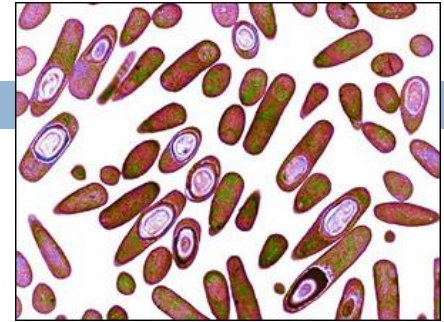


# LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA INFEKČÍ VYVOLANÝCH *C.DIFFICILE*

Otakar Nyč, Marcela Krůtová, Jana Matějková  
Ústav lékařské mikrobiologie FN Motol



# Clostridium difficile



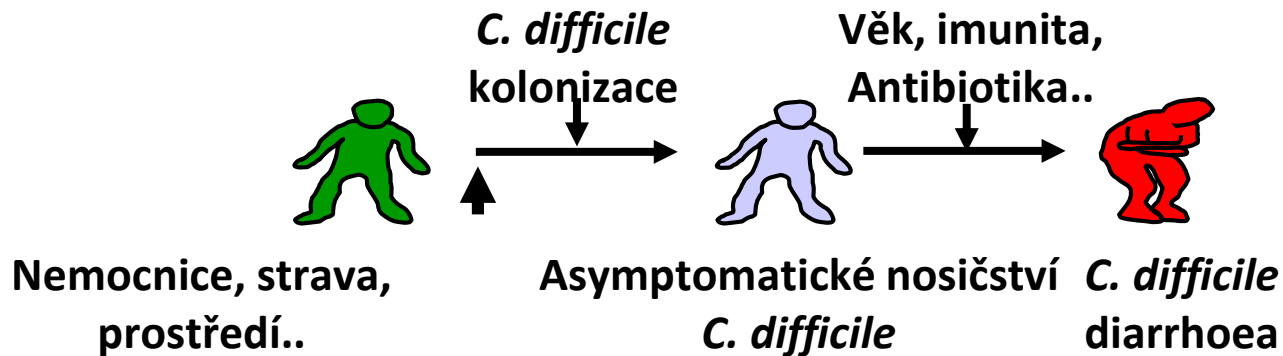
- Sporulující obligátní anaerob
  - Vysoká odolnost ( zevní vlivy, desinfekce, antibiotika..)
  - Součást flóry GIT u 3-5 % populace (↑ kojenci a staří lidé)
  - Virulentní kmeny – produkce **toxinů** ( A - enterotoxin, B - cytotoxin, binární toxin)
- infekční potenciál pro vznik různě závažných střevních infekcí - CDI

# Počátek tisíciletí – změna epidemiologie a závažnosti CDI

- Po roce 2002 : USA, Kanada, GB, NL, IR, FR, GE...
- hypervirulentní ribotypy -027,001,078,176
- Vysoká spotřeba některých skupin antibiotik – FQ, potencované aminopeniciliny, cefalosporiny..
- Nárůst vnímavé populace – věk, komorbidity, imunosuprese...
- Málo efektivní kontrola infekcí v nemocnicích –rozdílná pravidla než u ostatních nemocničních původců..

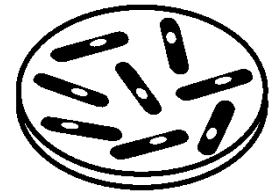
# Podmínky vzniku CDI

- Přítomnost toxigenního kmene *C. difficile*
- Potlačení fyziologické mikroflóry – antibiotika ( 90%)
- Zhoršená střevní peristaltika
- Imunodeficit
- Inhibitory protonové pumpy, H<sub>2</sub> blokátory...



# Laboratorní diagnostika a reálná incidence CDI

- **Esenciální pro potvrzení diagnózy, ale...**
- Kdy zaslat vzorek do laboratoře
  - *informovanost, zájem, obavy z pozitivního nálezu...*
- Jaké testy použít
  - *cena, náročnost, informovanost*
- Jaké výsledky správně interpretovat
  - *různé metody nedávají vždy jednoznačný a totožný výsledek..*



# Indikace laboratorního vyšetření *C.difficile*

- **Průjmovitá stolice**
- Frekvence  $\geq 3$  stolice /24 hodin
- Formovaná stolice - výjimky
  - paralytický ileus, epidemiologické důvody..
- Úloha laboratoře, LP, kritéria odmítnutí vzorku k vyšetření



# Doporučení ESCMID...

- Testovat všechny zaslané vzorky průjmovité stolice i bez požadavku klinika (vyjma dětí do 3 let )<sup>1</sup>
- Studie EUCLID – 23 % falešně negativních vzorků bez podezření na CDI nebo pochybením při transportu a vyšetření<sup>2</sup>
- Možnosti v ČR ?

**1. Crobach MJ, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection. Clin Microbiol Infect. 2016**

**2. Davies K, et al. Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of CDI in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis. 2014**

# Transport

- Nestabilita toxinů – falešně negativní výsledky ?
- zpracování v co nejkratší době
- dlouhodobá stabilita při chladničkové teplotě (4 C<sup>0</sup>)
- úbytek cytotoxické aktivity toxinů při zmrazení (- 20 C<sup>0</sup>)



# Laboratorní diagnostika CDI

- Konfirmace nebo vyloučení CDI, ale...
- různé metody detekují různé cíle s různou citlivostí :

Cílová struktura	Metoda
Toxiny <i>C.difficile</i> (stolice)	EIA CCA ( cytotoxicita na tkáňových kulturách) *
<i>C.difficile</i>	Kultivace GDH
Toxigenní <i>C.difficile</i>	PCR Toxigenní kultivace*

\* referenční metody detekující různé cíle

# Testování - doporučení

- **Jeden test je nedostatečný**
- **Dvou stupňový algoritmus**
  - první linie : GDH ( EIA) nebo PCR
  - následně : A/B toxiny – EIA
- + **doplňkové testy**

EUCLID - : méně než 40 % laboratoří nepoužívá optimální strategii testování <sup>1</sup>  
Surveillance Evropa 2016 -17 : 30 % nemocnice nepoužívá optimální dg.  
algoritmus

**1.Davies K,et al. Underdiagnosis of . difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of CDI in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis. 2014**

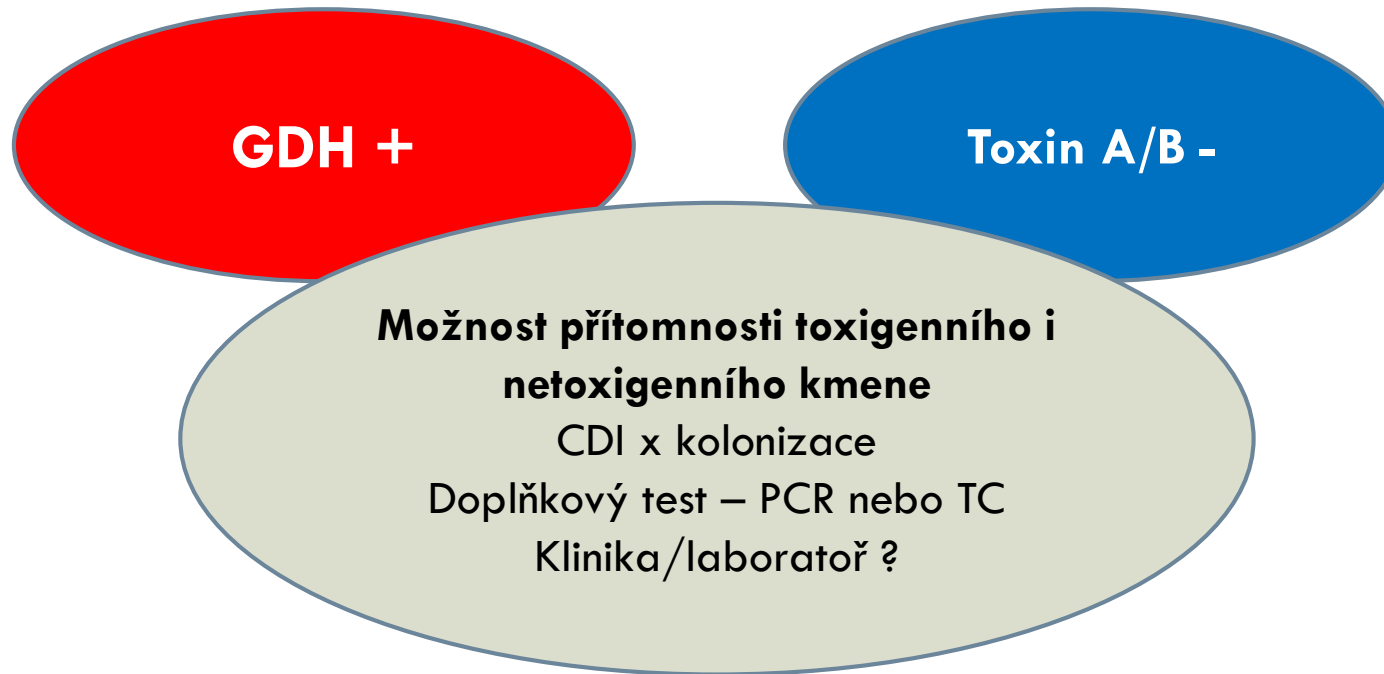
# Interpretace I

GDH nebo PCR negativní  
**C. difficile není přítomno nebo se nejedná  
o toxigenní kmen**

GDH –glutamátdehydrogenáza – EIA TEST;  
PCR průkaz genů produkce toxinů

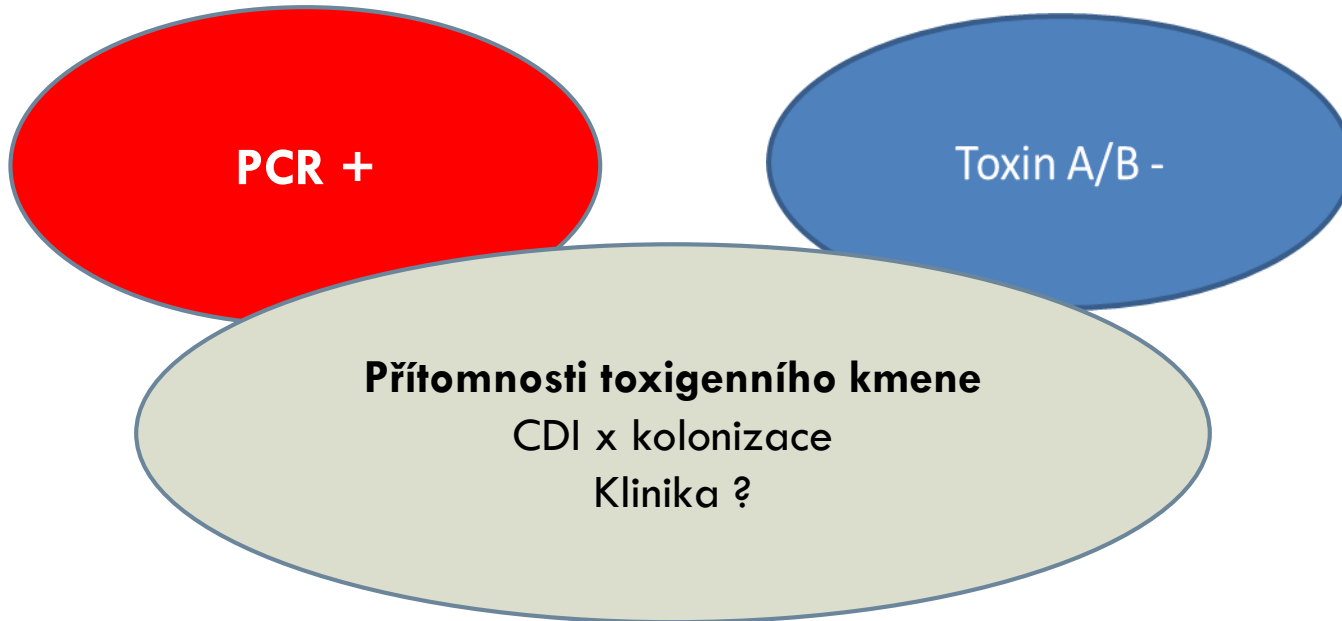
GDH nebo PCR pozitivní + toxin A/B  
pozitivní  
**Toxigenní kmen, vysoká  
pravděpodobnost CDI**

# Interpretace II



Negativita toxinů může být způsobena nízkou senzitivitou testu  
pochybením v preanalytické fázi, výjimečně současnou ATB léčbou

# Interpretace III



Negativita toxinů může být také způsobena pochybením v preanalytické fázi, nízkou senzitivitou testu, výjimečně současnou atb léčbou

Při průjmu epidemiologické riziko !

# GDH +, toxiny A,B negativní ?

- Netoxigenní kmen
- Asymptomatický nosič toxigenního kmene, nízká nebo žádná produkce toxinu
- Falešně negativní test – nízká senzitivita, může se jednat o aktivní infekci
- Falešně pozitivní GDH
- Pochybení v preanalytické fázi

izolace symptomatického pacienta

# Opakované testování

- Ne při první pozitivitě v rámci jedné průjemové epizody
- Při prvním negativním výsledku při významné klinické suspekci a/nebo epidemiologické situaci (pozitivita 0,9 – 8.2 %)
- Ne kontrola účinnosti léčby ( 56 % zůstává pozitivní po léčbě v rozpětí 1 – 4 týdnů po ukončení léčby)

# Doplňková mikrobiologická vyšetření

- Kultivace, PCR, molekulární typizace
- Ribotypizace ( amplifikace ISR – oblast mezi 16 S – 23 S rRNA – liším se počtem alel a délkou ISR)
- Rozdílné vlastnosti ribotypů ( RT) – virulence, sporulace, adherence..
- Epidemické ribotypy – 027,017,078,001...176
- Predikce klinického průběhu ( závažnost, mortalita, rekurence...)
- Epidemiologické souvislosti
- Podmínka efektivní kontroly CDI



# Struktura RT v ČR a Evropě 2017

393 izolátů *C. difficile*

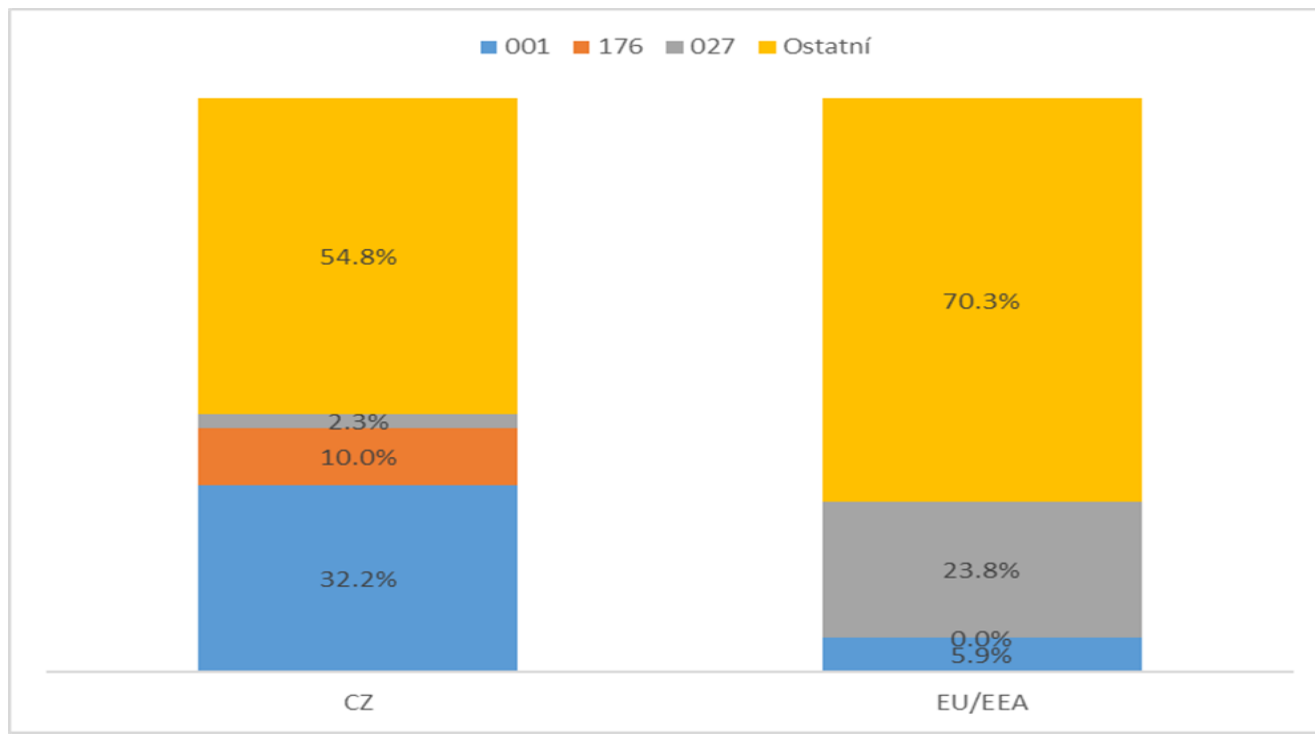
RT001 n=127, 32,2%, 17 nemocnic

RT176 n=42, 10,7%, 11 nemocnic

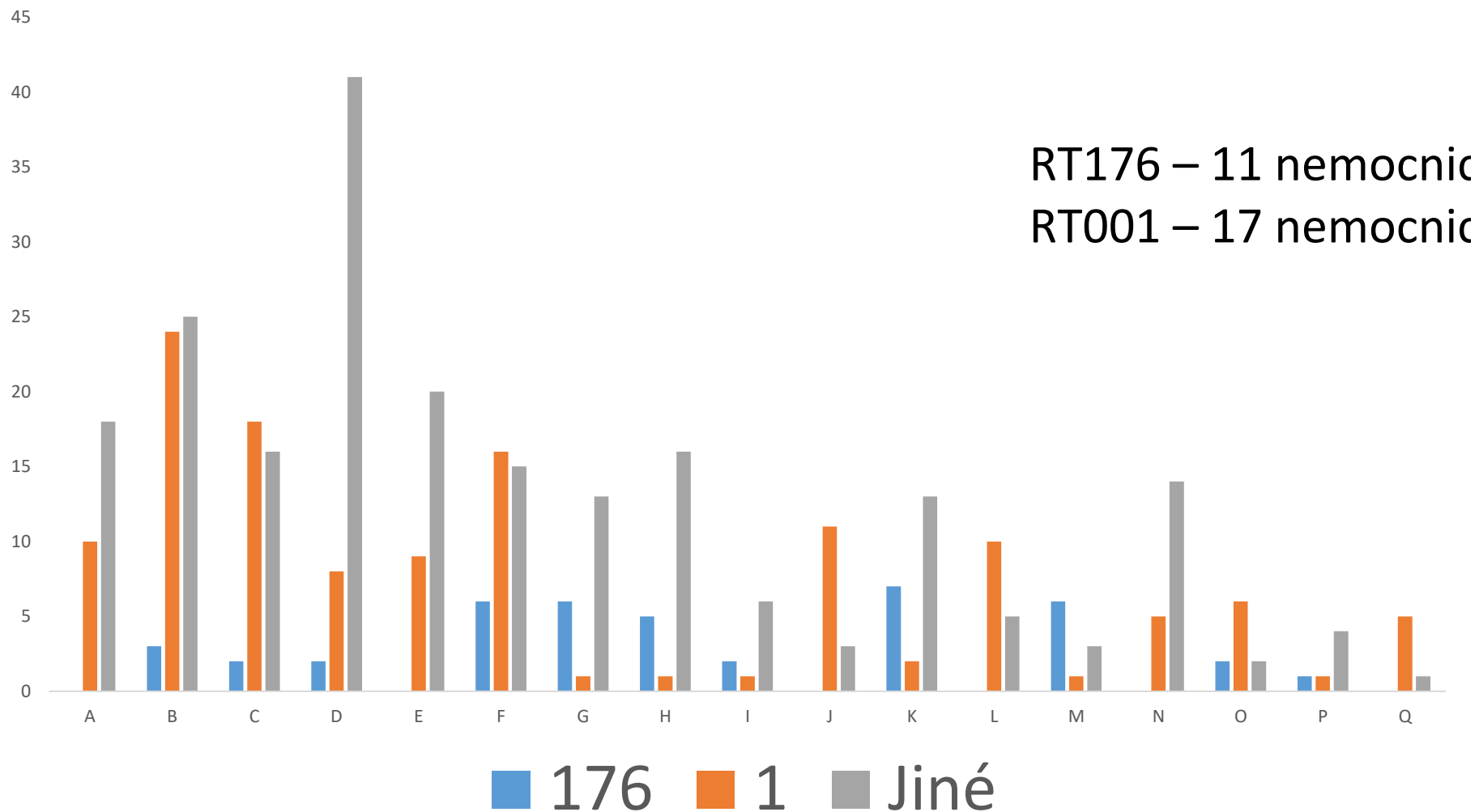
RT027 n=9, 2,3%, 4 nemocnice

Jiný RT n=216, 54,8%, 17 nemocnic

1265 izolátů *C. difficile*



# Distribuce RT v českých nemocnicích 2017



# Ribotyp 001

- Nozokomiální původ
- Vysoká virulence
- Multirezistence
- Vyšší mortalita a počet rekurencí
- V ČR cca 1/3 všech izolovaných ribotypů
- Rezervy v kontrole infekcí a spotřebě antibiotik (fluorochinolony)



Krehelova M. et al. The predominance and clustering of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* PCR ribotype 001 isolates in three hospitals in Eastern Slovakia, 2017. *Folia Microbiol*

# Závěr – laboratorní diagnostika CDI

- Žádný laboratorní test/algorithmus nedává 100 % jistotu
- Významný vliv indikace vyšetření, odběrové soupravy, metody testování a interpretace
- Konečné rozhodnutí o diagnóze CDI musí vycházet z komplexního mezioborového posouzení
- Vysoká homogenita ribotypů svědčí pro častý nozokomiální zdroj a přenos !

Děkuji za pozornost

