

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

## **Laboratorní diagnostika *Clostridium difficile***

Bakalářská práce

Autor práce: Romana Jandová  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Petra Dovinová

Datum odevzdání práce: 3.5.2013

## Abstrakt

*Clostridium difficile* s produkcí toxinů je nejčastějším původcem nozokomiálních střevních infekcí. Způsobuje zánětlivé onemocnění tračníku nazývané *Clostridium difficile* infection (CDI) různé závažnosti – od banálního průjmu až po život ohrožující stav jako je paralytický ileus a toxické megakolon. CDI se může projevit i jako rekurentní infekce – vyčerpávající opakované průjmy. *C. difficile* stále ještě uniká pozornosti laické veřejnosti a stojí v pozadí za jinými bakteriemi, jako je např. MRSA. Onemocnění však nabývá na významu v důsledku stálého (nad)užívání antibiotik a také kvůli stále se zvyšujícímu počtu lidí rizikové skupiny nad 65 let. Dá se předpokládat, že tato situace bude mít jak zdravotnický, tak ekonomický dopad.

*Clostridium difficile* je striktně anaerobní bakterie. Je to grampozitivní tyčinka tvořící oválné subterminální spóry. Tato bakterie je běžně přítomna ve vodních tocích, půdě, střevech zvířat i lidí. Její spóry jsou mimořádně odolné vůči zevním vlivům a dokážou zamořit prostředí na mnoho dnů až měsíců. *C. difficile* může produkovat dva typy toxinů - a to toxin A (enterotoxin) a toxin B (cytotoxin). Vlivem toxinů dochází k poškození střevního epitelu i hlubších vrstev střevní stěny. Vznikají zánětlivé ulcerace, které se pokrývají pseudomembránami. Může dojít k postupné zástavě peristaltiky a rozvoji ileu. V terminálním stádiu dochází k roztažení tračníku a ztrátě bariérové funkce střevní sliznice. Bakterie a toxiny se dostávají do krevního oběhu a vzniká sepse.

Některé kmeny produkují ještě binární toxin, jehož přesná funkce zatím není objasněna. Předpokládá se, že potencuje účinek toxinů A a B zvyšováním jejich koncentrace.

Hlavně v severní Americe a také v evropských státech byl v posledních letech zaznamenán nárůst tohoto onemocnění, projevující se těžším průběhem onemocnění a častějšími relapsy. To je způsobeno šířením hypervirulentních kmenů s extrémně vysokou produkcí toxinů A i B (ribotyp 027). V České republice se vyskytl neméně nebezpečný ribotyp 176.

Lékem volby pro léčbu CDI jsou metronidazol (podávaný per os nebo parenterálně) a vankomycin (podávaný perorálně nebo do nasogastrické sondy). Transplantace stolice nasojejunální sondou se jeví jako možný způsob léčby u rekurentních infekcí.

Při výskytu CDI ve zdravotnickém zařízení musí být po dobu trvání průjmu pacient v izolaci.

Cílem práce bylo zhodnotit současné možnosti laboratorní mikrobiologické diagnostiky *C. difficile*. Vyhodnotila jsem četnost pozitivních a negativních nálezů v závislosti na pohlaví a věku. Dále mě zajímal stav rezistence *C. difficile* k antibiotikům.

K průkazu CDI je nutné odebrat vzorek stolice do sterilní zkumavky. Na Pracovišti bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s. se provádí přímý průkaz antigenu a toxinu imunochromatografickou metodou. Jedná se o membránovou enzymovou immunoanalýzu pro detekci antigenu - glutamát dehydrogenázy (GDH) a toxinu A/B. Negativní výsledek GDH vyloučí s velkou spolehlivostí klostridiovou infekci. Za potvrzenou CDI se považuje průkaz toxigenního kmene *C. difficile*. To je zřejmé buď přímo z výsledku imunochromatografie, kdy se prokáže zároveň antigen i toxin, nebo průkazem genu pro toxin B metodou PCR. Pokud totiž vyjde v přímém průkazu pozitivní pouze antigen, vzorek se zasílá na PCR vyšetření do Laboratoře molekulární biologie a genetiky. Nezávisle na výsledku imunochromatografie se ze stolice zhotovuje mikroskopický preparát obarvený podle Grama. V případě prokázaného toxinu *C. difficile* se provádí anaerobní kulturační vyšetření, které trvá dva dny. K identifikaci narostlých bakterií se používá nejčastěji latexová aglutinace. Jde o metodu, kdy se IgG protilátky navázané na latexových partikulích specificky vážou k antigenům buněčné stěny. K identifikaci bakterie lze použít též přístroj VITEK – MS, který používá metodu ionizaci laserem za přítomnosti matrice s následnou hmotnostní spektrometrií. V případě pozitivního kulturačního nálezu *Clostridium difficile* se z narostlé kultury stanovuje citlivost k antibiotikům pomocí E-testu a diskové difuzní metody.

Za rok 2011 bylo na Pracoviště bakteriologie vyšetřeno 291 vzorků stolic. Z nich mělo v imunochromatografickém vyšetření 13,4 % pozitivní antigen i toxin; 15,1 % pozitivní antigen a negativní toxin a 71,5 % bylo negativních. U 74 vzorků byl prokázán

toxin *C. difficile*. U těchto vzorků bylo následně provedeno i kultivační vyšetření – pozitivní bylo v 62,2 %. Nejvíce pozitivních vzorků bylo odesláno z Infekčního oddělení. V počtu vyšetřených pacientů převažovaly ženy, bylo jich 53,6 % a mužů 46,4 %. Procentuální zastoupení toxigenních kmenů bylo u obou pohlaví prakticky totožné - 25 %. Všechny kmeny byly citlivé k vankomycinu a pouze jeden kmen byl rezistentní k metronidazolu.

## Abstract

*Clostridium difficile* toxin with production is the most common cause of nosocomial enteric infections. It causes inflammatory bowel disease called *Clostridium difficile* infection (CDI) of varying severity - from trivial diarrhea to life-threatening conditions such as paralytic ileus and toxic megacolon. CDI may manifest as recurrent infections - an exhaustive repeated diarrhea. *C.difficile* still escapes the attention of the general public and is in the background of other bacteria, such as MRSA. The disease has become more important due to the constant (over) use of antibiotics and also due to the increasing number of people at risk groups over 65 years. It can be expected that this situation will have both medical and economic impact.

*Clostridium difficile* is a strictly anaerobic bacterium. It is a gram-positive rod forming an oval subterminal spores. This bacteria is normally present in the waterways, soil or the intestines of animals and humans. It's spores are extremely resistant to external influences and can contaminate the environment for many days or months. *C. difficile* can produce two types of toxins - and toxin A (enterotoxin) and toxin B (a cytotoxin). Due to the toxin causes damage of the intestinal epithelium and deeper layers of the bowel wall. Into inflammatory ulceration that cover of the pseudomembrane. There may be a gradual arrest of peristalsis and the development of ileus. In the terminal stage of the disease bowel distension and loss of barrier function of the intestinal mucosa. Bacteria and toxins get into the bloodstream and sepsis arises.

Some strains produce more binary toxin, whose exact function is not understood yet. It is assumed that potentiates the effect of toxins A and B to increase their concentration.

Especially in North America and in European countries in recent years has been seen an increase in this disease, manifested by severe course of disease and frequent relapses. This is due to the spread of hypervirulent strains with extremely high production of toxins A and B (ribotype 027). In the Czech Republic occurred less dangerous ribotype 176.

The drug of choice for treatment of CDI are metronidazole (administered orally or parenterally) and vancomycin (administered orally or by nasogastric tube in).

Transplantation stool nasojejunal probe appears as a possible treatment for recurrent infections.

Upon the occurrence of CDI in a medical device must be for the duration of diarrhea in the patient isolation.

The aim of the thesis was to evaluate the possibility of microbiological laboratory diagnosis of *C. difficile*. I have evaluated the frequency of positive and negative findings in relation to sex and age. I have been also interested in state *C. difficile* resistance to antibiotics.

To demonstrate the CDI must remove the stool sample into a sterile tube. In the bacteriology workplace in Czech Budweis Hospital is being made direct conclusiveness of antigen and toxin by immunochromatography method. It is a membrane-enzyme immunoanalysis for the detection of antigen - glutamate dehydrogenase (GDH) and toxin A / B A. Negative result excludes GDH with high reliability clostridial infection. For confirmed CDI is considered proof toxigenic strain of *C. difficile*. This is evident from the result of either immunochromatography which is demonstrated both the antigen and the toxin, or identity of the gene for toxin B by PCR. If you find out in direct detection only positive antigen, the sample is sent for PCR testing to the Laboratory of Molecular Biology and Genetics. Regardless of the outcome of the immunochromatography, the microscopic specimen stained by Gram are being produce from reces.. In the case of proven *C. difficile* toxin is carried anaerobic culture test that takes two days. For identification of accrued bacteria is used latex agglutination. This is a method in which IgG antibodies bound to latex particles specifically bind to the antigens of the cell wall. To identify the bacteria can be also used the VITEK – MS machine that uses a laser ionization method in the presence of the matrix, followed by mass spectrometry. In case of a positive culture findings *Clostridium difficile* is being from grown culture set sensitivity to antibiotics by E-test and disk diffusion methods

For the year 2011 the Department of Bacteriology examined 291 samples of feces. 13,4 % of these samples had positive antigen and toxin in an imunochromatographic examination; 15,1 % had a positive antigen and negative toxin and 71,5 % were negative. 74 samples was positive in *C. difficile* toxin. These samples were subsequently

conducted to culture examination – 62,2 % were positive. Most positive samples were sent from the infectious department. It has been examined 53,6 % of women and 46.4 % of mens. Percentage of toxigenic strains of both sexes were virtually identical – 25 %. All strains were susceptible to vancomycin and only one strain was resistant to metronidazole.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2013

.....

Podpis studenta



## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala MUDr. Petře Dovinové za její odbornou pomoc, trpělivost a cenné rady při zhotovení této práce. Velký dík patří též kolektivu Laboratoře bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s. za ochotu a vytvoření příjemných pracovních podmínek při výzkumu. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během studia.

## Seznam použitých zkratk

Ag – antigen

CDI – infekce *Clostridium difficile*

CPE – cytopatický efekt

CT – počítačová tomografie

C<sub>T</sub> – threshold cycle

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESGCD – ESCMID Study Group on *Clostridium difficile*

GDH – glutamát dehydrogenáza

GIT – gastrointestinální trakt

HIV - Human Immunodeficiency Virus

IČP – identifikační číslo pracoviště

LAS – Látalův anaerobní systém

MALDI - ionizace laserem za přítomnosti matrice

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

NAP1/027 - American Pulsed Field type 1/ or PCR ribotype 027

PCR – polymerázová řetězová reakce

PME – pseudomembranózní enterokolitida

RT – PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

TNF – Tumor Necrosis Factor

UCLA – University of Los Angeles

UV – ultrafialové záření

TOF - analýza doby letu

tox - toxin

## Obsah

ÚVOD.....	12
1. SOUČASNÝ STAV.....	13
1.1 Bakteriální buňka .....	13
1.2 Rod <i>Clostridium</i> .....	16
1.2 <i>Clostridium difficile</i> .....	19
1.2.1 Charakteristika <i>Clostridium difficile</i> .....	19
1.2.2 Faktory virulence .....	20
1.2.3 Onemocnění vyvolané <i>Clostridium difficile</i> .....	22
1.2.4 Epidemiologie, přenos a preventivní opatření.....	25
1.2.5 Terapie infekcí <i>Clostridium difficile</i> .....	28
1.2.6 Metody diagnostiky <i>Clostridium difficile</i> .....	31
2. CÍL PRÁCE.....	36
3. METODIKA.....	37
3.1 Charakteristika souboru .....	37
3.2 Materiál.....	37
3.3 Metody .....	38
3.3.1 Přímý průkaz antigenu a toxinu .....	38
3.3.2 Mikroskopie.....	41
3.3.3 Kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům .....	42
3.3.4 Kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům .....	46
4. VÝSLEDKY .....	50
5. DISKUSE.....	57
6. ZÁVĚR .....	59
7. KLÍČOVÁ SLOVA.....	60
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	61
9. PŘÍLOHY.....	66

## ÚVOD

*Clostridium difficile* bylo prvně popsáno roku 1935. Jedná se o grampozitivní, anaerobní bakterii, velmi náročnou na kultivaci. Toxické kmeny *Clostridium difficile* za určitých podmínek vyvolávají průjemová onemocnění. Může vyústit až v pseudomembranózní kolitidu, ileus nebo toxický megakolon. Rychlá a včasná diagnostika *C. difficile* je velmi důležitá nejen pro individuální léčbu pacienta, ale i k prevenci nozokomiálních přenosů. Bakterie se přirozeně vyskytuje ve vodních tocích, půdě, střevech zvířat i lidí. Dvě třetiny zdravých dětí jsou touto bakterií osídleny několik prvních měsíců po narození, aniž by se projevil příznaky onemocnění. U zdravých dospělých osob je míra kolonizace 2-5 %.

Jedním z důvodů, proč jsem si vybrala téma Laboratorní diagnostika *Clostridium difficile*, je v posledních letech narůstající četnost střevních onemocnění souvisejících s *C. difficile*. Jako původce nozokomiálních infekcí nabývá stále většího významu. Převážně jsou postiženi lidé s poruchami imunity, vyššího věku, po předchozí hospitalizaci ve zdravotnickém či pečovatelském zařízení a hlavně lidé užívající antibiotika. V této práci se zabývám diagnostikou *C. difficile*, a to přímým průkazem antigenu a toxinu pomocí metod imunochromatografie a PCR. Poté kultivací a stanovením citlivosti k antibiotikům. V závěru práce jsem zhodnotila četnost pozitivních i negativních nálezů *C. difficile* za rok 2011 v závislosti na jednotlivých měsících a podle zasílajících oddělení. Vyhodnotila jsem četnost onemocnění v závislosti na pohlaví a věku a citlivost k antibiotikům. Můj výzkum probíhal na Pracovišti bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a. s.

# 1. SOUČASNÝ STAV

## 1.1 Bakteriální buňka

Na rozdíl od eukaryotní buňky živočišné a rostlinné je bakteriální buňka nazývána buňkou prokaryotní. Bakteriální buňka je řádově menší, než buňka živočišná. To má své důsledky - a to velký poměr povrchu k objemu, velkou plochu kontaktu buňky s prostředím a vysokou rychlost výměny molekul mezi buňkou a prostředím. Mimo jiné jsou minimalizovány časy důležité pro intracelulární přenos molekul do místa interakce. V malém prostoru bakteriální buňky je vysoká pravděpodobnost vzniku srážky reagujících molekul. S tím je spjata vysoká rychlost metabolismu. [6]

Bakterie mají protáhlý nebo kulovitý tvar. Protáhlým formám říkáme tyčinky (řec. baktérion, hůlka), kulaté formy nazýváme koky (řec. kokkos, jádro). Při dělení bakterií vzniká uspořádání závislé na rovině buněčného dělení. Některé koky se dělí ve stejné rovině a tvoří řetízky. Další se dělí ve dvou a třech rovinách, jiné jsou nepravidelně uspořádány do shluků. Tyčinky vidáme jen vzácně ve dvojicích, většinou bývají uspořádány jednotlivě.

Hlavní rozdíl mezi bakteriální a rostlinnou či živočišnou buňkou je v jejím vnitřním uspořádání. Struktura bakteriální buňky je podstatně jednodušší. Bakteriální buňka se skládá z cytoplasmy obklopené cytoplasmatickou membránou. Na ni nasedá bakteriální stěna, ta může mít na svém povrchu pouzdro nebo vrstvu slizu, glykokalix. V cytoplasmě se nacházejí ribozomy, inkluzní tělíska, nukleotidy, vakuoly nebo granula. Z povrchu vystupují výběžky nazývané pili (lat. pilus, vlas, chlup) nebo bičíky. Cytoplasmatická membrána se skládá z dvojité fosfolipidové vrstvy. Zastává mnoho zásadních funkcí a pro buňku je nezbytná. Bílkoviny cytoplasmatické membrány slouží k přenosu živin do buňky, v sekreci složek, k vylučování látek cytoplasmy do vnějšího prostředí a v respiračních pochodech.

K udržení základního tvaru bakterie a ochraně cytoplasmatické membrány slouží buněčná stěna. Je to silná vrstva odolávající nitrobuněčnému osmotickému tlaku. Základní vrstva tvořící stěnu bakterie je peptidoglykan. Ten je z polysacharidových

řetězců pospojovaných krátkými peptidy. U grampozitivních a gramnegativních bakterií jsou další struktury velmi rozdílné. Struktura grampozitivních bakterií je poměrně jednoduchá. Skládá se ze silné peptidoglykanové vrstvy, jejíž součástí jsou nad sebou uložené polysacharidové řetězce. Peptidoglykanem probíhají kolmo k povrchu buňky řetězce kyseliny teichoové, to je kyselý polysacharid, který se skládá u opakujících se jednotek ribitolu a glycerolu. Stěna je silná asi 20 nm. Naopak stěna gramnegativních bakterií je tenčí, asi 15 nm. Svou strukturou je mnohem složitější. Je složena ze zevní membrány a peptidoglykanu. Zevní membrána obsahuje lipopolysacharidy, proteiny a fosfolipidy. Lipoproteiny jsou zodpovědné za pevnou vazbu zevní membrány k peptidoglykanu. Fosfolipidy tvoří dvojitou vrstvu, ve které jsou uloženy bílkoviny. Některé tvoří kanálky, nazývané poriny, které slouží k transportu živin do periplasmatického prostoru. Prostupu molekul do bakterie brání zevní membrána. V periplasmatickém prostoru jsou enzymy štěpící nebo transportující živiny. Některé z nich inaktivují antibiotika, jako třeba beta-laktamasy štěpící beta-laktamový kruh penicilinů a cefalosporinů. [39]

Bakterie se běžně vyskytují ve vodě, v půdě, na povrchu těla a sliznic živočichů. Nacházejí se i ve vzduchu, a to samostatně, jsou – li unášeny větrem, nebo častěji na částech prachu. Jsou schopny přežít i extrémní fyzikální i chemické podmínky, jako vysoký tlak v hlubinách oceánu, v horkých plamenech odolávají vysoké teplotě, přežijí záření v dávkách, které je pro člověka smrtelné, v Mrtvém moři zase čelí vysoké koncentraci soli a v žaludečních šťávách zase vysoké kyselosti. Jen malá část bakterií, vyskytujících se v živé přírodě je pro člověka patogenní a má schopnost vyvolat onemocnění. Některé organismy získávají energii ze světla nebo oxidací anorganických látek, jiné pak z odumřelých organických látek, ty jsou známé jako *saprophyty*. Naopak pro *parazity* jsou zdrojem výživy živá těla, ve kterých žijí. Na kůži, sliznici horních cest dýchacích, ve střevě a pochvě jsou *komezálové*. Ty jsou součástí přirozené flóry. Živí se sekrety a zbytky potravy. Většinou jsou neškodní, ale za určitých podmínek, kdy dojde k oslabení imunity jedince, mohou vyvolat onemocnění, proto jsou označovány jako *podmíněné patogeny*. Jiné jsou adaptovány tak, aby překonávaly obranné mechanismy hostitele. Vniknou do tkání a množí se, nebo tvoří toxiny, které poškozují

hostitele. S tím je spojený proces infekce a onemocnění způsobené mikroby se nazývá *infekční onemocnění*. [16,39]

Některé grampozitivní bakterie jsou schopny tvořit spory. Jedná se o rody *Clostridium* a *Bacillus*. Spóry vznikají uvnitř buňky, označují se tedy endospory. Proces tvoření spóry se nazývá sporulace. Jsou to odolné útvary, které jsou schopny přežít v nepříznivých podmínkách. U spóry se popisuje její tvar, velikosti a uložení v buňce, to napomáhá k identifikaci bakterie. Spóry jsou často oválné (*Clostridium botulinum*), nebo kulaté (*Clostridium tetani*). Průměr spóry může být větší, než tloušťka vegetativní buňky, nebo ne. Pokud je vegetativní buňka v místě uložení spory rozšířena, označujeme to, jako bubření tyčinky. V opačném případě, kdy spóra tyčinku nebubří, není v místě spóry zduřelá. Je-li spóra uložena uprostřed tyčinky, nazývá se centrální. Je-li umístěna na konci, nazývá se terminální. Pokud je spóra uložena mezi středem a koncem tyčinky, nazývá se subterminálními.

Tvorba spóry je zahájena replikací DNA a rozbalením bakteriálního chromosomu do dlouhého vlákna. Vchlípí se cytoplasmatická membrána a vytvoří se septum. To rozčlení buňku na dvě různé části. Do každé se zapíše úsek DNA. Minoritní část nazývaná *prespora* je obalena septem a tím získá dvojitou membránu a ocitne se v nitru mateřské buňky. V místě mezi membránami se tvoří tuhý kortex z peptidoglykanu. V prespoře vzniká kalciumdipikolinát, který se jinde netvoří. Pod kortexem se tvoří další vrstva peptidoglykanu a na povrchu se ukládají bílkovinné obaly bohaté na cystein. Vývoj spóry je tímto dokončen. Poté dojde k rozpadu mateřské buňky a spora je vpuštěna do okolí. Proces, kdy ze spóry vznikne vegetativní buňka se nazývá germinace. [6,39]

Aby spóra mohla vyklíčit, musí se dostat do přijatelných podmínek. Zpočátku je nutné spóru zaktivovat, to se děje většinou samovolně. Pro klíčení je nutná přítomnost vody. Do buňky vstupuje  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  a další ionty a molekuly. Mezitím mizí termorezistence a světlolomnost. Později jsou přepisovány jednotlivé geny, probíhá tvorba příslušných bílkovin, je replikována DNA atd. Následně prasknou spórové obaly a vznikne vegetativní buňka.

Jako spóry mohou bakterie přežít stovky let. Makromolekuly uvnitř spór jsou stabilizovány novými proteiny, úbytkem vody a její náhradou v polymerech vápníku.

Odolnost vůči zevnímu prostředí je význačná zvláště u některých spór. Vegetativní buňky jsou při teplotě 70 °C usmrceny za 10 minut, naproti tomu k usmrcení spór původce tetanu je potřeba je vařit 90 minut při 100 °C. Většinu spór jiných klostridií, jako například *Clostridium botulinum* zničí působení vodní páry za zvýšeného tlaku, tzv. autoklávování.

Spóry jsou rezistentní k UV záření a dezinfekčním prostředkům (např. etanolu). Naopak účinné jsou kyseliny, koncentrované louhy, chloramin, některé jodové preparáty, peroxid vodíku a kyselina peroctová. [6,39]

## 1.2 Rod *Clostridium*

Klostridia patří k velmi staré skupině bakterií vázané na archeobakterie. Jsou to grampozitivní tyčinky různé velikosti, rostoucí za anaerobních podmínek se schopností tvořit spory. V přírodě se nacházejí v půdě, v bahně rybníků, řek a mořského pobřeží, v prachu, ale také v tlustém střevě obratlovců, i člověka. Člověk je využívá jako producenty hospodářsky použitelných metabolitů, jako je např. ocet. Několik málo druhů je schopno vyvolat onemocnění u lidí či zvířat. Často se jedná o závažná onemocnění končící smrtí.

Klostridia jsou charakteristicky dlouhé, rovné tyčinky, méně často zahnuté, se zaoblenými konci. Pokud tvoří endospory, mají tvar paličky na buben nebo větvena. Díky charakteristickému uspořádání se dají identifikovat některá klostridia (např. spirálovité řetízky *C. cocleatum*). Pohyb klostridií je umožněn díky peritrichálně uložených bičíků. Některé druhy tyto bičíky netvoří, jsou tedy nepohyblivé (např. *C. perfringens* a další jemu příbuzné druhy). U jiných druhů můžeme vidět pohyb pouze v mladých kulturách. [6,16]

Klostridiální spóra je obklopena obaly, které chrání cytoplasmu a jadernou hmotu. Dále slouží k ochraně před zářením, teplem, vyschnutím a dezinfekcemi. Spóra klostridií, produkuje své vlastní antigeny, lišící se od vegetativní buňky, např. lytické enzymy. Má tedy antigeny své a antigeny vegetativní buňky. Spóry klostridií jsou uloženy terminálně nebo subterminálně. Mají oválný nebo kulatý tvar a často tyčinku



vydouvají. Pokud je spóra uložena centrálně, tyčinku nevydouvá (např. u *C. bifermentans*). *C. difficile* tvoří lehce vydouvají subterminální spóry. V pohotovosti vytvářet spóry je mezi jednotlivými kmeny velká odlišnost. Závisí na prostředí, ve kterém se bakterie nachází. Na střevní sliznici se sporám daří velmi dobře, naopak na některých kultivačních půdách sporulují špatně, mnohdy vůbec (např. *C. perfringens*).

Metabolismus klostridií je mimořádně citlivý na kyslík. I když je míra této citlivosti rozdílná, tak při kontaktu se vzduchem za normálního atmosférického tlaku nikdy nedojde k pomnožení. Mezi aerotolerantní patří např. *C. perfringens* nebo *C. haemolyticum* - snáší kyslík do 0,5%. Pouze *C. histolyticum* je za normálních atmosférických podmínek schopno vytvářet tečkovité kolonie na povrchu agarové půdy. Klostridie jsou takto citlivé ke kyslíku, protože nemají cytochromy, katalázu, superoxididismutázu, obvykle žádnou peroxidázu a cytochromoxidázu. Prostředí obsahující katalázu a záporný oxidoredukční potenciál dovoluje bakteriím se množit při větší koncentraci kyslíku, než je běžné. Proto senzitivita ke kyslíku je vlastností celého kmene, druhu, prostředí i stáří buněk.

Při oxidačních a redukčních procesech klostridia využívají enzymy  $Fe^{2+}$  v molekule nazývané feredoxiny. Ty začínají působit při záporném eH (oxidoredukční potenciál) v prostředí (od -100 do -200 mV). Množení bakterií je možné až po dosažení této hodnoty. eH se snižuje při množení některých druhů tak, že konečný eH může klesnout až na -400 mV.

Bakterie získávají energii pro své metabolické procesy z anaerobní glykolýzy (fermentace) nebo oxidoredukci mezi dvěma aminokyselinami (Sticklandova reakce). Podle způsobu získávání energie se dělí klostridia na druhy, které štěpí aminokyseliny z peptonů a bílkovin, na druhy které fermentují sacharidy, na druhy využívající bílkoviny i sacharidy a na druhy jejichž hlavním substrátem jsou pyrimidiny a puriny. [6,40]

Mezi produkty metabolismu klostridií patří alkoholy, plyny, enzymy, inol nebo skatol a organické kyseliny. Toho se využívá při dourčování na tzv. pestrých řadách.

Z produktů klostridií jsou nejdůležitější toxiny. Toxiny vznikají v klostridiové buňce a uvolňují se při rozpadu buňky (botulotoxin, tetanospasmin, toxiny *C. difficile*) nebo při množení kmene (toxin alfa *C. perfringens*). Toxiny se dají prokázat pokusem

na zvířeti. Smrt pokusného zvířete způsobují hlavní toxiny nebo také alfa toxiny. Tyto toxiny mají hemolyzující a nekrotické účinky, jindy mohou mít povahu enzymu.

Na průkaz toxinů *in vitro* se používá latexová aglutinace, imunoprecipitační reakce, nepřímá hemaglutinace nebo imunochromatografie. Toxiny klostridií jsou polypeptidy nebo bílkoviny. Po vpravení do organismu dojde k tvorbě protilátek (tzv. antitoxinu). Antitoxiny se používají k určení toxinů metodami *in vivo* a *in vitro*, také k léčbě některých onemocnění způsobené klostridiemi.

Všechny druhy klostridií jsou citlivé k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, hlavně ke krystalickému penicilinu G. Vysoce účinný je také clindamycin a vankomycin, dále jsou citlivé na imidazolové preparáty jako metronidazol. Účinné jsou také tetracykliny, erytromycin a chloramfenikol. K léčbě se nedoporučují pro svůj bakteriostatický účinek. Klostridia jsou rezistentní na aminoglykosidová antibiotika.

Mezi onemocnění, které klostridie vyvolávají, patří nekrotizující toxoinfekce měkkých tkání a nitrobřišních orgánů, patologické procesy ve střevě (průjmy, pseudomembranózní kolitida, enterotoxemie a nekrotizující enterokolitida) a neurointoxikace (*C. botulinum* a *C. tetani*). Příčinou onemocnění klostridiemi jsou jejich toxiny, jak nekrotizující tak letální. Mohou se uplatnit i vedlejší toxiny jako jsou proteinázy, hemolyziny a jiné. Jistý vliv mají také produkty metabolismu jako sirovodík, histamin, čpavek, vodík a serotonin. Schopnost klostridií proniknout do tkání je u většiny druhů omezená (*C. tetani*). Existují ale druhy, jejichž invazivita je až překvapivě rychlá. Po vniknutí do tkáně a krevního oběhu způsobují sepsi (*C. septicum*). Pro vznik klostridiové infekce je potřeba, aby měly bakterie optimální prostředí, ve kterém vyklíčí spory, pomnoží se a vytvoří toxiny. Podmínkou je tedy záporná hodnota oxidoredukčního potenciálu, který se u člověka nachází ve střevě, vagině a v dásňových chobotech dutiny ústní. Kladný oxidoredukční potenciál je v prokrvených tkáních, pokles může nastat při ztrátách krve a lokálně při nekrotizacích a hnisavých procesech, v hlubokých ranách. [6,16,40]

Klostridiové infekce jsou exogenního a endogenního původu. Při poranění v přírodě se do ran dostane prach společně se spory klostridií. Další cesta vniku je perorální, kdy při otravách z potravy pronikají do organismu spory nebo již vytvořený toxin. Endogenní zdroj se nachází ve vagině, žlučníku nebo střevě. Při místním

nedokrvení, nebo tlakem nádorů, kaménků, po operacích či zranění střeva vznikají plynaté sněti a sepse. K infikování kůže operačního pole může dojít spórami *C. perfringens* ze střeva např. při operaci kyčelního kloubu nebo vysoké amputaci stehenní kosti. Jedná se o nosokomiální infekci. [6]

## 1.2 *Clostridium difficile*

### 1.2.1 Charakteristika *Clostridium difficile*

Historie postantibiotických průjmů se datuje již od začátku éry antibiotik. První zmínka o pseudomembranózní kolitidě pochází z roku 1899. Tedy ještě z doby, kdy antibiotika nebyla používána. Tehdy byla popsána u mladé ženy, jako „difterická“ kolitida po gastrointestinálním chirurgickém zákroku. První zmínka o *Clostridium difficile* je z roku 1935, kdy byla popsána jako součást normální střevní flóry novorozenců. [22,37] V 50. - 60. letech minulého století si lékaři všimli, že po opakovaném podání antibiotik se u pacientů objevují průjmy. Původně byly tyto komplikace připisovány přemnožení *Staphylococcus aureus* ve střevě. Roku 1977 odhalilo nezávisle na sobě několik autorů, že za průjmy jsou zodpovědná klostridia. V roce 1978 bylo *C. difficile* popsáno jako původce pseudomembranózní kolitidy, jeho toxiny A a B o tři roky později. Název *Clostridium difficile* je podle jeho obtížné kultivace. Podle vědecké klasifikace se řadí:

Říše: Procaryotae

Doména: Bakterie

Kmen: Firmicutes

Třída: Clostridia

Řád: Clostridiales

Čeleď: Clostridiaceae

Rod: *Clostridium*

Druh: *Clostridium difficile*

Jedná se o striktně anaerobní bakterii, která patří mezi významné původce nozokomiálních chorob. Je to grampozitivní tyčinka tvořící subterminální oválné spóry. Šířka bakterie se pohybuje od 0,6 do 1,6  $\mu\text{m}$ , délka od 4 do 16  $\mu\text{m}$ . Buňky mají tendenci k autolýze, která u určitých buněk postihuje prvotně polární sporangium, poté spóra vypadá jako terminální. Bakterie snadno sporuluje ve střevě.

Spóry jsou odolné vůči běžným dezinfekčním prostředkům a dokážou zamořit prostředí, ve kterém pacient pobýval, na mnoho týdnů až měsíců. Za normálních okolností je množení této bakterie ve střevě potlačeno kmeny fyziologické mikroflóry. Následkem antibiotické léčby dojde k narušení rovnováhy přirozené střevní mikroflóry. Obecně je *Clostridium difficile* neinvazivní mikroorganismus. Ke vzniku onemocnění je nutná kombinace infekce toxigenními kmeny *C. difficile* a již výše zmiňovaná ztráta střevní ochranné mikroflóry. [6,8,11,17]

### 1.2.2 Faktory virulence

Většina vegetativních buněk *Clostridium difficile* je zničena v žaludku, jen 1 % buněk projde do tenkého střeva. Spóry jsou však acidorezistentní a v tenkém střevě vyklíčí do vegetativních forem. *Clostridium difficile* nepatří mezi invazivní patogeny, zpočátku jen adhezuje na stěnu tračníku. Během množení produkují toxigenní kmeny *Clostridium difficile* dva typy termolabilních proteinových toxinů: A a B, které se do prostředí uvolňují rozpadem buněk. Toxiny A a B působí synergicky. Malé procento toxigenních kmenů produkuje pouze toxin B, přesto jejich infekční potenciál je zachován. Toxin A působí především na buňky střevní sliznice, proto se nazývá enterotoxin. Toxin B je cytotoxin, který odpovídá za apoptózu ovlivněním aktinového cytoskeletu buňky. Jeho účinnost je desetkrát až stokrát větší. Oba toxiny zvyšují vaskulární permeabilitu, interferují s proteosyntézou, působí chemotakticky na granulocyty, indukují produkci TNF – alfa a zánětlivých interleukinů. Toxiny ničí střevní epitel i hlubší vrstvy střevní stěny. S poškozením sliznice je spojeno uvolnění velkého množství tekutin. Vznik průjmu je pro nemocného člověka prospěšný, jedná se o samočisticí mechanismus. V případech, kdy se průjem nevyvine, nebo je mu

zabráněno podáním antimotilitik, onemocnění progreduje. Následně vznikají ostrůvkovité ulcerace a jejich povrch se vlivem zánětlivé odpovědi pokrývá pablánami. Pablány, neboli pseudomembrány jsou nažloutlé adhezující plaky, histologicky složené z neutrofilů, konglomerátů zničených buněk střevního epitelu, fibrinu a hlenu.[7,22,28,27] Tyto žlutě zbarvené krusty lze endoskopicky detekovat. Působením toxinu B na hladkou svalovinu a vegetativní nervy ve stěně tračníku dojde následně k zástavě peristaltiky a rozvoji ileu, tím vzniká ideální prostředí pro další množení bakterií. Takovéto poškození může vyústit až v perforaci střeva. Konečné stádium onemocnění se značí nadměrným roztažením tračníku (toxický megakolon) a pozvolnou ztrátou bariérové funkce střevní sliznice, do hlubších tkání vnikají další bakterie. Dochází k rozvoji sepse s vysokou smrtností. [7,8,22]

Netoxigenní kmeny *Clostridium difficile* (neprodukují ani toxin A ani toxin B) jsou nepatogenní a nepředstavují ohrožení ani pro vnímavé jedince.

Roku 1988 byl prvně popsán, dříve neznámý, binární toxin. Jeho úloha se nepovažovala za zásadní a jeho role dosud nebyla objasněna. Jedna z teorií však předpokládá, že potencuje účinek toxinů A a B zvyšováním jejich koncentrace. Nedávno byly objeveny kmeny, které produkují pouze tento binární toxin. Kmeny produkující zároveň toxiny A a B a binární toxin jsou provázeny těžším onemocněním (většina epidemických PCR ribotypů produkuje také binární toxin), ale kmeny s negativním toxinem A a B a pozitivním binárním toxinem se jeví jako nepatogenní. Byly vysloveny teorie o souvztažnosti mezi tímto binárním toxinem a závažností CDI. Pokusy na zvířatech však tuto teorii nepotvrdily. [7,22,23,37]

Od roku 2002 dochází v Americe, Evropě i Asii k šíření hypervirulentního ribotypu 027. Ten byl pojmenován jako North American Pulsed Field type 1 and PCR ribotype 027 (NAP1/027). Tento kmen je hypertoxigenní a má schopnost epidemického šíření kvůli vysoké rezistenci vůči antibiotikům a větší odolnosti jeho spor. Epidemický kmen má delecii na 117. místě regulačního *tcd C* genu. Dojde k ochromení down – regulace vzniku toxinů A a B. To vede k 16 až 23 násobnému zvětšení jejich produkce. Tento kmen má navíc tendenci k hypersporulaci, tím dlouhodobě přežívá v gastrointestinálním traktu i v prostředí. Další významnou charakteristikou, která zřejmě usnadnila šíření ve vyspělých zemích, je odolnost proti široce používaným fluorochinolonom. [1,10,37]

Podle kanadských autorů je až 23 % smrtnost do 30 dnů od stanovení diagnózy CDI u pacientů s infekcí způsobenou ribotypem 027. Vzhledem k této skutečnosti byla při Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční lékařství (ESCMID) zřízena skupina pojmenovaná ESGCD (ESCMID Study Group on *Clostridium Difficile*). [22, 27]

Na území České republiky zatím nebyl ribotyp 027 zaznamenán, místo něj se objevil ribotyp 176, který je ribotypu 027 geneticky příbuzný a je nazýván „027 like“. Tento kmen byl zaznamenán také ve dvou nemocnicích v Polském Mazovsku. Klinický průběh u postižených pacientů je stejně závažný jako u ribotypu 027 a v tuto chvíli neexistuje studie hodnotící, který ze dvou ribotypů je virulentnější. Předpokládá se, že se jedná o kooperaci více faktorů a teprve jejich kombinací vzniká nemocniční „superbakterie“, jak je někdy *Clostridium difficile* označováno. Pokud jde o antibiogram, odolnost u ribotypu 176 byla prokázána u chinolonů a erytromycinu. V České republice jsou kmene citlivé k metronidazolu, vankomycinu a klindamycinu, kmene v Polsku jsou naopak na klindamycin rezistentní. Z toho vyplývá, že tyto ribotypy z různých zemí jsou klonálně odlišné a nejedná se o heterogenní populaci. [31, 24]

### **1.2.3 Onemocnění vyvolané *Clostridium difficile***

Pro onemocnění vyvolané *Clostridium difficile* se v mezinárodní literatuře před rokem 2000 používal termín *Clostridium difficile* – associated diarrhoea nebo *Clostridium difficile* – associated disease (CDAD). V novější anglicko-jazyčné literatuře se nemoc označuje jako *Clostridium difficile* infection (CDI). Jde o zánětlivé onemocnění tračníku způsobené patologickým pomnožením kmene *Clostridium difficile* produkujícího toxiny A a B, nebo alespoň toxin B. [7,9] K propuknutí CDI jsou nutné dvě podmínky - a to ztráta ochranné střevní flóry a infekce toxigenními kmeny. K patologickému pomnožení *C. difficile* dochází většinou u polymorbidních pacientů léčených širokospektrými antibiotiky, ale v žádném případě se nejedná o pravidlo. V 70. letech 20. století byl jako rizikové antibiotikum označován klindamycin, v osmdesátých

a devadesátých letech cefalosporinová antibiotika a v současné době jsou za jednu z nejrizikovějších skupin považovány fluorochinolony. [14,22] Právě fluorochinolony byly dříve považovány, z hlediska postantibiotických průjmů, za bezpečná antibiotika. Z posledních informací však vyplývá, že právě odolnost *C. difficile* vůči chinolonům je jedním z důvodů rozšíření hypervirulentních kmenů. Podle nizozemské studie až 24 % pacientů s infekcí *C. difficile* ribotyp 027 užívalo právě fluorochinolony. Kmeny NAP1 mají geneticky podmíněnou rezistenci na zmíněné fluorochinolony, makrolidy a klindamycin. Za relativně bezpečné jsou považovány základní peniciliny, karbapenemy, tetracykliny, aminoglykosidy a kotrimoxazol. Dalším důležitým aspektem je také délka podávání antibiotik a míra preskripce. Riziko propuknutí CDI se u hospitalizovaného pacienta zvyšuje díky možnosti přežívání spór v nemocničním prostředí a jejich odolnosti vůči běžným alkoholovým dezinfekčním přípravkům. K přenosu může docházet při nedodržování hygienických opatření, používáním společných toalet a sprch, rukama zdravotníků, rizikové jsou i pomůcky pro enterální výživu. Dalším rizikovým faktorem je snížená kyselost žaludečního sekretu, tím je pacient náchylný k řadě infekcí. Studie však neprokázala zvýšené riziko vzniku CDI u pacientů užívající antagonisty H<sub>2</sub> receptorů nebo inhibitory protonové pumpy. Důležitou roli hraje pacientova imunita. Riziko vzniku infekce je vyšší u lidí s onkologickým onemocněním, ulcerózní kolitidou, malnutricí, hemodialýzou, těhotných žen a žen v šestinedělí a pacientů s utlumenou střevní mobilitou. Větší procento nemocných je nad 65 let. To je způsobeno stárnutím imunitního systému s věkem pacienta, opětovanou a delší hospitalizací a častějším užíváním antibiotik. [3,22,37] „Bylo prokázáno, že vnímavost k vzniku a rozvoji klinicky manifestní infekce vyvolané *Clostridium difficile* souvisí s výškou titrů protilátek IgG vůči toxinu A a protilátek IgM proti povrchovému proteinu *C. difficile*.“ [13]

K rozvoji klostridiové kolitidy dochází většinou již během antibiotické léčby (byl popsán vznik kolitidy i po jedné dávce antibiotik). Přesto 25 – 40 % pacientů může onemocnět až 10 týdnů po skončení léčby. Nemocní většinou trpí vodnatými průjmy s příměsí hlenu. Průjmy u klostridiové kolitidy nebývají profúzní, stolice jsou časté, někdy páchnoucí a v malém množství. U pacientů po operacích, nebo jinak připoutaných na lůžko, může tento stav vypadat jako náhle vzniklý samovolný únik

stolice. Zřídka kdy je ve stolici přítomna i krev. K dalším příznakům patří bolest břicha, nechutenství, váhový úbytek, teplota, dehydratace, leukocytóza, hypoalbuminémie, mineralogický rozvrat a vzácně i polyartritida. V závažných případech může vzniknout břišní distenze, paralytický ileus, perforace tlustého střeva s peritonitidou, sepsí a multiorgánovým selháním. [3,7,13] Zvláště záluďná je atypická CDI s postižením pravého tračníku (ileokolitida). Projevuje se bolestivostí až peritonitidou v pravé jámě kyčelní, popřípadě ileózním až subileózním stavem a sepsí, avšak bez typických průjmů. Klinický nález pak může falešně poukazovat na komplikace Crohnovy choroby, apendicitidy, nemoci terminálního ilea aj. [9]

Dříve byl za etiologické agens **pseudomembranózní kolitidy** (PME) považován *Staphylococcus aureus*, později jím byly označeny toxiny *Clostridium difficile*. PME prvně popsal Finney v John Hopkins Hospital v Baltimore roku 1893. Jak bylo v předchozí kapitole řečeno, s proliferací bakterií dochází k tvorbě a sekreci toxinu A a B. Ty způsobují vyplavení prozánětlivých slizničních cytokinů, díky kterým vznikají ve sliznici střeva zánětlivá ložiska s intenzivní exsudací. (Příloha č. 1) „Makroskopicky vypadají ložiska postižené sliznice jako šedožluté pseudomembrány, což je dáno přítomností plaků složených ze zánětlivých buněk a buněčné drti z poškozených krypt.“ [18] Mezi známky PME patří:

- horečka (nad 38 °C)
- ztuhlost
- hemodynamická nestabilita včetně příznaků septického šoku
- známky peritonitidy
- příznaky ileu včetně zvracení bez průchodu stolice
- výrazná leukocytóza (leukocyty > 15 x 10<sup>9</sup> /L)
- zvýšený kreatinin v séru (> 50 % nad výchozí hodnoty)
- zvýšená koncentrace laktátu v séru
- distenze tlustého střeva

[5,18,42]

Ve 3 % případů se vyskytuje již výše zmíněný **fulminantní průběh** onemocnění. Může se projevit jako ileus, toxický megakolon nebo perforace střeva; je spojen



s hyperlaktatemií (nad 5,0 mmol/l) a leukocytózou (nad 50 000). Mortalita činí 40 – 50 %. Náchylní k tomuto onemocnění jsou především starší, imunosuprimovaní pacienti. Pro toto onemocnění je typický častý výskyt rekurentních infekcí, až u 20 %. Ty se objevují od jednoho týdne do dvou měsíců po ukončení léčby. Rekurentní infekce vznikají díky dozrávání spór perzistujících ve střevě pacienta i po přeléčení CDI. Po léčbě první rekurentní infekce je riziko následných infekcí až 65 %. Rizikovější skupinu tvoří ženy, a to až 60 %. [18,22]

K opětovnému rozvoji infekce dochází snadno, protože pokud se neobnoví fyziologický střevní ekosystém, zůstává organismus vysoce vnímavý k opětovnému přemnožení klostridií. Za rekurentní infekci se považuje relaps (opětovné vzplanutí infekce z klostridií, díky spórám zůstávajícím ve střevech) nebo reinfekce (nově vzniklá infekce způsobená spórami klostridií z vnějšího prostředí; může se jednat o stávající nebo jiný kmen). Nemocný s klostridiovou kolitidou vylučuje miliony spór v každém mililitru průjmové stolice, kterými kontaminuje okolí. Proto jsou častější reinfekce, než relapsy. Infekční dávka je u vnímavého jedince desítky až stovky spór. Příčinou rekurencí není selhání antibiotické léčby v důsledku odolnosti. [7]

#### **1.2.4 Epidemiologie, přenos a preventivní opatření**

*Clostridium difficile* je sporulující bakterie a vyskytuje se běžně v přírodě, odpadních i povrchových vodách. Pravděpodobný (ale nepotvrzený) zdroj kolonizace a možné CDI v komunitě jsou zvířata a masné produkty.

*Clostridium difficile* je významný původce nozokomiálních infekcí. Pravděpodobnost kolonizace nemocničních pacientů je závislá na lokální epidemiologické situaci narůstá s délkou hospitalizace. Faktory přispívající k vzniku klostridiové kolitidy jsou: střevní dysmikrobie (antibiotická léčba – hl. aminopeniciliny, cefalosporiny, linkosamidy, fluorochinolony), snížená motilita střeva (stavy po operaci v břišní dutině, podávání léků tlumících peristaltiku, těhotenství), celková omezená pohyblivost (dlouhodobý pobyt na lůžku, operace v celkové narkóze, revmatické a nervové choroby omezující hybnost), porucha slizniční imunity v GIT (nedostatečná tvorba slizničních IgA, karence bílkovin, zhoubné tumory, léčba cytostatiky, ulcerózní

kolitida), vyšší věk (incidence a závažnost choroby se podstatně zvyšuje od věku  $\geq 65$  let). [7]

Roku 2003 došlo k významnému zlomu v epidemiologii a významnosti infekcí v souvislosti s *C. difficile* v severní Americe. Nejdříve v Kanadě a následně v USA byl zaznamenán zvýšený výskyt CDI, a to hlavně v nemocnicích a dalších zdravotnických zařízeních. Tyto infekce byly typické svým těžkým průběhem a vysokou četností rekurentních infekcí, zvýšenou morbiditou a mortalitou. Za původce infekcí byl označen hypervirulentní PCR ribotyp 027, typický mimo jiné nadměrně vysokou produkcí toxinů A i B. Další výzkumy ukázaly, že ribotypů s podobnými vlastnostmi je více. V krátké době se objevil i ve Velké Británii, Belgii, Francii a Rakousku. Největší četnost výskytu byla zaznamenána ve Velké Británii, kde se *Clostridium difficile* stalo nejrozšířenějším nozokomiálním patogenem, který svou závažností předčil i výskyt MRSA. [7,25] Kmeny bakterií *Clostridium difficile* se velmi liší, pokud jde o jejich virulenci. Každý kmen má jinou kvalitu a kvantitu tvorby toxinů, tak i závažnost konečných příznaků. Spóry, které tato bakterie vytváří, jsou mimořádně odolné vůči okolnímu prostředí. Díky tomu patogen snadno přežívá v okolí nemocných osob a přispívá k epidemickému šíření infekcí v pečovatelských zařízeních a nemocnicích. Nemocní, kteří jsou postiženi průjmem způsobeným *C. difficile* vylučují stolicí nesmírné množství spór, ty jsou přenášeny hlavně fekálně orální cestou. Přenosu se dá předcházet dodržováním hygienických režimových opatření a správnou ošetrovatelskou péčí. Do hygienických režimových opatření patří dezinfekční a sterilizační postupy, dodržování zásad osobní hygieny zdravotníků včetně správného mytí rukou. Správná ošetrovatelská péče je také nezbytná pro zabránění přenosu. Patří k ní dodržování standardních postupů při invazivních zákrocích, např. cévní a močové katetrizaci, umělá plicní ventilaci a jiné.

V případě propuknutí akutní infekce *C. difficile* by měl být personál dostatečně informován o patogenu, cestách přenosu, způsobu zacházení s infikovaným pacientem a o nezbytných hygienických opatřeních.

V případě propuknutí infekce *C. difficile*, je nutné okamžitě zajistit určitá ochranná opatření:

- Izolace nakaženého pacienta na jednolůžkový pokoj se samostatnou toaletou. V případě nakažení více pacientů je možná skupinová izolace. Nemocný má vyčleněny všechny pomůcky (fonendoskop, teploměr, tonometr, močovou láhev, podložní mísu apod.). Dává se přednost jednorázovým pomůckám. Použité nástroje a pomůcky se odkládají do uzavíratelných nádob, ve kterých je sporicidní prostředek. Zbylé nástroje se sterilizují běžným způsobem. Izolace musí být dodržena alespoň do doby, kdy dojde k odeznění průjmů. O ukončení izolace rozhoduje lékař.

- Pohyb pacienta mimo izolační pokoj je minimální. V případě nezbytného přesunu se informuje dotyčné oddělení. Jde – li pacient na operaci, je stanoven individuální, preventivní režim a zákrok je zařazen na konec operačního programu.

- Dezinfekce ploch a povrchů je prováděna důsledně a podle dezinfekčního programu daného zařízení. Nádobí a přístroje jsou v uzavíratelných kontejnerech. Jejich mytí se provádí při teplotě 60 °C. Použité lůžkoviny a prádlo se dávají do popsanych a oddělených pytlů, které jsou umístěny přímo na pokoji pacienta. Všechn kontaminovaný materiál je považuje za infekční odpad a podle toho je i likvidován.

- Ošetřující personál používá jednorázové rukavice a při vstupu do pokoje se převléká do pláště pro jednorázové použití. Před odchodem z pokoje si dezinfikuje ruce přípravkem se sporicidním účinkem.

- Úklidová služba je informována o výskytu infekce a pro daný pokoj používá jen vyčleněné pomůcky a prostředky se sporicidním účinkem.

- Rodinní příslušníci jsou informováni, že návštěvy jsou možné pouze se souhlasem ošetřujícího lékaře. Samozřejmě i návštěvy dodržují bariérová opatření.

- Propuštění nebo přeložení pacienta je možné až po odeznění infekce. Pokud dojde k relapsu, je nutné znovu pacienta izolovat. I po vyléčení infekce pacient zůstává přenašečem, toto je nutné zaznamenat do pacientovy dokumentace. Dokumentace pacienta vždy zůstává mimo jeho pokoj.

- Po propuštění pacienta s klostridiovou kolitidou musí být provedena důkladná mechanická očista a dezinfekce všech povrchů a předmětů v příslušném pokoji. K dezinfekci je nutné používat sporicidní prostředky (k. peroctová, aldehydy).
- Doporučený postup mytí rukou:
  - Umýt ruce mýdlem a opláchnout
  - Osušit jednorázovým ručníkem
  - Aplikovat sporicidní dezinfekční prostředek v dostatečném množství a vtírat ho do zaschnutí

[20,28,32]

### 1.2.5 Terapie infekcí *Clostridium difficile*

Léčba CDI zahrnuje zabezpečení dostatečného přísunu tekutin, minerálů a podání kauzálních léků. Jedná se tedy o komplexní přístup. U bezpříznakových nosičů není léčba indikována. Pokud tomu dovolují okolnosti, měla by být vysazena antibiotika, která zapříčinila onemocnění CDI. To vede k obnovení fyziologické střevní flóry zažívacího traktu a mírní riziko relapsů. Dále je důležité vyvarovat se aplikaci léků tlumící střevní peristaltiku. Základními přípravky pro léčbu CDI jsou metronidazol a vankomycin, podávané 10 až 14 dnů. [3, 26]

#### **Vankomycin**

Vankomycin je optimálním lékem, který se z trávicího traktu prakticky nevstřebává a ve stolici dosahuje vysoké koncentrace. Aplikace se provádí perorálně nebo enterální sondou, zřídka klyzmatem, a to jen u pacientů v ileózním stavu. Takto jsou dosahovány koncentrace ve stolici, které jsou vyšší, než MIC kmenů *Clostridium difficile*. Citlivost těchto kmenů je v rozmezí 0,06 – 4 µg/ml. Doporučené dávkování vankomycinu je 125 mg po šesti hodinách, tím se docílí koncentrace antibiotika ve stolici > 1 000 µg/g. Naopak parenterální aplikace se ukázala jako neefektivní

v souvislosti s dosažením požadovaných hladin. Léčba vankomycinem je dražší než metronidazolem. Forma k perorálnímu užití je na trhu těžko k dostání. Vankomycin se užívá k terapii těžších forem CDI. [9,26]

### **Metronidazol**

Při perorálním užití je metronidazol rychle a kompletně vstřebán a jeho antibakteriálně aktivní metabolity jsou zhruba 6 – 15 % zpětně vylučovány do stolice. Intravenózním podáním přípravků dosahuje ve stolici podobných koncentrací. „Podstatným momentem je stupeň jeho vylučování do střevního lumen, u vodnaté stolice na počátku léčby byly naměřeny koncentrace kolem 9 µg/g, zatímco následně při klinickém zlepšení u formované stolice nepřevyšovaly 1 µg/g.“ [26] Různorodost koncentrací nejspíše souvisí se stupněm zánětu střevní sliznice, s tím souvisí vstřebávání antibiotika do střevní sliznice. Doporučené množství metronidazolu je 500 mg perorálně nebo intravenózně po 8 hodinách. U těžších forem CDI, kde nelze podat vankomycin nebo v kombinaci s ním, je doporučováno po 6 hodinách. Metronidazol je levnější, podle některých autorů však méně účinný než vankomycin. [9,26]

Vypukne – li u pacienta lehčí forma CDI je všeobecně doporučováno použít metronidazol, který je u těchto forem onemocnění stejně účinný jako vankomycin. To ovšem neplatí, dojde – li k těžké infekci. V těchto případech je metronidazol neúčinným lékem, zvláště souvisí – li infekce s ribotypem 027. Bylo dokázáno, že při léčbě komplikovaných infekcí je lékem volby vankomycin. Komplikovanou CDI se rozumí onemocnění, ve kterém jsou splněny nejméně dvě z následujících faktorů, a to:

- Věk > 65
- Horečka > 38,5 °C
- Hladina albuminu < 25 g/l
- Leukocytóza > 15 000 mm<sup>3</sup>
- Prokázaná pseudomembranózní kolitida

Mezi další účinné léky patří **nitazoxanid**. Jedná se o 5 – nitrothiazolový derivát, který působí na řadu helmintů, protozoí a *Clostridium difficile*. Podle některých studií je jeho účinnost podobná metronidazolu, navíc s nižším množstvím vedlejších účinků. Dalším z nových léků pro lehčí formy nemoci je **tolevamer**. Jedná se o tekutý polymer, který

vyvazuje toxiny a nemá vliv na střevní mikroflóru. Prokazatelný terapeutický efekt mají rifampicinová antibiotika, mezi které patří **rifampicin** a **rifaximin**. Rifampicin se při perorálním podání téměř celý vstřebává, posléze je však vylučován žlučí jako metabolit. Rifaximin se minimálně vstřebává a v tlustém střevě dosahuje extrémně vysokých hladin. [3,26]

Mezi novinky patří **fidaxomicin**, jedná se o nově syntetizované makrocyclické antibiotikum. V roce 2011 byl registrován přímo pro léčbu CDI v USA a následně i v zemích Evropské unie včetně České republiky. *In vitro* je zhruba osmkrát účinnější proti izolátům *C. difficile* než vankomycin. Minimálně ovlivňuje ostatní střevní flóru a jeho klinický účinek je srovnatelný s vankomycinem. Další významnou předností je nižší riziko rekurencí CDI, která je ve srovnání s vankomycinem nižší až o 50%. [7]

Antibiotika, která jsou používána k léčbě CDI, mění ve střevech přirozené prostředí bakterií a tím dochází k usmrcení i těch bakterií, které by za normálních okolností zamezily šíření *Clostridium difficile*. Vědci z University of California at Los Angeles (UCLA) a University of Texas zjistili, že při infekci buňky ve střevě uvolňují molekuly, které inaktivují toxiny *Clostridium difficile*. Testy na zvířatech potvrdily účinnost léku, který zapříčiňuje tento proces známý jako proteinová s - nitrosylace, díky němuž se stávají toxiny neškodné. Výzkum zatím není dokončen. Než bude lék podán člověku, musí předtím projít dalšími testy. [30]

### **Probiotika**

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které mají pozitivní účinek na lidský organismus při svém podávání. Účinně podporují sacharolytické bakterie, upravují střevní mikroflóru a ztěžují podmínky pro růst a množení patogenních mikroorganismů jako jsou klostridie či kvasinky. Probiotika se vyrábějí ve formě kapslí, prášku atd. Forma však není podstatná, důležitý je druh bakterie, účinnost a jejich počet. V gastroenterologii se používají k prevenci, tak k terapii chorob i chorobných stavů. Pravidelné užívání probiotik zamezuje bolestem břicha, nadýmání, harmonizuje střevní pasáž a frekvenci stolic. Jejich pozitivní účinky jsou prokázány u zácpy i průjmů. Zvláště jedná – li se o infekční průjmy, pak jsou probiotika schopna zkrátit dobu trvání i snížit jejich frekvenci. Jejich použití je také vhodné jako prevence střevní dysmikrobie při používání antibiotik. Chrání před vznikem postantibiotické kolitidy způsobené

*Clostridium difficile*, tak i pseudomembranózní kolitidy, která bez včasného léčení končí smrtí pacienta. Kombinace probiotik a širokospektrých antibiotik dokáže snížit riziko vzniku postantibiotických kolitid. V tomto případě slouží probiotika jako doplněk k antibiotické terapii. [19]

### **Transplantace stolice**

První zmínky o fekální bakterioterapii pocházejí z roku 1958. Základem této metody je poznatek, že stolice zdravého člověka je až z 80 % tvořena intestinální mikroflórou. „První publikované práce byly založeny na kolonoskopicky aplikovaných nálevech – nevýhodou byla nutnost provedení několikrát týdně, větší zátěž pacienta a riziko perforace zaníceného tlustého střeva.“ [29] V souvislosti se stále se zvyšujícím výskytem relabující klostridiové kolitidy zažívá transplantace stolice renesanci. V současné době se provádí jednorázová aplikace fekální bakterioterapie nasojejunální sondou. Tím dochází k restrikci nežádoucího působení žaludeční kyseliny na přežití mikrobiálních kmenů. Úspěšnost této metody činí minimálně 80 %. Podmínkou pro započítání této léčby je pochopení a souhlas jak pacienta i dárce doloženým podepsaným informovaným souhlasem. Dárce stolice bývá zpravidla člen rodiny, a to díky předpokládané podobnosti střevní fóry. Každý dárce musí projít testy na virovou hepatitidu A a B, HIV a syfilis. Samozřejmě nesmí dárceva stolice obsahovat toxiny *Clostridium difficile* a dárce nesmí dva měsíce před transplantací užívat antibiotika, jinak je z transplantace stolice vyřazen. [29]

## **1.2.6 Metody diagnostiky *Clostridium difficile***

### Laboratorní diagnostika

Pro diagnostiku CDI (*Clostridium difficile* infection) je stěžejní **mikrobiologické vyšetření**. Odebírá se vzorek stolice (nestačí rektální výtěr) do sterilní nádoby. Množství odebrané stolice by mělo být aspoň 2 ml. Optimální je vzorek vyšetřit do dvou hodin po odběru. Pokud to není možné, je třeba vzorek uchovat při chladničkové teplotě. Zpracování vzorku by mělo proběhnout nejdéle do 48 hodin po odběru.

Pro mikrobiologickou diagnostiku se v dnešní době používá řada metod. Každá z nich má jinou míru senzitivity a specificity, proto se doporučuje kombinovat vždy více metod. [7]

Pro vyřazení negativních vzorků se používá test na **průkaz glutamát dehydrogenázy** (GDH test). GDH je specifický antigen - exoenzym, který produkuje *C. difficile*. GDH může být stanoveno samostatně, nebo zároveň s toxiny. K průkazu se používá metoda ELISA nebo imunochromatografie. U imunochromatografie jsou specifické protilátky proti GDH adsorbované na testovací membráně. Konjugát (např. myší monoklonální protilátka proti GDH s vázanou křenovou peroxidázou) se váže na antigen (GHD) přítomný ve vzorku. Vzniklý komplex migruje filtračním proužkem k membráně, kde dochází k vazbě na imobilizované protilátky proti GHD. Po aplikaci substrátu (např. tetrametylenbenzidin) se hodnotí přítomnost barevné linie – pozitivita reakce. Test trvá 30-45 minut, citlivost testu je 90-100 %. [7, 10]

Pokud je průkaz GHD pozitivní, je nutné provést další testy: průkaz toxinů, PCR nebo kultivační vyšetření – je nutné potvrdit nebo vyloučit toxigenní kmen *C. difficile*.

Pro **průkaz toxinů A, B ze stolice** se používají imunochemické testy (ELISA nebo imunochromatografie). K dispozici je řada komerčních testů, senzitivita většiny z nich je 60-80 % - není tedy postačující.

ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay) je nejpoužívanější metodou. Protilátky proti toxinu A a B jsou navázány v jamkách testované destičky. Jako konjugát proti toxinu A se používá monoklonální myší protilátka s navázanou křenovou peroxidázou, proti toxinu B polyklonální kozí protilátka se stejným enzymem. Pozitivita testu se projeví žlutým zbarvením po přidání substrátu. Test trvá cca 2 hodiny. Při negativním výsledku se doporučuje vyšetření zopakovat, případně vyšetřit i třetí vzorek stolice. [7,34,37]

Pokud se imunochemickým testem neprokáže pozitivita toxinů, doporučuje se provést PCR vyšetření stolice nebo kultivace a následně test na průkaz toxinů u kmene.

**PCR** – k dispozici jsou komerční kity (většinou na principu realtime PCR) pro průkaz genu pro toxin B (*tcdB*). Některé kity slouží zároveň ještě k průkazu genu pro binární toxin a detekci delecí, které jsou typické pro epidemické PCR ribotypy (např. 027). Realtime PCR trvá cca 1 hodinu, citlivost je vysoká: 99-100 %. Vysoká senzitivita



může být ale i nevýhodou – PCR prokáže i velmi malé množství toxigenních *C. difficile*, které může znamenat i kolonizaci. [7]

PCR se řadí mezi molekulárně-biologické metody s amplifikací. Amplifikace spočívá v namnožení hledaného úseku DNA (templátu). Jedná se o velmi citlivou metodu.

PCR probíhá v termocykleru (přístroj, který dokáže vzorek velmi rychle zahřát a ochladit).

Reakce probíhá v tenkostěnné kyvetě, která se umístí do termocykleru. Součástí reakční směsi je izolovaná DNA, primery (syntetické oligonukleotidy), DNA - polymeráza, nukleotidy,  $MnCl_2$  a  $MgCl_2$ .

K amplifikaci templátu se používají tři opakující se kroky:

- 1) denaturace – při teplotě 95 °C se od sebe oddělí vlákna DNA (dojde k rozrušení vodíkových můstků mezi bázemi)
- 2) hybridizace – při ochlazení reakční směsi na teplotu 50 - 60 °C se na specifická místa jednovláknové DNA navážou komplementární primery, které na obou vláknech vymezí tzv. amplikon (úsek pro amplifikaci)
- 3) elongace – při teplotě 72 °C dojde k polymeraci – syntéze nového řetězce DNA (od primeru, na který nasedne DNA-polymeráza a připojuje volné nukleotidy)

Celý proces se opakuje zhruba třicetkrát. Množství amplikonů roste geometrickou řadou – po dvou hodinách vzniká cca  $10^5$  –  $10^6$  kopií DNA.

K detekci namnožených PCR produktů se využívá např. elektroforetická separace v agarózovém gelu a následné obarvení v roztoku ethidium bromidu viditelném v UV světle. (2)

**Realtime PCR** umožňuje rychlou, spolehlivou a citlivou detekci a kvantifikaci úseku RNA nebo DNA. Princip je založen na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce, tedy v reálném čase. Primery jsou značené fluorescenčními barvivy. Nenavázané sondy nefluoreskují, k fluorescenci dojde až po nasednutí primeru na DNA. Výhodou oproti běžnému PCR je možnost kvantifikace, tedy přesné stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA. K real time PCR se používají termocyklyery, které mají víko s fotobuňkami. Díky nim probíhá teplotní cyklování, tak i

detekce fluorescence v každém cyklu PCR. Fluorescence je přímo úměrná množství amplifikátu nacházejícího se v reakční směsi. Kvantifikace se znázorňuje pomocí amplifikačních křivek. Amplifikační křivka má esovitý tvar a skládá se ze tří částí, a to:

- 1) „background“ fázi – množství amplifikátu je tak malé, že jeho fluorescence nelze měřit
- 2) exponenciální fáze – množství produktu exponenciálně roste
- 3) plateau fáze – dochází k ustálení systému a množství amplifikovaného produktu se nemění, fluorescenční signál zůstává stálý

Při detekci mikroorganismů se používá absolutní kvantifikace, která stanoví výchozí počet kopií cílových molekul. Principem je zjištění existence lineárního vztahu mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a  $C_T$  dané amplifikační křivky.  $C_T$  (*threshold cycle*) je matematická hodnota rovnající se cyklu, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh umístěný v exponenciální fázi reakce. (15,41)

### **Kultivační vyšetření**

K anaerobní kultivaci se využívají selektivní kultivační půdy, které obsahují cefoxitin a cykloserin k potlačení ostatní flóry. Existují i chromogenní půdy k záhytu *C. difficile*. Citlivost kultivace ještě zvýší krátkodobá inkubace (cca 0,5-1 hod. před naočkováním) s 96% etanolem. Etanol stimuluje germinaci (klíčení) spór. Kolonie *C. difficile* jsou ploché, našedlé, obvykle protažené ve směru očkovací čáry. K identifikaci *C. difficile* se kromě mikroskopie používá většinou latex aglutinace, biochemické testy, MALDI (popř. i PCR).

Kultivace trvá 2-4 dny. Senzitivita je 99-100 %. Nevýhodou kultivačního vyšetření je délka trvání, výhodou je možnost stanovení citlivosti k antibiotikům a popř. další molekulární typizace. Pro průkaz toxinů z narostlé kultury je možné použít imunochemické metody nebo PCR (viz výše). [7]

Historický význam má **průkaz cytotoxicity na tkáňových kulturách**. Cytotoxin je možné touto metodou prokázat ve stolici nebo z izolovaného kmene *C. difficile*. Po naočkování tkáňové kultury (např. lidských embryonálních plicních fibroblastů) se sleduje vznik CPE (cytopatického efektu). CPE se dá neutralizovat antitoxinem *C.*

*difficile*. Tato metoda je ale náročná na provedení, nevýhodou je i trvání testu (minimálně 2 dny) a riziko falešné positivity. Senzitivita se uvádí 94-100 %. Tato metodu provádí jen specializovaná a referenční pracoviště. [7,43]

#### Endoskopická diagnostika a zobrazovací metody

**Endoskopické vyšetření** - při dodržování všech kontraindikací (riziko perforace u těžšího postižení střeva) má téměř 100% senzitivitu a specificitu ve fázi pseudomembranózní kolitidy – pro CDI jsou typické ostrůvkovité pablány na hyperemické, edematózní sliznici tračníku. Nižší senzitivitu má endoskopické vyšetření v prvních stádiích nemoci nebo u mírně probíhajícího onemocnění, kdy nejsou pablány přítomné. Je možné odebrat bioptický vzorek na histologické vyšetření.

Diagnostiku CDI může podpořit **CT** a sonografické vyšetření (rozšíření střevní stěny zánětem, dilatace střevních kliček). [4,22,37]

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zhodnotit současné možnosti laboratorní mikrobiologické diagnostiky *Clostridium difficile*. Vyhodnotila jsem četnost pozitivních a negativních nálezů za rok 2011 v jednotlivých měsících, podle pohlaví, věku a oddělení, ze kterého byly odeslány. Také jsem zhodnotila množství rezistentních kmenů *C. difficile* k antibiotikům ve spádové oblasti Nemocnice České Budějovice, a. s.

### 3. METODIKA

#### 3.1 Charakteristika souboru

Praktická část této práce byla uskutečněna v Laboratoři lékařské mikrobiologie na Pracovišti bakteriologie, v Centrálních laboratořích Nemocnice České Budějovice, a.s. Po dobu šesti měsíců jsem se podílela na rutinní práci v laboratoři zahrnující zpracování vzorku, provedení jednotlivých diagnostických metod a jejich vyhodnocení. Závěrečné výsledky však obsahují údaje získané za celý rok 2011. Tato data byla získána z databáze Pracoviště bakteriologie.

Materiál: stolice na průkaz *Clostridium difficile*  
Metody: přímý průkaz antigenu a toxinu  
mikroskopie  
kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům

#### 3.2 Materiál

Pro mikrobiologické vyšetření je důležitý správný odběr biologického materiálu. Na průkaz *Clostridium difficile* nestačí odebrat rektální výtěr, ale je nutné zaslat vzorek stolice. Vzorek stolice se odebírá do sterilního plastového kontejneru. Stolica by neměla obsahovat příměsi menstruační krve či moči. Velikost vzorku by měla zhruba odpovídat velikosti vlašského ořechu (2,5 cm<sup>3</sup>). Většinou se zasílá vzorek tekuté stolice (15 – 30 ml). [21]

Transport materiálu do laboratoře by měl být co nejrychlejší. Optimálně do 2 hodin po odběru. Vzorky stolice se do transportu uchovávají v lednici. Snížení teploty zpomalí metabolické procesy. Vyšší teplota (25-30 °C) může způsobit přemnožení bakterií běžné mikroflóry a potlačení patogenních bakterií. Odebraný materiál je možné zpracovat do 24 hodin, pokud je do té doby uchováván při chladničkové teplotě.

Zkumavka se vzorkem musí být označena jménem pacienta, jeho rodným číslem, kódem zdravotní pojišťovny, IČP – identifikačním číslem pracoviště, názvem oddělení, kódem diagnózy a druhem biologického materiálu. Společně se vzorkem se do laboratoře odesílá i žádanka o bakteriologické vyšetření. Kromě výše zmíněných informací musí obsahovat čas odběru, jméno zdravotnického pracovníka, který odběr provedl a jméno lékaře, který odběr indikoval. Na žádance se jako materiál označí stolice a v kolonce pro průkaz antigenu, toxinu se označí *Clostridium difficile* (při pozitivitě kultivace). Poté je vzorek se žádankou odeslán na centrální příjem Centrálních laboratoří. Zde jsou opět zkontrolovány údaje na vzorku a na žádance (jméno a rodné číslo). Laborant, který převzal materiál, musí zapsat své jméno, datum a čas převzetí vzorku na žádanku. Z centrálního příjmu je materiál odeslán na Pracoviště bakteriologie. Zde laborantka znovu zkontroluje shodu údajů na vzorku a na žádance, do které napíše své jméno a tím potvrdí převzetí biologického materiálu. Žádanku i kontejner s biologickým materiálem označí laboratorním číslem, pod kterým je pacient veden v počítačovém systému laboratoře (LIS-STAPRO).

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Přímý průkaz antigenu a toxinu

Vzorek se na Pracovišti bakteriologie zpracovává postupně ve dvou laboratořích. V Laboratoři dourčování izolátů se provádí přímý průkaz antigenu a toxinu *Clostridium difficile* **imunochromatografickou metodou** – jedná se o membránovou enzymovou immunoanalýzu pro detekci glutamátdehydrogenázy (antigenů *C. difficile*) a toxinů A a B. Používá se komerčně vyráběný set od firmy TECHLAB®. Reagencie jsou uchovávány při teplotě 2 – 8 °C. Před použitím se nechají vytemperovat na pokojovou teplotu 15 – 30 °C. Set obsahuje testovací kazetu, diluent, promývací pufr (*Wash Buffer*), substrát, konjugát, pozitivní kontrolu a jednorázové plastové pipety. (Příloha č. 2) Další pomůcky, které nejsou součástí setu, jsou rukavice, stopky, pipeta, testovací zkumavky, aplikační tyčinky a pipeta se špičkami. Opět se zkontrolují údaje z žádanky a vzorku.

Laboratorním číslem ze žádanky se označí zkumavka a testovací kazeta, které jsou následně použity.

Postup:

1. Příprava vzorku:

- v označené zkumavce se smíchá 750 µl diluentu, 1 kapku konjugátu a 25 µl vzorku stolice (tekutá stolice se odebere pipetou).
- takto naředěný vzorek je homogenizován na třepačce

2. Aplikace vzorku

- do aplikační jamky (*Sample Well*) na testovací kazetě (v pravém dolním rohu testovací kazety) se pipetou přenesou 500 µl naředěného vzorku a nechá se 15 minut inkubovat při pokojové teplotě

3. Promytí membrány

- poté se aplikuje 300 µl promývacího pufru (*Wash Buffer*) do reakčního okna (*Reaction Windows*); promývací pufr se nechá dokonale vsáknout do membrány.

4. Aplikace substrátu

- do reakčního okna se aplikují 2 kapky *substrátu*.
- vzorek se nechá 10 minut inkubovat při pokojové teplotě, poté se hodnotí výsledek testu

5. Interpretace výsledků

- objevení linie modrých teček uprostřed reakčního okna značí pozitivní kontrolu testu; tato linie se vždy musí objevit, jinak test nelze hodnotit.
- dále se hodnotí pozitivita antigenu a toxinu pomocí modrých linií
- v levé části kazety se hodnotí pozitivita antigenu (oblast Ag) - pokud se objeví modrá linie, jsou ve stolici přítomny antigeny *Clostridium difficile*
- v pravé části kazety se hodnotí pozitivita toxinů (oblast Tox) – pokud se objeví modrá linie, jsou ve stolici přítomny toxiny A/B
- v případě, že se zbarví pouze pozitivní kontrola, tedy modrá linie čtyř teček uprostřed reakčního okna, bez linií v detekčních oblastech kazety, je vzorek označen za negativní - není v něm tedy přítomen antigen ani toxin *Clostridium difficile*.

- nezobrazí – li se po uplynutí deseti minut žádná linie, výsledek je považován za chybný, to samé platí, nezobrazí – li se pozitivní kontrola.
- pokud se zobrazí pozitivní kontrola a linie pouze v oblasti toxinu, tak je tento test považován za nejasný - v tomto případě je doporučeno test opakovat s čerstvým vzorkem stolice. [33]

Vyhodnocení test:



[33]

Je – li antigen i toxin A/B pozitivní, výsledek je nahlášen na oddělení a navíc ústavnímu epidemiologovi. Na Pracovišti bakteriologie v Laboratoři stolice se dále provádí kultivace na *Clostridium difficile* a při její pozitivitě i stanovení citlivosti na antibiotika. Pokud je antigen pozitivní a toxin A/B negativní, je výsledek hlášen na příslušné oddělení, ústavnímu epidemiologovi a stolice odeslána do Laboratoře molekulární biologie a genetiky na PCR – na průkaz genu pro toxin B *Clostridium difficile* metodou GeneXpert. Pokud je výsledek PCR pozitivní, na Pracovišti bakteriologie (v Laboratoři stolice) se dále provádí kultivace na *Clostridium difficile* a při její pozitivitě i stanovení citlivosti na antibiotika.

Vyjde – li antigen i toxin A/B negativní, další vyšetření na *Clostridium difficile* (kultivace) se neprovádí. Výsledek je ohlášen na příslušné oddělení. Pouze na žádost ošetřujícího lékaře je vzorek zaslán do Laboratoře molekulární biologie a genetiky, kde se pomocí PCR vyšetří stolice na průkaz genu pro toxin B. Metodou GeneXpert (real



time PCR) se kromě genu pro toxin B prokazuje ještě gen pro binární toxin a průkaz potencionálního ribotypu 027.

### 3.3.2 Mikroskopie

Mikroskopický preparát se ze stolice zhotovuje vždy – nezávisle na výsledku imunochromatografie.

Mikroskopický preparát je zhotoven z nativní stolice natřené na podložní sklíčko. Před obarvením je sklíčko ofixováno plamenem kahanu a dále obarveno podle Grama.

Na Pracovišti bakteriologie se na barvení používá barvicí automat MIRASTAINER®. (Příloha č. 3) Tímto systémem je možné obarvit 30 sklíček najednou. Sklíčka se naskládají vyjímatelného držáku sklíček, který se poté nasadí do ramene držáku. Barvicí a fixační roztoky v barvicích nádobách, které jsou vloženy do jednotlivých stanic automatu. Při barvení se držák se sklíčky pohybuje podle naprogramovaného postupu od stanice ke stanici. Po dokončení barvení dává systém MIRASTAINER® zvukový signál. Barvení dle Grama v barvicím automatu trvá celkem 8 minut.

Postup:

Roztok krystalové violeti ..... 1 min. 30 sek.

Proplach ..... 30 sek.

Lugolův roztok 1 min. .... 30 sek.

Proplach ..... 30 sek.

Odbarvovací roztok ..... 30 sek.

Proplach ..... 30 sek.

Roztok safraninu ..... 30 sek.

Proplach ..... 30 sek.

Sušení ..... 2 min

Mikroskopický preparát se prohlíží optickým mikroskopem při celkovém zvětšení 1000x (s využitím imerzního systému).

V mikroskopickém obraze se hodnotí přítomnost leukocytů, erytrocytů a bakterií. Kvantita se vyjadřuje na +, ++, +++. Obvykle bývá přítomna polymikrobiální smíšená anaerobní a fakultativně-anaerobní flóra, někdy kvasinky. Pokud jsou nalezeny

grampozitivní silnější tyčinky s oválnými subterminálními spórami – může se jednat o *Clostridium difficile*. (Příloha č. 4)

### 3.3.3 Kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům

Pokud je výsledek imunochromatografie negativní, nebo pokud je prokázán pouze antigen *Clostridium difficile* (jedná se o netoxigenní kmen), zpracovává se stolice podobně jako rektální výtěr – naočkuje se na tyto kultivační půdy: McConkey agar, SS agar, Selenitovou půdu, Sabouraud agar a Campylo Butzler gel. S tím rozdílem, že u rektálních výtěrů se Sabouraud agar standardně nezařazuje. (Příloha č. 11)

**McConkey agar** je selektivně – diagnostická půda, používá se k záchytu koliformních mikrobů a střevních patogenů. Selektivita spočívá v potlačení růstu grampozitivních bakterií, rostou na ní tedy jen gramnegativní bakterie. Diagnostická půda odlišuje bakterie štěpící a neštěpící laktózu. Světlé (bezbarvé) kolonie mají bakterie laktózu neštěpící, růžové kolonie laktózu štěpící.

Složení (g/litr):

Pepton	17,0
Laktosa	10,0
Proteosový pepton	3,0
Žlučové soli	1,5
NaCl	5,0
Neutrální červeň	0,03
Krystalová violet	0,001
Agar	13,5

pH 7,1 ± 0,2

**SS agar** je pojmenován podle anglického názvu *Salmonella – Shigella* agar. Jedná se o selektivně-diagnostickou půdu. Kromě štěpení laktózy diagnostikuje i bakterie

produkující sirovodík – s černým zbarvením kolonií. Kolonie salmonel jsou bezbarvé s černým středem a kolonie shigel jsou pouze bezbarvé.

Složení (g/litr):

Peptony	10,0
Laktosa	10,0
Citrát sodný	10,0
Hovězí žluč, sušená	8,5
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,5
Citrát železitoamonný	1,0
Neutrální červeň	0,025
Brilantní zeleň	0,0003
Agar	12,0

pH 7,0 ± 0,2

**Selenitová půda** je tekutá půda sloužící k selektivnímu pomnožení salmonel. Půda se druhý den vyočkovává na SS agar.

Složení (g/1000 ml):

Pepton pro bakteriologii	6,0
Seleničitan sodný	2,0
Laktosa	5,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,5

pH 7,1 ± 0,2

**Sabouraudův agar** se používá ke kultivaci kvasinek a plísní.

Složení (g/litr):

Pankreatický hydrolyzát kaseinu	5,0
---------------------------------	-----

Peptický hydrolyzát zvířecí tkáň	5,0
Glukosa	40,0
Agar	15,0

pH 5,6 ± 0,2

McConkey agar, SS agar, Sabouraud agar a Selenitová půda se kultivují aerobně 24-48 hodin při 37 °C.

**Campylo Butzler gel** je krevní agar pro kultivaci *Campylobacter jejuni*.

Složení (g/litr):

Proteázový pepton	15,0
Játrový extrakt	2,5
Kvasnicový extrakt	5,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	15,0
Beraní defibrinovaná krev	100,0 ml

pH 7,4 ± 0,2

*Campylobakter jejuni* roste pouze v mikroaerofilní atmosféře. Ta se vytvoří pomocí přístroje LAS, který je podrobněji popsán níže. Plotna je zatavena do bílého sáčku, ve kterém se vytvoří vhodná mikroaerofilní atmosféra pro kultivaci *C. jejuni*: 79,3 % N<sub>2</sub>; 7,5 % O<sub>2</sub>; 6,4 % H<sub>2</sub>; 6,4 % CO<sub>2</sub>. Kultivace probíhá 48 (popř. 72) hodin při teplotě 42 °C.

Pokud je prokázán toxigenní kmen *Clostridium difficile* (imunochromatograficky a popř. PCR) je vzorek stolice naočkován ještě na CLDA (*Clostridium difficile* agar) a THIOM (VF – bujón) – tyto půdy se označí písmenem „B“. Citlivost kultivace zvýší inkubace stolice s 96% etanolem (alkohol stimuluje klíčení spór). Stalice o hmotnosti cca 0,5g (0,5 ml) se přidá do 0,5 ml 96% etanolu. Za 30-40 minut se alkoholová suspenze vyočkuje na CLDA a THIOM – tyto půdy se označují písmenem „A“.

**THIOM** (thioglykolátové médium, VF-bujón) je tekutá pomnožovací anaerobní půda s parafínem. Inkubuje se 48 hodin aerobně při 37 °C.

Složení (g/litr):

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	15,0
Kvasničný extrakt	5,0
Thioglykolát sodný	0,5
Chlorid sodný	2,5
L – cystin	0,5
Glukóza	5,5

pH 7,1 ± 0,2

**CLDA** je selektivní půda s antibiotiky, která slouží k izolaci *Clostridium difficile*.

Složení (g/litr):

Proteosový pepton	40,0
Hydrogenfosforečnan disodný	5,0
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,0
Síran hořečnatý	0,1
Chlorid sodný	2,0
Fruktóza	6,0
Agar	15,0
Defibrinovaná koňská krev	70,0 ml
D – cykloserin	0,5
Cefoxitin	0,016

pH 7,4 ± 0,2

[38]

Půdy CLDA se kultivují v anaerobní atmosféře. Na Pracovišti bakteriologie je pro anaerobní kultivaci k dispozici anaerobní box, v případě kultivace stolice na *Clostridium difficile* se ale využívá LAS systém.

LAS – Látalův anaerobní systém

Toto zařízení se skládá z několika samostatných částí, které zajišťují funkčnost celku. Slouží k odsátí vzduchu, plynu nebo směsi plynů z uzavřeného prostoru (vakuovací komory), pomocí elektrické rotační vývěvy (vakuování) a následné naplnění vakuovací komory plynem daného složení, objemu a kvality z připojené plynové láhve (plynování).

LAS systém lze použít jak k vytvoření mikroaerofilní atmosféry (pro kultivaci *Campylobacter jejuni*) – používají se speciální průhledné sáčky, nevkládá se katalyzátor a dojde jenom k částečnému vakuování (ze 75 %), aby byla splněna podmínka 7,5 % O<sub>2</sub> v atmosféře. (Příloha č. 5)

Pro vytvoření anaerobní atmosféry se plotny vkládají do sáčku zlaté barvy. Tyto sáčky jsou postupně vrstveny z několika různých termoplastických umělých hmot. Do aplikačního sáčku se přidává katalyzátor kyslíku. Jedná se o dvě válečkové tablety 5 x 5 mm, které jsou vloženy v sáčcích z hedvábného papíru. Katalyzátor se do sáčku dává jako první, poté se vloží kultivační půdy, které se dávají víčkem nahoru. Zabrání se tak uvolnění agarů během vakuování. Velikost aplikačního sáčku musí být taková, aby se do něj vešly všechny plotny a jeho volný okraj byl 4 – 5 cm. Sáček s miskami se vloží do vakuovací komory. Okraj sáčku se zasune do zářezu držáku plynové trysky. Víko komory se oběma rukama zavře. (Příloha č. 6) Poté začne proces vakuování. Přístroj vytvoří vakuum ze 100 % a poté do komory pustí 80 % N<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>. Po zatavení se sáček ukládá do termostatu, kde se dva dny kultivuje při 37 °C.

### **3.3.4 Kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům**

Po 48 hodinách se hodnotí kultivace na anaerobních půdách CLDA. Na půdách označených „B“ obvykle roste smíšená flóra, na půdách označených písmenem „A“ je větší pravděpodobnost záchytu *Clostridium difficile* (často zde roste v čisté kultuře). Ze suspektních kolonií (větší, ploché, nepravidelné, šedavé kolonie, obvykle protažené ve směru očkovací čáry) se zhotovuje mikroskopický preparát. Nález grampozitivních nebo gramlabilních delších rovných tyček (sporulace v preparátu zhotoveného z kultury nebývá většinou vyznačena; někdy jsou však přítomny typické subterminální oválné

spóry) se ověřuje dalším testem (popř. testy). Pokud v primokultuře na tuhých půdách nebyla kultivace *Clostridium difficile* úspěšná, zhotoví se mikroskopický preparát pomnožovacích anaerobních bujónů A a B a při nálezu suspektních grampozitivních tyček se tyto půdy opět vyočkují na CLDA, které se inkubují v anaerobní atmosféře dalších 48 hodin při 37°C.

Většinou se k identifikaci narostlých kolonií používá **latexová aglutinace**. Jedná se o metodu, kdy se IgG protilátky, navázané na latexových partikulích, specificky vážou k antigenům buněčné stěny *C. difficile*. V bakteriologické laboratoři se využívá C. DIFFICILE TEST KIT od firmy OXOID. Sety se skladují v lednici při teplotě 2 – 8 °C. Zde jsou chráněny před mrazem i slunečním zářením. Důležité je dodržení data spotřeby. Po uplynutí expirace se sety nepoužívají.

Součástí sady jsou reagentie, a to antisérum (IgG protilátky) navázané na latexu - *C. difficile latex reagent*, fyziologický roztok - 0,85 % *isotonic saline* a pozitivní kontrola - *C. difficile positive control*. Dále pak jednorázové karty a jednorázové tyčinky. (Příloha č. 7)

Před použitím se reagentie nechají vytemperovat na pokojovou teplotu. Do vyznačené oblasti na reakční kartě se aplikuje 1 kapka fyziologického roztoku a smíchá se pomocí sterilní tyčinky s testovanou kolonií ze selektivní půdy CLDA. Po smíchání musí být vytvořen zákal. Může se stát, že už v tomto kroku dojde k aglutinaci nebo shlukování. Pravděpodobně se jedná o autoaglutinaci a v testu se nepokračuje. Pokud nedojde ke spontánní aglutinaci, pak se přidá kapka antiséra *C. difficile*. Je důležité, aby špička kapátka zůstala sterilní a nedotkla se suspenze. Celá suspenze se míchá sterilní tyčinkou 30 sekund. V případě pozitivní reakce dojde do dvou minut k aglutinaci. (Příloha č. 8) Při negativní reakci k aglutinaci nedojde.

U každého vzorku se provádí pozitivní kontrola kvality kytu a reagentií. Pozitivní kontrola je součástí balení. Smícháním jedné kapky pozitivní kontroly a *C. difficile Latex reagent* dojde při správné reaktivitě k aglutinaci do dvou minut. Kontrola reagentií se provádí smícháním kapky fyziologického roztoku a kapky *C. difficile latex reagent*. Aglutinace by měla být negativní.

K identifikaci kmene bakterie lze též použít přístroj **VITEK MS** - metodou **MALDI TOF** (MALDI - ionizace laserem za přítomnosti matrice, TOF – analýza doby letu). Jedná se o systém sloužící k identifikaci bakterií a mikromycet. Používá metodu ionizace laserem za přítomnosti matrice a následnou hmotnostní spektrometrii. Destička (nosič) obsahuje 48 pozic rozdělených na 3 měřicí skupiny. (Příloha č. 9) Destička se vzorky musí být umístěna na rovném povrchu. Pomocí jednorázové kličky o kapacitě 1 µl se nabere kolonie (je důležité nabrat jen kolonii bez agaru) a v tenké vrstvě natře do středu pozice. Na rozetřenou kulturu se poté aplikuje 1 µl matričního roztoku HCCA (kyselina kyanoskořicová) a suspenze se nechá zaschnout. Jako kontrola slouží vzorek kontrolního referenčního kmene *Escherichia coli*, který je vždy umístěn na stejné pozici (uprostřed každé měřicí skupiny). Na každé destičce je čárový kód, díky kterému přijímá stanice informace o pozici vzorku na nosiči. V přístroji VITEK MS je nosič podroben opakovanému působení laserového paprsku. Matrice vstřebá laserové světlo a vznikne elektrický náboj. Po vzniku náboje se matrice odpaří (= ionizace). Ve vakuové trubici dojde k rozdělení iontů podle jejich hmotnosti. Výsledky měření jsou znázorněny pomocí křivek (píků), které odpovídají různým fragmentům původních molekul ve vzorku. Spektra jsou porovnávána s databází spekter známých kmenů. Poté procentuálně znázorní pravděpodobnost shody s typickým spektrem daného mikroorganismu. Dokonalá shoda činí 99%. Pokud není kmen v databázi, nepodaří se ho identifikovat.

Další možností identifikace kmene v případě podezření na *Clostridium difficile* (využívané zřídka) je metoda PCR (prování Laboratoř molekulární biologie a genetiky). Po potvrzení identifikace kmene *Clostridium difficile* z narostlé kultury se stanovuje citlivost k antibiotikům, které jsou léky volby při terapii CDI - v tomto případě vankomycinu a metronidazolu. Pro tyto účely se používá **E-test** od firmy OXOID a bioMérieux. (Příloha č. 10) Jedná se o proužek, který je napuštěn antimikrobiální látkou se vzestupným gradientem koncentrací od jednoho konce na druhý. E-testy vycházejí ze stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace). Hodnoty koncentrací antimikrobiální látky jsou na proužku znázorněny.



Před použitím se proužky nechají vytemperovat na pokojovou teplotu. Suspenzí kmene *C. difficile* o hustotě 0,5 McFarlanda se naočkuje Schaedlerův agar (neselektivní půda pro kultivaci anaerobních bakterií). E-test se položí doprostřed agarového média. Pinzetou se jemně přitlačí na proužek, tím se odstraní vzduchové bubliny. Po položení E-testu na agar dochází k difúzi antibiotika do agaru a vytvoří se kontinuální koncentrační gradient. Plotna s E-testem se nechá inkubovat 24 – 48 hodin při 37 °C v anaerobní atmosféře.

Hodnota MIC se odečítá v bodě průsečíku inhibiční zóny a E-testu. Inhibiční zóna (zóna zábrany růstu) má tvar protáhlé kapky (elipsy). V případě, že inhibiční zóna proužek neprotíná, pak je MIC odečtena jako < nejnižší koncentrace antibiotika na E-testu. Pokud zóna nevznikne, MIC je považována za > nejvyšší koncentrace antibiotika na E-testu. V případě, že průsečík je mezi dvěma hodnotami na stupnici, je zvolena ta vyšší. Konkrétní informace o hodnotách MIC jsou součástí příbalových letáků u jednotlivých testů. Hodnota MIC se porovnává s tzv. hraniční koncentrací (break – point). Pokud je  $MIC \leq$  hraniční koncentraci, kmen je k antibiotiku citlivý, pokud je  $MIC >$  hraniční koncentrace, kmen je k antibiotiku rezistentní. Break – point pro VAN je 2 mg/l, pro MTR je 2 mg/l.

DDT (diskový difuzní test) se používá na testování citlivosti k moxifloxacinu a erytromycinu. Citlivost k těmto antibiotikům se do výsledku neuvádí. V případě zjištěné rezistence minimálně k jednomu z těchto antibiotik se kmen zasílá do Laboratoře molekulární biologie a genetiky k provedení PCR vyšetření (pokud již nebylo provedeno přímo ze stolice). Kromě genu pro toxin B se metodou GeneXpert zároveň prokazuje i gen pro binární toxin a potencionální ribotyp 027. V případě, že je kultivačně zachycen tento suspektní epidemicky závažný ribotyp, kmen se zasílá do Národní referenční laboratoře k další typizaci.

#### 4. VÝSLEDKY

V roce 2011 bylo na Pracovišti bakteriologie vyšetřeno 291 stolic na průkaz *Clostridium difficile*. Za prokázanou infekci se považuje průkaz toxigenního kmene *Clostridium difficile*.

Přímý průkaz antigenu a toxinu A/B *Clostridium difficile* se provádí imunochromatografickou metodou.

*Tabulka 1.: Počet pozitivních a negativních nálezů imunochromatografického vyšetření stolice v roce 2011.*

<b>Výsledek imunochromatografického vyšetření</b>	P Ag/P tox	P Ag/N tox	N Ag/N tox	Celkem
<b>Počet vzorků</b>	39	44	208	291

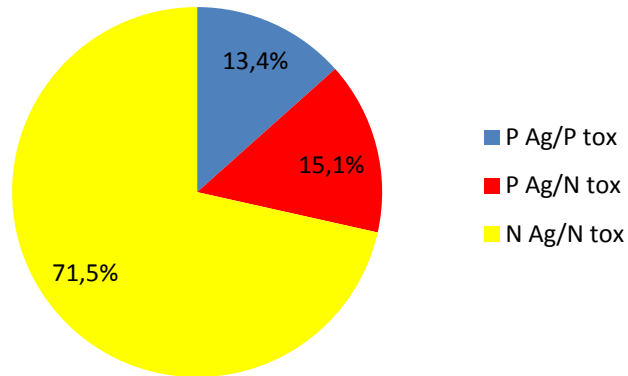
P Ag/P tox ... pozitivní antigen a pozitivní toxin A/B

P Ag/N tox ... pozitivní antigen a negativní toxin A/B

N Ag/N tox ... negativní antigen a negativní toxin A/B

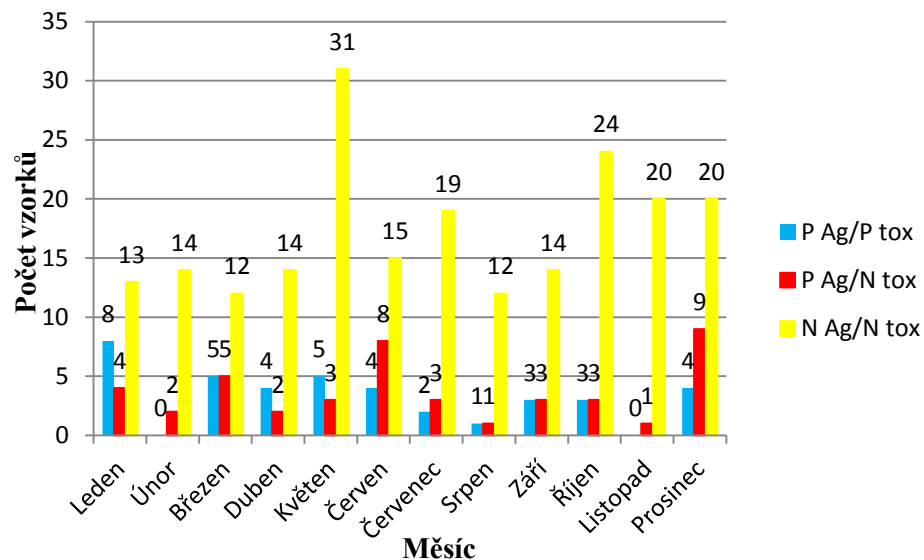
Z 291 vzorků stolic mělo 208 negativní antigen i toxin, 44 mělo pozitivní antigen a negativní toxin a 39 pozitivní antigen i toxin.

**Graf 1.: Procentuální zastoupení pozitivních a negativních nálezů imunochromatografického vyšetření.**



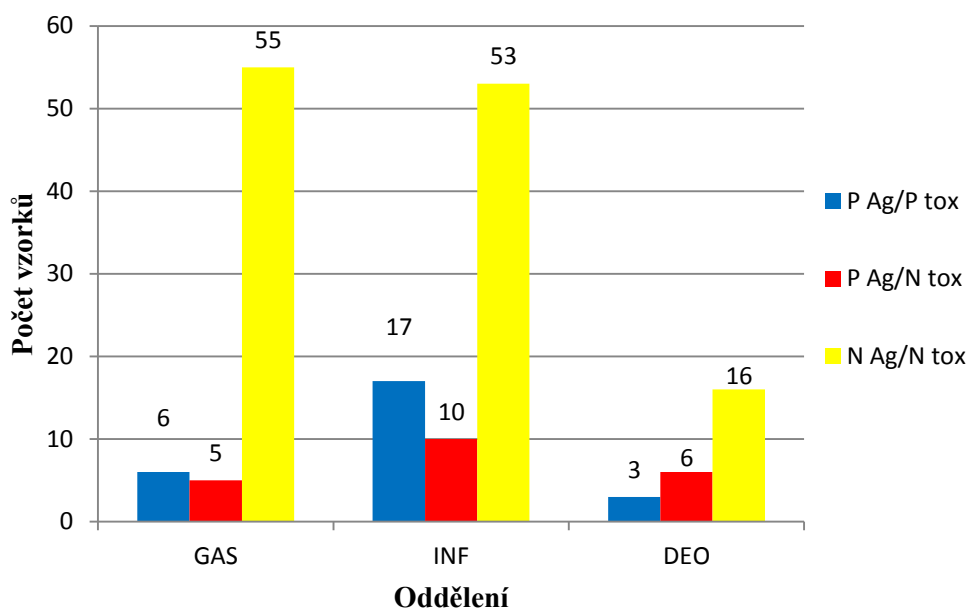
71,5 % vzorků bylo negativních, 15,1 % mělo pozitivní antigen a negativní toxin a 13,4 % mělo pozitivní antigen i toxin.

**Graf 2.: Počet pozitivních a negativních nálezů imunochromatografického vyšetření na průkaz *Clostridium difficile* za rok 2011 v jednotlivých měsících.**



Množství pozitivních nálezů se v průběhu roku výrazně nelišilo. Nejvíce vzorků bylo vyšetřeno v měsíci květnu, počet vyšetření však nebyl spojen s vyšším záchytem infekce *Clostridium difficile*. Nebyl prokázán vliv ročního období na výskyt CDI.

**Graf 3.: Počet vzorků z nejčastěji zasílajících oddělení (ve vztahu k výsledku imunochromatografického vyšetření)**



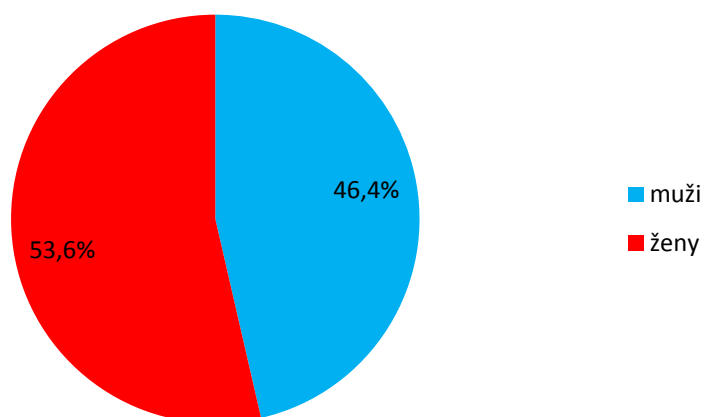
(GAS ... Gastroenterologické oddělení, INF ... Infekční oddělení, DEO ... Dětské oddělení)

Nejčastěji byly vzorky stolice na průkaz *Clostridium difficile* odebírány na Infekčním oddělení (80 vzorků; 27,5%), Gastroenterologickém oddělení (66 vzorků; 22,7%) a Dětském oddělení (25 vzorků; 8,6%). Nejvíce pozitivních nálezů bylo z Infekčního oddělení.

**Tabulka 2.: Počet vyšetřených vzorků dle pohlaví**

	Počet vzorků	Procenta (%)
<b>Celkem</b>	291	100
<b>muži</b>	135	46,4
<b>ženy</b>	156	53,6

**Graf 4.: Procentuální vyjádření počtu vyšetřovaných mužů a žen**

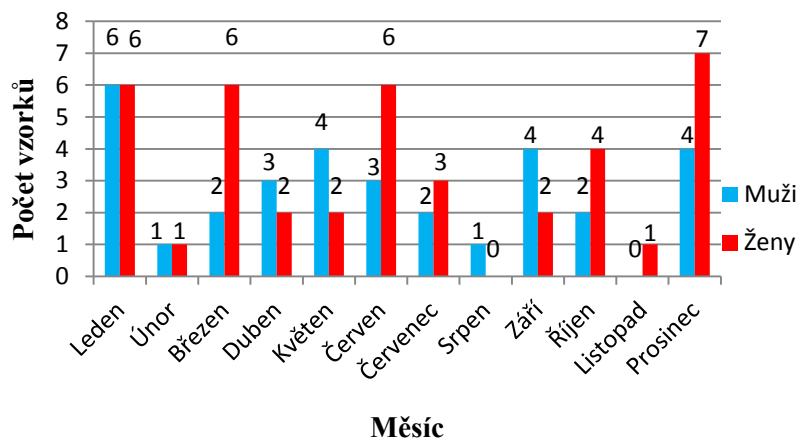


Tabulka 2 a graf 4 znázorňují zastoupení pohlaví mezi vyšetřovanými vzorky. Z 291 vzorků bylo 46,4 % od mužů, tj. 135 vzorků. Více vyšetřovaných bylo žen, a to 53,6 %, tj. 156 vzorků.

Za průkaz toxigenního kmene je považován průkaz toxinu A/B imunochromatografickým vyšetřením nebo průkaz genu pro toxin B metodou PCR. (PCR vyšetření ze stolice se provádí, pokud při imunochromatografickém vyšetření vyjde pozitivní pouze antigen.)

U imunochromatografie je detekční hladina glutamát dehydrogenázy od 0,8 ng/ml – senzitivita testu (průkazu antigenu) je 90,3%; detekční hladina toxinu A je od 0,63 ng/ml a toxinu B od 0,16 ng/ml – senzitivita testu je 87,8%. Negativní výsledek toxinu A/B při pozitivitě antigenu znamená nepřítomnost toxinu nebo nízkou koncentraci nedostatečnou pro jeho detekci. Real-time PCR má vysokou senzitivitu: 99-100%, detekuje gen pro toxin B (*tcdB*).

**Graf 5.: Počet pozitivních nálezů toxigenních kmenů *Clostridium difficile* u mužů a žen v jednotlivých měsících**



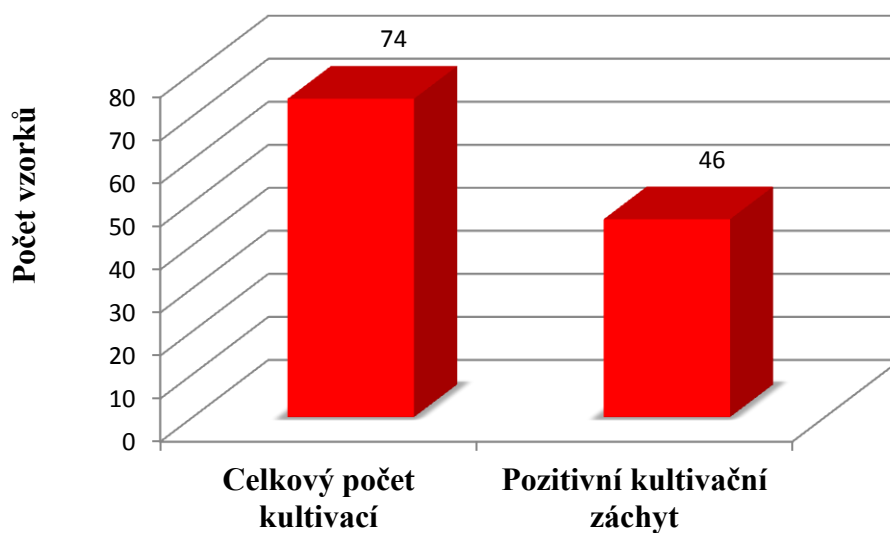
**Tabulka 3.: Procentuální vyjádření pozitivních výsledků CDI**

	Počet vzorků	Počet toxigenních kmenů	Procentuální zastoupení toxigenních kmenů
<b>Celkem</b>	291	74	25,4 %
<b>Muži</b>	135	34	25,2 %
<b>Ženy</b>	156	40	25,6 %

Infekce *Clostridium difficile* byla prokázána u 74 osob, tj. u 25,4 % z celkového počtu vyšetřovaných. Jednalo se o 34 mužů a 40 žen. Procento positivity toxigenních kmenů bylo prakticky totožné u obou pohlaví (muži 25,2 % a ženy 25,6 %).

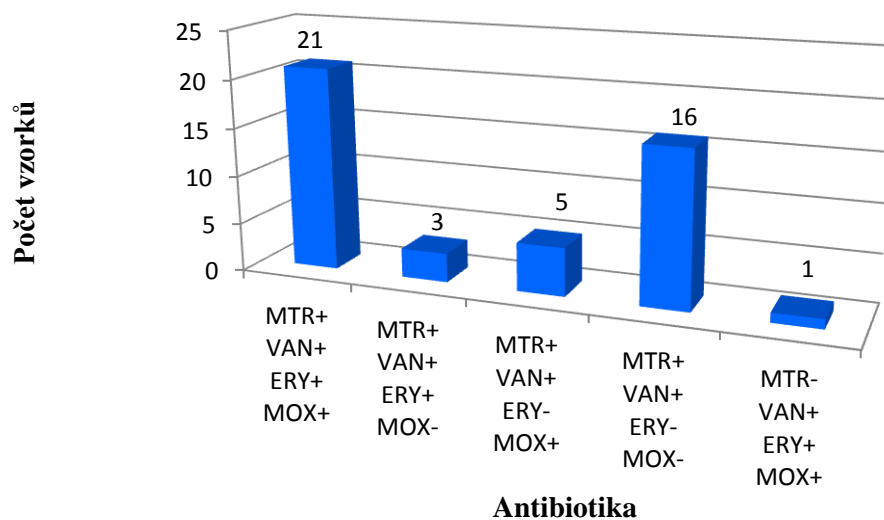
U pozitivního průkazu toxinu A/B imunochromatografickým vyšetřením nebo jen genu pro toxin B metodou PCR se provádí kultivační vyšetření na CLDI.

**Graf 6.: Počet pozitivních nálezů u kultivačního vyšetření na průkaz *C. difficile* za rok 2011**



V roce 2011 bylo kultivační vyšetření provedeno u 74 vzorků. Pozitivní kultivační záchyt byl u 46 vzorků, tj. u 62,2 %.

**Graf 7.: Citlivost k testovaným antibiotikům**



(MTR ... metronidazol, VAN ... vankomycin, ERY ... erytromycin, MOX ... moxifloxacin, + ... citlivost k antibiotiku, - ... rezistence k antibiotiku)

Citlivost k antibiotikům byla stanovena u 46 kmenů. Z toho byl jeden kmen rezistentní k metronidazolu, jednalo se o ženu (27 let), která měla pozitivní antigen i toxin (imunochromatografickým vyšetřením) a vzorek byl odeslán z Infekčního oddělení. Všechny kmeny byly citlivé k vankomycinu. Citlivost k MTR a VAN byla stanovena E-testem. Citlivost k MOX a ERY pomocí diskového difuzního testu (jedná se o diagnostická antibiotika, do výsledku se citlivost k nim neuváděla).

**Tabulka 4.: Průměrný věk pacientů s prokázanou infekcí *Clostridium difficile***

	<b>Pohlaví</b>	
	Muži	Ženy
<b>Průměrný věk (rok)</b>	58	59

Průměrný věk u prokázané CDI byl u obou pohlaví téměř totožný - u mužů 58 let, u žen 59 let.

Toxin *C. difficile* byl prokázán ve 39 vzorcích stolice imunochromatografickým vyšetřením. 44 vzorků stolice (imunochromatografickým vyšetřením prokázán pouze antigen) bylo testováno metodou PCR, z toho u 35 vzorků byl prokázán gen pro toxin B, u 9 vzorků ne. U těchto 9 vzorků se jednalo o průkaz netoxigenního kmene *C. difficile*, nebo o falešnou pozitivitu přímého průkazu antigenu. U 74 vzorků celkem (z 291) byl prokázán toxigenní kmen *Clostridium difficile*. U těchto vzorků bylo také provedeno kultivační vyšetření na *Clostridium difficile*.



## 5. DISKUSE

Infekce *Clostridium difficile* má v posledních letech vzrůstající charakter. Ve vyspělých zemích Severní Ameriky, Evropy a Asie jsou hlášeny vyšší incidence CDI již od roku 2003, v České republice je tento výrazný vzestup zaznamenán od roku 2007. [36,37] Za rok 2011 bylo na Pracoviště bakteriologie přijato 291 vzorků stolic. Toxigenní kmen byl prokázán u 74 osob, což z celkového počtu činí 25,4 %. Tento počet je o něco nižší, než uvádí Tejkalová ve své studii, kde ve FN sv. Anny v Brně bylo za rok 2009 přijato 304 vzorků a v roce 2010 dokonce 534. Z toho byla přítomnost toxigenního kmene u 11,5 % pacientů v roce 2009 a u 11,4 % pacientů v roce 2010. [35] Z toho vyplývá, že v Nemocnici v Českých Budějovicích, a. s. mají lepší záchyt infekce, než ve FN sv. Anny v Brně.

Senzitivita kultivace CLDI je uváděna 99 až 100 %. [7] Pozitivní kultivační záchyt byl v roce 2011 na Pracovišti bakteriologie u 62,2 % vzorků s prokázaným toxinem (z přímého průkazu nebo PCR). Tato nižší senzitivita může být ovlivněna kvalitou pořízených kultivačních půd nebo prodlevou před zpracováním stolice do výsledku PCR vyšetření (material je uchováván do zpracování při chladničkové teplotě).

V odborné literatuře je za jeden z rizikových faktorů označován věk nad 65 let. [37] Tabulka 4 na straně 56 ukazuje, že průměrný věk pacientů s potvrzenou infekcí *Clostridium difficile* byl v roce 2011 v Nemocnici České Budějovice, a. s. u mužů 58 let a u žen 59 let.

Na Pracoviště bakteriologie přicházejí vzorky z různých oddělení nemocnice. Nejvíce jich však bylo z Infekčního (80 vzorků; 27,5%), Gastroenterologického (66 vzorků; 22,7%) a Dětského oddělení (25 vzorků; 8,6%). Nejvíce pozitivních vzorků pochází z Infekčního oddělení. Zde jsou hospitalizováni pacienti s infekčními chorobami včetně průjmových, kteří sem byli přeloženi z důvodu izolace z jiných oddělení, nebo jiných zdravotnických zařízení. To potvrzuje ve své práci Vojtilová. [36]

Z celkového počtu vyšetřovaných vzorků (291) bylo 46,4 % od mužů a 53,6 % od žen. Vzorků s prokázanou infekcí *C. difficile* bylo 74. Z toho 34 pozitivních bylo od mužů, tj. 25,2 % a 40 vzorků od žen, což je 25,6 %. Konečné výsledky pozitivních

vzorků z hlediska pohlaví jsou téměř totožné, pravděpodobně tedy pohlaví není rizikovým faktorem. Tento faktor není ani uváděn v odborné literatuře.

Nejčastěji užívanými antibiotiky pro léčbu CDI jsou metronidazol a vankomycin. V mém výzkumu byla citlivost k ATB stanovena u 46 kmenů. Z toho byl jeden kmen rezistentní k metronidazolu. Jednalo se o ženu (27 let), která měla pozitivní antigen i toxin. Vzorek pocházel z Infekčního oddělení. Podle Nyče je metronidazol stále považován za vysoce účinný lék, který se u lehčích forem CDI vyrovná vankomycinu. [26] Všechny kmeny byly citlivé k vankomycinu. Tento výsledek je v souladu se studií Nyče, podle které zatím nejsou validní informace o rezistenci vůči vankomycinu. [26] Podle Denèva je častější selhání léčby metronidazolem uváděno zejména v souvislosti s výskytem ribotypu 027. Jedna z teorií spekuluje, že suboptimální hladiny metronidazolu v tlustém střevě, mohou být právě u vysoce virulentních kmenů spojeny s pokračující produkcí cytotoxinu. [12]

## 6. ZÁVĚR

V roce 2011 bylo na Pracovišti bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s. přijato 291 vzorků stolic. Pozitivní průkaz CDI byl prokázán u 74 osob, z toho průměrný věk činil u mužů 58 let a u žen 59 let. Mezi pacienty vyšetřovaných na CDI převažovaly ženy, avšak v procentuelním zastoupení mezi prokázanými toxigenními kmeny byly výsledky téměř totožné (u mužů 25,2 % a u žen 25,6 %). U 74 vzorků s prokázanou CDI bylo provedeno kultivační vyšetření. Kmen byl vykultivován u 46 vzorků, což je 62,2 %. U těchto 46 kmenů byla následně stanovena citlivost k antibiotikům. Z tohoto souboru byly všechny kmeny citlivé k vankomycinu. Pouze jeden kmen byl rezistentní k metronidazolu. Na Gastroenterologickém oddělení bylo odebráno 66 vzorků, tj. 22,7 %, na Dětském oddělení 25 vzorků, tj. 8,6 %. Z hlediska četnosti bylo nejvíce vzorků zasláno z Infekčního oddělení (80; 27,5 %), odtud pocházelo i nejvíce pacientů s prokázanou CDI.

## **7. KLÍČOVÁ SLOVA**

antigen

*Clostridium difficile*

nozokomiální infekce

pseudomembranózní kolitida

toxin

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. AMBROŽOVÁ, H. Akutní infekce trávicího traktu. Interní medicína pro praxi. 2011, roč. 13, č. 7 - 8, s. 288 - 291. ISSN 1212 - 7299.
2. Bakteriální původci alimentárních onemocnění. PCR – polymerázová řetězová reakce [online]. Brno, 2011 [cit. 2013-02-27]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/uni03/uni03.html>
3. BAROŇOVÁ, I., ŠÍPKOVÁ E., KRYSTOVÁ, L. Postantibiotická pseudomembranózní enterokolitida způsobená bakterií *Clostridium difficile*. Pediatrie pro praxi. 2011, roč. 12, č. 5, s. 344 - 346. ISSN 1213 - 0494.
4. BARTLETT, JOHN G., GERDING. DALE N. Clinical Infectious Diseases. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection [online]. 2008, č. 46, s. S12-S18 [cit. 2013-04-14]. DOI: 10.1086/521863. Dostupné z: [http://cid.oxfordjournals.org/content/46/Supplement\\_1/S12.full](http://cid.oxfordjournals.org/content/46/Supplement_1/S12.full)
5. BAUER, M. P., KUIJPER E. J., van DISSEL J. T. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). Clinical Microbiology and Infection. 2009, roč. 12, č. 15, s. 1067–1079. ISSN 1469-0691.
6. BEDNÁŘ, M. a kol. Lékařská mikrobiologie. Praha. Marvil, 1996, s. 558. ISBN 80-2380-297-6.
7. BENEŠ, J., HUSA, P., NYČ, O. Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2012, roč. 18, č. 5, s. 160-167. ISSN 1211-264X.
8. BENEŠ, J. Infekční lékařství. Praha. Galén, 2009. ISBN 9788072626441.
9. BERGMANN, D., HORÁK, L. Kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. Rozhledy v chirurgii. 2008, roč. 87, č. 8, s. 409 - 412. ISSN 0035 - 9351.
10. BIOSYNEX IMMUNOQUICK®. *Clostridium difficile* GDH. France, 2012, 3 s. REF: 0537 – K25.
11. *Clostridium difficile*: A "difficult" human pathogenic bacterium. Classification of *Clostridium difficile* [online]. Wisconsin, 2009 [cit. 2013-03-12]. Dostupné z: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/kumm\\_jakl/classification.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/kumm_jakl/classification.htm)

12. DENÈVE, C., JANOIR, C., POILANE, I., FANTINATO, C., COLLIGNON, A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. International Journal of Antimicrobial Agents[online]. 2009, č. 33, s. S24-S28 [cit. 2013-03-24]. DOI: 10.1016/S0924-8579(09)70012-3. Dostupné z: <http://www.corsiperfezionamento.com/ITA/Dumontet/Clostridium%20difficile%20articles.pdf>
13. DRÁBEK, J., a kol. Úloha endoskopie v diagnostice clostridiové kolitidy. Endoskopie. 2008, roč. 17, č. 3, s. 68 – 70. ISSN 1211-1074.
14. ELLIOT, B. A kol. *Clostridium difficile* – associated diarrhoea. Int. Med. J. 2007. roč. 37, s. 561 – 568, ISSN 1445-5994.
15. Generi biotech s.r.o. Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR) [online]. Hradec Králové, 2009 - 2011 [cit. 2013-02-24]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>
16. GREENWOOD, D. a kol. Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Londýn, Grada, 1999, s. 686. ISBN 80-7169-365-0.
17. CHMELAŘOVÁ, E., ŠKAPOVÁ, T. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2010, roč. 16, č. 3, s. 86 - 89. ISSN 1211 - 264X.
18. JOYCE, A. M., BURNS, D. Recurrent *Clostridium Difficile* colitis. Tackling a tenacious nosocomial infection. Medicína po promoci. 2003, roč. 4, č. 4, s. 15 - 19. ISSN 1212 - 9445.
19. KOHOUT, P. Probiotika v gastroenterologii. Zdravotnické noviny. 2008, roč. 57, č. 13, s. 12. ISSN 1805 – 2355 .
20. KRATOCHVÍLOVÁ, J., FORALOVÁ, M. Pokles výskytu rezistentních bakteriálních kmenů - multioborový přístup. Nozokomiální nákazy. 2010, roč. 9, č. 4, s. 3 - 4. ISSN 1336-3859.
21. KRIŠKOVÁ A. a kol. Ošetrovatelské techniky, Martin. Osveta, 2001, s. 805. ISBN 80-8063-087-9.

22. LIGOVÁ, A. a kol. *Clostridium difficile* Associated Diarrhoea - problém onkologického pacienta. *Klinická onkologie: Časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. 2009, roč. 22, č. 3. s. 108 – 116. ISSN 0862-495X.
23. NYČ, O., URBÁŠKOVÁ, P., JINDRÁK, V. *Clostridium difficile* - aktuální hrozba blízké budoucnosti?. *Medical tribune: aktuální - nezávislá - mezinárodní*. 2007, roč. 3, č. 32, s. A1 - A4. ISSN 1214 – 8911.
24. NYČ, O. a kol. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. *The Lancet*[online].2011, roč. 377, č. 9775, s. 1407. [cit. 2013-03-04]. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60575-8. Dostupné z: [http://www.lancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(11\)60575-8/fulltext](http://www.lancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(11)60575-8/fulltext)
25. NYČ, O. Infekce v koloproktologii pohledem mikrobiologa. *Rozhledy v chirurgii*. 2008, roč. 87, č. 8, s. 395 - 396. ISSN 0035 – 9351.
26. NYČ, O. Přístupy k léčbě střevních infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010, roč. 16, č. 3, s. 93 - 96. ISSN 1211 - 264X.
27. PÉPIN, J., VALIQUETTE, L., COSSETTE, B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *PubMed*[online]. 2005, roč. 9, č. 173, 1037–1042 [cit. 2013-03-01]. DOI: 10.1503/cmaj.050978. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1266326/>
28. PODSTATOVÁ, R. Opatření při výskytu infekce vyvolané *Clostridium difficile*. *Společnost prevence nozokomiálních nákaz*. 2010, roč. 8, č. 2. s. 183. ISSN 1336 – 3859.
29. POLÁK, P. a kol. První zkušenosti s fekální bakterioterapií v léčbě relabující pseudomebranózní kolitidy způsobené *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2011, roč. 17, č. 6, s. 214 - 217. ISSN 1211-264X.
30. SAVIDGE, Tor C. et al. Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. *Nature Medicine* [online]. 2011, č. 17, s. 1136–1141 [cit. 2012-12-11]. DOI: 10.1038/nm.2405. Dostupné z: <http://www.nature.com/nm/journal/v17/n9/full/nm.2405.html>

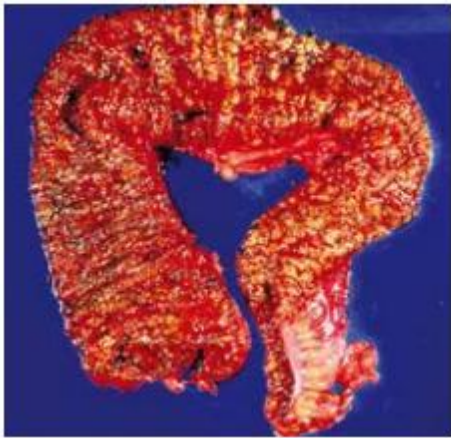
31. SLADKÁ, J. Hypervirulentní kmeny *Clostridium difficile* zůstávají reálnou hrozbou. Zdravotnické noviny. 2010, roč. 59, č. 42, s. 10 - 11. ISSN 1805 – 2355.
32. TÁBORSKÝ, P., BECKER, K. *Clostridium difficile* jako původce nozokomiálních infekcí. Sestra. 2007, roč. 17, č. 4, s. 4 - 6. ISSN 1210 - 0404.
33. TECHLAB®. C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE. USA, 2010, s. 40, RMS #91 – T525C – 01.
34. TECHLAB®. C. DIFFICILE TOX A/B II™. USA, 2008, s. 32, RMS #92 – 008 – 03.
35. TEJKALOVÁ, R., ROZKYDAL, Z. Výskyt infekcí vyvolaných kmenem *Clostridium difficile* u ortopedicky nemocných ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně, Ortopedie. 2011, roč. 5, č. 4, s. 156-159, ISSN 1802-1727.
36. VOJTILOVÁ, L. a kol. Analýza souboru pacientů s onemocněním vyvolaným toxinem *Clostridium difficile* hospitalizovaných na Klinice infekčních chorob v Brně v letech 2007-2010, Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2011, roč. 17, č. 6, s. 208-213. ISSN 1211-264X.
37. VOJTILOVÁ, L., HUSA, P., SVOBODA, R. Kolitida vyvolaná *Clostridium difficile*: Rizikové faktory, hypervirulentní kmen a terapeutické možnosti. Česká a Slovenská gastroenterologie a hepatologie. 2009, roč. 63, č. 4, s. 180 - 185. ISSN 1213 – 323X.
38. VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii, Brno. Hortus, 2000. s. 408. ISBN 80-238-5058-X.
39. VOTAVA, M. a kol. Lékařská mikrobiologie obecná. Brno. Neptun, 2005. s. 351. ISBN 80-86850-00-5.
40. VOTAVA, M. a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno. Neptun, 2003. s. 495. ISBN 80-902896-6-5.
41. Xpert®. *C. difficile*, GeneXpert , Sweden, 2012, s. 12, REV D 300 - 9291.
42. ZBOŘIL, V. Komentář k práci autorů Zemanová, E. at el.: "Asociace infekce *Clostridium difficile* a pseudomembranózní kolitidy v nemocnici okresního typu". Vnitřní lékařství. 2003, roč. 49, č. 8, s. 588 - 589. ISSN 0042-773X.



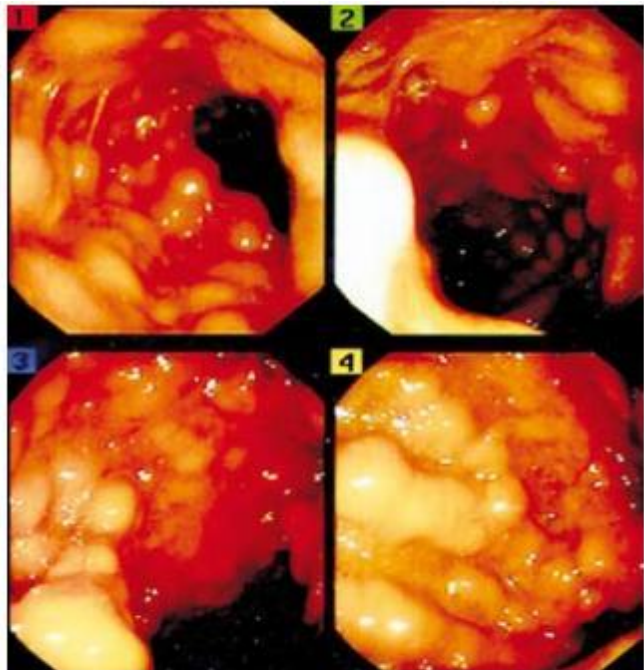
43. ZELA, O., VÍTEK, P. Medicína pro praxi. Infekce *Clostridium difficile* - stav v roce 2012[online]. 2012, roč. 10, č. 9, s. 391 - 394 [cit. 2013-04-14]. ISSN 1214-8687. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/10/06.pdf>

## 9. PŘÍLOHY

### Příloha č. 1



**Obr. 2.** Preparát resekovaného tlustého střeva 47leté pacientky s těžkou postantibiotickou pseudomembranózní kolitidou; patrné četné pseudomembrány (zdroj: <http://radiographics.rsna.jnl.org>)  
**Fig. 2.** Gross specimen of the resected colon from a 47-year-old woman with severe pseudomembranous colitis that developed following antibiotic therapy shows multiple, widely distributed pseudomembranes (source: <http://radiographics.rsna.jnl.org>)



**Obr. 3.** Endoskopický nález u stejné pacientky zobrazující charakteristické pseudomembrány cirkulárně v různých zobrazených segmentech kolon (zdroj: <http://radiographics.rsna.jnl.org>)  
**Fig. 3.** Endoscopic images obtained in the same patient show characteristic yellow plaques representing pseudomembranes completely involving the visualized segments of the colon circumferentially (source: <http://radiographics.rsna.jnl.org>)

[37]

### Příloha č. 2



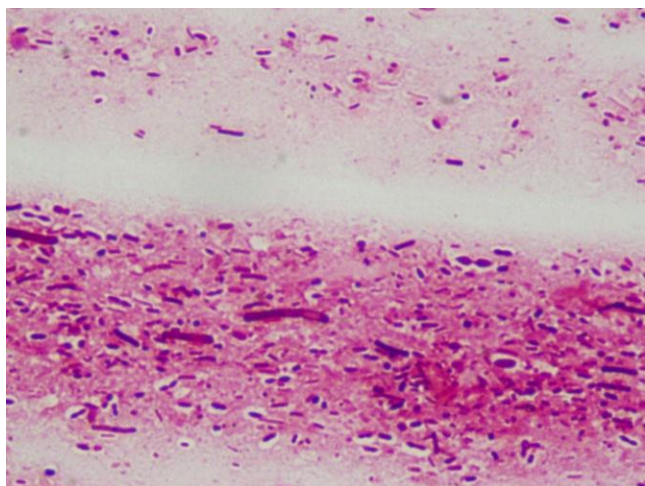
[Vlastní zdroj]

Příloha č. 3



[Vlastní zdroj]

Příloha č. 4



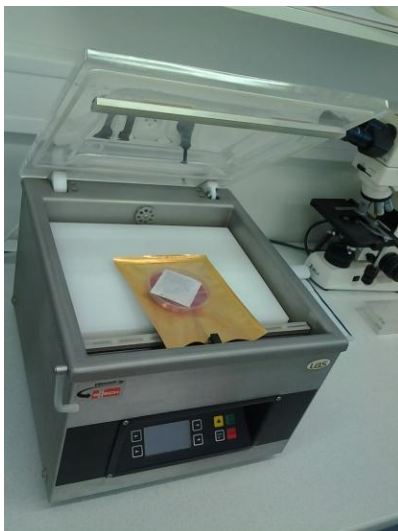
[Vlastní zdroj]

Příloha č. 5



[Vlastní zdroj]

Příloha č. 6



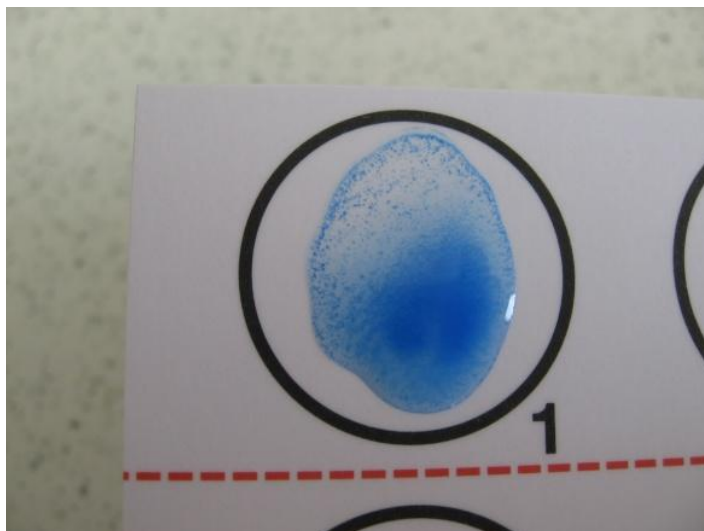
[Vlastní zdroj]

Příloha č. 7



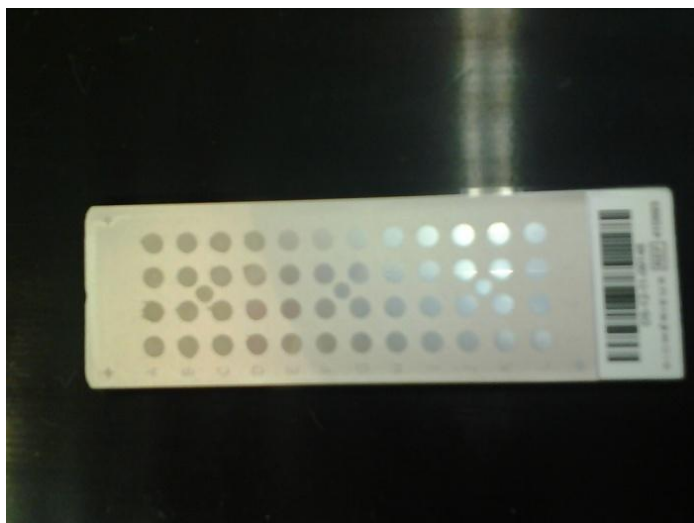
[Vlastní zdroj]

Příloha č. 8



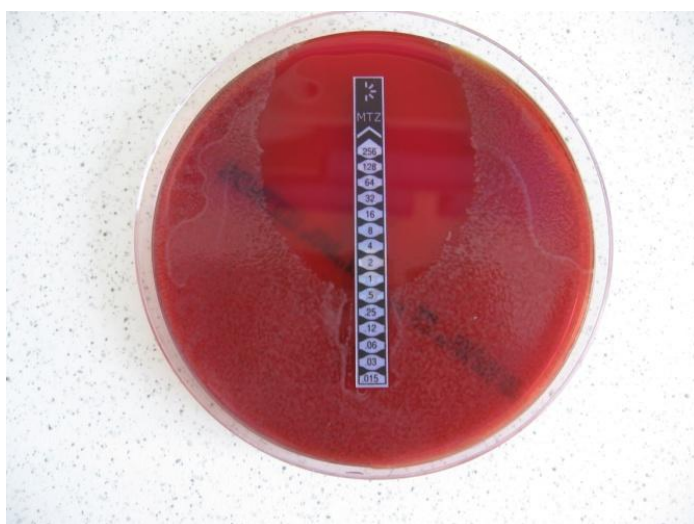
[Vlastní zdroj]

Příloha č. 9



[Vlastní zdroj]

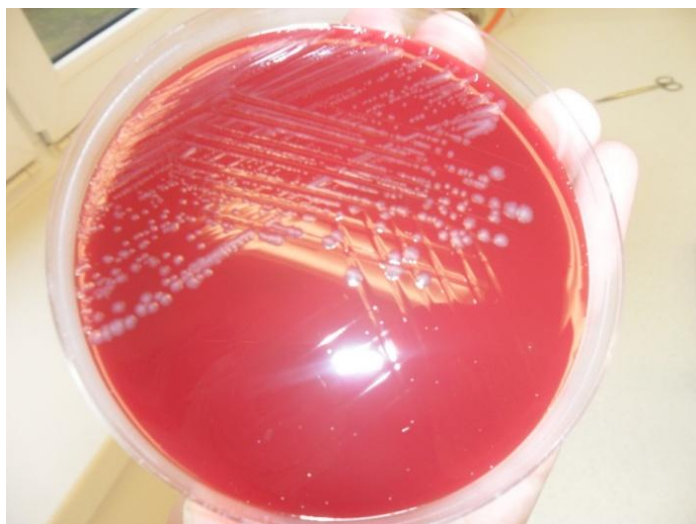
Příloha č. 10



[Vlastní zdroj]



Příloha č. 11



[Vlastní zdroj]