

Aktualizace českých doporučených postupů pro laboratorní diagnostiku infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*

Krůtová M., Nyč O.

Ústav lékařské mikrobiologie, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

SOUHRN

Clostridium difficile jako původce střevních infekcí (CDI) různé závažnosti patří k významným nosokomiálním patogenům. Mikrobiologická diagnostika zahrnující vhodný testovací algoritmus a odpovídající interpretaci výsledků je klíčová pro verifikaci CDI. Předkládaná aktualizace vychází z evropských doporučení pro laboratorní diagnostiku CDI s ohledem na současnou epidemiologickou situaci a přístupy v laboratorní diagnostice CDI v České republice (ČR).

Indikací k laboratornímu vyšetření je průjemovitá stolice. Výtěr z rektu je možné použít k testování pouze u ileózních pacientů. Aktuálně je pro diagnostiku CDI doporučen dvoustupňový testovací algoritmus. Použití pouze jednoho testu není považováno za dostatečné pro nízkou pozitivní prediktivní hodnotu. Problém z hlediska jednoznačného diagnostického závěru představují vzorky s pozitivním vyhledávacím testem (glutamát dehydrogenáza nebo DNA detekce toxigenního kmene) a následnou negativitou průkazu volných toxinů ve stolici imunoenzymat-

ickou (EIA) metodou. Možné je pak použít třetí (konfirmační) test, ale především je nutné zohlednit aktuální klinický stav pacienta a další laboratorní nálezy pro odlišení probíhající CDI od kolonizace toxigenním kmenem *C. difficile* s možnou jinou příčinou průjmu.

Obecně by se při volbě diagnostického testu měla brát v potaz zjištěná senzitivita a specifita vůči referenční metodě. Jako zdroj by měly sloužit srovnávací studie publikované v recenzované literatuře, ne pouze informace výrobce. V současné době neexistuje diagnostická souprava pro stanovení toxinů produkovaných *C. difficile* se 100% citlivostí. Na snížení citlivosti stanovení může mít vliv preanalytická fáze (teplota skladování a transportu vzorku) a také zahájení empirické terapie před odběrem vzorku.

KLÍČOVÁ SLOVA

Clostridium difficile – laboratorní diagnostika – testovací algoritmus – interpretace nálezů

ABSTRACT

Krůtová M., Nyč O.: Updated Czech guidelines for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections

Clostridium difficile, a causative agent of intestinal infections (CDI) of varying severity, is an important nosocomial pathogen. Microbiological diagnosis, including an appropriate test algorithm and the corresponding interpretation of the results, is crucial for CDI confirmation. This update is based on the European guidance document for CDI laboratory diagnosis, taking into account the current CDI epidemiology and laboratory diagnostic approaches in the Czech Republic.

Any diarrhoeal patient should be tested for CDI. The rectal swabs can only be used for testing in patients with paralytic ileus. Currently, a two-step test algorithm is recommended for CDI diagnosis. Due to a low positive predictive value, a single commercial test is not recommended as a stand-alone test for diagnosing CDI. Samples with a positive screening test (glutamate dehydrogenase or toxigenic strain nucleic acid) and a subsequent negative EIA (enzyme immunoassay) test for the presence of free toxins are diagnostically inconclusive. An option

is to use a third confirmatory test; however, the current clinical status of the patient along with other laboratory findings should be considered in order to differentiate between ongoing CDI, carriage of a toxigenic strain of *C. difficile*, and other causes of diarrhoea.

In general, when implementing a new diagnostic test, its sensitivity and specificity should be compared against the reference method. Diagnostic tests should refer to the data from published comparative studies and should not rely solely on information provided by the manufacturer. Currently, there is no commercial test available for detection of free *C. difficile* toxins in stool samples with 100 % sensitivity. Moreover, the pre-analytical conditions (storage and transport temperature of stool samples) and/or the initiation of an empirical therapy prior to the sampling may decrease the sensitivity of the assay.

KEYWORDS

Clostridium difficile – laboratory diagnosis – laboratory testing algorithm – result interpretation

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 67, 2018, č. 2, s. 92–95

ÚVOD

Clostridium difficile je významným nosokomiálním a v řadě zemí i komunitním patogenem. Infekce vyvolané *C. difficile* (CDI) jsou charakterizovány vysokou mortalitou

a jsou spojeny s narůstající ekonomickou zátěží pro zdravotnická zařízení [1]. Pro úspěšné monitorování výskytu CDI, zahájení adekvátní terapie a nastavení účinných protiepidemických opatření je zásadní včasné zaslání vzorku stolice pacientů se suspekci na tuto diagnózu. Stejnou

důležitost má připravenost mikrobiologického pracoviště z hlediska používaných diagnostických souprav, testovacího algoritmu a propracovaného komunikačního systému pro hlášení a konzultaci zejména pozitivních a nejednoznačných výsledků.

Incidence CDI v ČR má podle výsledků několika multicentrických studií stoupající charakter. V roce 2008 byla zjištěna ve třech českých nemocnicích velmi nízká incidence CDI (1,1 případů na 10 000 ošetřovacích dní) [2]. V druhé evropské studii, která zahrnovala data z 10 českých nemocnic, byl zaznamenán nárůst incidence CDI na 4,4 případů na 10 000 ošetřovacích dní v období 2011–2012 a 6,2 případů na 10 000 ošetřovacích dní v období 2012–2013 [3]. V roce 2014 byla v 18 nemocnicích zjištěna incidence CDI 6,1 případů na 10 000 ošetřovacích dní [4] a v roce 2015, byla incidence CDI 5,2 případů na 10 000 ošetřovacích dní ve 27 nemocnicích. Po započítání vzorků s pozitivním konfirmačním testem při negativitě toxinů A/B však stoupla na 7,7 případů na 10 000 ošetřovacích dní [5].

Testovací frekvence zjištěná v letech 2014 a 2015 (39,5 a 37,3 testů na 10 000 ošetřovacích dní) [4, 5] byla podprůměrná ve srovnání s průměrnou testovací frekvencí ve výše uvedené evropské studii (62,3 a 69,2 testů na 10 000 ošetřovacích dní), [3].

O určitém rozptylu v diagnostických přístupech na národní úrovni svědčí výsledky webového dotazníku (duben až červenec, 2014), kdy 61 českých mikrobiologických laboratoří uvedlo používání 24 různých laboratorních algoritmů. Doporučenou citlivou screeningovou metodu nepoužívalo 8,2 % (n = 5) laboratoří a 21,3 % (n = 13) laboratoří nemělo k dispozici konfirmační metodu v případě výsledku testu GDH pozitivní, toxin A/B negativní [6].

S cílem optimalizovat CDI laboratorně diagnostický algoritmus byla provedena metaanalýza výsledků studií zaměřených na porovnání komerčních testů pro diagnostiku CDI s referenční metodou. Na základě těchto výsledků byla revidována doporučení z roku 2009 [7] a formulována nová doporučení pro laboratorní diagnostiku CDI [8], která jsou platná i pro účely standardizované surveillancie CDI koordinované Evropským centrem pro prevenci a kontrolu infekcí (ECDC), [9].

VÝBĚR VZORKŮ K TESTOVÁNÍ

Laboratorní diagnostika CDI je založena na vyšetření průjmovité stolice pacienta (vzorek kopíruje tvar kontejneru). Pro efektivní kontrolu výskytu CDI v nemocničním zařízení by měly být testovány všechny průjmovité stolice zaslané do laboratoře. Limitem laboratorní diagnostiky je zaslání pouze rektálního výtěru, což znamená, že ošetřující lékař na diagnózu CDI nepomýšlí, a významné procento CDI tak není diagnostikováno [3]. Formovanou stolicí se nedoporučuje vyšetřovat pro absenci průjmu a možnosti detekce asymptomatického nosičství toxigenního *C. difficile*. Takový vzorek je možno uvádět jako důvod neshody. Výjimku tvoří pacienti s paralytickým ileem. Pouze u ileózních pacientů je přípustné provést vyšetření i z rektálního výtěru, ideálně pomocí molekulárních metod. Diskutabilní je spodní věková hranice pacientů pro vyšetření CDI, kdy v rámci evropských doporučení pro diagnostiku a léčbu CDI byla stanovena na tři roky [8] a v technickém protokolu pro surveillancie CDI koordinovanou ECDC na dva roky [9]. U dětí mladších tří let bylo

zjištěno vysoké procento kolonizace toxigenními kmeny *C. difficile* [10]. Testování je tedy doporučeno, pouze pokud klinické podezření na CDI přetrvává a ostatní možné příčiny průjmu byly vyloučeny.

MOŽNOSTI LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY CDI

Současná mikrobiologická diagnostika CDI vychází z několika metod, které principiálně detekují tři různé cíle. Průkaz volného toxinu ve stolici pomocí EIA nebo testem cytotoxicity, průkaz *C. difficile* kultivací nebo přítomností GDH metodou EIA nebo ověření přítomnosti toxigenního kmene na základě NAAT (Nucleic Acid Amplification Test) nebo toxigenní kultivací. Jak je známo, senzitivita a specifita jednotlivých metod je různá, každá má svá omezení a žádná zatím není považována za optimální metodu volby, pokud je použita izolovaně.

STANOVENÍ GLUTAMÁT DEHYDROGENÁZY A VOLNÝCH TOXINŮ A/B VE STOLICI

Glutamát dehydrogenáza je enzym metabolismu kódovaný genem *gluD*, produkovaným jak toxigenními, tak netoxigenními kmeny *C. difficile* [11]. Metody stanovení jsou imunoenzymatické (EIA) nebo imunochromatografické. Pozitivní výsledek ukazuje na pravděpodobnou přítomnost *C. difficile* ve vzorku stolice bez předpokladu, zda kmen produkuje toxin (y), proto musí být konfirmován metodou s vyšší specifitou (přítomnost volných toxinů). Přítomnost toxinů A/B může být detekována taktéž pomocí EIA, imunochromatograficky nebo neutralizačním testem na tkáňových kulturách. Komerčně dostupné testy poskytují rychlý výsledek, ale žádný z nich nedosahuje 100% senzitivity. Senzitivita kolísá od 29 % do 86 % podle uspořádání testu [8]. Senzitivitu daného testu by měly udávat srovnávací studie vůči referenční metodě publikované v recenzované literatuře, ne pouze informace od výrobce.

DETEKCE TOXIGENNÍCH *C. DIFFICILE*

Přítomnost *C. difficile* může být zjišťována anaerobní kultivací nebo průkazem fragmentů DNA toxigenních *C. difficile* pomocí molekulárních metod (NAAT). Před kultivací vzorku stolice na průkaz *C. difficile* je nezbytný „alkoholový šok“, který indukuje germinaci spór. Vzorek stolice je smíchán v poměru 1 : 1 se 70% metylalkoholem a následně inkubován 30–60 minut při pokojové teplotě. Selektivní půdy pro kultivaci *C. difficile* obsahují látky podporující germinaci spór (kyselina cholová) a do jisté míry potlačující růst průvodní mikroflóry (cykloserin a cefoxitin) [12]. U chromogenních médií byla publikována u některých kmenů (ribotyp 023) neschopnost hydrolyzování eskulinu, což má za následek odlišný morfologický vzhled kolonií (bílé, transparentní namísto černých kolonií) [13, 14]. Pro odlišení toxigenních a netoxigenních kmenů by měly být izoláty *C. difficile* dále testovány na přítomnost genů pro tvorbu toxinů nebo na produkci toxinů samotných pomocí EIA, kdy je testována suspenze kolonií nebo supernatant kultury narostlé v bujónu nebo neutralizačním testem na tkáňových kulturách (toxigenní kultivace) [15].

KRÁTKÉ SDĚLENÍ

Molekulární testy (NAAT) se liší podle cílového místa v genomu, které detekují, a také podle principu metody. Některé testy jsou cílené pouze na gen pro produkci toxinu B, jiné upřednostňují detekci genu pro tvorbu toxinu A, další volí kombinaci hned několika cílových míst v genomu toxigenních *C. difficile* (např. gen pro produkci toxinu B, gen pro produkci binárního toxinu a delece v pozici 117 genu *tcdC* [16]).

U molekulárních testů umožňujících odlišení přítomnosti ribotypu 027 od ostatních ribotypů na základě přítomnosti delece v pozici 117 genu *tcdC* a binárního toxinu je nutné vzhledem k nálezům této delece u jiných ribotypů [17] a k současné epidemiologické situaci v ČR, kdy analýzou 2021 izolátů *C. difficile* v letech 2013–2015 bylo identifikováno 588 izolátů ribotypu 176 a pouze 5 izolátů ribotypu 027 [18], doplnit výsledek o komentář. Ten by měl obsahovat informaci, že se nemusí jednat o ribotyp 027, ale naopak jde s vyšší pravděpodobností o detekci aktuálně v ČR více rozšířeného ribotypu 176.

PREANALYTICKÁ FÁZE

Vzorek stolice by měl být do laboratoře dopraven v co nejkratším čase, ideálně při chladničkové teplotě.

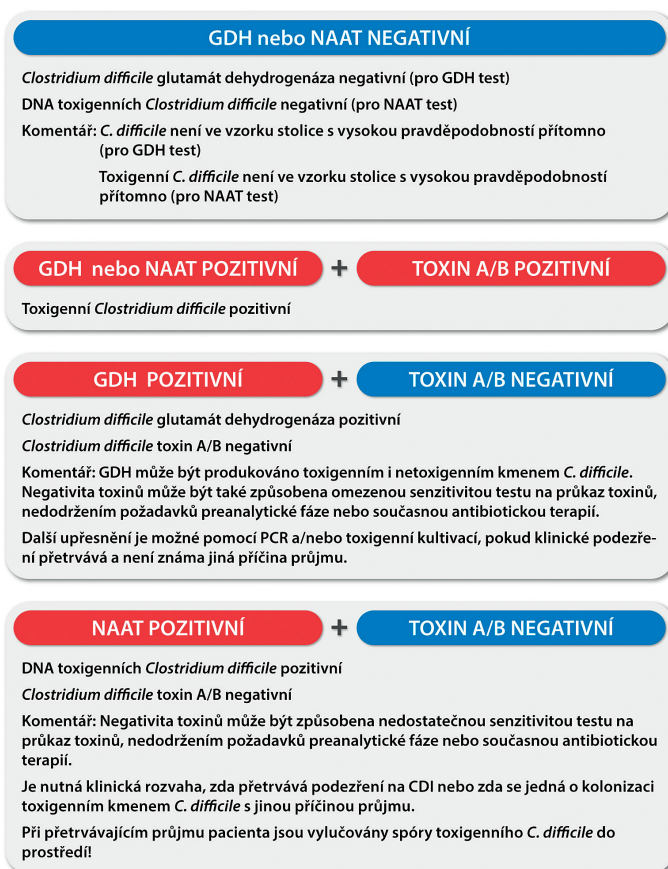


Schéma 1. Interpretace výsledků jednotlivých testů
Diagram 1. Interpreting the results of individual tests

CDI - *Clostridium difficile* infection, DNA - deoxyribonucleic acid, GDH - glutamát dehydrogenáza, NAAT - nucleic acid amplification tests

Chladničková teplota je důležitá i pro skladování vzorku stolice, pokud není laboratorní vyšetření dostupné v neomezeném režimu. Mražení vzorku významně snižuje titer toxinů ve stolici [19], což může vést k falešné negativitě stanovení volných toxinů ve stolici. Dalším významným faktorem ovlivňujícím citlivost laboratorní diagnostiky CDI je zahájení empirické terapie před odběrem vzorku k vyšetření. Výsledky studie autorů Sunkesula et al., ukázaly, že u 51 testovaných pacientů došlo ke změně výsledku laboratorních testů (GDH, volné toxiny ve stolici a NAAT) z pozitivního na negativní u 14 % po jednom dni, u 35 % po dvou dnech a u 45 % po třech dnech od nasazení terapie [20].

TESTOVACÍ ALGORITMUS

Pro diagnostiku CDI je u pacientů s podezřením na tuto infekci základním vyšetřením průkaz glutamát dehydrogenázy (GDH), toxinů A/B a/nebo přítomnosti toxigenního *C. difficile* pomocí NAAT, jakožto citlivé vyhledávací testy s vysokou negativní prediktivní hodnotou. V případě pozitivity prvního testu by mělo následovat stanovení přítomnosti volných toxinů A/B ve stolici pomocí EIA. Alternativním algoritmem je testování přítomnosti GDH a toxinů A/B současně, vzhledem k principu stanovení komerčního testu [8, 15].

Pozitivita obou testů potvrzuje s vysokou pravděpodobností přítomnost toxin produkujícího kmene *C. difficile* a tím i diagnózu CDI. Pokud je výsledek prvního testu pozitivní a druhý test (EIA na průkaz toxinů) negativní, je doporučeno vyšetření doplnit třetím konfirmačním testem, kterým může být NAAT, pokud nebyl tento test použit jako vyhledávací. Další možností je toxigenní kultivace. Především je ale nutné zohlednit aktuální klinický stav pacienta a další laboratorní nálezy pro odlišení probíhající CDI od kolonizace toxigenním kmenem *C. difficile* s možnou jinou příčinou průjmu [8, 15].

U kombinovaných testů je v případě pozitivity toxinů A/B a negativity GDH doporučeno test provést znovu. V případě tohoto opakovaného, velmi málo pravděpodobného výsledku je nutné použít další konfirmační test (toxigenní kultivace nebo NAAT) [8, 15].

Použití pouze jednoho testu k diagnostice CDI není doporučeno vzhledem k nízké pozitivní prediktivní hodnotě pro diagnózu CDI. Pozitivní GDH neumožní odlišit toxigenní a netoxigenní *C. difficile*, testy pro stanovení volných toxinů A/B ve stolici vykazují nedostatečnou citlivost a pozitivní NAAT neodliší nosičství toxigenního *C. difficile* od probíhající infekce [8, 15].

Interpretace výsledků jednotlivých testů jsou uvedeny na schématu 1.

OPAKOVÁNÍ TESTOVÁNÍ

Pokud byl první testovaný vzorek pozitivní, není během jedné epizody CDI (1–14 dní) opakování testování doporučeno a může být důvodem k záznamu o neshodě. Testování není vhodné ani pro kontrolu účinnosti léčby CDI [8] z důvodu možného přetrvávání pozitivity GDH, toxinů a/nebo DNA toxigenních *C. difficile* i přes ústup klinických obtíží [21]. Z tohoto důvodu také nelze požadovat tři negativní výsledky u pacienta s prodělanou CDI. Rozhodující pro po-

souzení efektivity antibiotické, případně neantibiotické, terapie je vždy úprava klinických příznaků, tj. především přítomnost formované stolice.

Pokud byl první test negativní, může být vyhledávací test zopakován během jedné epizody průjmu:

- a) při přetrvávání klinického podezření s vyloučením jiné příčiny průjmu nebo
b) v závislosti na lokální epidemiologické situaci [8].

ZÁVĚR

Komerčně dostupné mikrobiologické testy se liší jak svým uspořádáním, principem detekce, tak i senzitivitou. Tato skutečnost musí být zohledněna při interpretaci laboratorních nálezů, což je nezbytné zejména u nejednoznačných výsledků korelovat s klinickým stavem pacienta a dalšími laboratorními údaji.

LITERATURA

- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev*, 2010;23(3):529-549.
- Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*, 2011;377(9759):63-73.
- Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis*, 2014;14(12):1208-1219.
- Krutova M, Matejkova J, Kuijper EJ, Drevinek P, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes 001 and 176 – the common denominator of *C. difficile* infection epidemiology in the Czech Republic, 2014. *Euro Surveill*, 2016;21(29).
- Krutova M, Matejkova J, Drevinek P, Kuijper EJ, et al. Increasing incidence of *Clostridium difficile* ribotype 001 associated with severe course of the infection and previous fluoroquinolone use in the Czech Republic, 2015. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017;36(11):2251-2258.
- Krůtová M, Nyč O. Diagnostika infekcí vyvolaných *Clostridium difficile* v České republice – dostupnost, možnosti, interpretace laboratorních nálezů. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2015;64(2):92-97.
- Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect*, 2009;15(12):1053-1066.
- Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*, 2016;22(Suppl 4):S63-81.

9. European Centre for Disease Prevention and Control. European Surveillance of *Clostridium difficile* infections. Surveillance protocol version 2.3. Stockholm: ECDC; 2017.

10. Bryant K, McDonald LC. *Clostridium difficile* infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, 2009;28(2):145-146.

11. Carman RJ, Wickham KN, Chen L, Lawrence AM, et al. Glutamate dehydrogenase is highly conserved among *Clostridium difficile* ribotypes. *J Clin Microbiol*, 2012;50(4):1425-1426.

12. Bowman RA, Riley TV. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1988;7(4):476-484.

13. Connor MC, Fairley DJ, McKenna JP, Marks NJ, et al. *Clostridium difficile* Ribotype 023 Lacks the Ability To Hydrolyze Esculin, Leading to False-Negative Results on Chromogenic Agar. *J Clin Microbiol*, 2016;54(5):1404-1405.

14. Reigadas E, Alcalá L, Marín M, Martín A, et al. *C. difficile* PCR-ribotype 023 might go undetected when using ChromID *C. difficile* agar. *Anaerobe*, 2017;44:34-35.

15. Gateau C, Couturier J, Coia J, Barbut F. How to: Diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 2017; pii:S1198-743X(17)30678-X.

16. Paitan Y, Miller-Roll T, Adler A. Comparative performance study of six commercial molecular assays for rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 2017;23(8):567-572.

17. Krutova M, Nyc O, Matejkova J, Kuijper EJ, et al. The recognition and characterisation of Finnish *Clostridium difficile* isolates resembling PCR-ribotype 027. *J Microbiol Immunol Infect*, 2017 May 24.

18. Krutova M, Nyc O, Matejkova J, Allerberger F, et al. Molecular characterisation of Czech *Clostridium difficile* isolates collected in 2013-2015. *Int J Med Microbiol*, 2016;306(7):479-485.

19. Freeman J, Wilcox MH. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *J Clin Pathol*, 2003;56(2):126-128.

20. Sunkesula VC, Kundrapu S, Muganda C, Sethi AK, et al. Does empirical *Clostridium difficile* infection (CDI) therapy result in false-negative CDI diagnostic test results? *Clin Infect Dis*, 2013;57(4):494-500.

21. Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Bobulsky GS, et al. Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010;31(1):21-27.

Do redakce došlo dne 18. 1. 2018.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Marcela Krůtová, Ph.D.

Ústav lékařské mikrobiologie,

2. LF UK a FN v Motole

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: marcela.krutova@lfmotol.cuni.cz