

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Diagnostika Clostridium difficile jako nozokomiální nákazy  
v Nemocnici České Budějovice a.s. pomocí molekulárně-biologických  
metod**

Bakalářská práce

Autor: Denisa Štěrbová

Vedoucí práce: doc. dr. Ing. Alexandr Popkov, CChem, MRSC, Ph.D.

Datum: 2. 5. 2012

Konzultanti: Mgr. Olga Dvořáčková

Ing. Natalja Piskunová, CSc.

## **Abstrakt**

Diagnostics of *Clostridium difficile* as nosocomial infections in Nemocnice ČB a.s. using methods of molecular biology.

Nosocomial infections caused by *Clostridium difficile* represent a substantial part of hospital-acquired infections in Czech hospitals. Intoxication by toxins produced by *Clostridium difficile* leads to serious damage to gastrointestinal tract and life of the patient may be in danger. The progress of intoxication could be quick, this is why reliable and time-efficient diagnostic methods are of great importance for efficient treatment of the patients. Bacterial toxins are not produced during the whole life cycle of *Clostridium difficile*. This is why it is better to detect bacterial DNA which is always present in the bacterial cells, not the toxins.

In Nemocnice ČB a.s. (České Budějovice municipal hospital) I compared methods based on toxins detection („hyplex® *ClosTox*“ and „hyplex® *ClosTox 027*“ by BAG Health Care) with a method based on DNA detection (real-time PCR „*Xpert C. Difficile*“ by Cepheid). I found out the real-time PCR method is much quicker. It takes one hour to prepare the samples and to obtain analytical result for this method. Both tests based on toxin detection are much more time consuming. It takes up to 5 hours to complete them. I conclude the real-time PCR is much quicker analytical method and it allows *Clostridium difficile* detection during all life phases of the bacteria.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Diagnostika Clostridium difficile jako nozokomiální nákazy v Nemocnici České Budějovice a.s. pomocí molekulárně-biologických metod 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 Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích.....

podpis studenta

### **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu v laboratoři molekulární biologie a genetiky (v Nemocnici ČB a.s.), především panu Mgr. Trubačovi a paní Ing. Piskunové za spolupráci a ochotu seznámit mě s chodem laboratoře a za umožnění výzkumu k mé bakalářské práci. Dále chci poděkovat mému vedoucímu a konzultantce paní Mgr. Dvořáčkové za čas, který mi byli ochotni obětovat.

## Obsah

Seznam zkratk	8
Úvod	9
1. Současný stav	11
1.1 Nozokomiální nákazy	11
1.1.1 Co považovat za nozokomiální infekci	11
1.1.2 Rizikové faktory pro vznik NN	12
1.1.3 Nejčastější původci NN	12
1.2 Rod Clostridium	13
1.2.1 Dělení klostridií	14
Neurotoxická klostridia	14
Histotoxická klostridia	16
Klostridia působící na střevní sliznici	16
1.3 Clostridium difficile	17
1.3.1 Charakteristika Clostridium difficile	17
Faktory virulence, mechanismus působení toxinů	18
1.4 Nemoci vyvolané Clostridium difficile	18
1.4.1 CDAD	18
1.4.2 Rizikové faktory k propuknutí CDAD	20
1.5 Léčba CDAD	20
1.5.1 Vankomycin	21
1.5.2 Metronidazol	21
1.5.3 Fidaxomicin (Dificlir)	22
1.5.4 Léčebné alternativy	22
Probiotika	22
Dárcovská stolice	23
Nový lék?	23
1.6 Preventivní opatření	23
1.6.1 Dezinfekce a hygiena rukou	23
Běžné mytí rukou	24

Hygienické mytí rukou .....	24
Chirurgické mytí rukou.....	24
1.6.2 Obecná pravidla prevence NN.....	25
1.7 Diagnostika .....	26
1.7.1 Imunochromatografie .....	26
1.7.2 Mikroskopický průkaz <i>Clostridium difficile</i> .....	27
Barvení dle Grama .....	27
1.7.3 Kultivace.....	27
1.7.4 EIA (ELISA) .....	28
1.7.5 PCR.....	28
Elektroforéza (ELFO).....	29
1.7.6 Kvantitativní real - time PCR.....	30
1.7.7 Endoskopické vyšetření.....	31
1.8 Výskyt infekce v letech 2005-2011.....	31
2. Cíl práce a hypotézy .....	32
2.1 Cíle práce .....	32
2.2 Hypotézy .....	32
3. Metodika .....	33
3.1 Struktura a vybavení laboratoře .....	33
3.1.1 Izolační místnost.....	33
3.1.2 Master mix.....	34
3.1.3 PCR místnost .....	35
3.1.4 ELFO .....	35
3.2 Postup při izolaci bakteriální DNA .....	35
3.3 Hplex® ClosTox .....	37
3.3.1 Princip testu .....	37
3.3.2 Reagencie .....	38
Obsah PCR modulů .....	38
Obsah hybridizačních modulů .....	38
3.3.3 Provedení.....	39

3.3.4	Hodnocení testu .....	42
3.4	GeneXpert systém .....	42
3.4.1	Postup zpracování vzorku.....	43
4.	Výsledky .....	45
4.1	Hodnocení výsledků Hyplex® ClosTox testu.....	45
4.2	Hodnocení výsledků GeneXpert systému .....	45
4.2.1	Pozitivní vzorek – přítomnost všech genů pro produkci toxinů.....	46
4.2.2	Pozitivní vzorek – přítomnost genu pro cytotoxin B.....	47
4.2.3	Negativní vzorek .....	48
5.	Diskuze .....	49
	Vysvětlivky k tabulce č. 5.....	52
6.	Závěr .....	54
7.	Seznam použitých zdrojů.....	55
8.	Klíčová slova .....	59
9.	Přílohy.....	60

## **Seznam zkratek**

MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

CDAD – *Clostridium difficile* – associated disease

NN – nozokomiální nákaza

ATB – antibiotikum

CRP – C- reaktivní protein

GIT – gastrointestinální trakt

MIC – minimální inhibiční koncentrace (bakteriostatická hodnota)

EIA – Enzyme Immuno Assay

ELFO – elektroforéza

CD – *Clostridium difficile*

PCR – polymerázová řetězová reakce

DNA – deoxyribonukleová kyselina

POD – konjugát-peroxidáza

UV světlo – ultrafialové světlo

RNA – ribonukleová kyselina

PBS pufr – fosfátový pufr



## Úvod

Téma mé bakalářské práce - Diagnostika *Clostridium difficile* jako nozokomiální nákazy v Nemocnici České Budějovice a.s. pomocí molekulárně-biologických metod jsem si zvolila sama, za pomoci svého vedoucího. Jedním z důvodů této volby bylo, že mě lákalo vrátit se zpět do prostředí laboratoří, a pak také to, že se jedná o téma aktuální, a ráda bych zvýšila informovanost o této problematice.

Pokud se řekne nozokomiální nákaza, většině lidí se vybaví typický patogen methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) označovaný též jako „zlatý stafylokok“. Málo kdo už ale ví, že právě *Clostridium difficile* je řazeno na první příčky původců nozokomiálních nákaz. Střevní onemocnění způsobené produkcí toxinů této bakterie se označuje jako *C. difficile* – associated disease (CDAD). Způsobuje komplikace především u hospitalizovaných pacientů s předchozí antibiotickou léčbou a u imunosupresovaných osob. Jeho šíření je usnadněné způsobem přenosu, který je fekálně orální cestou. Příznaky ne vždy směřují k typickým projevům onemocnění, proto je důležitá jeho včasná diagnostika, která mnohdy bývá komplikovaná. A právě k ní se moje práce ubírá. Je zaměřena na detekci toxinů, případně genů pro produkci toxinů *Clostridium difficile*, které ale nejsou produkovány neustále, ale pouze za určitých pro bakterii výhodných podmínek. Proto je v diagnostice vhodné použít kombinaci různých testů, popřípadě výsledek ověřit kultivací. Je možné použít metod bakteriologických a molekulárně biologických. Rozdíl mezi nimi je, že bakteriologické metody detekují přítomnost toxinů nebo samotný patogen. Ty na molekulární úrovni se zaměřují na přítomnost genů pro daný toxin.

V práci jsem se zaměřila na metody molekulárně biologické, používané v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. Jedná se o metody, které prokážou na základě přítomnosti genu pro produkci toxinu toxigenní *Clostridium difficile*, i v době, kdy nedochází k vylučování toxinů do organismu. U těchto metod jsem se zaměřila na jejich citlivost a hlavně časovou dostupnost výsledků. Právě ta je v mnoha případech klíčovou pro zahájení účinné terapie. Výsledkem by

mělo být nalezení optimální metody, která poskytne spolehlivé výsledky v co nejpříjemnějším čase.

## 1. Současný stav

### 1.1 Nozokomiální nákazy

Nozokomiální nákazy (NN) jsou stále nežádoucími komplikacemi hospitalizace a zdravotní péče. Tyto infekce nepředstavují jen závažný zdravotní problém, ale i ekonomický. Výrazně se zvyšují náklady na léčbu, hospitalizaci a prodlužuje se pracovní neschopnost. Většina nemocnic si tento problém uvědomuje, proto na prevenci NN kladou neustále větší důraz. Ve většině případů postihují organismus oslabený primárním onemocněním a mohou být komplikací chirurgického, diagnostického nebo terapeutického výkonu. Jejich vznik je spojován s léčebnými, diagnostickými a ošetrovatelskými postupy. Mezi nejrizikovější skupinu osob patří děti do 3 let věku a osoby starší 60 let. (9) Základní legislativou, upravující tuto problematiku je zákon č. 258/2000 Sb. Ve druhém odstavci § 16 stojí, že: *„osoba poskytující péči je povinna evidovat každou nemocniční nákazu a na vyžádání poskytovat údaje o ní příslušnému orgánu ochrany veřejného zdraví.“* (33)

Základem prevence vzniku nemocničních nákaz je dodržování bariérových postupů a především *vyhlášky MZ č. 195/2005 Sb.*, kterou se upravují podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění. (33) Jejím obsahem jsou postupy dezinfekce a sterilizace a jejich kontroly nebo používání ochranných pomůcek, nakládání s odpadem, manipulace s prádlem, dodržování hygieny rukou a používání jednorázového materiálu. Jedná se o složitý proces, který vyžaduje především zodpovědný přístup personálu. Tato vyhláška také upravuje v § 2 postup při hlášení nemocničních nákaz. (41) K zajištění povinného hlášení a evidenci infekčních onemocnění slouží program EPIDAT. (22, 9)

#### 1.1.1 Co považovat za nozokomiální infekci

Jedná se o infekci vzniklou v souvislosti s poskytováním ambulantní, nemocniční nebo následné péče. Zároveň musíme vyloučit, že infekce nebyla přítomna při příchodu pacienta do zdravotnického zařízení, ani v inkubační době. Za nozokomiální infekci je považováno také onemocnění, u kterého se příznaky objeví až po propuštění ze zdravotnického zařízení a to u nemocí s dlouhou inkubační dobou,

jako je například hepatitida typu B. Jako nejčastější způsob přenosu NN se uvádí přenos kontaminovanými rukama personálu. Dalšími možnostmi přenosu jsou přenos kontaminovanými předměty, přímým kontaktem s nakaženou osobou, kontaminovanou vodou, potravinami ale i vzduchem. (9)

Rozlišujeme nákazy endogenního a exogenního původu. Nákazy endogenního původu jsou způsobeny mikroorganismy, které běžně najdeme v organismu, tj. jsou součástí normální mikroflóry. U zdravého člověka nezpůsobují žádné problémy, ale pokud dojde k oslabení imunitního systému a vzplanutí onemocnění. Takovéto mikroorganismy označujeme jako oportunní. Prevencí těchto nákaz je správná antibiotická terapie založená na znalosti výskytu rezistence a výsledcích kultivace. U exogenních infekcí existují daleko větší možnosti preventivních opatření. Patří sem zejména dodržování hygienicko – epidemiologických opatření. To je povinností veškerého zdravotnického personálu. Jakékoli zanedbání či neznalost preventivních postupů představuje závažné riziko ohrožení zdraví a života pacienta. (22)

### **1.1.2 Rizikové faktory pro vznik NN**

Rizikovými pacienty jsou zejména lidé nad 65 let. Je to dáno zhoršeným hojením ran, které trvá podstatně delší dobu, a také oslabeným imunitním systémem. U lidí vyššího věku se často vyskytují přidružená onemocnění, jako je diabetes mellitus nebo nemoci krevního oběhu, které jsou také predispozičním faktorem. Další rizikovou skupinou představují nedonošené děti, u kterých může dojít k nákaze v inkubátoru. Vysoce ohroženi jsou také onkologičtí pacienti díky oslabenému imunitnímu systému a citlivosti k oportunním patogenům. Mezi další rizikové faktory vnitřního původu patří: životní styl, obezita, malnutrice, polytraumata, popáleniny nebo hematologická onemocnění. Z faktorů zevního původu uveďme například: operace, transplantace, zavádění sond a žilních katetrů nebo léčba cytostatiky, antibiotiky či ozařování. (22)

### **1.1.3 Nejčastější původci NN**

Vůbec nejčastějším nozokomiálním patogenem je *Stafylococcus aureus*, jedná se o multirezistentní kmen, označovaný jako MRSA. Tento „zlatý“ stafylokok způsobuje hlavně infekce otevřených ran a je rezistentní k methicilinu. Označení „zlatý“ získal

díky nažloutlé barvě kolonií, které vytváří na krevním agaru. Jeho přítomnost signalizuje nedostatečnou dezinfekci. Dalšími častými původci jsou patogeny, vyvolávající průjmy. Sem patří jak bakterie (*Clostridium difficile*), tak i viry (rotaviry). Dále se objevují infekce močových cest, kdy velké riziko představuje zavedení močového katetru (bakterie *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Nozokomiální infekce mohou postihnout prakticky jakýkoli systém, ale nejčastější případy NN jsou infekce močové, ranné, respirační, kožní a infekce krevního řečiště. (9)

## 1.2 Rod *Clostridium*

Jedná se o skupinu grampozitivních anaerobních bakterií, schopných vytvářet spory. Vegetativní formy mají tvar robustních tyčinek. Díky přítomnosti bičíku, jich je většina pohyblivá. Většinou se jedná o saprofyty, jen několik málo druhů vyvolává onemocnění u člověka a zvířat. Jedná se o bakterie produkující exotoxiny, a onemocnění jimi vyvolaná bývají obvykle závažná, často smrtelná. Spory, jsou klidová stadia klostridií, která neumožňují množení. Umožňují ale odolávat vlivu nepříznivých podmínek jako jsou vyschnutí, záření nebo dezinfekční prostředky. Sporulace probíhá uvnitř vegetativní formy, a to v několika stádiích.

Klostridiové infekce mohou být endogenního i exogenního původu. Exogenní infekce vznikají nejčastěji při úrazech, kdy jsou spory klostridií do rány zavlčeny společně s prachovými částicemi. Další exogenní infekcí jsou potravinové otravy. Endogenním zdrojem je přirozená střevní mikroflóra, jejíž běžnou součástí jsou zejména u novorozenců i klostridia. Při jejím oslabení například: antibiotickou léčbou, dochází k rozvoji infekce. (5)

Na povrchu vegetativních forem klostridií se vyskytuje značné množství antigenů, které umožňují sérologické dělení klostridií a jejich identifikaci. Jak už bylo uvedeno, jsou klostridia velmi citlivá na kyslík. V jeho přítomnosti nedochází k množení. Tato citlivost je dána absencí enzymu katalázy, cytochromů a některých dalších enzymů, většinou i peroxidázy. Meziprodukty, vznikající při metabolismu nemohou být rozloženy a bakterii jednoduše otráví. Citlivost na kyslík závisí na druhu klostridia. Některé jsou striktně anaerobní (*Clostridium haemolyticum*), některé snášejí

nižší koncentraci kyslíku (*C. perfringens*). Energií získávají anaerobní glykolýzou – fermentací různých substrátů. Produkty metabolismu klostridií jsou rozmanité a některé lze využít pro jejich identifikaci ( $H_2S$ ,  $NH_4$ ). Charakteristickým znakem pro klostridia je rezistence vůči aminoglykosidovým antibiotikům (ATB). Naopak k beta-laktamovým ATB jsou všechny druhy klostridií citlivé. K léčbě infekcí je často používán clindamycin nebo vankomycin. (39)

### 1.2.1 Dělení klostridií

Klostridia lze rozdělit do tří skupin, podle toho kde a jaké onemocnění vyvolávají. Jedná se o neurointoxikace, nekrotizující toxikoinfekce a postižení střevního traktu. (18)

#### Neurotoxická klostridia

Mezi neurotoxická klostridia patří *Clostridium botulinum*, vyskytující se v půdě. Jeho výskyt ve střevě člověka je vzácný. Výjimkou je novorozenecký botulismus, kdy jsou klostridia přítomna ve střevě. Jedná se o skupinu klostridií, která produkuje botulotoxin, vyskytující se v 7 antigenických typech (A – G). Botulotoxin se vyskytuje ve sporách a je uvolňován při rozpadu buněk. Nejčastější intoxikace pochází z podomácky vyráběných konzerv, které byly nedostatečně sterilovány. Jedná se jak o zeleninové konzervy (výskyt toxinu A), tak o masové (obsahující toxin B). Smrtelná dávka toxinu pro člověka je  $6 \times 10^{-8}$  g. Jedná o nejsilnější známý bakteriální toxin vůbec. Má paralytický účinek, způsobuje hlavně paralýzu příčně pruhovaných svalů. Jeho využití se uplatnilo i v kosmetice, slouží k vyhlazování vrásek. Dále se využívá k terapeutickým účelům u nemocí s výskytem abnormálního svalového tonu. Existují tři formy botulismu. Jedná se o ranný botulismus, způsobený kontaminací rány, který se často vyskytuje u narkomanů. Další forma je alimentární, která vzniká požitím jedu v potravě, a posledním druhem je kojenecký botulismus. Objevuje se hlavně u kojenců živěných umělou výživou, do 6 měsíců věku. (39)

Onemocnění probíhá různě. Od velmi mírné intoxikace, kdy není třeba lékařská pomoc, až po stavy, končící smrtí. Projevy otravy jsou zpočátku gastrointestinálního

původu, později dochází k postižení nervů. Objevuje rozostřené až dvojité vidění, zácpa z důvodu zástavy střevní peristaltiky, později zástava močení. Později dojde k postižení dalších příčně pruhovaných svalů, nebezpečná je zástava dýchání z důvodu ochrnutí dýchacích svalů. Vědomí je při tom zachováno. Pokud pacient přežije, dochází k úplnému napravení stavu. Inkubační doba je udávána řádově v hodinách až dnech. Průkaz spočívá v průkazu toxinu na myších. Pokud jsou k dispozici zbytky jídla, provádí se kultivace. (39)

*Clostridium tetani* způsobuje produkcí svého toxinu onemocnění *tetanus*. Postižen je neuromuskulární systém. *Clostridium tetani* se běžně vyskytuje ve střevě savců, hlavně koní. S jejich výkaly se potom dostává do půdy, kde přežívá ve formě spor. Odtud se infekce dostává k člověku infikováním rány. Rány bývají obvykle hluboké a znečištěné. Příznivé podmínky pro tetanický toxin vytváří také rány zhmožděné (dekubity), nebo přítomnost cizího tělesa. „*Tetanus je onemocnění charakterizované tonickými i klonickými křečemi kosterního svalstva.*“ (5) Projevy onemocnění jsou spasmy, lokalizované nejdříve v obličejové části (sardonický úsměv), později postihují ostatní kosterní svalstvo a z něj nejdříve svaly zádové. Typickým projevem je lukovité prohnutí těla – *opisthotonus*. Prodělané onemocnění nezanechává imunitu. Inkubační doba se nejčastěji pohybuje okolo týdne. Čím kratší je, tím je horší prognóza onemocnění. Jelikož je dostupné očkování, snížil se výskyt v ČR na 2-3 případy ročně. Smrtnost je poměrně vysoká, pohybuje se mezi 10 až 50 %. Horší prognóza je u novorozeneckého tetanu a u starších lidí. Léčba může být specifická nebo nespecifická. Specifická spočívá v opakovaném podávání antitetanického imunoglobulinu. Nespecifická zahrnuje chirurgickou revizi rány, dostatečné ošetření a podporu dýchání. Léčba penicilinem slouží jako podpůrná terapie. (5)

Diagnostika *Clostridia tetani* spočívá v posouzení klinického obrazu a anamnézy. Mikrobiologicky lze vyšetřit vzorek materiálu odebraný z rány excisí nebo seškrábnutím. Tento materiál se prokazuje mikroskopicky po obarvení dle Grama a déle kultivací. Průkaz tetanického toxinu se provádí pokusem na myších. (5)

## **Histotoxická klostridia**

Infekce vyvolané histotoxickými klostridii se projevují jako toxikoinfekce měkkých tkání a jako průjmová onemocnění.

Nejtěžší formou toxikoinfekce měkkých tkání je plynatá sněť nebo také myonekróza. Nejčastějším původcem je *Clostridium perfringens*. Proces probíhá v živém svalu, kde se vytvoří lokální nekróza, do které pronikají klostridia, množí se a produkují toxin. Místem vstupu jsou hluboké rány a otevřené zlomeniny. Proces se může dále šířit krevní nebo lymfatickou cestou do celého těla. Dochází k celkové intoxikaci organismu a sepsi. Generalizace se vyskytuje v přítomnosti invazivních druhů (*Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*). Vznikající zánětlivý exsudát a otok je příčinou ztráty velkého množství tekutin a bílkovin. V krevním obraze dochází ke vzniku anémie a hemoglobinémie. Vzhled exsudátu se liší podle druhu klostridia. V případě *Clostridia perfringens* je exsudát nahnědlý a řidší, u *Clostridia septicum* má hemoragický vzhled. Dalšími původci těchto toxikoinfekcí mohou být *C. novyi*, *C. sordellii* nebo *C. histolyticum*. Smrtnost se pohybuje kolem 20-25%. (5)

## **Klostridia působící na střevní sliznici**

Do této skupiny můžeme zařadit již zmiňované *Clostridium perfringens*. Po požití masa kontaminovaného sporami dochází ke vzniku enterotoxikémie, která často končí smrtí. Dalším onemocněním vyvolaným enterotoxiny je otrava z potravin, která se projevuje prudkými průjmy a bolestmi břicha. Toto onemocnění se vyskytuje hromadně, např.: ve veřejném stravování (jidelny apod.). Dalším zástupcem, patřícím do této skupiny je *Clostridium difficile*. To způsobuje průjmová onemocnění vyvolané toxinem A, nebo závažnější pseudomembranózní enterokolitidu. Ta je často dávana do souvislosti s antibiotickou léčbou, kdy dochází k potlačení přirozené střevní mikroflóry. Průjmy vyvolané *Clostridiem difficile* jsou také nežádoucími, v mnoha případech život ohrožujícími komplikacemi hospitalizovaných pacientů. (5)



## 1.3 Clostridium difficile

### 1.3.1 Charakteristika Clostridium difficile

První zmínka o této bakterii pochází z roku 1935, kdy byla popsána jako součást normální střevní flóry novorozenců. V 70. letech byla tato bakterie popsána jako původce pseudomembranózní kolitidy. (20) Jedná se o gram-pozitivní, tyčinkovitou, obtížněji kultivovatelnou bakterii (odtud název *difficile*) se schopností vytvářet spory. (příloha č. 2) Spory jsou klidová stadia bakterií, v nichž nedochází k jejich množení, ani k produkci toxinů. Jsou schopny přežívat na různých materiálech 5 až 6 měsíců. Zároveň jsou odolné vůči běžným dezinfekčním prostředkům, obsahujícím alkohol. Podstatné také je, že se tato bakterie vyskytuje i ve střevech zdravé populace. U dospělých se výskyt pohybuje okolo 5%, zvláštní rizikovou skupinu představují novorozenci, hlavně nedonošení, u kterých je výskyt podstatně vyšší. (37) Problematika *Clostridium difficile* je v posledních 10 letech hodně diskutovaným problémem. Se stoupajícím výskytem, stoupá i zájem o tuto problematiku. Jako původce nozokomiálních infekcí se *Clostridium difficile* dostalo na přední příčky. Podle posledních studií z USA předstihlo i infekce vyvolané MRSA. (28) Infekce vyvolané bakterií *Clostridium difficile* jsou zánětlivá onemocnění střeva, označované jako CDAD (*Clostridium difficile* associated diseases) a v současnosti patří k častým komplikacím hospitalizovaných pacientů. Dříve byl jejich výskyt spíše sporadický. Ke změně došlo s objevením hypervirulentního kmene CD ribotyp 027. Ten vyvolal rozsáhlé epidemie v USA, Kanadě a státech západní Evropy. Projevy onemocnění jsou různé. Patří sem průjemy a v nejtěžších případech dochází k rozvoji pseudomembranózní enterokolitidy, která může vést až k perforaci střeva. Rizikovou skupinou jsou pacienti, kteří jsou dlouhodobě léčeni antibiotiky, nebo dlouhodobě hospitalizováni. V nemocničním prostředí je umožněno delší přežívání spor, zejména díky jejich odolnosti vůči dezinfekčním prostředkům. Klostridia se dále mohou šířit rukama zdravotnického personálu, společným hygienickým zařízením apod. Postantibiotický průjem je až z ¼ způsoben právě touto bakterií. Nejrizikovější skupinou ATB jsou širokospektré peniciliny a cefalosporiny. Mezi další antibiotika dávaná do souvislosti s rozvojem CDAD patří linkosamidy a fluorochinolony. (28, 33, 10, 42)

## **Faktory virulence, mechanismus působení toxinů**

Hlavním faktorem virulence je produkce exotoxinů. Jedná se o enterotoxin A a cytotoxin B. Ne všechny kmeny jsou však schopny produkovat tyto toxiny. Toxin A se zachytí na receptory střevních buněk, dojde k jejich poškození a uvolnění velkého množství tekutiny. Cytotoxin B, jak už plyne z názvu ničí buňky, které primárně poškodil toxin A. Tím dochází k poškození střevní sliznice, na které vznikají nekrotická ložiska a pseudomembrány složené ze zničených buněk střevní sliznice, mucinu a fibrinu a uhynulých polymorfonukleárů. To se na střevní sliznici projeví tvorbou žlutých krust, které můžeme endoskopicky detekovat. V horším případě může tento stav vést k perforaci střeva. Infekce vyvolané toxiny se označují jako CDAD. Aby ale k takové infekci došlo, je zapotřebí, aby v místě usídlení bakterie byly zajištěny podmínky pro vyklíčení spor, množení bakterie a tvorbu toxinů. (10, 37) Způsob přenosu infekce je fekálně-orální cestou. Avšak většina vegetativních buněk *Clostridium difficile* je zničena už v žaludku (díky kyselému pH) a do tenkého střeva se dostane jen 1%. Toto ale naplatí pro spory, které jsou acidorezistentní, proto je kyselé pH v žaludku nezničí. Ty se dostanou dále do tenkého střeva, kde tzv. „vyklíčí“ do vegetativních forem. (20)

Některé kmeny bakterií produkují navíc tzv. binární toxin. „*Role binárního toxinu na průběh onemocnění není zatím zcela vyjasněna. Kmeny produkující tento toxin jsou sice provázány těžším průběhem onemocnění, ale kmeny s negativním toxinem A a B a pozitivním binárním toxinem se jeví jako nepatogenní.*“ (14) Tento toxin je mimo jiné produkován také hypervirulentním kmenem, označovaným jako ribotyp 027. (14)

## **1.4 Nemoci vyvolané *Clostridium difficile***

### **1.4.1 CDAD**

Hlavním predispozičním faktorem je expozice ATB 1 až 8 týdnů před vznikem onemocnění. Antibiotickou léčbou dochází k rozvratu přirozené střevní mikroflóry, která za normálních okolností brání množení *Clostridia difficile*. Vytvoří se příznivé podmínky pro vyklíčení spor do vegetativních forem, které začnou produkovat toxiny.

Způsob přenosu se děje fekálně orální cestou. Tím je způsobeno poměrně snadné šíření v nemocničním prostředí, přes kontaminované předměty, sociální zařízení a při nedostatečné dezinfekci také prostřednictvím rukou personálu. Typickým projevem je čtveřice příznaků: průjem, bolesti břicha, horečka a leukocytóza přes  $20 \times 10^9$ / litr. Průjem je definován jako: „*časté vyprazdňování, tj. více než 3 krát denně, řídké nebo vodnaté stolice, v množství větším než 250g/den.*“ (11) Stolice je kašovitá až vodnatá, může obsahovat příměs hlenu nebo krve. Často bývá vylučována v malém množství, proto může být zaměněna u starších lidí za inkontinenci. (15, 20, 37)

Dalším laboratorním nálezem je neutrofilie s posunem doleva a také hodnota C-reaktivního proteinu (CRP) bývá mírně zvýšena. CRP je bílkovina akutního zánětu, jejíž hladina v krvi se zvyšuje v přítomnosti zánětlivého onemocnění. Ve skutečnosti bývá klinický obraz různorodý. Od mírných projevů průjmu, až po stavy život ohrožující, jako je pseudomembranózní enterokolitida. Další komplikací může být vznik subileu až ileu s možností tvorby toxického megakolon a perforací střeva. Tento průběh onemocnění se označuje jako fulminantní a vyskytuje se zhruba ve 3 % případů. (14) Vyznačuje se vysokou mortalitou. Jedná se při tom o skupinu nejvíce ohrožených osob, kterou tvoří starší osoby a imunosupresovaní jedinci. (20, 14)

Další možností je atypický průběh. To znamená, že příznaky jednoznačně neukazují na CDAD. Stolice bývá pouze řidší, může se objevit nadýmání (meteorismus), dyspepsie, různá intenzita bolestí břicha a v některých případech zvracení nebo enteroragie. „*Podle nových poznatků 10 – 20% pacientů nemá v anamnéze užívání antibiotik.*“ (20)

U tohoto onemocnění dochází poměrně často k relapsům. „*Relaps je definován jako znovuobjevení se příznaků a průkaz infekce v průběhu dvou měsíců od úspěšné terapie.*“ (20) Relaps je zde uváděn do souvislosti s postupným dozráváním spor, které jsou obsaženy ve střevě. (20)

### 1.4.2 Rizikové faktory k propuknutí CDAD

Jak už bylo uvedeno, normální střevní flóra je proti kolonizaci CD odolná, proto je k propuknutí infekce nezbytné její narušení. Proto jsou za hlavní rizikový faktor považována antibiotika, které vedou k jejímu narušení. V současné době jsou mezi nejvíce rizikové řazeny: fluorochinolony, klindanycin a zástupci II. a III. generace cefalosporinů. (25) Dalším rizikovým faktorem je hospitalizace pacienta. Riziko vyplývá ze schopnosti spor přežít v nemocničním prostředí i několik měsíců. Dalším rizikem je přenos prostřednictvím rukou zdravotnického personálu. Dále sem patří oslabení imunitního systému. Jako příklad můžeme uvést onkologické pacienty, pacienty trpící malnutricí nebo ulcerózní kolitidou. Nově tvoří rizikovou skupinu také těhotné ženy v důsledku snížené motility střev. Významnou roli hraje také věk pacientů, chirurgie gastrointestinálního traktu (GIT) a další, viz tabulka č. 1. (14, 20, 25)

**Tabulka 1: Další rizikové faktory CDAD**

Hlavní rizikové faktory	Vedlejší rizikové faktory
dlouhodobá hospitalizace	chirurgie GIT
věk nad 60 let	endoskopické vyšetření GIT
imunosuprese	současná přítomnost více chorob (polymorbidita)
malnutrice	nasogastrická sonda
ulcerózní kolitida	změkčovadla stolice
hemodialýza	antacida
maligní nádory	nově - těhotenství

Zdroj: (14, 20)

### 1.5 Léčba CDAD

Léčba musí být komplexní. Spočívá ve vysazení antibiotika, jímž byl pacient léčen. Dalším krokem je doplnění tekutin a minerálů, k jejichž ztrátám došlo při průjmech. Jelikož mnoho kmenů *Clostridium difficile* vykazuje rezistenci vůči některým druhům ATB, základními léky pro léčbu CDAD jsou vankomycin a metronidazol. Antibiotická rezistence bakteriálních kmenů a jejich šíření představuje globální

problém, vyžadující mezinárodní spolupráci. Proto byla v roce 1993 sestavena pracovní skupina pro monitorování antibiotické rezistence (PSMR). „*Náplní práce je národní surveillance ATB rezistence a účast v Evropském projektu surveillance ATB rezistence.*“ (36) U nás došlo v 90. letech k vzestupu spotřeby ATB o  $\frac{1}{4}$  a tato hodnota nadále přetrvává. Důsledkem nadužívání antibiotik je zvýšený výskyt antibiotické rezistence u bakterií vyvolávajících infekční onemocnění jak v komunitě, tak v nemocnicích. Se zveřejňováním informací o zbytečném podávání antibiotik a stoupajícím výskytu rezistentních kmenů došlo po roce 2002 ke snížení spotřeby 5 nejčastěji užívaných skupin ATB. (36)

### **1.5.1 Vankomycin**

Vankomycin je optimálním lékem při perorálním podávání. Téměř se nevstřebává a dosahuje tak vysoké koncentrace ve stolici. Naopak při parenterálním podání je neefektivní. Pro léčbu CDAD musí být tedy aplikován perorálně, nazogastrickou sondou nebo v krajních případech do konečníku. „*Takto se dosáhne koncentrací ve stolici, které mnohonásobně převyšují MIC citlivých kmenů CD.*“ (25) Standardně doporučené dávkování je 125 mg po šesti hodinách. Délka léčby se pohybuje v rozmezí 10 – 14 dnů. (25, 14)

### **1.5.2 Metronidazol**

Při perorálním podání dochází k jeho kompletnímu vstřebání, ale jeho aktivní metabolity jsou v 6-15% zpětně vylučovány do stolice. Při intravenózním podání najdeme ve stolici přibližně stejné koncentrace jako u perorálního podání. Dávkování se uvádí 500 mg per os, nebo i. v. po 8 hodinách, u těžkých infekcí po 6 hodinách i v kombinaci s vankomycinem. Nástup účinků se uvádí o něco pomalejší než u vankomycinu. Délka podávání je stejná jako v případě vankomycinu. (25, 14)

V léčbě komplikovaných CDAD je v současné době upřednostňován vankomycin. Je uváděna jeho vyšší citlivost u závažných případů. Komplikovaná CDAD není přesně definována. Jsou ale stanoveny významné faktory pro vznik CDAD, a pokud jsou přítomny alespoň dva nebo se jedná o pseudomembranózní kolitidu, je lékem volby právě vankomycin. Mezi tyto faktory patří:

- věk nad 60 let
- horečka > 38.3°C
- hladina albuminu < 25g/l
- leukocyty > 15000/mm<sup>3</sup>

Metronidazol je nadále používán u lehčích forem.

Dalšími antibiotiky, která přicházejí v léčbě CDAD v úvahu, jsou např.: rifampicin (případně jeho aktivní metabolit rifaximin) nebo nitazoxanid. (25)

### 1.5.3 Fidaxomicin (Dificlir)

V Evropské unii byl nedávno registrován nový lék pro léčbu průjmů souvisejících s *Clostridium difficile* – Fidaxomicin (obchodní název Dificlir). Jedná se o makrocyclické antibiotikum s úzkým spektrem účinnosti na gram-pozitivní bakterie. Na rozdíl od vankomycinu výrazně snižuje četnost recidiv a nežádoucích systémových účinků. Při jeho používání navíc dochází jen k minimálnímu narušení střevní mikroflóry. (21)

### 1.5.4 Léčebné alternativy

I když jsou antibiotika ve většině případů účinná, problémem jsou případy opakujících se infekcí. Proto se neustále hledají nové možnosti jak předejít vzniku onemocnění, jeho opětovnému návratu a dosažení rychlejšího uzdravení.

### Probiotika

O probioticích je delší dobu známo, že pozitivně působí na složení bakteriální mikroflóry ve střevě. Jsou proto používána v prevenci různých průjmových onemocnění a trávicích potížích. Zároveň zmírňují nežádoucí účinky antibiotik. (29) Ukázalo se, že se mohou uplatnit i v prevenci postantibiotických průjmů vyvolaných bakterií *Clostridium difficile*. V souvislosti s CDAD jsou nejčastěji uváděny *Saccharomyces boulardii* a některé druhy laktobacilů. (25) Na druhé straně připadá v úvahu i možné ohrožení pacientů bakteriemií (laktobacily) nebo fungémií (*Saccharomyces boulardii*). (14)

## **Dárcovská stolice**

Jedná se o transplantaci stolice od zdravého příbuzného dárce nazogastrickou sondou nebo kolonoskopem jako prevence vzniku recidiv. Efekt této metody se uplatnil jen u malého množství pacientů. Vzhledem k možnému riziku zanesení infekce a také z etických důvodů se tato metoda příliš nedoporučuje. (14)

## **Nový lék?**

Vědci na základě laboratorních studií prováděných na myších zjistili, že lidské střevní buňky jsou schopny po infekci bakterií *Clostridium difficile* produkovat molekuly, neutralizující toxiny CD. Při testech na zvířatech bylo zjištěno, že po použití léku, který vede k vyvolání procesu proteinové s-nitrosylace se toxiny stávají neškodnými. Další klinické studie budou zaměřeny na možnosti použití tohoto léku na lidech. Jejich potvrzení by znamenalo objevení nového léčebného přístupu tohoto závažného průjmového onemocnění. (31)

## **1.6 Preventivní opatření**

Cílem těchto opatření je zamezení vzniku infekčního onemocnění a jeho dalšímu šíření. Jedná se o hygienická a protiepidemická opatření zaměřená na eliminaci zdroje. Zahrnují celou řadu postupů. Jedním z nich je dezinfekce (podlahy, ploch, ruce personálu, WC, umyvadla, vany). Jedná se o „*soubor opatření ke zneškodňování mikroorganismů pomocí fyzikálních, chemických nebo kombinovaných postupů, které mají přerušit cestu nákazy od zdroje k vnímavé fyzické osobě.*“ (26) Dalším ochranným postupem je dekontaminace – „*soubor opatření vedoucích k usmrcení anebo odstranění mikroorganismů z prostředí a předmětů bez ohledu na stupeň snížení počtu zárodků.*“ (26) „*Sterilizace představuje zničení všech forem mikroorganismů, včetně spór, protozoí, helmintů a reverzibilní inaktivace virů.*“ (9) Způsoby provedení jsou: horkou parou, horkým vzduchem, plazmou, radiací nebo chemickými látkami. (13)

### **1.6.1 Dezinfekce a hygiena rukou**

Dezinfekce a hygiena rukou hrají významnou roli hlavně u infekcí přenášených fekálně orální cestou. Jejím dodržováním se významně snižuje pravděpodobnost

přenosu infekce, přitom náklady na její provoz jsou zanedbatelné. Existuje 5 situací, kdy hygienu rukou provádět:

1. *před kontaktem s pacientem*
2. *před aseptickými výkony*
3. *po manipulaci s rizikovými tělními tekutinami*
4. *po kontaktu s pacientem*
5. *po kontaktu s prostředím pacienta*

Zdroj: (13)

V praxi se rozlišuje *běžné mytí rukou*, s použitím mýdla, dále *hygienické mytí rukou* (mýdlo + použití dezinfekčního přípravku) a *chirurgické mytí rukou* (před chirurgickým zákrokem). (9)

### **Běžné mytí rukou**

Cílem běžného mytí rukou je odstranění mechanických nečistot z pokožky zejména u viditelně znečištěných rukou, po potřísnění biologickým materiálem, po smrkání apod. Používá se nejčastěji tekuté mýdlo a tekoucí voda. Proces by měl trvat nejméně 30 sekund. K vysoušení se používá jednorázových utěrek, popřípadě elektrických vysoušečů. (38)

### **Hygienické mytí rukou**

Slouží k odstranění nečistot a přechodné mikroflóry z pokožky za použití mycího a dezinfekčního prostředku. Dezinfekční prostředek je na alkoholové bázi. Po důkladném umytí a osušení rukou se vetře dezinfekční prostředek. Pokud by byly ruce vlhké, došlo by k naředění prostředku a omezení jeho účinnosti. (38, 27)

### **Chirurgické mytí rukou**

Zahrnuje mechanické mytí rukou a chirurgickou dezinfekci rukou. Mechanické mytí slouží k odstranění nečistot a přechodné mikroflóry z rukou a předloktí. Používá se tekuté mýdlo a tekoucí teplá voda. Proces by měl trvat alespoň 1 minutu. K odstranění nečistot z okolí nehtů použijeme kartáček. Po osušení jednorázovými utěrkami se



aplikuje alkoholový dezinfekční prostředek, určený pro chirurgickou dezinfekci rukou. Vždy se aplikuje z bezdotykového dávkovače. Důkladně a rovnoměrně se rozetře v oblasti rukou a zápěstí a nechá se zcela zaschnout. (38)

### 1.6.2 Obecná pravidla prevence NN

Existuje i několik obecných pravidel prevence nozokomiálních nákaz. Pro pacienta s infekčním onemocněním zajistit podle druhu nebo způsobu přenosu jeho izolované umístění. Na izolačním pokoji zabránit pohybu nadbytečných osob (medici apod.). Dále pro zdravotnický personál platí dodržování osobní hygieny a to především hygieny rukou. K utírání používat jednorázové utěrky ze zásobníků. Na rukou mít čisté, upravené nehty tak, aby nepřesahovaly bříško prstu (umělé nehty nejsou povoleny). Používat osobní ochranné pracovní pomůcky a pracovní oděv podle oddělení. Dodržovat zásady manipulace s biologickým materiálem, s prádlem a se stravou. Oddělovat čisté prádlo od použitého (čisté má být uloženo tak, aby se zabránilo kontaminaci). Použité prádlo se zbytečně nevíří, neroztřepává, nepokládá na zem, ale ihned se ukládá do pytlů. Protože se v případě infekcí *Clostridium difficile* jedná o alimentární nákazu je důležitá individualizace pomůcek. Proto je lepší upřednostňovat jednorázové zdravotnické pomůcky a prostředky. Dále je důležité provádět úklid a účinnou dezinfekci ploch, použité nástroje a pomůcky (určené k opakovanému použití) ihned vkládat do dezinfekčního roztoku. Dalším úkolem je zajistit dohled nad dodržováním osobní hygieny pacientů. (26)

Dodržováním těchto hygienických a protiepidemických zásad se minimalizuje riziko dalšího šíření nákazy mezi pacienty a personálem příslušného zdravotnického zařízení. (19)

Kontrola, nad dodržováním těchto zásad, spadá do kompetence vedoucího zaměstnance příslušného zdravotnického zařízení. Orgánem, vykonávajícím státní zdravotní dozor, nad dodržováním hygienických a protiepidemických opatření je příslušná krajská hygienická stanice. Provádí pravidelná šetření v této oblasti, pořizuje zápisy, které předkládá vedení příslušného zařízení i s návrhy nápravných opatření. (26)

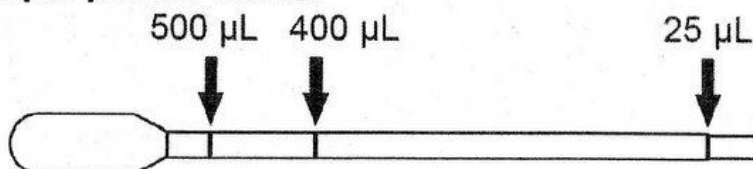
## 1.7 Diagnostika

Jak už vyplývá z klinických projevů, je CDAD závažné život ohrožující onemocnění, proto je důležitá jeho včasná diagnostika. Ta je založená na klinickém obrazu a detekci toxinů A a B. Skutečností je, že tato infekce je v praxi poměrně obtížně diagnostikovatelná, proto se doporučují používat kombinace diagnostických testů a pro ověření výsledků provádět i kultivaci. Protože všechny toxigenní kmeny *C. difficile* produkují toxin B, je vhodné použít k jejich průkazu detekci genu *tcdB* pomocí molekulárně genetických metod. (42, 8)

### 1.7.1 Imunochromatografie

Toxiny ze stolice lze detekovat prostřednictvím imunochromatografie, která funguje na principu vazby antigenu a protilátky. K realizaci slouží komerčně dodávané sady *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* od firmy Techlab. Sada obsahuje reagentie, kterými jsou konjugát, diluent, substrát a promývací roztok. Další součástí je testovací kazeta, v níž samotná reakce probíhá. Pro přenos vzorku se používá kalibrovaná pipeta. (34)

#### Kalibrovaná pipeta pro přenos vzorku:



Prvním krokem je ředění vzorku. Pomocí kalibrované pipety se přenesou 25 µl vzorku do zkumavky, která obsahuje 750 µl *Diluentu* a nakonec se vkápnou 1 kapka *Conjugátu* a vše se promíchá. Poté se 500 µl naředěného vzorku přenesou do jamky, pro aplikaci vzorku *Sample Well* a nechá se inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. V další fázi dochází k promývání. 300 µl promývacího pufru se aplikuje do reakčního okna (*Reaction Window*) a nechá se vsáknout. Následně se aplikují dvě kapky substrátu do reakčního okna, nechá se inkubovat při pokojové teplotě a po 10 minutách odečítáme výsledek testu. (34) (příloha č. 3)

Vyhodnocení testu:



Zdroj: (34)

### 1.7.2 Mikroskopický průkaz *Clostridium difficile*

Zhotovení mikroskopického preparátu spočívá v provedení nátěru z nativní stolice na podložní sklíčko. Následuje fixace nad plamenem kahanu a barvení dle Grama.

#### Barvení dle Grama

Zhotovený preparát po fixaci a vychladnutí převrstvíme *krystalovou violetí* a necháme působit 20 sekund. Potom barvu slijeme a preparát opláchneme vodou. Následně preparát přelijeme *Lugolovým roztokem* a necháme opět působit 20 sekund. Následuje další oplach vodou a odbarvování alkoholem nejdéle po dobu 20 sekund. Opět opláchneme vodou a dobarvujeme *safraninem* popřípadě *karboľfuchsinem* po dobu 40 sekund. Naposledy opláchneme vodou, osušíme a prohlížíme pod mikroskopem. Hodnotí se především leukocytóza a přítomnost klostridiových tyček. Jedná se o silné, rovné gramlabilní tyčky. (18)

### 1.7.3 Kultivace

Další možností je kultivace *Clostridium difficile* za použití selektivních půd. Jedná se o půdy umožňující díky přídatným látkám (jako je cykloserin) růst jen některým druhům bakterií, růst ostatních bakterií potlačují. (18, 4) Jelikož je *Clostridium difficile* i součástí normální střevní flóry samotná kultivace pro potvrzení

diagnózy nestačí. Provádí se společně s průkazem toxinů ve stolici. Protože je kultivace časově náročná a právě čas hraje při stanovení diagnózy významnou roli, volí se vždy v kombinaci s průkazem toxinů a slouží především k potvrzení diagnózy. Samotná kultivace musí probíhat v anaerobním prostředí (tj. bez přístupu kyslíku), při teplotě 37°C. *Clostridium difficile* roste ve formě šedobílých až bělavých kolonií s nerovnými okraji bez zóny hemolýzy. Výhodou kultivace je její citlivost (85-100 %), naopak nevýhodou, že prostřednictvím kultivace nelze odlišit toxické a netoxické kmeny CD. Jako další nevýhodu, můžeme považovat časovou dostupnost výsledků, která je 2 až 3 dny. Časté je její použití pro stanovení citlivosti na antibiotika – u CD citlivost k vankomycinu. (24)

#### **1.7.4 EIA (ELISA)**

Rutinně používanou metodou je EIA. Jedná se o enzymatický test pro průkaz toxinů ve stolici. Ta by měla být zpracována optimálně do dvou hodin od odebrání vzorku. Výhodou je možnost zpracování většího počtu vzorků najednou. (40 N) Specifita této metody je 65-100%, naproti tomu senzitivita jen 65-96%. Výsledky vyšetření jsou k dispozici již za 4 hodiny. Kvůli poměrně nízké senzitivitě je doporučeno při negativním výsledku prvního vyšetření testovat další vzorek. (20)

#### **1.7.5 PCR**

Další dostupnou metodou pro detekci toxinů je PCR (polymerázová řetězová reakce). Jedná se o reakci vysoce specifickou (100%), citlivost dosahuje 92-97%. Hlavní výhodou je právě její citlivost a možnost použití k průkazu virů, mykobakterií a některých mikroorganismů, kde je kultivace časově náročná nebo není možná. (20) Díky rychlé dostupnosti výsledků a malému množství materiálu, který je zapotřebí, patří k nejpoužívanějším metodám genetické analýzy. (16)

Obecným principem je opakovaná replikace ohraničeného úseku DNA specifickými primery. Detekce *Clostridium difficile* pomocí PCR probíhá v několika krocích. Nejprve je třeba izolovat DNA, která je uložena v jádře buňky, v buněčných strukturách zvaných chromozomy. Pro izolaci jsou k dispozici speciální sety, obsahující potřebná činidla. Jedním z těchto setů, který používají i v laboratoři molekulární

biologie a genetiky v Nemocnici ČB a.s. je „*QIAamp*®“. Obsahuje lyzační roztok, který je důležitý pro uvolnění DNA. Ten způsobí rozpuštění biomembrán a denuraci proteinů. Dalším, používaným činidlem je proteináza K. Jejím úkolem je rozštěpení bílkovin, které jsou navázané i na strukturu DNA. Izolace probíhá také za použití *vortexu*, což je přístroj na protřepávání, centrifugy a suché lázně (dry bath), která slouží pro udržení teploty 56°C.

Samotnou PCR reakci můžeme rozdělit do tří fází. V první fázi probíhá denaturace. Protože má DNA strukturu *dvojitě šroubovice*, je zapotřebí od sebe vlákna oddělit. Vlákna šroubovice jsou spojena vazbami, které označujeme jako vodíkové můstky. K jejich oddělení stačí zahřátí na teplotu 95°C. Dalším krokem je tzv. „*annealing*“, při kterém dochází k ochlazení na 50-60°C. V této fázi se primery připojují k templátové DNA. V poslední fázi dochází za pomoci enzymu *Taq* polymerázy k syntéze nového komplementárního řetězce. Teplota se pohybuje kolem 72 až 80 °C podle použité DNA polymerázy. Jedná se o termostabilní enzym, izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*. Tyto tři kroky, označujeme jako cyklus, který se neustále opakuje za neustálého monitorování teploty. (7) Na konci každého cyklu vznikne dvojnásobné množství DNA, přičemž samotný cyklus trvá jen několik minut. (16)

Prakticky tato reakce probíhá v přístroji zvaném „*termocycler*“. Zkumavky s reakční směsí jsou zde uloženy do kovového bloku a celá reakce je řízena podle předem zvoleného programu. Po dvou hodinách proběhne 30 cyklů a z jedné molekuly DNA vznikne asi 10<sup>9</sup> kopií.

### **Elektroforéza (ELFO)**

Výsledek PCR reakce se detekuje na agarózovém gelu pomocí elektroforézy. Nukleové kyseliny nesou v zásaditém prostředí záporný náboj, proto je možné je elektroforeticky oddělit. Na nosič, který tvoří 2 % agarózový gel, se společně se vzorky nanese pozitivní kontrola a vloží se do elektroforetické vany obsahující dvě elektrody (katodu a anodu) a pufr. Potom se připojí zdroj stejnosměrného napětí. Nukleové kyseliny putují v elektrickém poli od katody k anodě. Delší řetězce jsou v gelu více

zadržovány a jejich pohyb je pomalejší. 2 % agarózový gel připravíme rozvařením jednoho gramu agarózy v 50 mililitrech 1x TBE pufru. Po zchlazení se přidává kapka ethidium bromidu. Jedná se o jedovatou látku, která se interkaluje do dvoušroubovicové DNA a způsobí, že DNA pod UV světlem emituje záření, a tím nám umožní odečít výsledků – přítomnost či nepřítomnost proužků DNA případně jejich vzdálenost od startu a tedy jejich přibližnou délku. Nevýhodou je práce s jedem, při níž musí být zajištěno odsávání. Odečet výsledků se provádí z fotografie na monitoru počítače, popřípadě ručně na transiluminátoru. (7)

### **1.7.6 Kvantitativní real - time PCR**

Jedná se o moderní metodu molekulární biologie. Umožňuje rychlou a citlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA.

Oproti klasické PCR nám umožňuje sledovat průběh polymerázové řetězové reakce přímo během reakce (tzv. „*v reálném čase*“) a monitorovat přírůstky produktu během každého cyklu. Množství produktu je detekováno pomocí fluorescenční sondy, obsahující barvivo. Dokud je barvivo navázané na sondě, není schopné fluorescence. Tuto schopnost získá po uvolnění do roztoku. Platí zde přímá úměra mezi množstvím produktu PCR reakce a intenzitou fluorescence. Tato reakce probíhá v přístroji „*cycler*“, který umožňuje detekovat fluorescenci v každém cyklu PCR a speciální software zobrazí množství fluorescence, odpovídající množství produktu v reálném čase. Další výhodou zde je vypuštění detekce produktu na gelu pomocí elektroforézy. (12)

Kvantifikace (určení množství PCR produktu) se provádí prostřednictvím amplifikačních křivek, které získáme vynesením naměřené fluorescence na osu y a počtem cyklů na osu x. Křivka je esovitě zakřivená a dělí se na 3 části. První fáze je označována jako „background“. Jedná se o stav, kdy je produktu tak málo, že je fluorescence neměřitelná. Ve druhé exponenciální fázi, jak už z názvu vyplývá, množství produktu exponenciálně vzrůstá. Ve třetí fázi nedochází k dalšímu nárůstu množství produktu, tedy i intenzita fluorescence zůstává konstantní. (12)

### 1.7.7 Endoskopické vyšetření

Další vyšetření významné pro diagnostiku je endoskopické vyšetření střeva, při němž je možnost provést biopsii vzorku. Ta se ale kvůli riziku perforace střeva nedoporučuje při závažném průběhu a u onkologických pacientů. Makroskopický obraz tohoto vyšetření jsou nažloutlé pablány na střevní sliznici. (20)

### 1.8 Výskyt infekce v letech 2005-2011

Protože *Clostridium difficile* patří mezi infekční patogeny, platí stejně jako u ostatních infekčních onemocnění povinný systém hlášení. Pro tyto účely byl vypracován systém EPIDAT. Ten je celostátně používán od roku 1993 na odděleních epidemiologie a také orgány ochrany veřejného zdraví. U všech nemocí se vyplňuje epidemiologický dotazník na základě zadané diagnózy. Epidemiologické informace jsou pro veřejnost každý měsíc uveřejňovány v časopise „Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie.“ Infekce vyvolané *Clostridium difficile* spadají pod diagnózu A04. Pod tímto kódem se skrývá název „Jiné bakteriální střevní infekce“. (28)

**Tabulka 2: Výskyt jiných bakteriálních střevních infekcí v letech 2005-2011**

DG	Název onemocnění	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
A04	Jiné bakter. střevní infekce	2704	2471	2831	3305	3178	3343	4607

Zdroj: (32)

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### **2.1 Cíle práce**

Cílem práce je porovnat citlivost jednotlivých metod používaných k průkazu *Clostridium difficile* v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. Dále porovnat časovou dostupnost výsledků jednotlivých analýz pro případy rychlého vývoje onemocnění v nemocničních zařízeních a najít tak optimální metodu pro průkaz této bakterie.

### **2.2 Hypotézy**

Předpokládám, že průkaz pomocí real-time PCR je z dostupných metod detekce *Clostridium difficile* nejrychlejší.



### **3. Metodika**

#### **3.1 Struktura a vybavení laboratoře**

Pro PCR diagnostiku je zapotřebí funkční členění pracoviště, aby se zabránilo kontaminaci vzorků a tím se předešlo falešně pozitivním výsledkům.

##### **3.1.1 Izolační místnost**

V izolační místnosti probíhá izolace bakteriální DNA, dále je zde možné uchovávání vzorků. Tato místnost je vybavena dvěma boxy s laminárním prouděním a HEPA filtry, ve kterých se manipuluje se vzorky. Mezi další přístrojové vybavení patří centrifugy, suchá lázeň a vortex.

- AccuBlock – Dry bath od firmy Labnet

Jedná se o termostat s širokým teplotním rozsahem (+5 °C až 150°C). Požadovanou teplotu lze snadno nastavit pomocí šipek a hodnoty se zobrazují na digitálním displeji. Uvnitř bloku dochází k rovnoměrnému rozložení teploty tak, že všechny vzorky jsou vystaveny stejné teplotě nezávisle na jejich umístění.

- Centrifuga – Centrifuge 5417 R od firmy Eppendorf

Jedná se o stolní odstředivku s aktivním chlazením a nastavitelnou rychlostí otáček (až 25 000 g). Je určena pro práci s mikrozkuvkami a PCR-stripy.

- Vortex – Vortex Mixer VX 100 od firmy Labnet (umožňuje protřepání a promíchání vzorku)
- Laminární box – Aura vertical S.D.4

Jedná se o laminární box s vertikálním prouděním. Je vybaven dvěma HEPA filtry, které odstraňují částice větší než 0,3µm s účinností 99,99%. Jeho součástí je ovladač vnitřního osvětlení a UV světla. Uspořádání boxu chrání nejen předměty v boxu ale i pracovníka a vnější prostředí.

- Rukavice – Vasco sensitive, dodavatel B. Braun Medical s.r.o.

Pro ochranu pracovníků jsou k dispozici v různých velikostech sterilní latexové rukavice bez pudru. Vnitřní vrstva je ze syntetického materiálu, jehož složení snižuje riziko vzniku alergické reakce.

- Mikrozkušavky

Jedná se o uzavíratelné mikrozkušavky, vyrobené z polypropylenu odolného vůči vysokým teplotám i chemickým látkám. Díky tepelné odolnosti se provádí jejich resterilizace v autoklávu (121°C, 21 minut).

- Pipeta – Pasteurova (plastová)
- Mikropipety – Finnpiquette Digital (objemy: 0,5-5 µl, 1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)

Jedná se o autoklávovatelné pipety, pracující na principu nasávání a vytlačování vzduchu. Jejich objem je nastavitelný a právě nastavený objem je zobrazen v okénku na těle pipety. Každá pipeta má určitý objemový rozsah. Při práci se používají odnímatelné jednorázové špičky s filtrem. Jsou vyrobeny z čirého polypropylenu bez příměsí.

- Set reagenčních QIAamp DNA Mini (250) Kit – výrobce QIAGEN

### **3.1.2 Master mix**

Jedná se o místnost, ve které se připravují reagenční master mixy pro PCR reakce. Do této místnosti nevstupuje izolát, klinický materiál ani produkt. K nezbytnému vybavení patří mikrocentrifugy, vortex, PCR box, chladicí a mrazicí zařízení pro uchovávání reakčních činidel.

Pro průkaz genů pro produkci toxinů *Clostridium difficile* se master mixy nepřipravují, protože jsou součástí komerčně vyráběných setů. Tato skutečnost urychluje diagnostiku této patogenní bakterie.

### 3.1.3 PCR místnost

V této místnosti jsou umístěny přístroje cyclery a dále analyzátor PCR.

- T3 Thermocycler vyrábí Whatman Biometra, Rudolf-Wissell-Strasse 30, Göttingen, Germany

Jedná se o programovatelný termocycler s šestiřádkovým displejem, který umožňuje kontrolovat průběh reakce.

- Analyzátor PCR – Rotor Gene Q od firmy QIAGEN

Jedná se cycler pro metody real-time PCR. Poskytuje optické spektrum o rozsahu od 470 do 710 nm.

### 3.1.4 ELFO

Jedná se o místnost, ve které se klasicky provádí odečet vzorků PCR pomocí elektroforézy. Ale v případě mé práce (se sety „*hyplex*“) byly produkty po amplifikaci dále hybridizovány a ve výsledku měřena absorbance vzniklého zbarvení.

Pomůcky, přístroje pro ELFO:

- 2 % agarózový gel – připravíme rozvařením 1 g agarózy v 50 ml 1x TBE pufru.
- Zdroj napětí – Biometra Power Pack P25 T
- ELFO vana – SCIE – PLAS
- Ethidium bromid
- ELFO pufr – 1x TBE pufr (složení: Tris, kyselina boritá, EDTA)
- Digestoř – Merci s.r.o.
- Transiluminátor – Biometra
- Přístroj pro vyhodnocení - MiniBis

## 3.2 Postup při izolaci bakteriální DNA

Izolaci bakteriální DNA je možno provést různými způsoby, od těch automatizovaných, kdy ji za nás provede přístroj až po ruční. V tomto případě byla použita ruční izolace pomocí kolonek za použití setu reagentů QIAamp DNA Mini Kit.

Vzorek byl převzat ve formě stolice v odběrové zkumavce. Vzorek byl následně resuspendován v PBS pufru (fosfátový pufr + 0,9 M NaCl). Vzniklá suspenze byla dále přefiltrována, aby došlo k oddělení pevných částic stolice. Přefiltrovaný roztok byl zcentrifugován a ze vzniklého sedimentu byla provedena izolace bakteriální DNA podle postupu uvedeného níže. Na každý vzorek bylo potřeba si připravit 2 mikrozukavky, 1 kolonku, 2 sběrné zkumavky. Izolace probíhala v laminárním boxu, který se před započítím práce sterilizoval ultrafialovým zářením.

**Tabulka 3: Obsah setu pro izolaci DNA QIAamp DNA Mini Kit**

<b>QIAamp DNA Kits Mini (250)</b>	
Kolonka	250
Sběrná zkumavka	750
Pufr AL	54 ml
Pufr ATL	50 ml
Pufr AW1	95 ml
Pufr AW2	66 ml
Pufr AE	110 ml
Proteináza K	6 ml

Zdroj: (30)

#### Postup při ruční izolaci

- zapneme suchou lázeň na teplotu 56°C a druhou na 70 °C
- do připravených mikrozukavek pipetou přeneseme 20 µl proteinázy K
- přidáme sediment + 180 µl ATL pufru
- důkladně zvortexujeme (min. 20 s)
- inkubace 20 minut při 56°C
- přidáme 200 µl AL pufru
- inkubace 30 minut při 70 °C
- přidáme 200 µl 100% etanolu
- opět zvortexujeme (20s)

- opatrně přelijeme do připravených kolonek
- následuje centrifugace 1 minutu při 6000g
- kolonky přendáme do čistých zkumavek a přidáme 500 µl AW1 pufru
- centrifugace 1min/6000g
- kolonky přendáme do čistých zkumavek a přidáme 500 µl AW2 pufru
- centrifugace 3 min/13000g
- kolonky přendáme do sterilních mikrozkušavek a přidáme 100 µl AE pufru (56°C)
- inkubace 3 minuty při pokojové teplotě
- centrifugace 1 min/6000g

Vyizolovanou DNA lze uchovávat při teplotě 4°C maximálně po dobu tří dnů. Pro dlouhodobé uchování slouží zamražení na -20°C. (23)

### 3.3 Hyplex® ClosTox

Jedná se o přímý průkaz kmenů *Clostridium difficile*, které jsou geneticky schopné produkovat toxiny. Jedná se o in vitro test, k jehož provedení se používá set od firmy BAG Health Care s názvem „hyplex® ClosTox“. Tento set umožňuje citlivou a přesnou PCR diagnostiku především díky následné hybridizaci s imobilizovanou sondou. Před samotným provedením testu je nutné provést izolaci bakteriální DNA. (viz kapitola 3.2) (2)

#### 3.3.1 Princip testu

Tento set obsahuje značené oligonukleotidové primery, které umožňují současně a přitom specificky zmnožit různé oblasti DNA v jedné PCR reakci. V přítomnosti příslušné DNA jsou kromě interní kontroly inhibice tvořeny specifické amplifikace genu *tcdB* pro cytotoxin B, které mohou být následně zobrazeny pomocí hybridizačního modulu *hyplex® ClosTox*. K tomuto produktu se přidá specifická sonda, která je ukotvena na polystyrenovém povrchu mikrotitrační destičky. Za pomoci hybridizačního pufru probíhá hybridizace komplementárních sekvencí, které mohou být následně detekovány metodou ELISA. Po několika promývacích krocích je přidána konjugát-

peroxidáza (POD). Ta se vysoce specificky váže na značenou oligonukleotidovou sondu, která se navázala na PCR produkt. Po provedení dalších mycích kroků se přidá TMB substrát a vzniká modré zbarvení. Reakce je ukončena po přidání „stop“ roztoku, přitom je pozorována změna zbarvení do žluta. Následně je fotometricky měřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Pozitivní signály značí zmnožení (amplifikaci) určité oblasti DNA a s ní přítomnost příslušného genu ve vzorku. (2)

### **3.3.2 Reagencie**

#### **Obsah PCR modulů**

Reakční činidla jednoho balení stačí pro 96 stanovení. Každá souprava obsahuje:

- Směs primerů (240 µl) – nádobka se zeleným víčkem (obsahuje značené oligonukleotidové primery a vnitřní kontrolu inhibice)
- Směs nukleotidů (120 µl) – nádobka se žlutým víčkem (obsahuje nukleotidy dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Negativní kontrola (100 µl) – nádobka s modrým víčkem

Tato reakční činidla se po obdržení uchovávají při teplotě -20 °C. Je třeba se vyhnout častému rozmrazování a zamrazování. Po prvním použití je teplota skladování 2-8 °C, činidla pak musí být spotřebována do 3 měsíců. (2)

#### **Obsah hybridizačních modulů**

Činidla jedné soupravy stačí pro 48 stanovení. Jedná se o specifické oligonukleotidové sondy pro reverzní hybridizaci. Každá sada obsahuje:

- Kontrolní činidlo (blank)
- Barevně značené jamky se specifickou oligonukleotidovou sondou pro detekci příslušného genu (tmavě hnědé)
- Barevně značené jamky se specifickou oligonukleotidovou sondou pro interní kontrolu inhibice (tmavě modré)
- Hybridizační roztok (10 ml)
- Promývací roztok (100 ml)

- Promývací pufr (20x koncentrovaný) – 12 ml (obsahuje fosfátový pufr, detergent a konzervační látky)
- Konjugát (100x koncentrovaný) – 120  $\mu$ l – nádobka s průhledným víčkem
- TMB roztok substrátu (12 ml)
- Stop roztok (12 ml) – 25% kyselina fosforečná

Kromě toho je zapotřebí dalších reakčních činidel a příslušenství. K nim patří termostabilní DNA polymeráza, PCR reakční pufr, dvakrát destilovaná voda, hyplex® lyzační pufr, filtrační lahvičky. K potřebnému příslušenství patří termoblok, PCR reakční nádoby, termocykler, pipety různých objemů s různými špičkami, inkubátor, fotometr pro měření výsledků v mikrotitračních destičkách při vlnových délkách 450 nm a 620 nm. (2)

### 3.3.3 Provedení

Podle následujícího schématu byla připravena amplifikační reakce.

5  $\mu$ l vzorku + 1  $\mu$ l směsi nukleotidů + 2  $\mu$ l směsi primerů + 5  $\mu$ l PCR reakčního pufru + 0,2  $\mu$ l DNA polymerázy doplnit do 50  $\mu$ l destilovanou vodou. Následně byly na PCR termocykleru nastaveny tyto parametry. (viz tabulka č. 4)

**Tabulka 4: Parametry pro PCR**

Cyklus	Teplota (°C)	Čas	Reakce
1x	94	5 min	Počáteční denaturace DNA
35-x	94	25 s	Denaturace DNA
	52	25 s	Vazba primerů
	72	45 s	Elongace DNA
1x	72	3 min	Závěrečná syntéza

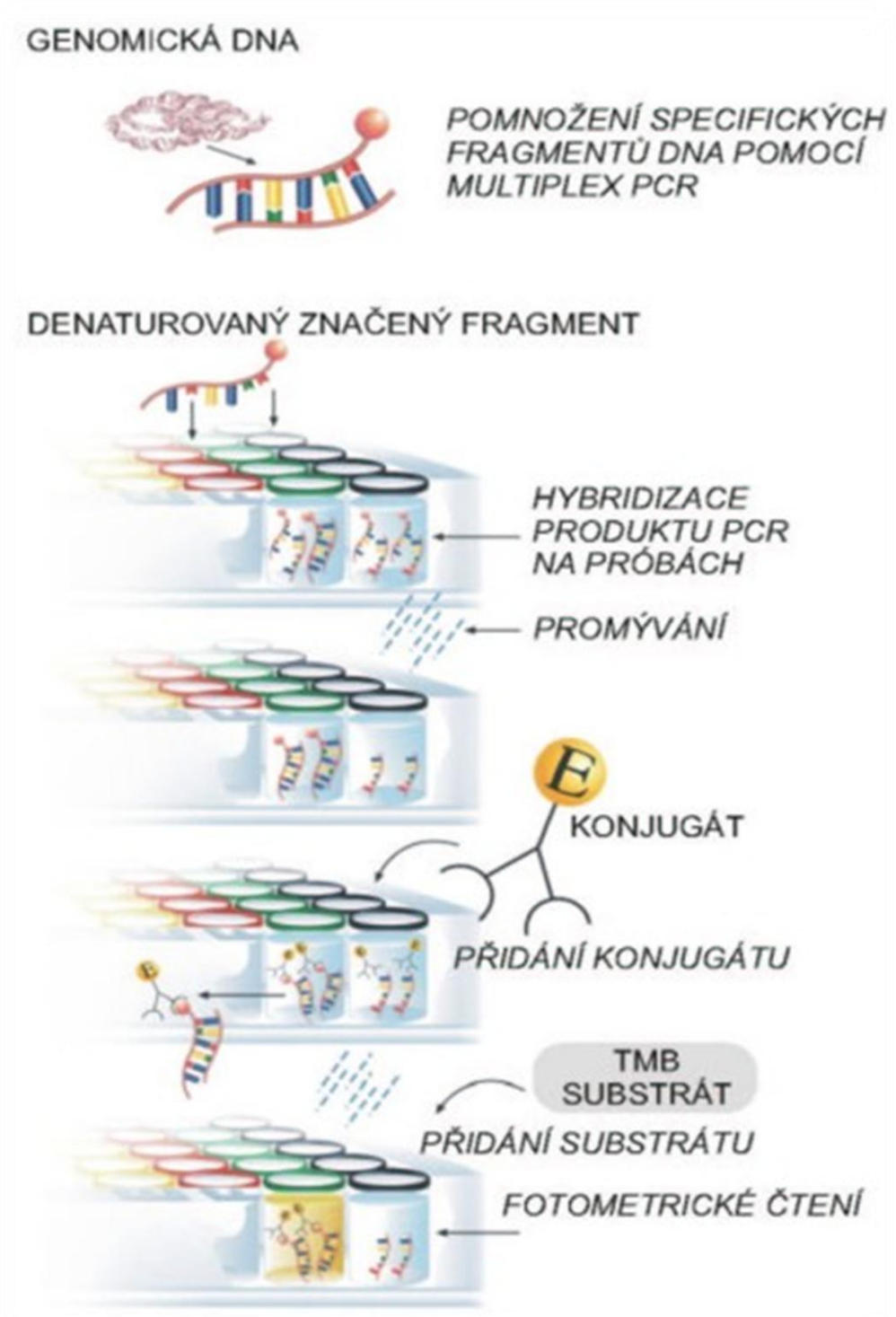
Zdroj: (2)

Po ukončení PCR musí být reakční směs uchovávána při teplotě 4-8 °C dokud není provedena reverzní hybridizace. (2)

Dalším krokem je reverzní hybridizace. V termocykleru byla provedena denaturace PCR produktů při 95 °C po dobu deseti minut. 5 µl PCR produktu bylo přidáno k 50 µl hybridizačního roztoku (o teplotě 2-8 °C) a dobře promícháno. Z toho 50 µl bylo rychle odpipetováno do příslušné jamky mikrotitrační destičky, destička byla zakryta a následovala inkubace 30 minut při 50 °C. V dalším kroku byly jamky vyprázdněny a třikrát krátce promyty 200 µl předeřátého promývacího roztoku. Po skončení promývání byla destička umístěna na papírový ubrousek a zcela odstraněny zbytky kapaliny z jamek. Následně bylo provedeno krátké promytí jamek za použití 200 µl promývacího pufu při pokojové teplotě. Poté bylo do každé jamky napipetováno 100 µl konjugátu a provedena 30-minutová inkubace při pokojové teplotě. Následně bylo znovu provedeno vyprázdnění jamek a ty byly opět třikrát krátce promyty 200 µl promývacího pufu při pokojové teplotě. Dále bylo do každé jamky přidáno 100 µl hotového TMB substrátu. Mikrotitrační destička se nechala inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. Čas byl počítán od přidání substrátu do první jamky. Reakce byla zastavena přidáním 100 µl stop činidla do každé jamky. Posledním krokem bylo změření absorbance jednotlivých jamek při vlnové délce 450 nm. Měření by mělo být provedeno do 60 minut po zastavení reakce. (2)



## Schéma průběhu reakce



Zdroj: (3)

### 3.3.4 Hodnocení testu

Test je možné vyhodnotit pouze při splnění následujících podmínek:

- Naměřená absorbance blanku musí být  $\leq 0,200$
- Naměřená absorbance negativní kontroly (ENC) je  $\leq 0,200$
- Zjištěná absorbance pozitivní kontroly musí být (IHC)  $> 1,000$

Pacientské vzorky s naměřenými hodnotami absorbance vyšší než 0,300 hodnotíme jako pozitivní. Pokud je naměřená hodnota absorbance vyšší než trojnásobek absorbance negativní kontroly a menší než 0,300 jedná se o hraniční výsledek a mělo by být provedeno nové měření. Pokud je naměřená absorbance nižší než trojnásobek absorbance negativní kontroly nebo menší než 0,150, je výsledek posuzován jako negativní. Pro tento případ musí být absorbance vnitřní kontroly inhibice vyšší než 0,300. Vzorky s hodnotami absorbance menšími než je trojnásobek absorbance negativní kontroly nebo menšími než 0,150 a hodnotou absorbance pro vnitřní kontrolu inhibice menší než 0,300 se hodnotí jako inhibované. (2)

Obdobným testem, od stejné firmy, který slouží k detekci hypervirulentní varianty *C. difficile*, je Hyplex® ClosTox 027. Je určen pro detekci mutace v regulačním genu, která vede k nadměrné tvorbě toxinů, např.: u ribotypu 027. Princip testu i podmínky pro hodnocení jsou stejné jako u předchozí varianty Hyplex® ClosTox. (1)

### 3.4 GeneXpert systém

Jedná se o systém od firmy Cepheid, zahrnující automatickou izolaci nukleové kyseliny, její detekci ve vzorku pomocí real-time PCR a automatické zpracování a vyhodnocení výsledků. Tento se systém se skládá z čtečky čárových kódů a analyzátoru, kde v kazetě probíhá izolace, amplifikace DNA s detekcí. Součástí systému je také počítač, jehož součástí je software pro analýzu výsledků. Vyžaduje používání jednorázových kazet, díky nimž je eliminována křížová kontaminace mezi vzorky. Jejich součástí jsou činidla pro izolaci DNA a PCR reakci.

Primery a sondy v *Xpert C. Difficile* testu jsou schopny detekovat sekvence v genech pro toxin B (tcdB), průkaz genu CDT (binární toxin) a přítomnost mutace v regulačním genu tcdC, při které dochází ke zvýšené tvorbě toxinů (např.: hypervirulentní ribotypy 027). (6)

Činidla:

- Činidlo 1 (Tris, EDTA a povrchově aktivní látky)
- Činidlo 2 (hydroxid sodný)
- Činidlo pro vzorek S (guanidinium thiokyanát a povrchově aktivní látky)

Další potřebný materiál:

- Suchý tampon pro přenos vzorku
- Vortex
- Fosfátový pufr
- Sterilní mikropipety + špičky
- Pipeta – Pasteurova (plastová)

#### **3.4.1 Postup zpracování vzorku**

Vzorek biologického materiálu byl do laboratoře dodán v odběrové nádobě ve formě stolice. Pro přípravu analýzy byla připravena činidla ze setu *Xpert C. difficile*, která jsou uchovávána v lednici. Jako první byla z obalu vyjmuta kazeta, jejíž součástí jsou 3 otvory, značené 1, 2, S. (příloha č. 1) U lahvičky s činidlem, značené číslem 1 byl odstraněn uzávěr a její obsah byl opatrně přenesen do otvoru kazety s číslem 1. To stejné bylo provedeno s lahvičkou číslo 2, jen obsah byl přenesen do otvoru s číslem 2. Následně byla provedena příprava vzorku. Ke vzorku byl přidán plastovou pipetou fosfátový pufr, mikrozkuhavka se následně uzavřela a obsah byl zvortexován. Následně byla zkuhavka odstavena, aby se veškeré pevné částice usadily na její dno. Pomocí suchého vatového tamponu byl vzorek ze zkuhavky přenesen do činidla pro vzorek, s označením S. Celý objem byl potom plastovou pipetou přenesen do kazety, do posledního volného otvoru, označeného S. Veškerá práce byla provedena v laminárním

boxu, který byl před začátkem práce vysterylizován ultrafialovým zářením. Kazeta byla uzavřena a přenesena do vedlejší místnosti k analyzátoru GeneXpert. Zde byl spuštěn počítač, kazeta vložena do analyzátoru a v systému GeneXpert zvolen „*Create Test*“. V dalším kroku bylo zadáno identifikační číslo vzorku a čtečkou naskenován čárový kód z kazety. Pro spuštění testu se kliklo na tlačítko „*Start Test*“. Celá analýza trvala asi 45 minut, a během jejího průběhu bylo možné průběžně sledovat nárůst barevných křivek. Výsledky byly po skončení analýzy zobrazeny v okně na základě naměřených fluorescenčních signálů a výpočetních algoritmů, které jsou zabudovány v systému *GeneExpert Dx*. (6)

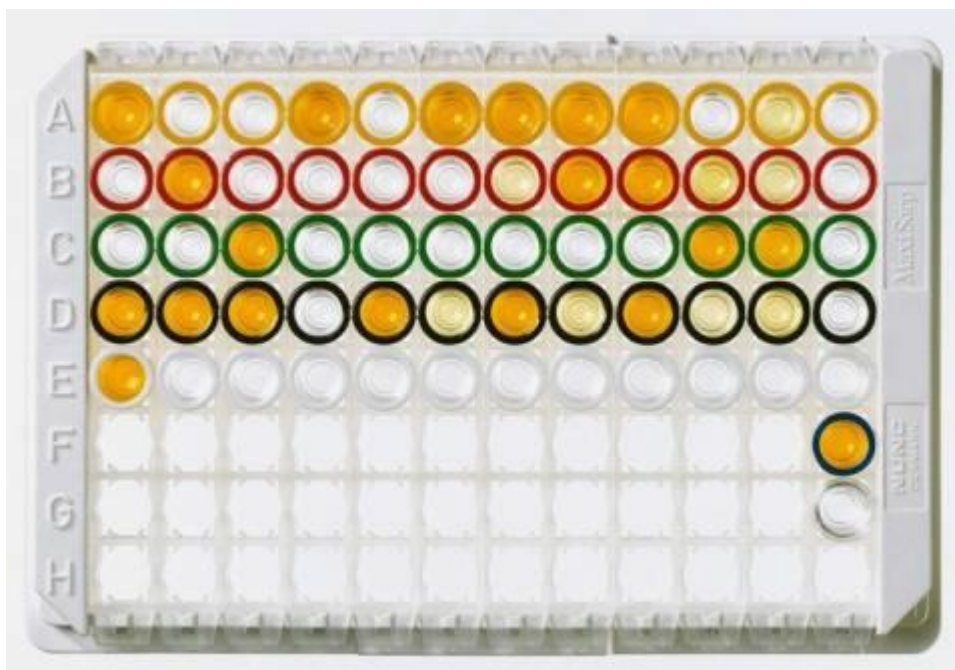
Výrobce uvádí, že analytická specifická podle provedených amerických studií dosahuje 100% a analytická citlivost 95%. (6)

GeneXpert systém je poměrně nákladná metoda, avšak velice citlivá, přesná a rychlá. Výsledky máme k dispozici do jedné hodiny, proto je vhodná také pro statimové vzorky. Jedná se o urgentní vzorky, vyžadující okamžité zpracování.

## 4. Výsledky

### 4.1 Hodnocení výsledků Hyplex® ClosTox testu

Tento test, jak již bylo uvedeno, se realizuje na mikrotitrační destičce, do níž se podle návodu nanese reakční činidla. Jako konečný produkt vzniká žluté zbarvení, jehož absorbanci fotometricky změříme.



Zdroj: (3)

Čím sytější je žlutá barva, tím vyšší je hodnota naměřené absorbance a pozitivita vzorků. Výsledky jsou dostupné během 4 až 5 hodin.

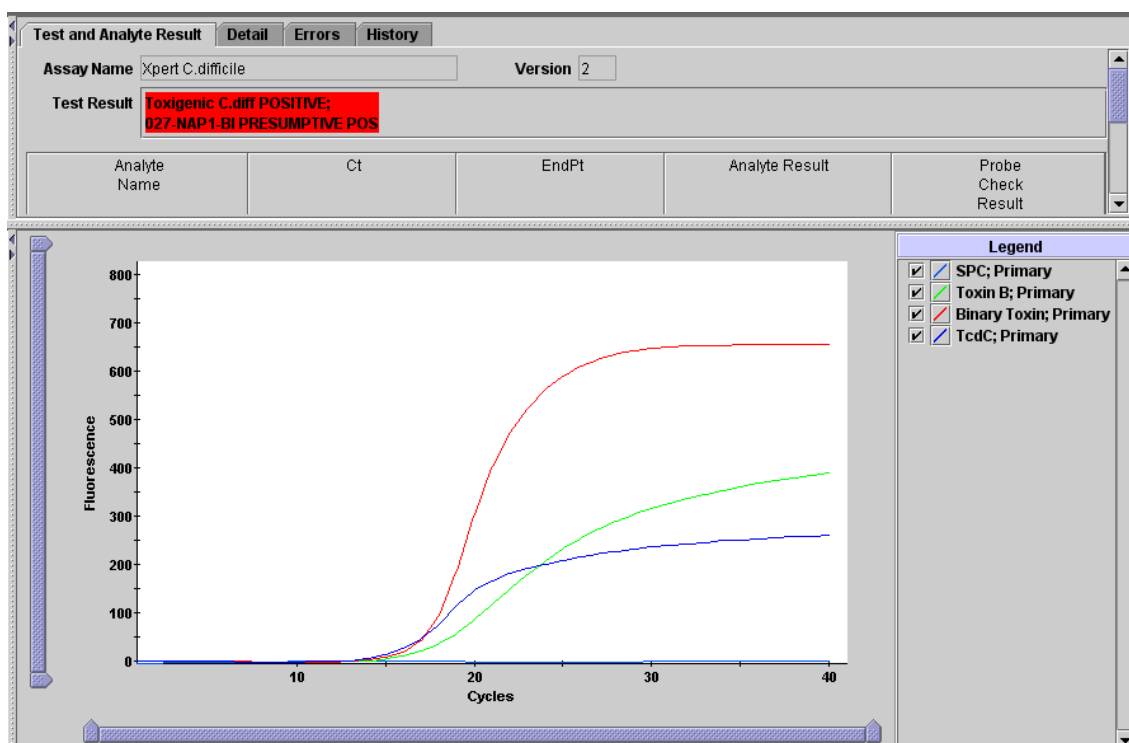
### 4.2 Hodnocení výsledků GeneXpert systému

U tohoto systému veškeré vyhodnocení výsledků, včetně grafického znázornění provádí program. Ve výsledku se nám zobrazí okno, na kterém vidíme 4 různobarevné amplifikační křivky, z nichž jednu tvoří kontrola. Ta slouží jako záruka, že vzorek byl správně zpracován a dále k odhalení možné inhibice. Pokud je vzorek negativní, měla

by kontrola být pozitivní, a pokud máme pozitivní vzorek, může být negativní nebo pozitivní. (6)

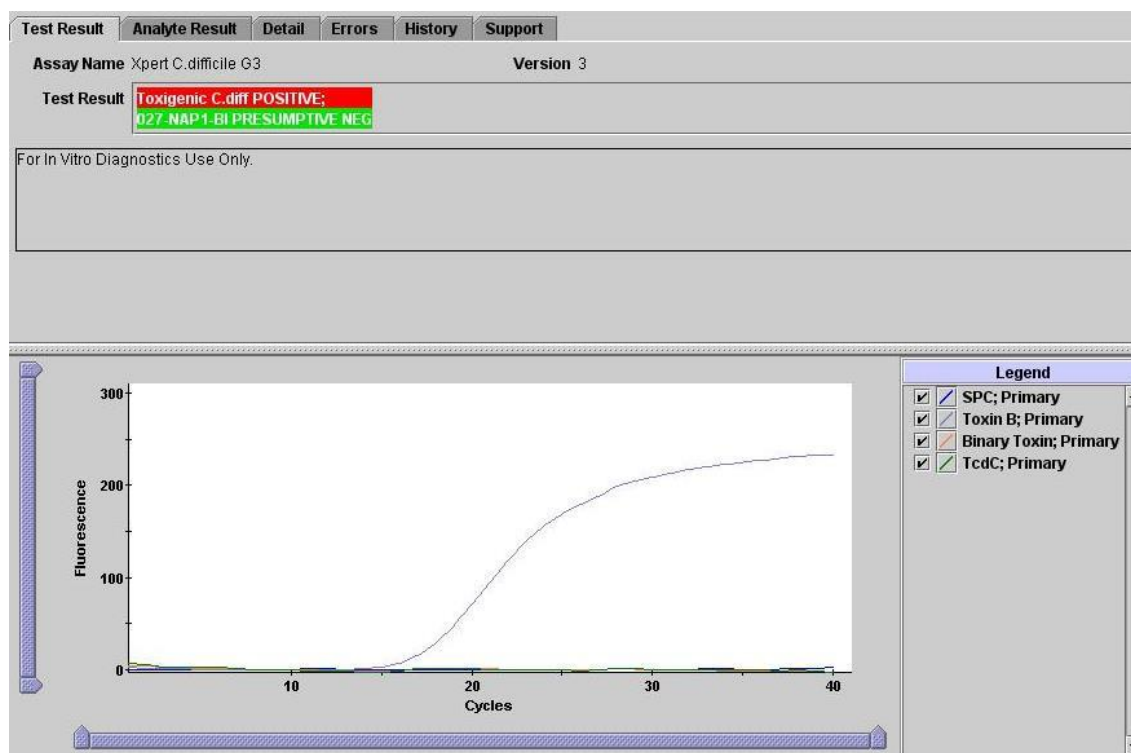
#### 4.2.1 Pozitivní vzorek – přítomnost všech genů pro produkci toxinů

V tomto okně vidíme nárůst červené amplifikační křivky, která symbolizuje přítomnost genu pro binární toxin. Další zelená narůstající křivka značí přítomnost genu pro toxin B a tmavě modrá narůstající křivka značí přítomnost mutace v regulačním genu *tcdC* genu (prezentováno jako potenciální ribotyp 027). Světle modrá barva značí kontrolu, zde k nárůstu křivky nedošlo.



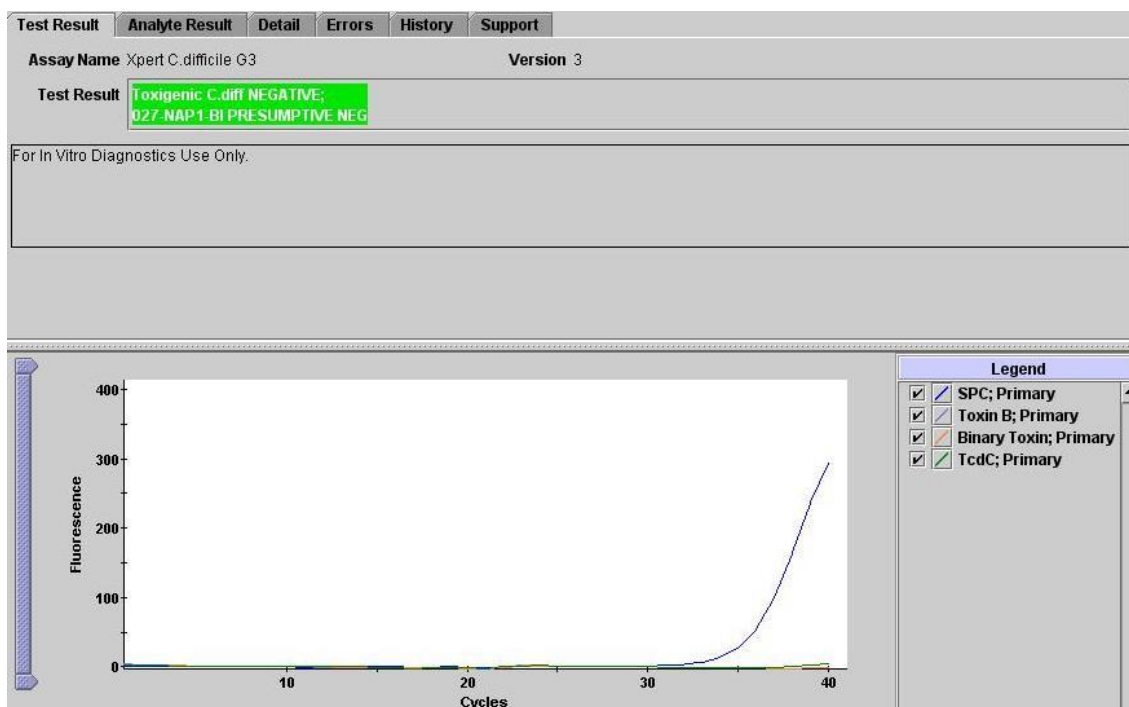
#### 4.2.2 Pozitivní vzorek – přítomnost genu pro cytotoxin B

Na tomto grafu je vidět pouze narůstající křivka, která značí přítomnost genu pro cytotoxin B. Přítomnost genu pro binární toxin a tcdC genu nebyla prokázána.



### 4.2.3 Negativní vzorek

V případě tohoto grafu se jedná o negativní vzorek. Nebyla prokázána přítomnost genu pro produkci cytotoxinu B, ani binárního toxinu ani genu *tcdC* pro hypervirulentní ribotypy. Došlo pouze k nárůstu křivky pro kontrolu, která zaručuje správnost zpracování vzorku.





## 5. Diskuze

Protože střevní infekce vyvolané bakterií *Clostridium difficile* patří k velice závažným, je velice důležitá jejich včasná diagnostika. V mnoha případech postihují hospitalizované pacienty, zejména ty oslabené nebo po předchozí antibiotické terapii. Jejich původci jsou často vysoce virulentní bakteriální kmeny, rezistentní k antibiotické terapii a proto se řadí mezi vážné nozokomiální nákazy. (28, 42)

Pro účely rychlé, přesné a citlivé diagnostiky těchto kmenů jsem na pracovišti molekulární biologie a genetiky vyzkoušela několik metod pro detekci bakterie *Clostridium difficile* a jejích toxinů.

První metodou byl test „*hyplex*® *ClosTox*“ od firmy BAG Health Care. Jedná se o Multiplex – PCR – Elisa systém pro detekci toxinů A/B. Jeho provedení spočívá v provedení ruční izolace bakteriální DNA, dále provedení PCR reakce a posledním krokem je reverzní hybridizace. Hodnotí se absorbance vzniklého žlutého zbarvení v mikrotitrační destičce pomocí fotometru. Výsledky jsou dostupné za 4 až 5 hodin. Specificita testu byla testována výrobcem na 96 odlišných kmenech různých druhů mikroorganismů s výsledkem 100% specificity v rámci referenčních kmenů. Pro citlivost systému bylo výrobcem testováno 10 různých toxinogenních kmenů *Clostridium difficile* nejrůznějších ribotypů. Citlivost u testovaných referenčních kmenů uvádí výrobce 100%. (2)

Kromě těchto výhod existuje i řada nevýhod. Hlavním problémem je časová náročnost a pracnost provedení. Jednalo se o metodu s dlouhým pracovním postupem a četným pipetováním, kdy díky lidské chybě mohlo snadno dojít ke kontaminaci a následnému znehodnocení výsledků. K dalším patří nutnost použití dvou souprav, čímž narůstá i cena. Jedna souprava slouží k provedení PCR a druhá pro reverzní hybridizaci. Ani časová dostupnost výsledků není uspokojivá, vzhledem k závažnému průběhu onemocnění. Dalším poměrně důležitým nedostatkem je nemožnost prokázání binárního toxinu. A konečně posledním problémem je zastoupení produktu v ČR, protože firma BAG Health Care ukončila prodej a distribuci celé řady *Hyplex*. (2)

Obdobou tohoto testu je „*hyplex® ClosTox 027*“, jímž se detekují hypervirulentní varianty *C. difficile*. Tento test byl pokračováním po provedení průkazu toxinu B. V případě positivity následovalo testování ribotypu 027. Specificita i citlivost testu udávané výrobcem dosahují rovněž 100%. Způsob provedení i hodnocení výsledků jsou stejné jako u předchozího testu, stejně tak výhody a nevýhody použití. (1)

Z důvodu převažujících nevýhod se od používání těchto metod v Nemocnici České Budějovice a.s. postupně upustilo a byly nahrazeny metodou po mnoha stránkách výhodnější.

Jedná se o systém GeneExpert od firmy Cepheid. Jeho hlavní výhodou je, že je podstatně rychlejší a oproti předchozím metodám také automatizovaný, čímž se snižuje riziko znehodnocení výsledků. Výsledky jsou k dispozici do jedné hodiny. Je to dáno tím, že systém zahrnuje jak automatickou izolaci nukleové kyseliny, její detekci pomocí real-time PCR i zpracování a zhodnocení výsledků. Samotná analýza trvá asi 45 minut a asi 15 minut zabere příprava vzorku a aplikace vzorku a reagensů do kazety. Hlavní výhodou je, že test „*Xpert C. Difficile*“ je schopen identifikovat jak gen pro toxin B (tcdB), tak pro binární toxin (TCD), tak i přítomnost mutace v regulačním genu tcdC současně v jedné analýze. Specificita dosahuje rovněž 100% jako u předchozích metod. Citlivost je uváděna 95%, tedy nižší než u předchozích stanovení, ale vzhledem k jednoduchosti provedení a časové dostupnosti výsledků jsou ztráty citlivosti zcela zanedbatelné. Z těchto důvodů se tento způsob stanovení jeví jako optimální, i přes poměrně vysoké finanční náklady a stal se rutinně používanou metodou pro diagnostiku toxinů *Clostridium difficile*. (6)

Zejména u statimových vyšetření, kdy je důležité, aby byly výsledky k dispozici v co nejkratším čase, našla tato metoda své hlavní uplatnění. V těchto případech se použití testů řady Hyplex jeví jako nevyhovující.

Protože laboratoř molekulární biologie a genetiky úzce spolupracuje s laboratoří bakteriologie, byly vybrány vzorky, které se zpracovávaly jak imunochromatograficky tak pomocí PCR. Jejich porovnání je uvedeno v tabulce č. 5.

**Tabulka 5: Porovnávání výsledků vyšetření z bakteriologické laboratoře a molekulární biologie a genetiky (Cepheid)**

vzorek			Cepheid (PCR)			bakteriologie	
	tox BAG	027 BAG	toxin B	binární tox	pot. 027	antigen	toxin
1			-	-	-	+	-
2			+	-	-	+	-
3			+	-	-	+	-
4			+	-	-	+	-
5			+	+	+	+	+
6			+	+	+	+	-
7			+	-	-	+	-
8			+	+	-	+	-
9			-	-	-	+	-
10			+	-	-	+	+
11			+	-	-	+	-
12			+	+	-	+	-
13			+	+	-	+	-
14			+	-	-	+	+
15			-	-	-	+	+
16			-	-	-	+	-
17			+	-	-	+	-
18			+	+	-	+	+
19			+	-	-	+	-
20			+	-	-	+	+
21			+	-	-	+	-
22			-	-	-	+	-
23	++	-					
24	++	-					
25	+	-					
26	-	-					
27	+/-	-					
28	-	-	+	-	-		-
29	+	+					+
30	-	-					+
31	++	+	+	+	+	+	+
32			+	+	+/-	+	-
33			+	-	-	+	-
34			+	-	-	+	+
35			-	-	-	-	-
36			+	-	-	+	+
37			+	-	-	-	-
38			+	+	-		
39			+	+	-		
40			+	-	-	+	-

### Vysvětlivky k tabulce č. 5

tox BAG – Hyplex ClosTox test od firmy BAG Health Care, pomocí něhož lze prokázat gen pro cytotoxin B.

tox 027 – Hyplex ClosTox 027 test taktéž od firmy BAG Health Care, pomocí něhož lze prokázat hypervirulentní varianty *C. difficile*.

Cepheid - systém GeneXpert, konkrétně test „*Xpert C. Difficile*“ – real-time PCR

+ značí přítomnost genu, +/- označuje hraniční nález, - negativní výsledek, ++ přítomnost většího množství

pot. 027 = potenciaální ribotyp 027 - v tabulce značí možnou přítomnost hypervirulentního kmene, například: ribotyp 027 (byly popsány i jiné vysoce virulentní ribotypy – například: na našem území vyskytující se ribotyp 176)

První dvě metody zaznamenané v tabulce tox BAG a tox 027 jsou metody genetické, které byly používány k průkazu toxinů *C. difficile* jen krátce, protože byly náročné na čas a provedení. Jeden průkaz vyžadoval použití dvou setů a navíc se jejich prostřednictvím nedal prokázat binární toxin.

V tabulce jsou červeně označeny případy, kdy se výsledky bakteriologického vyšetření liší od těch genetických. V těchto případech nedošlo bakteriologickými metodami k záchytu toxinů. Je to dáno tím, že na bakteriologii zachytí přítomnost toxinu ale už ne genu pro tento toxin. A jak je známo bakterie *Clostridium difficile* produkuje toxin jen za některých podmínek. Proto v daném okamžiku toxin nemusí být zachycen. Podle přítomnosti antigenu dokážou zjistit, zda se jedná právě o tuto bakterii, ale neprokážou, zda má potenciál právě pro produkci toxinů. A právě to je důležité vědět, protože se tato bakterie vyskytuje i v běžné flóře u určitého procenta dětí a dospělých, takže pouhá její přítomnost nemusí ještě nic znamenat. Naopak v případě vzorku č. 15 byla bakteriologicky prokázána přítomnost toxinu, ale tento výsledek nebyl

potvrzen metodou genetickou. V tomto případě se mohlo jednat o falešně pozitivní výsledek.

Z těchto důvodů je nutná spolupráce mezi jednotlivými laboratořemi, a pro tyto účely byl vypracován „*Postup vyšetření Clostridium difficile ve stolici*“.

Vzorek stolice je z oddělení zaslán nejprve do laboratoře bakteriologie. Zde provedou imunochromatografické vyšetření.

1. Pokud je průkaz antigenu i toxinu A/B negativní, výsledek se hlásí na oddělení a žádné další vyšetření se neprovádí.
2. Pokud jsou výsledkem pozitivní antigen i toxin A/B, výsledek se nahlásí na příslušné oddělení a také ústavnímu epidemiologovi. Dále se provádí kultivace s citlivostí na ATB. Pokud se jedná o citlivý kmen, další vyšetření se neprovádí. V případě že se prokáže rezistentní kmen, posílá se do Národní referenční laboratoře.
3. Pokud je výsledkem pozitivní antigen a negativní toxin A/B pošle se vzorek do laboratoře molekulární biologie a genetiky, kde prostřednictvím PCR tento výsledek potvrdí nebo vyvrátí.

V některých případech může být PCR vyšetření provedeno na žádost ošetřujícího lékaře i přesto, že byl vzorek antigen a toxin negativní. Jedná se zejména o klinicky závažný stav pacienta.

## 6. Závěr

1. Průkaz toxinů *Clostridium difficile* metodami „hyplex ClosTox“ a „hyplex ClosTox 027“ založených na fotometrickém měření absorbance žlutého zbarvení po reverzní hybridizaci se ukázal poměrně náročným, a to jak z hlediska provedení, tak i času. Na druhou stranu se jedná o citlivé metody, kdy výrobce u testovaných referenčních kmenů uvádí citlivost 100 %. Výrazným nedostatkem těchto metod je, že pomocí nich neprokážeme přítomnost binárního toxinu. Druhou testovanou metodou byl systém GeneXpert, konkrétně test „Xpert C. Difficile“. Zahrnuje automatickou izolaci DNA, real-time PCR s detekcí a vyhodnocení výsledků, čímž velice usnadňuje práci v laboratoři. Jeho citlivost je uváděna kolem 95 %.

2. Co se týče časové dostupnosti výsledků, jednoznačně zvítězil právě zmiňovaný systém GeneXpert. Samotná analýza trvá 45 minut a 15 minut zabrala příprava vzorku a kazety k analýze. Z toho vyplývá, že výsledek je k dispozici do jedné hodiny. I proto našel tento test uplatnění u statimových vzorků. Pokud se vrátím k metodám „hyplex ClosTox“ a „hyplex ClosTox 027“ musela jsem analýzu DNA provést ručně a i samotné pipetování zabralo dost času. Celkově jsem se k výsledku dopracovala po necelých pěti hodinách. A vzhledem k závažnosti průběhu onemocnění je právě čas klíčovým k zahájení včasné léčby.

3. Systém GeneXpert se proto ukázal jako optimální metoda pro detekci toxinů *Clostridium difficile*. I když testy „hyplex“ vykazují vyšší citlivost než zmiňovaná metoda, je tato ztráta oproti jejím dalším vlastnostem a výhodám zanedbatelná. Proto postupem času test „Xpert C. Difficile“ zcela vytěsnil používání metod „hyplex ClosTox“ a „hyplex ClosTox 027“.

## 7. Seznam použitých zdrojů

1. BAG HEALTH CARE. *Instructions for use hyplex® ClosTox 027*. Germany: Lich, 2009. 28 s.
2. BAG HEALTH CARE. *Instructions for use hyplex® ClosTox*. Germany: Lich, 2008. 30 s.
3. BAG HEALTH CARE: *Hyplex PCR diagnostika*. [online] © 2007 – 2011. [cit. 6.3. 2012] Dostupné z: <http://www.bag-healthcare.cz/gl-hyplex-pracovni-postup-74>
4. BALEJOVÁ, M. Předběžná identifikace klinicky významných druhů klostridií. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010, roč. 16, č. 3, s. 80-85. ISSN 1211-264X.
5. BEDNÁŘ, M. et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. – dotisk. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6. (v knize neuvedeno)
6. Cepheid. *Xpert C. difficile* [DVD]. [Sweden]: IVD, 2008. 71001617
7. ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ R. et al. Kurz základních metod molekulární biologie. In: *bc.cas.cz* [online]. [cit. 20.3.2012]. Dostupné z: <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/ZMMB4.pdf>
8. ČÁPOVÁ, E. MRSA a *Clostridium difficile* aktuální původci nozokomiálních infekcí. In: *Sborník přednášek z 1. Jihočeské konference nemocniční epidemiologie a hygieny na téma prevence nozokomiálních nákaz konané 12. března 2008 v Městském domě kultury ve Strakonicih*. [Strakonice]: Nemocnice Strakonice, Jihočeský kraj, 2008, s. 25-33.
9. ČEČETKOVÁ, B., KANCELOVÁ, Z., CHLÍBEK, R. Nozokomiální nákazy. *Praktický lékař*. 2010, roč. 90, č. 3, s. 152-156. ISSN 1803-6597.
10. DŽUPOVÁ, O., BENEŠ, J. *Clostridium difficile* a klostridiová kolitida: co je nového? *Klin mikromol inf lék* 2008;14(3):115-117
11. EHRMAN, J. Anamnéza a symptomatologie v gastroenterologii. *Postgraduální medicína*. Gastroenterologie pro praktické lékaře (příloha). Praha: Mladá fronta a.s., 2005, roč. 7, č. 5, s. 7 -15. ISSN 1212- 4184.

12. Genery biotech s.r.o. Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR). Hradec Králové: © 2009 – 2011 [cit. 6.12.2011]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>
13. HEDLOVÁ, D. Nemocniční infekce a hygiena rukou. *Diagnóza v ošetrovatelství*. Praha: Promediamotion s.r.o, 2009, roč. 5, č. 2, s. 4-6. ISSN 1801 – 1349.
14. HUSA, P., SVOBODA R., VOJTILOVÁ, L. Kolitida vyvolaná *Clostridium difficile* - rizikové faktory, hypervirulentní kmen a nové terapeutické možnosti. *Gastroenterologie a hepatologie* [online]. Brno: Ambit Media, a.s, 2009, roč. 63, č. 4, [cit. 7.12.2011]. ISSN 1804 – 803X. Dostupné z: [http://www.csgh.info/arch\\_detail.php?stat=397](http://www.csgh.info/arch_detail.php?stat=397)
15. CHMELAŘOVÁ, E., ŠKAPOVÁ, T. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridia difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010, roč. 16, č. 3, s. 86-89. ISSN 1211-264X.
16. KORF, R., BRUCE, PRICHARD, J., DORIAN. Polymerázová řetězová reakce. *Základy lékařské genetiky*. 1. České vyd. Praha: Galén, 2007. s. 149 – 151. ISBN 978-80-7262-449-2
17. KOZLOVÁ L., KUBELOVÁ, V. *Jak psát bakalářskou a diplomovou práci*. 2. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2009. 55 s. ISBN 978-80-7394-155-0.
18. KRAMÁŘ R. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2007. 73 s. ISBN 978-80-7394-021-8.
19. LHOTKOVÁ, Š., SKOUPÁ, Z. Zdravotnické prádlo, oděvy a ochranné pomůcky. *Diagnóza v ošetrovatelství*. Praha: Promediamotion s.r.o, 2009, roč. 5, č. 2, s. 8-9. ISSN 1801 – 1349.
20. LIGOVÁ, A. et al. *Clostridium difficile Associated Diarrhoea – problém onkologického pacienta?* [online]. Ostrava: eOnkologie, © 2009 [cit. 7.12.2011]. Dostupné z: <http://www.eonkologie.cz/cs/2009-3/2009-03-ligova>
21. LOUIE, TJ. et al. Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med*. 2011. 364: 422-431.



22. MAĎAR, R., PODSTATOVÁ, R., ŘEHOŘOVÁ J. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2006. Nozokomiální nákazy, s. 15-19. ISBN 80-247-1673-9.
23. Nemocnice ČB a.s., laboratoř molekulární biologie a genetiky. *Izolace DNA*. [vnitřní metodický postup].
24. NYČ, O. *Principy laboratorní diagnostiky Clostridium difficile*. In: szu.cz [online]. 2008. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/17\\_2008/1\\_2/19\\_principy.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/17_2008/1_2/19_principy.pdf)
25. 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.
26. PODSTATOVÁ, R. Péče o pacienty s infekčním onemocněním. *Sestra*. 2011, roč. 21, č. 4, s. 52-56. ISSN 1210-0404.
27. POKORNÁ, R. Dezinfekce a sterilizace ve zdravotnických zařízeních. *Diagnóza v ošetrovatelství*. Praha: Promediamotion s.r.o, 2007, roč. 3, č. 7, s. 251 – 252. ISSN 1801 – 1349.
28. POLÍVKOVÁ, S. et al. Výskyt a charakter infekcí vyvolaných Clostridium difficile u pacientů s průjmovým onemocněním v pražské fakultní nemocnici. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010, roč. 16, č. 6, s. 206-210. ISSN 1211-264X.
29. Prevence a léčba průjmů nejen u dětí. *Diagnóza v ošetrovatelství*. Praha: Promediamotion s.r.o, 2007, roč. 3, č. 7, s. 246. ISSN 1801- 1349.
30. QIAGEN. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Third Edition. 2010. 71 s.
31. SAVIDGE, TC. et al. Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. *Nature Medicine*. 2011, č. 9, s. 1136-U147.
32. SZÚ. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2002 – 2011 – absolutně*. In: szu.cz [online]. 2012. [cit. 10.2.2012] Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolute>

33. ŠKODOVÁ, I. Bariérové postupy ve zdravotnictví. In: *Sborník přednášek z 1. Jihočeské konference nemocniční epidemiologie a hygieny na téma prevence nozokomiálních nákaz konané 12. března 2008 v Městském domě kultury ve Strakonicih.* [Strakonice]: Nemocnice Strakonice, Jihočeský kraj, 2008, s. 36
34. TECHLAB ®. *C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE*. USA, 2010. 40 s. RMS #91 – T525C – 01.
35. TECHLAB ®. *C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE™*. USA, 2009. [protokol imunochromatografického stanovení]. 91-525C-02.
36. URBÁŠKOVÁ, P. Surveillance antibiotické rezistence bakterií jako základ pro léčbu a kontrolu infekcí. *Postgraduální medicína. Antimikrobiální terapie pro praktické lékaře (příloha)*. Praha: Mladá fronta a.s., 2004, č. 6, s. 6-11. ISSN 1212-4184
37. VÁGNEROVÁ, I. et al. Clostridium difficile jako potencionální patogen u nezralých novorozenců. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2009, roč. 15, č. 1, s. 22-25. ISSN 1211-264X.
38. VINTR, J. Hygieny rukou – opatření v prevenci vzniku a šíření NN. *Sestra*. 2011, roč. 21, č. 4, s. 57-58. ISSN 1210-0404.
39. VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
40. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
41. Vyhláška MZ č. 195/2005 Sb. za dne 18. května 2005, kterou se upravují podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a hygienické požadavky na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče.
42. Zdravotnické noviny. *Hypervirulentní kmeny Clostridium difficile zůstávají reálnou hrozbou* [online]. Praha: 18. 10. 2010. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/zdravotnicke-noviny/hypervirulentni-kmeny-clostridium-difficile-zustavaji-realnou-hrozbou-455097>
43. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, prosinec 2009, roč. 18. ISSN 1803 – 6422.

## **8. Klíčová slova**

*Clostridium difficile*

Nozokomiální nákaza

PCR

Real time PCR

Pseudomembranózní enterokolitida

Produkce toxinů

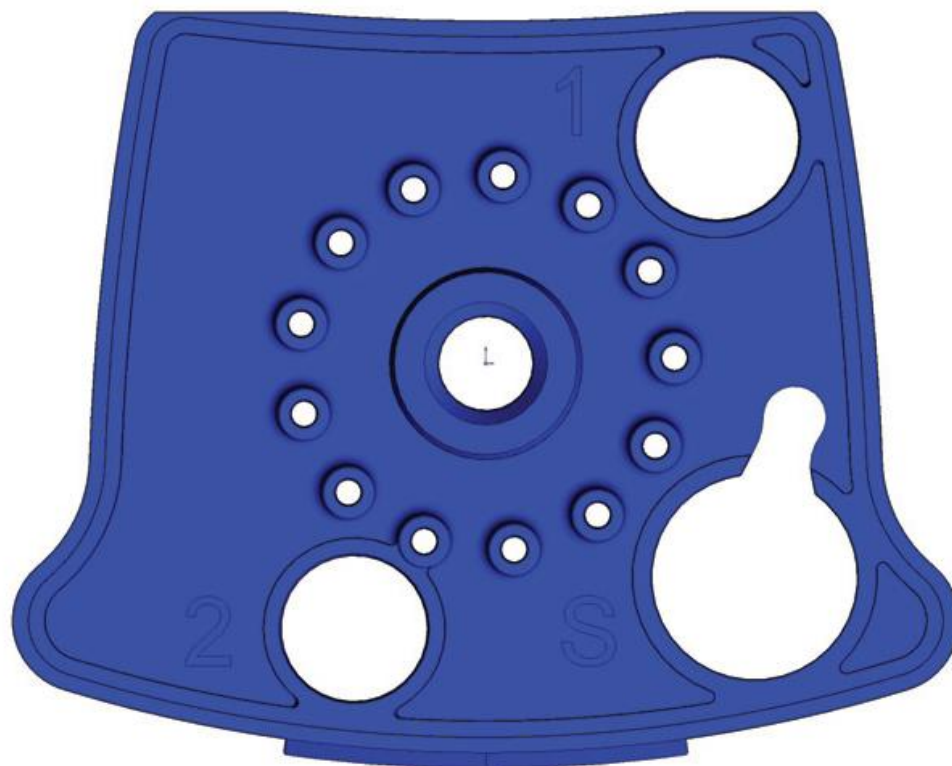
## 9. Přílohy

Příloha 1: Vrchní část kazety s otvory pro reakční činidla systému *Xpert C. Difficile* od GeneXpert

Příloha 2: Tyčky *C. difficile* v barevném rozlišení rastrovacího elektronového mikroskopu

Příloha 3: C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE™ – protokol imunochromatografického stanovení

Příloha 1: Vrchní část kazety s otvory pro reakční činidla systému *Xpert C. Difficile* od GeneXpert



Zdroj: (6)

Příloha 2: Tyčky *C. difficile* v barevném rozlišení rastrovacího elektronového mikroskopu



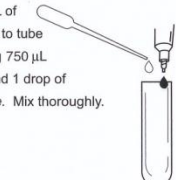
Zdroj: (14)

Příloha 3: C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE™ – protokol imunochromatografického stanovení

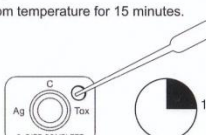
## C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™

### ASSAY PROTOCOL

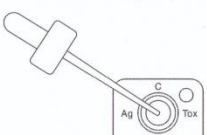
**1 Dilute fecal specimen**  
Add 25 µL of specimen to tube containing 750 µL Diluent and 1 drop of Conjugate. Mix thoroughly.



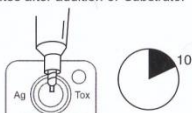
**2 Add sample**  
Transfer 500 µL of diluted sample-conjugate mixture to Sample Well. Incubate at room temperature for 15 minutes.




**3 Wash Membrane Device**  
Add 300 µL Wash Buffer to Reaction Window. Allow to completely absorb.




**4 Add Substrate reagent**  
Add 2 drops Substrate to Reaction Window. Incubate at room temperature. Read at 10 minutes after addition of Substrate.\*




**5 Interpretation**



Positive Antigen Result



Positive Antigen and Toxin Result





Negative Result


If there are no dots at C (control) the test is invalid. See package insert for additional interpretation of results.

\*A positive result may be interpreted at any time during the 10-minute incubation. A test cannot be ruled as negative or invalid until after the 10-minute incubation.

---

**Distributed by:**  
 **inverness medical**

**Developed and Manufactured by:**  
  
Blacksburg, VA 24060  
Made in the USA

 This chart does not contain the complete instructions for use of the C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™ test. For proper use of the assay, please read the accompanying literature.

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™ and TECHLAB are trademarks of TECHLAB®, Inc. ©2009 TECHLAB®, Inc. All rights reserved. Part No. 91-525C-02 Issued: 02/2009

Zdroj: (35)