	ESL	MNS	RAF	CEL	XYL	ARA	SOR	CON	
	+	+	—	—	—	—	—	—	
=Profil/Профиль/Профиль									
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты					Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация				

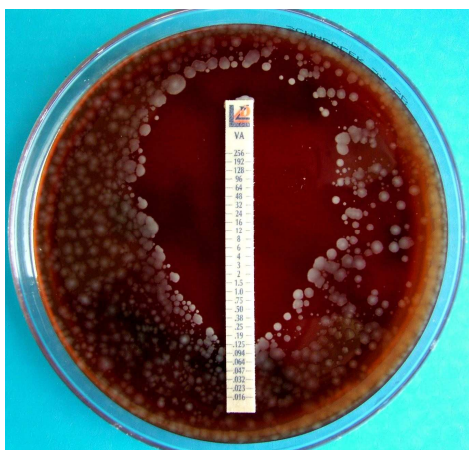
Obrázek 9. Anaerotest 23, Pliva - Lachema® (foto B. Petržilková)

Obrázek 10. Vyplněný štítek Anaerotestu 23, Pliva - Lachema® (foto B. Petržilková)

3.6 Stanovení citlivosti na antibiotika

Citlivost kmene *C. difficile* na antibiotika jsem stanovila pomocí E testu. Standardně se pro stanovení citlivosti anaerobních bakterií k antibiotikům používá Wilkins Chalgren agar. Kolonie *C. difficile* narostlé na kultivační půdě jsem odebrala mikrobiologickou kličkou a suspendovala ve fyziologickém roztoku (zákal 0,5 McFarland). Suspenzi jsem přelila Wilkins Chalgren agar, slila přebytek a nechala krátce zaschnout. Pak jsem do naočkovaného inokula položila plastický proužek s vankomycinem a metronidazolem. Vložila jsem do anaerostatu a nechala kultivovat 48 hodin v anaerobním prostředí. Po kultivaci jsem odečetla hodnotu MIC (minimální inhibiční koncentrace).

Hraniční hodnoty MIC pro vankomycin i metronidazol jsou 4 mg/l. Hodnoty MIC kmene, který je označován jako citlivý kmen na daná antibiotika, jsou menší nebo rovné 4 mg/l. Hodnoty MIC, které jsou větší jak 4 mg/l označují kmen rezistentní k daným antibiotikům. (ASPEVALL, 2006)



Obrázek 11. Citlivost na vankomycin, E test po 48 hodinové kultivaci (foto B. Petržilková)



Obrázek 12. Citlivost na metronidazol, E test po 48 hodinové kultivaci (foto B. Petržilková)

3.7 Toxinotypizace a ribotypizace

V současné době se k průkazu CD ve vzorku stále častěji využívají molekulárně-biologické metody.

PCR – polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR byla objevena v polovině 80. let 20. století a dnes již patří mezi nejnámější a nejvyužívanější molekulárně-biologické metody. PCR slouží k amplifikaci neboli zmnožení specifických fragmentů DNA pomocí tří na sebe navazujících procesů – denaturace, hybridizace a replikace. Před nástupem této metody se specifický fragment DNA amplifikoval o mnoho složitěji, až po vložení fragmentu do bakterie či kvasinky, která ho musela přijmout. Metoda PCR výrazně zkracuje dobu zmnožení úseků, snižuje technickou náročnost procesu a zvyšuje výtěžek metody. (KOČÁREK, 2007)

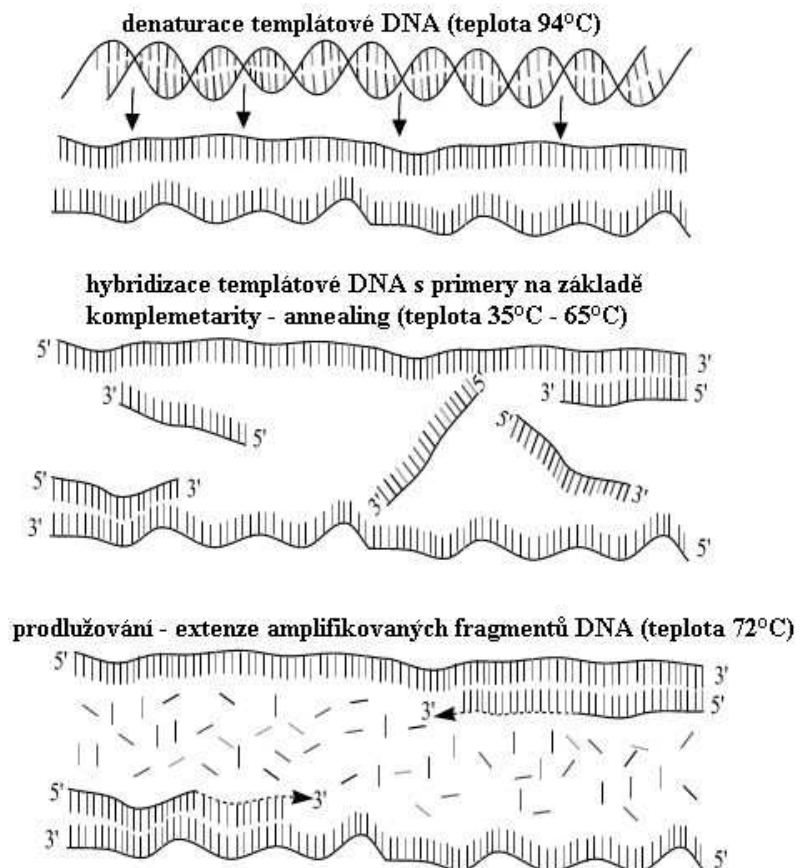
Pro amplifikaci specifické části DNA se využívají krátké úseky komplementární k oběma koncovým oblastem části DNA. Tyto úseky obsahují 20-25 nukleotidů a nazývají se primery. Další důležité složky k provedení PCR je dostatek deoxyribonukleotidtrifosfátů a enzym DNA-polymeráza. Nezbytný je přístroj, v němž celá reakce probíhá – cykler, resp. termocykler. (KOČÁREK, 2007)

Cyklus PCR je složen ze tří, již zmíněných, kroků:

- Denaturace DNA – dosáhneme ji působením zvýšené teploty (92-96°C).
- Hybridizace (neboli annealing) primerů – navázání primerů na určité sekvence DNA. Místa, kde se primery navážou, vymezí oblast DNA, která se bude nadále amplifikovat. Teplota 40-65 °C.
- Prodlužování (neboli elongace) nukleotidových řetězců pomocí DNA-polymerázy. Na primery, které jsou navázané na 3'-OH-koncích DNA, nasedne DNA-polymeráza. Připojuje k primerům nové nukleotidy, řetězec se prodlužuje

a vytváří se nový fragment DNA, který chceme získat. Teplota 70 - 74 °C. (KOČÁREK, 2007)

Popsané kroky shrnují pouze jeden cyklus PCR. Abychom získali dostatečné množství amplifikovaných fragmentů, musíme provést asi 15-40 cyklů za sebou. (KOČÁREK, 2007)



Obrázek 13. Polymerázová řetězová reakce (ZDROJ: <http://www.agris.cz>)

3.7.1 Izolace DNA

Z biologického materiálu pacientů jsem vyizolovala DNA. Pro následnou toxinotypizaci jsem provedla izolaci DNA tímto způsobem:

Nejprve jsem si připravila suspenzi CHELEX-100: 0,25 g CHELEX-100 jsem promíchala v 5 ml vody a vortexovala na třepačce. Roztřepanou suspenzi jsem rozdělila po 0,2 ml do každé Eppendorfové zkumavky.

Mikrobiologickou kličkou jsem z narostlé 48 hodin staré kultury odebrala jednu kolonii *C. difficile*, suspendovala jsem v chelexu a opět jsem nechala vortexovat. Následně jsem inkubovala v termostatu 12 minut při 98 °C, poté jsem přenesla 70 µl supernatantu do nové zkumavky. Vzorky byly uchovávány v mrazicím boxu.

3.7.2 Toxinotypizace

Pro toxinotypizaci jsem připravila vzorky izolované DNA. Pro přípravu jednoho vzorku produktu PCR jsem použila:

12,5 µl Taq-Purple DNA Polymerázy PCR Master Mix

9,5 µl PCR vody

0,75 µl primeru o koncentraci 10 pmol

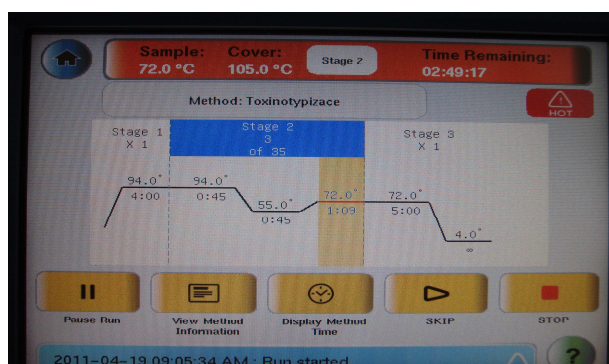
1,5 µl DNA

Pro amplifikaci úseku A3 jsem použila primer označený A3C o nukleotidové sekvenci 5'-TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG3' a druhý primer označený A4N o nukleotidové sekvenci 5'-TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC-3'.

Pro amplifikaci úseku B1 byly použity primery označené B1C a B2N. Nukleotidová sekvence primeru B1C je 5'-AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA-3' a sekvence nukleotidů primeru B2N je 5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG3'.

Připravené vzorky jsem vložila do cykleru a spustila jsem PCR reakci. Program pro PCR byl složen z následujících kroků:

Počáteční denaturace		94 °C 4 minuty
35 cyklů zahrnujících	-denaturace	94 °C 45 sekund
	-připojení primerů	55 °C 45 sekund
	-syntéza	72 °C 3 minuty
Konečná syntéza (Final extension)		72 °C 5 minut



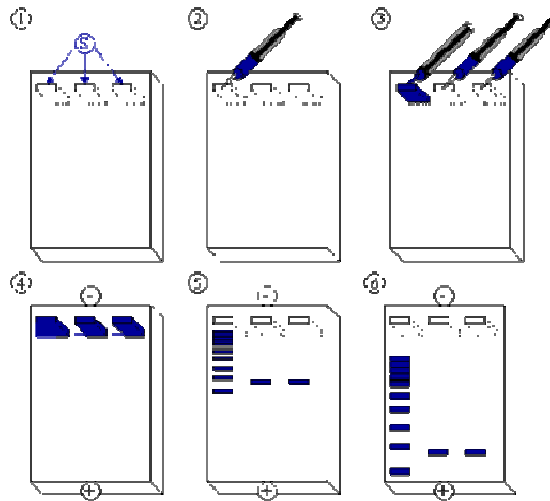
Obrázek 14. Průběh toxinotypizace na displeji termocykleru (foto B. Petržilková)

Po proběhnutí PCR reakce jsem elektroforézou zjišťovala počet fragmentů požadované délky.

ELEKTROFORÉZA

Principem metody je oddělení různě dlouhých úseků DNA pomocí tzv. molekulárního síta. Umístěním do elektrického pole uvedeme molekuly do pohybu. Směr molekul DNA je dán přítomností aniontových fosfátových skupin, proto mají DNA molekuly negativní náboj a pohybují se směrem ke kladně nabitě elektrodě – anodě. (KOČÁREK, 2007)

Amplifikované úseky se obarví fluorescenčním barvivem, nejčastěji etidiumbromidem, který se interkaluje mezi nukleotidy DNA. Amplifikované úseky jsou rozděleny na základě jejich molekulové hmotnosti a velikosti náboje. (RUMLOVÁ, 2003)



Obrázek 15. Postup elektroforézy v agarózovém gelu (ZDROJ: <http://upload.wikimedia.org>)

Vytvořila jsem 1% agarózový gel, do jehož jamek jsem mikropipetou aplikovala vzorky. Elektroforéza probíhala asi 20 minut při napětí 100 V. Pro vizualizaci proužků byl gel barven 10 minut v roztoku etidymbromidu a poté odbarvován 10 minut ve vodě. Po ukončení separace byl výsledek vyhodnocen v procházejícím UV světle na transluminátoru. Jestliže vznikl jen jeden fragment o požadované délce, dále jsem fragment štěpila.

Na štěpení fragmentu A3 byl použit restriční enzym *EcoRI*. Celková směs, kterou jsem vytvořila ke štěpení fragmentu, měla složení:

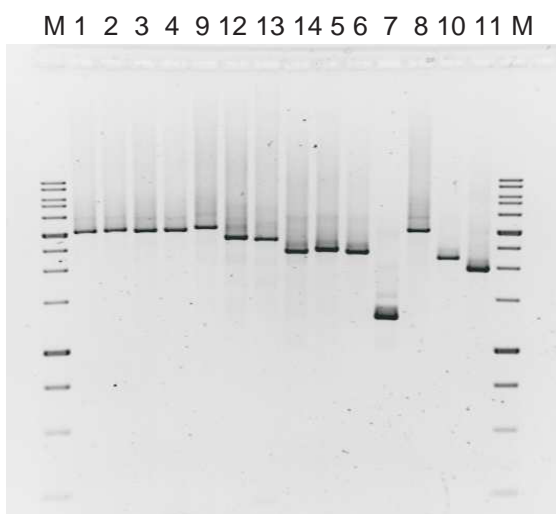
24 μ l PCR vody

2 μ l restričního enzymu *EcoRI* (aktivita 10 U/ μ l)

4 μ l pufru *EcoRI*

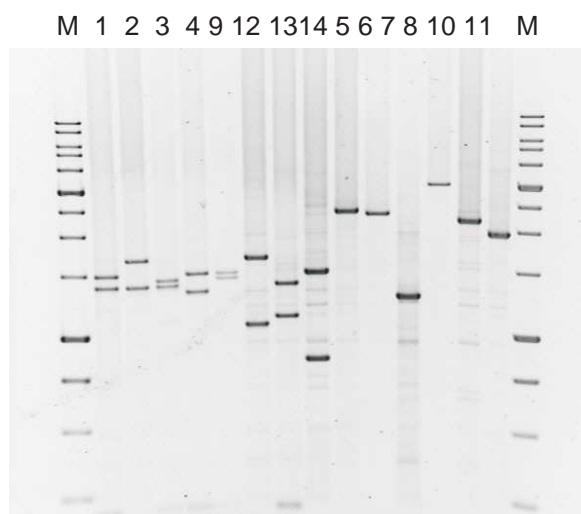
10 μ l amplikónu (amplifikovaného PCR produktu)

Štěpení fragmentu A3 probíhalo ve vodní lázni po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C. Fragmenty, které štěpením vznikly, jsem dále elektroforeticky vizualizovala. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu, do jehož jamek jsem mikropipetou aplikovala vzorky. Reakce probíhala asi 20 minut při napětí 100 V. Pro vizualizaci proužků byl gel barven 10 minut v roztoku etidymbromidu a poté odbarvován 10 minut ve vodě. Po ukončení separace byl výsledek vyhodnocen v procházejícím UV světle na transluminátoru.



Obrázek 16. Neštěpený vzor pro A3-PCR fragment

M – marker 1-14 – označení neštěpených vzorů (ZDROJ: www.mf.uni-mb.si)



Obrázek 17. Štěpný vzor pro A3-PCR fragment po restrikci enzymem *EcoRI*

M – marker 1-14 – označení štěpných vzorů (ZDROJ: www.mf.uni-mb.si)

Na štěpení fragmentu B1 jsem použila restrikční enzym *HincII*. Celková směs, kterou jsem vytvořila k štěpení fragmentu, měla složení:

24 μ l PCR vody

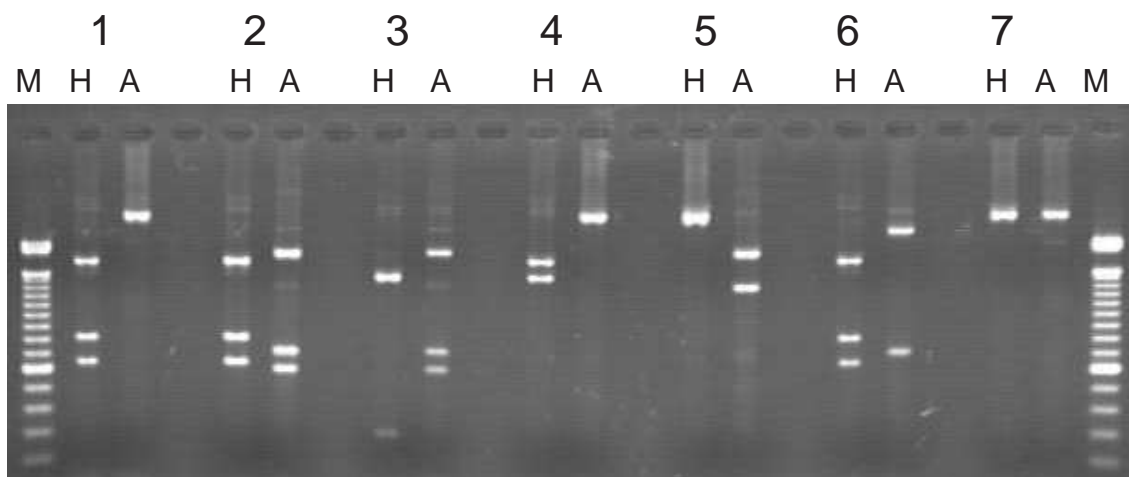
2 μ l *HincII* (aktivita 10 U/ μ l)

4 μ l Tango pufru

10 amplikónu (amplifikovaného PCR produktu)

Štěpení fragmentu B1 probíhalo ve vodní lázni 12 hodin při teplotě 37 °C. Vzniklé fragmenty jsem opět elektroforeticky vizualizovala. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu, do jehož jamek jsem mikropipetou aplikovala vzorky. Elektroforetická reakce probíhala asi 20 minut při napětí 100 V. Pro vizualizaci proužků byl gel barven 10 minut v roztoku etidiumbromidu a poté odbarvován 10 minut ve vodě. Po ukončení separace byl výsledek vyhodnocen v procházejícím UV světle na transluminátoru.

Po proběhnutí všech reakcí jsem získala fragmenty, které byly vytvořeny restrikčními enzymy. Profily restrikčních fragmentů jsem porovnávala s profily referenčních kmenů (standardů). Na základě shodnosti jsem kmeny zařadila k jednotlivým toxinotypům.



Obrázek 18. Štěpné vzory pro B1-PCR fragment

M – marker

H – B1-PCR fragment štěpený restriktázou *HincII*

1–7 – typ restrikce

A – A3-Pcr fragment štěpený restriktázou *AccI*

(ZDROJ: www.mf.uni-mb.si)

3.7.3 Detekce binárního toxinu

U všech vzorků jsem detekovala přítomnost binárního toxinu. Na přípravu jednoho vzorku produktu PCR jsem použila:

12,5 µl Taq-Purple DNA Polymerázy PCR Master Mix

10,5 µl PCR vody

0,5 µl primeru o koncentraci 10 pmol

1 µl DNA

Na amplifikaci fragmentu jsem použila primer označený cdtBrev o nukleotidové sekvenci 5'-AACGGATCTCTTGCTTCAGTC-3' a druhý primer použitý pro amplifikaci označený cdtBpos o jeho nukleotidové sekvenci 5'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG3'.

Vzorky jsem vložila do cykleru a spustila jsem PCR reakci. Program pro PCR byl složen z následujících kroků:

Počáteční denaturace		94 °C 3 minuty
35 cyklů zahrnujících	-denaturace	94 °C 15 sekund
	-připojení primerů	55 °C 30 sekund
	-syntéza	72 °C 1 minuta
Konečná syntéza (Final extension)		72 °C 7 minut

Po PCR reakci jsem opět elektroforeticky ověřovala vznik produktu. Elektroforéza proběhla v 1% agarózovém gelu, do jehož jamek jsem mikropipetou aplikovala vzorky. Elektroforetická reakce probíhala asi 20 minut při napětí 100 V. Pro vizualizaci proužků byl gel barven 10 minut v roztoku etidymbromidu a poté odbarvován 10 minut ve vodě. Po ukončení separace byl výsledek vyhodnocen v procházejícím UV světle na transluminátoru. Délka vzniklého fragmentu byla 510 bp (párů bází).

3.7.4 Ribotypizace

Na přípravu jednoho vzorku určeného k ribotypizaci jsem použila:

12,5 µl Taq-Purple polymerázy PCR Master Mix

12,1 µl PCR vody

0,125 µl primeru o koncentraci 100 pmol

5 µl DNA

Na amplifikaci fragmentu jsem použila primer označený bidet-16S o nukleotidové sekvenci 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3' a druhý primer použitý pro amplifikaci označený bidet-23S o jeho nukleotidové sekvenci 5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-3'.

Vzorky jsem vložila do cykleru a spustila jsem PCR reakci. Program pro PCR byl složen z následujících kroků:

Počáteční denaturace		94 °C 5 minut
35 cyklů zahrnujících	-denaturace	94 °C 1 minuta
	-připojení primerů	60 °C 30 sekund
	-syntéza	72 °C 1 minuta
Konečná syntéza (Final extension)		72 °C 10 minut

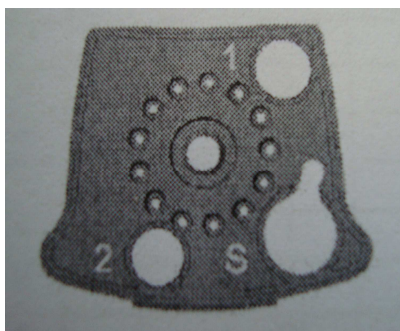
Po PCR reakci jsem opět elektroforeticky ověřovala vznik produktu. Elektroforéza probíhala v 1,5% agarózovém gelu, do jehož jamek jsem mikropipetou aplikovala vzorky. Elektroforéza byla spuštěna 3 hodiny při napětí 170 V. Pro vizualizaci proužků byl gel barven 30 minut v roztoku etidiumbromidu a poté odbarvován 30 - 60 minut ve vodě. Po ukončení separace byl výsledek vyhodnocen v procházejícím UV světle na transluminátoru.

Podle proužků, které vznikly štěpením a následnou elektroforézou, jsem vyhodnocovala příbuznost kmenů *C. difficile*.

3.7.5 RT-PCR Systém GeneXpert PCR, Cepheid®

Provedení testu:

Každý vzorek stolice jsem vortexovala s reakčním roztokem po dobu 10 sekund. Pak jsem vzorek přepipetovala do jamky zásobníku, označené „S“ – sample. Do jamek zásobníku označené 1 a 2 jsem napipetovala příslušné reagenty od výrobce a spustila jsem program.



Obr. 19. Zásobník systému GeneXpert PCR, Cepheid® (foto B. Petržilková)

3.8 Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Vysoce citlivá metoda využívaná k separaci vysokomolekulární DNA. PFGE umožňuje analyzovat dlouhé úseky DNA o délce 50 – 5000 kb (kilobáze). Metoda využívá k separaci dlouhých úseků DNA elektroforézu se dvěma elektrickými poli, které jsou kolmo na sebe orientované. Navzájem se elektrická pole periodicky zapínají a vypínají, to indukuje reorientaci každé molekuly DNA v gelu. Rychlost reorientace molekuly ve směru nového pole závisí na velikosti molekuly. Platí, že čím je delší molekula DNA (kb), tím je pomalejší její reorientace. Rozhodujícím parametrem pro separaci molekul DNA v PFGE je čas potřebný pro orientaci molekuly ve směru nového pole. Pohyb molekul DNA v gelu je „cik-cak“ a připomíná klikatou čáru. Avšak velikost elektrických polí a časy jejich sepnutí jsou shodné, výsledná dráha DNA fragmentů je přímá. (<http://home.ueb.cas.cz>)

PFGE udává vzájemnou polohu genů a poskytuje informace o poloze repetitivních sekvencí v úsecích, které jsou buď velké pro detailní sekvenování nebo příliš malé pro analýzu pomocí hybridizace in situ. (<http://home.ueb.cas.cz>)

4 VÝSLEDKY PRÁCE

Ve své práci jsem během sledovaného období (listopad 2010 - duben 2011) zpracovala 32 vzorků. Všechny vzorky pocházely od pacientů FN Motol. Ústav lékařské mikrobiologie si ke všem pacientům, u kterých je pozitivní průkaz toxinů CD nebo pozitivní kultivace zaznamenává též diagnózy a oddělení, ze kterého jednotlivé vzorky pocházejí. Tyto údaje jsem do své práce nezařadila.

4.1 Fenotypová charakteristika

Přítomnost toxinů

V testu *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab® jsem testovala 32 vzorků stolice, z nichž 17 bylo pozitivních – toxigenních. U 12 vzorků nebyla prokázána přítomnost ani antigenu ani toxinu a 3 vzorky měly pozitivní antigen a negativní toxin.

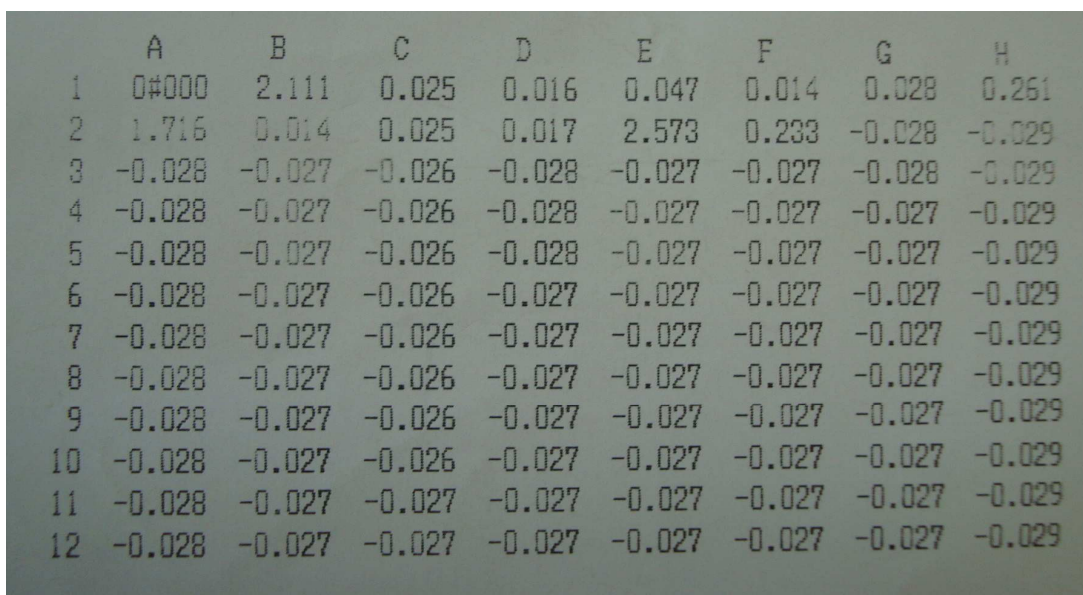
V testu ELISA jsem testovala 32 vzorků, z nichž bylo 19 pozitivních.
Vyhodnocení:

1) Výpočet mezní hodnoty

Cut off = extinkční hodnota negativní kontroly + 0,15

Cut off = negat. kontrola 0,025 (Obrázek 20. pozice C1) + 0,15 = 0,175

2) Výsledek testu



	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0#000	2.111	0.025	0.016	0.047	0.014	0.028	0.261
2	1.716	0.014	0.025	0.017	2.573	0.233	-0.028	-0.029
3	-0.028	-0.027	-0.026	-0.028	-0.027	-0.027	-0.028	-0.029
4	-0.028	-0.027	-0.026	-0.028	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
5	-0.028	-0.027	-0.026	-0.028	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
6	-0.028	-0.027	-0.026	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
7	-0.028	-0.027	-0.026	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
8	-0.028	-0.027	-0.026	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
9	-0.028	-0.027	-0.026	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
10	-0.028	-0.027	-0.026	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
11	-0.028	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029
12	-0.028	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.027	-0.029

Obrázek 20. Výsledek testu metodou ELISA (foto B. Petržilková)

Pozitivní vzorky – jejich extinkční hodnota překročí o více než 10% vypočítanou mezní hodnotu.

Extinkční hodnota 0,175 + vypočítaná mezní hodnota 0,0175 = 0,1925

Vzorky s extinkční hodnotou nad 0,1925 jsou pozitivní, jsou to vzorky na pozicích H1, A2, E2, F2 (viz. Obrázek 20.).

Vzorky s mezní hodnotou – jejich extinkční hodnota se nachází v oblasti 10 % nad a pod mezní hodnotou, test se má opakovat.

Negativní vzorky – jejich extinkční hodnota se nachází více než o 10% pod vypočítanou mezní hodnotou.

Extinkční hodnota 0,175 - vypočítaná mezní hodnota 0,0175 = 0,1575

Vzorky s extinkční hodnotou pod 0,1575 jsou negativní, jsou to vzorky na pozicích D1, E1, F1, G1, B2, C2 a D2 (viz. Obrázek 20.).

Typ testu		Počet vzorků
ELISA		19
<i>C. diff.</i> Quick Chek Complete Techlab®	Ag + / Tox +	17
	Ag + / Tox -	3

Tabulka 3. Srovnání testů na přítomnost toxinů a pozitivních vzorků

Kultivace

Pro kultivaci jsem měla k dispozici 20 vzorků stolice pacientů FN Motol: všechny vzorky s pozitivním průkazem toxinu metodou ELISA a všechny vzorky s pozitivním průkazem toxinu nebo jenom antigenu testem *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab®. Kultivace probíhala na Brazierově půdě a Schaedlerově agaru. Všechny vzorky jsem vykultivovala.

U kmenů, které měly pozitivní pouze antigen (a současně byla ELISA pozitivní) jsem zopakovala *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab® z narostlých kultur. Průkaz toxinu byl opět negativní.

Biochemická identifikace

Biochemické vlastnosti jsem zjišťovala testem Anaerotest 23, Pliva – Lachema®. U všech vzorků se potvrdila přítomnost kmene *C. difficile*.

Citlivost na antibiotika

Hodnotila jsem citlivost kmenů *C. difficile* na přítomnost vankomycinu a metronidazolu. Celkem jsem měla k dispozici 20 kmenů. Na vankomycin i metronidazol byly všechny kmeny citlivé, ani jeden z testovaných kmenů nebyl na antibiotika rezistentní.

	Citlivé	Rezistentní
Metronidazol	20	0
Vankomycin	20	0

Tabulka 4. Citlivost *C. difficile* na ATB

4.2 Genotypová charakteristika

Toxinotypizace

Pro toxinotypizaci jsem měla k dispozici 17 vzorků DNA pacientů FN Motol. Do toxinotypu VIII se zařadily 4 kmeny. Do toxinotypu XI se zařadily 3 kmeny. Do toxinotypu X se zařadily 3 kmeny. Do toxinotypu II se zařadily 2 kmeny. Do toxinotypu I se zařadily 2 kmeny. Do toxinotypu XII, XIII, XIV se zařadil 1 kmen.

Toxinotyp	Typ restrikce A3	Typ restrikce B1	Produkce toxinů	Ribotyp
I	4	1	A+B+CDT-	003,012,102
II	3	1	A+B+CDT-	103
VIII	7	5	A-B+CDT-	017,047
X	NEG	5	A-B+CDT+	036
XI	5	NEG	A-B-CDT+	033
XII	1	6	A+B+CDT-	056
XIII	9	1	A+B+CDT-	070
XIV	2	7	A+B+CDT+	111

Tabulka 5. Zařazení kmenů k odpovídajícím toxinotypům, ribotypům a typu restrikce (ZDROJ: www.mf.uni-mb.si)

Detekce binárního toxinu

Pro detekci genů binárního toxinu jsem měla k dispozici 17 vzorků pacientů FN Motol. U 7 kmenů byl binární toxin detekován a u 10 kmenů nebyl binární toxin potvrzen.

Ribotypizace

Pro ribotypizaci jsem měla k dispozici 17 vzorků pacientů FN Motol, z nichž 2 kmeny spadaly pod ribotyp 47. 3 kmeny patřily do ribotypu 33. Další 3 kmeny spadaly do ribotypu 36. 2 kmeny patřily do ribotypu 103. 2 kmeny patřily do ribotypu 017 a do ribotypu 56, 111, 102, 70, 004 spadal vždy jeden kmen.

Číslo kmene	Typ restrikce A3	Typ restrikce B1	Toxinotyp	Binární toxin	Ribotyp
1	7	5	VIII	-	047
2	5	-	XI	+	033
3	5	-	XI	+	033
4	7	5	VIII	-	047
5	-	5	X	+	036
6	3	1	II	-	103
7	3	1	II	-	103
8	1	6	XII	-	056
9	2	7	XIV	-	111
10	4	1	I	-	102
11	9	1	XIII	-	070
12	-	5	X	+	036
13	-	5	X	+	036
14	5	-	XI	+	033
15	4	1	I	-	004
16	7	5	VIII	-	017
17	7	5	VIII	-	017

Tabulka 6. Výsledná tabulka typizace kmene *C. difficile*

Real time PCR - Systém GeneXpert PCR, Cepheid®

Tímto systémem jsem ověřovala 1 kmen. Vyšetření bylo provedeno u vysoce rizikového pacienta k vyloučení nebo potvrzení infekce CD eventuelně ribotypu 027. U tohoto pacienta byla prokázána přítomnost toxigenního kmene, nikoliv ribotypu 027.

5 DISKUZE

Během mého období (listopad 2010 - duben 2011) jsem testovala a porovnávala citlivost různých metod. Vzorky jsem zpracovávala klasickými metodami jako je kultivace a citlivost na ATB a metodami na přítomnost toxinů. Kultivaci jsem prováděla na Brazierově půdě, která obsahuje určitá antibiotika k potlačení růstu původní střevní flóry. Při zachování správných kultivačních podmínek, zejména anaerobní prostředí, není kultivace *C. difficile* náročná. Další půda používaná ke kultivaci je Schaedler agar. Ta již není selektivní, proto je nutná následná izolace jednotlivých kolonií.

V rámci metod na přítomnost toxinů se v poslední době těší nejčastějšímu využití test *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab[®]. Test je nejen časově i laboratorně nenáročný, ale i dostatečně citlivý. Další výhodou testu je jeho současný průkaz přítomnosti antigenu a toxinů, který je zároveň nezávislý. Pokud se na tomto testu jeví kmen jako antigen pozitivní, provede se znovu jeho kultivace pro vyloučení falešné negativy toxigenního kmene. Pro všechny tyto výhody je test *C. diff.* Quick Chek Complete Techlab[®] zařazen do rutinního vyšetřování. Nicméně za standardní metodu pro stanovení přítomnosti toxinů se stále považuje metoda ELISA, která je velice citlivá.

Další test k detekci toxigenních kmenů *C. difficile* je integrovaný a vysoce citlivý Systém GeneXpert PCR, Cepheid[®]. Pro nenáročnou obsluhu a odolnost vůči možnému pochybení, by systém mohl být zařazen do POCT vyšetření. Finanční náročnost systému však nedovoluje, aby byl zařazen do POCT nebo rutinního vyšetřování. Tento systém je tak využíván hlavně při vyšetření sporných případů, při vyšetření některých urgentních vzorků nebo při potvrzení či vyvrácení přítomnosti ribotypu 027 ve vzorku. Zůstává však otázkou, zda-li by včasná identifikace původce průjmu systémem GeneXpert PCR, Cepheid[®] nezaznamenala menší finanční zátěž.

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla shrnuta problematika a možnosti laboratorní diagnostiky *C. difficile*. Nedostatečná izolace osob postižených *C. difficile* zvyšuje výskyt CDAD jako nozokomiální infekce. Nevhodná a častá indikace léčby antibiotik, i bezdůvodné užívání širokospektrých antibiotik, vede ke zvyšování rezistence. Je otázkou, kdy začne být rezistence na metronidazol aktuálním problémem. Epidemiologické šíření *C. difficile* již není problém jen západní Evropy.

7 POUŽITÁ LITERATURA

ASPEVALL, O., LUNDBERG, A., BURMAN, L. G., AKERLUND, T., SVENUNGSSON, B., 2006, Antimicrobial susceptibility pattern of *Clostridium difficile* and its relation to PCR ribotypes in a Swedish university hospital. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, Vol. 50, No. 5, ISSN 1098-6596

BEDNÁŘ M., SOUČEK, A., VÁVRA, J., et al., 1994, Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie, Triton Praha 1994, ISBN 80-901521-4-7

DŽUPOVÁ, O., BENEŠ, J., 2008, *Clostridium difficile* a klostridiová kolitida: Co je nového? In: Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2008; Vol. 14, No. 3

HAVLÍK, J., et al., 2002, Infekční nemoci, Nakladatelství Galén, Praha, ISBN 80-7262-173-4

CHMELAŘOVÁ, E., ŠKAPOVÁ, T., Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile*, Časopis Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2010, číslo 3, ročník 2010, s. 86 – 89, ISSN 1211-264X

KOČÁREK, E., Molekulární biologie v medicíně, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007, ISBN 978-80-7013-450-4

MATĚJKOVÁ, J., NYČ, O., MELTER, O., Zkušenosti s využitím nových testů v diagnostice *Clostridium difficile*, Časopis Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2010, číslo 3, ročník 2010, s. 90 – 92, ISSN 1211-264X

NYČ, O., Přístupy k léčbě střevních infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*, Časopis Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2010, číslo 3, ročník 2010, s. 93 – 96, ISSN 1211-264X

RUMLOVÁ, M., et al., 2003, Základní metody genomického inženýrství, Centrum integrované genomiky, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT v Praze, 2003, ISBN 80-86313-12-3

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2008. Metody molekulární biologie, Brno : Masarykova univerzita, 2008, ISBN 978-80-210-3841-7

ŠTERN, P., et al., 2007, Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 2007, ISBN 978-80-246-1025-2

ŠTĚPÁN, J., et al., 2004, Molecular diagnostics of clinically important staphylococci (Review). In: Folia microbiologica, Praha, Mikrobiologický ústav Praha AV ČR. ISSN 0015-5632, 2004, Vol. 49, No. 4

ZÁVADOVÁ, M., *Anaerobní bakterie a anaerobní infekce*, Praha Avicentrum 1986

Internetové zdroje:

BÁRTOVÁ, M., BÉBROVÁ, E., GEIGEROVÁ, L., CHMELAROVÁ, E., JEŽEK, P., JIRSA, R., MATĚJKOVÁ, J., NYČ, O., *Principy laboratorní diagnostiky Clostridium difficile* [online]. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie SZÚ, Praha, 2008. [cit. 2011-03-10]. Český. Dostupný z WWW:
<http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/17_2008/1_2/19_principy.pdf>
>

BERGMANN, D., KOTEN, J., BENEŠ, Z., KOHOUT, P., CHLUMSKÁ, A., *Pseudomembranózní kolitida* [online]. Vnitřní lékařství 53(10), s. 1100-1107, 2007. [cit. 2011-03-27]. Český. Dostupný z WWW:
<http://www.vnitrnilekarstvi.cz/pdf/vl_07_10_15.pdf>

DRÁBEK, J., KEIL, R., NYČ, O., LOCHMANNOVÁ, J., ŠŤOVÍČEK, J., *Úloha endoskopie v diagnostice clostridiové kolitidy*, [online]. Časopis Endoskopie 17(3-4), s. 68 - 70, 2008. [cit. 2011-03-26]. Český. Dostupný z WWW:
<<http://www.solen.cz/pdfs/end/2008/03/05.pdf>>

DŽUPOVÁ, O., BENEŠ, J., 2008, *Clostridium difficile* a klostridiová kolitida: Co je nového?, [online]. 2008. [cit. 2011-03-08]. Český. Dostupný z WWW: <<http://kmil.trios.cz/Predchozi/kmil08037c.htm>>

IMUNOCHEMICKÁ LABORATOŘ VŠCHT, *Enzymová imunoanalýza*, [online]. [cit. 2011-03-02]. Český. Dostupný z WWW: <http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html>

KELLY, C. P., LAMONT, T., *Patient information: Antibiotic-associated diarrhea (Clostridium difficile)* [online]. 2008. [cit. 2011-04-16]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.uptodate.com/contents/patient-information-antibiotic-associated-diarrhea-clostridium-difficile>>

KOVAŘÍK, A., Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy [online]. Molekulární-genetické přístupy ke studiu rostlinné buňky, s. 87 – 89, 1997. [cit. 2011-03-31]. Český. Dostupný z WWW: <http://home.ueb.cas.cz/methods/files/Methods_1997/molgen_1997.pdf>

Medicína – Studijní materiály, *Clostridium difficile*, [online]. 2008. [cit. 2011-02-27]. Český. Dostupný z WWW: <http://medicina.bloguje.cz/647317_item.php>

MEDICINENET.COM, *How does C. difficile cause colitis?* [online]. [cit. 2011-03-02]. Anglický. Dostupný z WWW: <http://www.medicinenet.com/clostridium_difficile_colitis/page2.htm>

OXOID.COM – Informace o produktu, *Brazier's Clostridium difficile Selective Medium, modified*, [online]. 2007. [cit. 2011-04-03]. Anglický. Dostupný z WWW: <http://www.oxid.com/CZ/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PB5191&c=CZ&lang=EN>

Schaedler agar in use and procedure, [online], 2008. [cit. 2011-03-10]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.jsunitech.com/product/culture/manual/Schaedler%20Agar.pdf>>

SOLOMON, K., *Clostridium difficile: tracking ribotype 027*, [online]. University College Dublin 2008. [cit. 2011-03-31]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.cfz.ie/images/assets/sub-typing-day-1-session-1-katie-solomon.pdf> >

Studijní materiály, *Klasifikace a identifikace bakterií* [online]. 2009. [cit. 2011-03-29]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/9.pdf>>

TÁBORSKÝ, P., BECKER, K.P., *Clostridium difficile jako původce nozokomiálních infekcí* [online]. 2007. [cit. 2011-04-17]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/sestra-priloha/clostridium-difficile-jako-puvodce-nozokomialnich-infekci-301164>>

VOTH, E. D., BALLARD, D. J., *Clostridium difficile Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease* [online]. *Clinical Microbiology Reviews*, April 2005, p. 247-263, Vol. 18, No. 2 [cit. 2011-02-27]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://cmr.asm.org/cgi/content/full/18/2/247>>

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, *Toxiny Clostridium difficile*, [online]. 2010. [cit. 2011-03-13]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab15.php>>

Zdroje obrázků:

Obrázek 2.

<<http://www.solen.cz/pdfs/end/2008/03/05.pdf>>

26.3. 2011

Obrázek 13.

<http://www.agris.cz/_images/32/110017/Image3.jpg>

10.3. 2011

Obrázek 15. <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/11/Agarose-Gelelektrophorese.png/400px-Agarose-Gelelektrophorese.png>>

25.3. 2011

Obrázek 16., 17., 18.

<<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/images/Figure%201.pdf>>

30.3. 2011

Zdroje tabulek:

Tabulka 1.

<http://www.oxid.com/CZ/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PB5191&c=CZ&lang=EN>

27.2. 2011

Tabulka 2.

<http://www.oxid.com/CZ/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0497&c=CZ&lang=EN>

2.3. 2011

Tabulka 5.

<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/images/Table%203%20_12%2011%2007_.pdf>

12.3. 2011