



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Laboratorní metody diagnostiky *Clostridium difficile*
u hospitalizovaných pacientů v Nemocnici Tábor, a.s.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Luboš Čížek

Vedoucí práce: MUDr. Alice Kuchařová

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Laboratorní metody diagnostiky Clostridium difficile u hospitalizovaných pacientů v Nemocnici Tábor, a.s.*“ jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

podpis

Poděkování

Děkuji paní primářce MUDr. Alici Kuchařové za odborné vedení mé bakalářské práce. Mé poděkování patří též celému Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Tábor, a.s. za spolupráci při získávání údajů a odborné rady pro praktickou část.

Laboratorní metody diagnostiky *Clostridium difficile* u hospitalizovaných pacientů v Nemocnici Tábor, a.s.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je věnována problematice bakteriální infekce způsobené *Clostridium difficile*. Tato infekce je významným medicínským a epidemiologickým problémem, zejména u hospitalizovaných pacientů ve zdravotnických zařízeních.

Teoretická část této práce se věnuje popisu bakterie *Clostridium difficile* v souvislosti s jejím klinickým významem, příčinami výskytu, možnostmi laboratorních vyšetřovacích metod na průkaz její přítomnosti a jí produkovaných toxinů ve vzorcích. Shrnuje aktuální možnosti léčby způsobených onemocnění a prevence jejich vzniku. V praktické části jsou popsány laboratorní vyšetřovací postupy v současné době prováděné v Nemocnici Tábor, a.s. a jsou zde zpracována data z provedených vyšetření ve sledovaných obdobích. Všechna analyzovaná data popisují výsledky vyšetření u pacientů hospitalizovaných v tábořské nemocnici.

V praktické části práce jsou shrnuty a vyhodnoceny výsledky z provedených vyšetření. Je zaměřena na zodpovězení otázky týkající se dostatečnosti vyšetřovacího postupu a vlivu vybraných rizikových faktorů na četnost provedených vyšetření. Součástí je i důkaz, že výskyt klostridiové kolitidy vzniklé v souvislosti s nemocniční péčí v průběhu let roste. Dále jsou zde uvedeny případy dvou pacientů postižených onemocněním klostridiovou kolitidou způsobenou předchozí léčbou antibiotiky.

V závěru práce je shrnut význam bakterie *Clostridium difficile*, odpovědi na stanovené otázky a zhodnocení možných zlepšení v dané oblasti s ohledem na zjištění, že u provedených vyšetření je vysoký počet negativních výsledků

Klíčová slova

Clostridium difficile; *Clostridioides difficile*; kolitida; antibiotika; HAI; CDI

Laboratory Methods of *Clostridium difficile* Diagnostics in Hospitalized Patients in Tábor Hospital., a.s.

Abstract

This thesis deals with the issue of bacterial infection caused by *Clostridium difficile*. This infection is a significant medical and epidemiological problem, especially in hospitalized patients in health care facilities.

The theoretical part of this thesis focuses on the description of the bacterium *Clostridium difficile*, deals with its clinical significance, the causes of occurrence, and laboratory methods used to examine samples for the presence of the bacterium and its toxins. It summarizes current possibilities of treatment and prevention of the diseases caused by the bacterium. The practical part describes current laboratory examination procedures in the Hospital Tábor, a.s. The data from the examinations in the reference years are processed there. All analysed data describe results of examinations in patients hospitalized in the hospital in Tábor.

The practical part of the thesis brings summarized and evaluated results of the examinations. This part gives answers to the question of adequacy of examination procedures and the impact of selected risk factors on the frequency of the examinations. It also includes evidence that the incidence of health care associated *Clostridium difficile* colitis has been increasing over the years. The cases of two patients affected by this colitis caused by previous antibiotic treatment are also described.

In conclusion, the thesis summarizes the importance of *Clostridium difficile* and answers to the set questions. It was found that high number of results of tested samples were negative. Therefore, possible improvements are recommended.

Key words

Clostridium difficile; *Clostridioides difficile*; colitis; antibiotics; HAI; CDI

Obsah

1. TEORETICKÁ ČÁST	9
Úvod do problematiky <i>C. difficile</i>	9
1.1. Název	9
1.1.1. Morfologie a výskyt	10
1.1.2. Biochemické vlastnosti	11
1.2. Klinický význam	11
1.2.1. Toxigenita	11
1.3. Toxin A	12
1.4. Toxin B	12
1.5. Binární toxin	12
1.6. Rizikové faktory a patogeneze	13
1.6.1. Rizikové faktory onemocnění	13
1.6.2. Klinické příznaky klostridiové kolitidy	13
1.6.3. Pseudomembranózní kolitida	14
1.6.4. Toxické megakolon	14
1.7. Léčba	15
1.7.1. Obecná terapeutická doporučení	15
1.7.2. Antibiotická léčba	16
1.7.3. Probiotika	18
1.7.4. Fekální baterioterapie	18
1.7.5. Operativní řešení	19
2. Nákazy spojené s nemocniční péčí	20
2.1. Surveillance CDI	20
2.1.1. Surveillance na lokální úrovni	21
2.1.2. Surveillance na regionální, národní a evropské úrovni	21
3. Detekce <i>C. difficile</i>	22

3.1.	Preanalytická fáze	22
3.1.1.	Odběr.....	22
3.1.2.	Transport	23
3.1.3.	Uchování vzorku.....	23
3.2.	Analytická fáze	23
3.2.1.	Průkaz glutamátdehydrogenázy a toxinů	24
3.2.2.	Polymerázová řetězová reakce.....	26
3.2.3.	Kultivační vyšetření	28
3.2.4.	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	29
4.	PRAKTICKÁ ČÁST	31
	Cíle práce a hypotézy.....	31
4.1.	Metodika	32
4.2.	Preanalytická fáze.....	32
4.3.	Analytická fáze	32
4.3.1.	TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE.....	32
4.3.2.	Kultivace <i>C. difficile</i>	36
4.3.3.	Xpert® <i>C. difficile</i> BT.....	37
5.	Zpracování dat	40
6.	Klinické případy	46
6.1.	Kazuistika I.....	46
6.2.	Kazuistika II.....	46
7.	Diskuze	48
8.	Závěr	50
9.	Zdroje.....	51
10.	Seznam obrázků.....	56
11.	Seznam grafů a tabulek.....	57
12.	Seznam zkratk.....	58

ÚVOD

Clostridium difficile je anaerobní, grampozitivní, sporulující bakterie. V malém množství je tato bakterie běžnou součástí střevní mikroflóry lidí i zvířat, ale přemnožení zejména toxigenních kmenů může vyvolat u postiženého jedince onemocnění různé závažnosti. Toxiny a antigeny *Clostridium difficile* lze laboratorně prokázat vyšetřením vzorku stolice. Vyšetření lze provádět různými metodami pomocí komerčních diagnostických sad.

Tato bakalářská práce se v teoretické části zabývá problematikou bakterie *Clostridium difficile*, onemocněními, která může způsobovat, faktorů jejich vzniku a léčbou. V praktické části jsou vypracovány postupy vyšetření, které jsou využívány v současné době na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Tábor, a.s. Dále jsou zpracována poskytnutá data o provedených vyšetřeních z minulých let. Data poskytnutá pro tuto práci pochází z reálného provozu nemocnice, a tak s nimi je i dále nakládáno, neboť popisují reálný stav v místě a čase.

1. TEORETICKÁ ČÁST

Úvod do problematiky *C. difficile*

Clostridioides difficile, též označovaná starším názvem *Clostridium difficile* je grampozitivní bakterie s klinickým a epidemiologickým významem. Od roku 1978 je *C. difficile* v literatuře označováno za možného původce kolitid spojených s nadměrným užíváním antibiotik (Beneš et al., 2014). Z tohoto důvodu je nutné sledovat výskyt onemocnění způsobených touto bakterií a hledat možnou spojitost s předchozí antibiotickou léčbou.

Taxonomické zařazení *C. difficile*:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Clostridia*

Řád: *Clostridiales*

Čeleď: *Peptostreptococcaceae*

Rod: *Clostridioides*

Druh: *Clostridioides difficile*

(Lawson et al., 2016).

1.1. Název

Bakterie *Clostridioides difficile* byla poprvé popsána v roce 1935 mikrobiology Ivanem C. Hallem a Elisabeth O'Toole jako součást kolonizující flory trávicího traktu u novorozenců. Byla pojmenována *Bacillus difficilis* (Hall, 1935). Druhové jméno *difficilis* (*difficile*) odkazuje na neobvyklou obtížnost izolace a studia této bakterie. Kultivace bakterie *Clostridioides difficile* totiž vyžaduje anaerobní prostředí a trvá zpravidla déle, než je tomu u jiných bakterií (De Vos et al., 2009).

V roce 1938 bylo pojmenování této bakterie upřesněno francouzským bakteriologem André R. Prévotem. Bakterie *Bacillus difficilis* byla přejmenována na *Clostridium difficile*. Tato změna byla zveřejněna v časopise *Annales de l'Institut Pasteur* (Kamiya, 1993; Gerding, 2009).

Spolu s rozvojem moderních identifikačních metod dochází k přesnějšímu porozumění fylogenetické příbuznosti bakterií. V důsledku toho byl v roce 2016 publikován článek o návrhu reklasifikace *Clostridium difficile* na *Clostridioides difficile*. Hlavním autorem tohoto článku je profesor Paul A. Lawson z univerzity v Oklahomě. Podkladem pro tuto změnu byly fylogenetické analýzy sekvencí 16S rRNA u bakterií rodu *Clostridium*. Následně došlo k vymezení rodu *Clostridium* výhradně bakterii *Clostridium butyricum* náležící do klastru I. Oproti tomu u *Clostridium difficile* byl stanoven klastr XI, kterému náleží i další bakteriální druhy z čeledi *Peptostreptococcaceae*. *Clostridium difficile* bylo nově klasifikováno jako *Clostridioides difficile*. Tato změna umožnila zachovat již zažité zkratky, např. CDI = *Clostridium difficile* infection/ *Clostridioides difficile* infection. V praxi se nyní velice často používá označení *C. difficile*, jehož význam zůstává i po reklasifikaci beze změny (Lawson et al., 2016; Krůtová a Nyč, 2015).

1.1.1. Morfologie a výskyt

Bakterie rodu *Clostridioides* mají tvar štíhlých tyček. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,5-1,9 x 3,0-16,9 μm . Tyčinky se barví dle Grama pozitivně (obr. č. 1).



Obr. 1: Preparát *C. difficile* obarvený dle Grama (vlastní foto)

Bakterie *Clostridioides difficile* se vyskytuje běžně v přírodě v prostředí s nedostatkem kyslíku, například v půdě, ve stolici zvířat a lidí a v odpadních i povrchových vodách. Při nepříznivých životních podmínkách tvoří endospory. Sporulace je významnou vlastností celého bakteriálního kmenu Firmicutes (Schindler, 2010).

Endospory jsou klidovým stádiem bakterií. Tvoří se zejména v případě, kdy v okolním prostředí není dostatek živin. Spóry jsou rezistentní vůči vlivu nepříznivých vnějších faktorů, jako je příliš nízká či vysoká teplota, dehydratace nebo přítomnost toxických látek (Říhová Ambrožová, 2004).

1.1.2. Biochemické vlastnosti

Bakterie *C. difficile* má schopnost z bílkovin hydrolyzovat želatinu. Ze sacharidů kvasí velkou část jejich zástupců. *C. difficile* vytváří na kultivačních půdách ploché okrouhlé nepravidelně lemované kolonie, které nezpůsobují změnu na žloutkovém agaru, ani na agaru obsahujícím krev. Jednotlivé bakteriální kolonie pod UV světlem zeleně fosforeskují, za předpokladu, že je přidán do kultivačního media vitamín K₁. Sporulace in vitro není u *C. difficile* ve významné míře, proto je cíleně zvyšována přidávkem žloutku a žlučových solí (Bednář et al., 1994).

1.2. Klinický význam

C. difficile se u lidí běžně vyskytuje v tlustém střevě zdravých jedinců. Na klinickém významu nabývá tehdy, když se v důsledku nerovnováhy střevní mikroflóry začne množit. Některé kmeny *C. difficile* produkují toxiny, které svým působením narušují strukturu a funkci tlustého střeva

1.2.1. Toxigenita

Clostridioides difficile je za určitých podmínek schopno produkovat toxiny. Toxin A je enterotoxin a toxin B je cytotoxin. Oba tyto toxiny působí vzájemně synergicky. Produkované toxiny poškozují střevní epitel a hlubší vrstvy střevní stěny. Působení toxinu B na hladkou svalovinu a vegetativní nervy stěny tračníku způsobuje postupnou zástavu peristaltiky. To má za příčinu zvýšené množení mikrobů ve střevech, na které organismus reaguje úpornými průjmy, které jsou samočisticím mechanismem střev. Proto jsou průjmy spojené s iniciálním stádiem onemocnění. Převážná část toxigenních kmenů je schopna

tvořit ještě tzv. binární toxin. Mechanismus působení tohoto toxinu není zatím blíže popsán, ale je prokázáno jeho spojení se závažnějším průběhem onemocnění (Beneš et al., 2014).

1.3. Toxin A

Toxin A je řazen mezi enterotoxiny a má molekulovou hmotnost 308 kDa. Jeho působení ve střevech vyvolává vodnaté až mírně hemorrhagické průjmy (Bednář et al., 1994).

Toxin A způsobuje dysfunkci epitelových buněk střeva tak, že vyvolává kumulaci vazké tekutiny krevního původu ve střevě. V důsledku přítomnosti většího množství viskózní tekutiny nemohou buňky střevního epitelu řídit vodní bilanci ve střevě. Toxin A je toxický pro většinu buněk imunitního systému, ničí struktury buněk na povrchu střevní sliznice a potlačuje preventivní účinek polymorfonukleárů. Dále způsobuje zánětlivou reakci epitelových buněk střeva signalizující rozvíjející se pseudomembranózní enterokolitidu (Petržilková, 2011).

1.4. Toxin B

Toxin B je klasifikován jako nekrotizující cytotoxin, může být až tisíckrát toxičtější v porovnání s toxinem A. Přes svou vysokou toxicitu, dokáže toxin B způsobovat nekrózu buněk střevního epitelu pouze tehdy, byly-li již poškozeny jejich povrchové struktury působením toxinu A. K destrukci epitelových buněk je nutné působení obou toxinů a ve správném pořadí, tím pak dochází na sliznici střeva ke vzniku typických erozí a ulcerací (Petržilková, 2011).

1.5. Binární toxin

Některé toxigenní kmeny *C. difficile* také mohou produkovat další toxin, popsáný jako binární toxin, jehož produkce je kódována geny *cdtA* a *cdtB*. Poprvé byl tento toxin popsán v roce 1988 a jeho role zatím nebyla zcela objasněna, stejně tak nebyla dosud prokázána patogenita tohoto toxinu. Předpokládá se, že má nepříznivý vliv na těžší průběh onemocnění. Některé kmeny *C. difficile* produkují pouze binární toxin bez přítomnosti toxinů A a B. Přítomnost binárního toxinu je využívána při toxinotypizaci (Drábek et al., 2008).

1.6. Rizikové faktory a patogeneze

Přemnožení toxigenních kmenů *C. difficile* předchází řada možných rizikových faktorů. Tyto faktory mohou výrazně usnadňovat či dokonce způsobovat nástup onemocnění tlustého střeva a zkomplikovat tak dosavadní zdravotní stav a léčbu pacienta.

1.6.1. Rizikové faktory onemocnění

Jedním z hlavních rizikových faktorů vedoucích ke vzniku onemocnění označovaných jako *C. difficile* infection (CDI) způsobených bakterií *C. difficile* je střevní dysmikrobie. Tato dysmikrobie vzniká především působením antibiotik, která ovlivňují střevní mikroflóru. Podle Bergmanna a Horáka (2008) se převážně jedná o antibiotika se širokospektrým působením, a to až v 90 % případech. Za nejvíce riziková antibiotika lze považovat aminopeniciliny kombinované s inhibitory betalaktamáz, cefalosporiny druhé a vyšší generace, klindamycin, linkomycin a fluorochinolony. Onemocnění může také postihnout i jedince, kterým nebylo podáno žádné antibiotikum, zde se jedná o pacienty s maligní i benigní stenózou střeva či ischemií střeva. Příčinou těchto onemocnění může být dlouhotrvající operační výkon v kombinaci s celkovým zdravotním stavem (Bergmann a Horák, 2008).

Existují další rizikové faktory vedoucí k onemocnění způsobenému *C. difficile*. Jejich význam zatím nebyl zcela prozkoumán a dostatečně popsán. Jedná se například o látky, které snižují žaludeční aciditu, jako jsou inhibitory protonové pumpy a blokátory histaminových receptorů (Džupová a Beneš, 2008).

Mezi faktory, které nejsou spojeny s podáním léčiv, patří délka hospitalizace, imobilita střev i samotného pacienta a vyšší věk pacientů spolu s polymorbiditou. Jsou však známy i infekce vyskytující se u jedinců mladších věkových skupin (Džupová a Beneš, 2008).

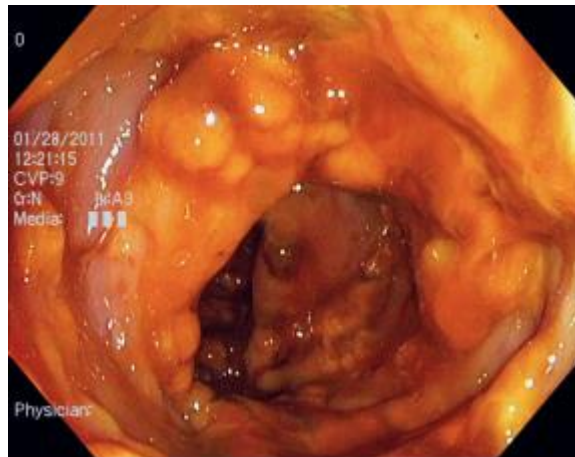
1.6.2. Klinické příznaky klostridiové kolitidy

Zánětlivé onemocnění tlustého střeva, konkrétně tračníku, způsobené kolonizací střeva toxigenním kmenem bakterie *C. difficile*, se může u citlivého jedince projevovat lehkými až středně těžkými vodnatými průjmy. Průjmy mohou být doprovázeny horečkami či zvracením. Průjmy mohou vést až k dehydrataci organismu (Bergmann a Horák, 2008). Průjmy prokazatelně vyvolané působením klostridiových toxinů jsou označovány zkratkou CDAD (z ang. *C. difficile*-associated diarrhea) (Gerding et al., 1995).

O závažném průběhu klostridiové kolitidy mohou svědčit příznaky jako horečka, zimnice, hemodynamická nestabilita se septickým šokem, peritonitida, leukocytóza nad $15 \times 10^9/l$, v séru pak zvýšená hladina kreatininu o více než 50 % nad obvyklou hodnotu a zvýšená hladina laktátu. Dalším příznakem může být pseudomembranózní kolitida, nebo rozpětí tračníku (Beneš et al., 2014).

1.6.3. Pseudomembranózní kolitida

Působení klostridiových toxinů na střevní sliznici u těžších forem onemocnění vede k tvorbě ulcerací ostrůvkovitých tvarů pokrytých pablánami. Snímek takto poškozeného střeva je na Obr. 2. Tento stav střevní sliznice je pojmenován pseudomembranózní kolitida. V důsledku vzniku ulcerací na střevní sliznici–může dojít k útlumu či úplné zástavě peristaltických pohybů střeva. Střevní stěna přestává plni fyziologickou funkci bariéry (Bergmann a Horák, 2008).



Obr. 2: Endoskopický snímek střevní sliznice poškozené CDI. Na snímku jsou viditelné typické ulcerace pokryté pablánami (GALLEGOS-OROZCO, 2012).

1.6.4. Toxické megakolon

Nadměrné hromadění toxických látek a plynu může vést k rozepínání tračníku a rozvoji tzv. toxického megakolon. Toto závažné onemocnění je spojeno se zaplavováním organismu toxickými látkami, které pronikají ze střeva do dutiny břišní a do krevního oběhu. Dochází k rychlému rozvoji sepse, možné ruptuře střeva a s tím souvisejícím ohrožením života postiženého jedince (Bergmann a Horák, 2008). Toxické megakolon je znázorněno na Obr. 3.



Obr. 3: Toxické megakolon na radiografickém snímku (ClinicalGate.com, 2015).

1.7. Léčba

Léčba kolitidy způsobené toxiny bakterie *C. difficile* má široké spektrum možností. Volba léčebného vždy závisí na konkrétním případě, tedy na závažnosti onemocnění, na jeho průběhu, na věku a fyzické kondici pacienta a na přítomných komorbiditách, neboli onemocněních se kterými se v daném případě kolitida kombinuje. Obecně lze léčbu kolitidy rozdělit do dvou kategorií, jednou jsou obecná terapeutická doporučení, mezi které patří opatření, kterými lze onemocnění mírnit a dále nevyvolávat, ale také lze tato opatření uvažovat i jako prevenci před vznikem onemocnění. Druhou kategorií pak jsou terapeutická řešení, která cílí přímo na daný problém, tedy na léčbu onemocnění (Beneš et al., 2014).

1.7.1. Obecná terapeutická doporučení

Prvním krokem v léčbě CDI je okamžité přerušení podávání antibiotik. Není-li to možné, je nutné změnit doposud užívaný lék. Volí se antibiotika s užším spektrem účinnosti, současně se podává speciální terapie namířená přímo proti původci onemocnění. Při lehčích formách onemocnění lze tímto způsobem docílit uzdravení z kolitidy (Beneš et al., 2014).

Podle potřeby je u pacienta zavedena rehydratační a kolitická dieta. Kolitická dieta se pak skládá z nenadýmavé a nedráždivé stravy. V těžších případech je aplikována výživa parenterální. (Beneš et al., 2014).

Následuje kontraindikace medikace. Vysazují se všechny léky, které mohou negativně přispívat k průběhu onemocnění. Jedná se například o léky tlumící peristaltiku střeva, ty mohou vést k rozvoji toxického megakolon, úplné zástavě peristaltiky a možné perforaci střeva. Dále jsou kontraindikovány léky tlumící aciditu, ty jednoznačně přispívají ke vzniku kolitidy, není však podloženo, že přerušení této konkrétní medikace má vliv na již vzniklé kolitické onemocnění (Beneš et al., 2014).

1.7.2. Antibiotická léčba

Mezi nejčastěji podávaná antibiotika při léčbě kolitidy patří metronidazol, vankomycin, fidaxomicin, tigeicyklin, teikoplanin a rifaximin. Každý z těchto léků má své specifické vlastnosti a spektra účinnosti i použití či způsobu podání. Schéma léčby je znázorněno na Obr. 4 (Beneš et al., 2014).

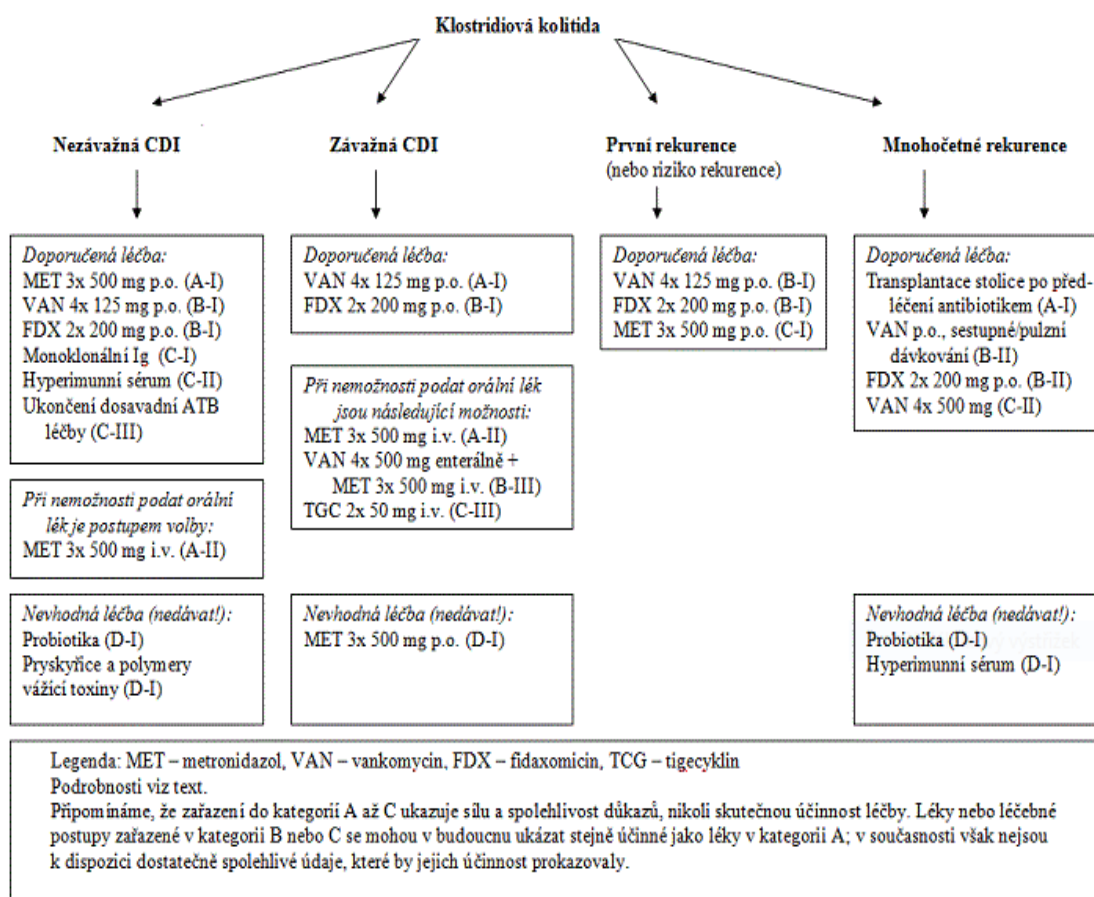
Metronidazol je antibiotikem působícím na většinu anaerobně rostoucích bakterií. Jedná se o jediné antibiotikum na léčbu CDI, které lze podávat orálně i parenterálně. Do tračníku se pak samotná látka dostává intestinální sekrecí, čímž je účinek obou způsobů podání léku prakticky identický (Beneš et al., 2014).

Vankomycin je antibiotikum určené především k léčbě závažných infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi, mezi které *Clostridioides difficile* patří. Vankomycin se nevstřebává z gastrointestinálního traktu. Podání tohoto léku je buď ve formě roztoku nebo kapslí. Vankomycinu je příbuzný lék teikoplanin, který je díky své vyšší ceně a obtížné dostupnosti zřídka používán (Beneš et al., 2014).

Fidaxomicin je novější antibiotikum, které má úzké spektrum působení registrované pouze na léčbu CDI. Stejně jako vankomycin se nevstřebává z gastrointestinálního traktu. Tento lék inhibuje proteosyntézu na bakteriálních ribozomech, což má za následek zastavení buněčných procesů produkujících toxiny, proto je účinek tohoto léku rychlejší (Beneš et al., 2014).

Tigecyklin je parenterálně podávané širokospektrální antibiotikum tetracyklinové řady s účinností na mnohé kmeny multirezistentních bakterií. Do střevního lumen se dostává intestinální sekrecí a způsobuje inhibici proteosyntézy stejně jako fidaxomicin. Účinnost tohoto léku zatím nebyla plně zdokumentována a je proto užíván zejména v případech těžké kolitidy spojené se zástavou střevní peristaltiky, při kterém není možné podání léčby orální cestou (Beneš et al., 2014).

Rifaximin je antibiotikum s širokým spektrem účinnosti, které se vztahuje i na bakterie *Clostridioides difficile*. U některých kmenů *C. difficile* byla popsána rezistence na toto antibiotikum (Beneš et al., 2014).



Obř. 4: Schéma terapeutických možností CDI (Beneš et al., 2014).

1.7.3. Probiotika

Při léčbě kolitidy je možné podpořit obnovení toxiny zasažené střevní mikroflóry podáním probiotik. Probiotika jsou mikroorganismy, které jsou přidávány do potravin, protože příznivě působí na střevní mikroflóru člověka či zvířete. Příznivé působení mikroorganismů je podmíněno požitím dostatečného množství živých bakterií, například konzumací mléčných produktů či kvašených výrobků. Probiotické organismy se musí při konzumaci dostat do střev, v množství nejméně 10^8 kolonií/ml, aby byly schopny významně ovlivnit složení střevní mikroflóry (Kokešová, 2003).

Všechny známé bakterie, u nichž byly prokázány probiotické účinky náleží do skupiny bakterií mléčného kvašení, která zahrnuje druhy *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus* (Kokešová, 2003).

Prokazatelný účinek probiotik při léčbě CDI byl pozorován pouze u přípravků obsahujících živé kvasinky *Saccharomyces boulardii*. Jedná se o nepatogenní kmen kvasinek používajících se při léčbě průjemových onemocnění. Tento kmen je odolný a rezistentní vůči kyselému prostředí, vysoké i nízké teplotě. U imunokompromitovaných pacientů, není léčba probiotiky příliš vhodná, jelikož s sebou nese riziko systémové mykologické infekce (Beneš et al., 2014).

1.7.4. Fekální bakterioterapie

Fekální bakterioterapie, neboli transplantace stolice, je metoda založená na přenesení prokazatelně zdravé intestinální mikroflóry od zdravého dárce pacientovi. Před transplantací je pacient 10–14 dní léčen vankomycinem k potlačení růstu *C. difficile*. Pacientovi je následně nazojejunální sondou podána mikrobiologicky prověřená homogenizovaná stolice. Nazojejunálním podáním dochází k eliminaci nežádoucího vlivu žaludečních šťáv. Úspěšnost této metody u rekurentních případů podle Beneše et al. (2014) převyšuje 80 %. Alternativně lze stejného cíle se zatím neznámou mírou úspěšnosti dosáhnout vysokým klysmatem nebo pomocí endoskopu. V současné době se provádí výzkum úspěšnosti podání preparátu orálně ve formě specificky upravených kapslí (Borody a Khoruts, 2012; Beneš et al., 2014).

1.7.5. Operativní řešení

Kolektomie s terminální ileostomií, neboli odnětí tlustého střeva s vyústěním na povrch břišní stěny, je metoda používaná jako naprosto krajní řešení problému s onemocněním způsobeným *C. difficile* u pacientů, kteří pozitivně nereagují na žádnou z nasazených, v porovnání téměř neinvazivních metod. Samotné chirurgické řešení není řešením se stoprocentní účinností, udává se v rozmezí mezi 19 % až 71 % v závislosti na konkrétním zdravotním stavu pacienta (Beneš et al., 2014).

2. Nákazy spojené s nemocniční péčí

Nákazy spojené s nemocniční péčí, (HAI, z angl. „healthcare associated infections“), dříve označované jako nozokomiální nákazy jsou onemocnění způsobená interakcí se zdravotní péčí. Dochází k nim při kontaktu mezi pacienty, zdravotnickým personálem, diagnostickými nástroji nebo materiálem. Příznaky těchto onemocnění nejsou v přímé souvislosti s onemocněními, které byly důvodem k hospitalizaci, neboť vznikly až v jejím průběhu, zpravidla v horizontu 48 hodin od hospitalizace. Za HAI lze považovat i onemocnění, která propuknou do 30 dnů po propuštění pacienta ze zdravotnického zařízení do domácí péče (Čečetková et al., 2010). HAI postihují jak dospělé pacienty, tak i děti. Nejčastěji se vyskytují infekce krevního řečiště, zápal plic a infekce močových cest (Čečetková et al., 2010).

Mezi nejlepší a nejúčinnější způsob obrany před těmito nemocemi je prevence. Ta zahrnuje desinfekci a sterilizaci nástrojů, případně používání nástrojů jednorázových a používání vhodných ochranných prostředků zdravotnického personálu. Důležitým prvkem prevence je také správné dodržování hygienických návyků, mezi které patří důkladné mytí a desinfekce rukou jak pacientů, zdravotnického personálu tak i případných návštěv. Nedílnou součástí prevence je také racionální antibiotická léčba (Gerding et al., 2008; Revelas, 2012).

C. difficile je příčinou HAI z důvodu, že jeho spóry jsou rezistentní vůči většině používaných desinfekcí na alkoholové bázi, která účinkují na ostatní infekční agens. Spórami kontaminované plochy se následně stávají možnými zdroji nákazy pro pacienta. Hospitalizovaní pacienti s rizikovými faktory, mezi které patří i léčba antibiotiky, jsou více náchylné právě k těmto infekcím (Beneš et al., 2014).

2.1. Surveillance CDI

Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci (ESCMID) uveřejňuje postupy, podle kterých lze jednotně diagnostikovat, léčit a zároveň kontrolovat výskyt infekcí *C. difficile*. Od roku 2003 byl Evropě zaznamenán zvýšený výskyt ribotypu O27, který se vyznačuje vyšší virulencí. V roce 2015 byl Evropským centrem pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) zveřejněn protokol pro podporu surveillance případů CDI u hospitalizovaných pacientů v nemocnici. Získaná statistická data slouží k

zmapování incidence případů CDI i k evidenci úmrtí na toto onemocnění. Surveillance je prováděna na úrovni lokální, regionální a evropské (Krůtová et al., 2018).

2.1.1. Surveillance na lokální úrovni

Surveillance na lokální úrovni je prováděna jednotlivými nemocnicemi. Účelem je včasné a efektivní monitorování jednotlivých případů CDI. Na základě získaných informací jsou přijímána epidemiologická opatření, mezi které patří izolace pacienta a zmapování možných rezervoárů nákazy na jednotlivých odděleních. Pro systém lokální surveillance je důležitá funkční infrastruktura sestávající se z lékařů a sester přímo na klinických pracovištích při identifikování pacientů s charakteristickými příznaky CDI, pracovníků z oddělení odpovídající za prevenci a kontrolu infekčních nemocí a laboratoří s efektivní vyšetřovací metodou *C. difficile* a toxinů. Získaná data jsou významným podkladem pro regionální a evropskou úroveň surveillance CDI (Jindrák et al., 2016).

2.1.2. Surveillance na regionální, národní a evropské úrovni

Účelem regionální úrovně surveillance CDI je získávání a monitorování dat v rámci okresů a krajů. Součástí je i monitorování na úrovni celé republiky. Získaná data jsou využita jako podklad pro účinné omezování rizik přenosu onemocnění mezi zdravotnickými zařízeními, případně do komunity. Za tuto část surveillance odpovídají orgány ochrany veřejného zdraví, zejména Krajské hygienické stanice (KHS) (Jindrák et al., 2016).

Evropská úroveň využívá data získaná z jednotlivých evropských zemí ke sledování výskytu vysoce virulentních kmenů v oblasti kontinentu. Hlídá i jejich případný přeshraniční přenos. Tuto úroveň zajišťuje ECDC se spoluprací Evropské komise (Jindrák et al., 2016).

3. Detekce *C. difficile*

Pro zahájení odpovídající léčby a hygienických opatření u pacientů s CDI je důležité včasné a správné laboratorní vyšetření. Diagnostika je tvořena preanalytickou, analytickou a postanalytickou vyhodnocovací fází. Dodržení doporučených postupů v jednotlivých fázích je předpokladem pro kvalitu celého diagnostického procesu.

3.1. Preanalytická fáze

Preanalytickou fází vyšetření jsou míněny všechny úkony před samotnou analýzou vzorku. Tato fáze zahrnuje informace o zdravotním stavu pacienta před odběrem, jeho přípravu na odběr a samotný odběr biologického materiálu, uchování a transport (Zima, 2013).

3.1.1. Odběr

Primárním vzorkem pro vyšetření přítomnosti bakterie *C. difficile* a produkce jejích toxinů je vzorek stolice. Odběr je doporučeno provádět co nejdříve po nástupu symptomů, jako je průjem. Dle Štěpánové a Tomáškové (2014) můžeme průjem klasifikovat jako 5. až 7. typ v Bristolské škále typů stolice (Tabulka 1). Odběr se provádí do sterilního uzavíratelného plastového kontejneru nebo speciální nádoby na odběr stolice. Doporučené minimální množství odběru jsou 2 ml (Beneš et al., 2014). Odběrové soupravy jsou zobrazeny na Obr. 5 a 6.

Typ 1:	oddělené, tvrdé hrušky (bobky), podobné ořechu (obtížná pasáž)
Typ 2:	tvar jitrnice s naznačeným hrudkováním
Typ 3:	tvar jitrnice s rýhami na povrchu
Typ 4:	tvar jitrnice či hada, vyhlazená na povrchu a poddajná
Typ 5:	hladké hrušky, jasně oddělené okraje (snadná pasáž)
Typ 6:	kypré částičky s členitými okraji, kašovitá stolice
Typ 7:	vodnatá, bez pevných kousků, úplně tekutá stolice

Tabulka 1: Bristolská škála stolice (Štěpánová a Tomášková, 2014).



Obr. 5: Sterilní plastový kontejner o objemu 120 ml. (vlastní foto)



Obr. 6: Nádoba na odběr stolice se špachtlí, objem 20 ml. (Medipos.cz)

3.1.2. Transport

Optimální doba pro transport a zpracování vzorku s ohledem na postupnou degradaci toxinů je do 2 hodin od odběru. Pozdější zpracování vzorku může být u imunochemické metody průkazu toxinů příčinou falešné negativity výsledku. Pokud není možné dodržet tento časový limit, je nutné se řídit následujícími pravidly pro uchovávání vzorků, aby nedošlo k jeho znehodnocení (Beneš et al., 2014).

3.1.3. Uchování vzorku

Po dobu nezbytně nutnou je možné vzorek uchovat při teplotě 5 °C maximálně 24 hodin. Pro delší skladování vzorku určeného k vyšetření toxinu je nutné uchování při teplotě – 70 °C. Uchování vzorku při – 20 °C není možné z důvodu rychlé ztráty cytotoxických aktivit (Nyč, 2008).

3.2. Analytická fáze

Analytická fáze zahrnuje samotné zpracování vzorku stolice, při kterém je zjišťována přítomnost *C. difficile* nebo jeho toxinů v daném vzorku. Jedná se o metodu nepřímou, kdy je ve vzorku detekována glutamátdehydrogenáza (GDH), kterou *C. difficile* produkuje. Zároveň s GDH je možné prokazovat i klostridiové toxiny. *C. difficile* je také možné určit kultivačním vyšetřením stolice s následnou identifikací narostlého kmene. Prokazovat lze také klostridiové toxiny, které tato bakterie produkuje, případně geny

odpovědné za produkci těchto toxinů. Citlivost jednotlivých metod se liší, proto je doporučeno využití minimálně dvou různých testů k získání přesnějšího výsledku (Beneš et al., 2014).

3.2.1. Průkaz glutamátdehydrogenázy a toxinů

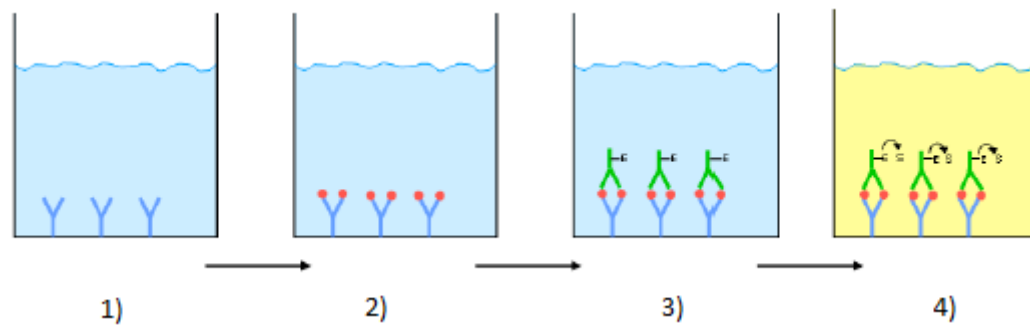
Glutamátdehydrogenáza (GDH) je specifický enzym, který je produkován bakterií *C. difficile*. Díky této specifitě je GDH vhodným analytem při zjišťování přítomnosti *C. difficile* ve stolici. Při stanovení GDH může být současně prokazována přítomnost klostridiových toxinů, jejichž detekční metoda využívá stejného principu. K zajištění validních výsledků je doporučeno používat pouze soupravy stanovující jak GDH, tak toxiny, určení pouze GDH se považuje za nedostatečné (Beneš et al., 2014).

K průkazu GDH i toxinů se používají imunochemické metody, které jsou založeny na specifické vlastnosti antigenů (Ag) a protilátek (Ab) tvořit vzájemně vazby tzv. imunokomplexy. Mezi takové metody patří ELISA (z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“, enzymová imunoanalýza na pevné fázi) a imunochromatografie (Lochmanová, 2014). Antigen nebo protilátka jsou označeny enzymem. Komplex protilátka-enzym nebo protilátka-antigen se nazývá konjugát (Bartoš et al., 2013).

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), známá také jako EIA (Enzyme Immunoassay) (Bursová et al., 2014, s. 28) lze rozdělit na nekompetitivní (sendvičovou) a kompetitivní, která se dále dělí na přímou a nepřímou. Při provádění nekompetitivní metody je nutno dodržet reakční podmínky, kterými jsou nadbytečné množství antigenu navázaného na stěnu vyšetřovací destičky i konjugátu oproti předpokládanému množství protilátek, při nesplnění těchto podmínek by pak výsledné koncentrace byly falešně nižší, jelikož by se některé protilátky neměly kam navázat a v důsledku toho by došlo při promývání k jejich odstranění (Fialová, 2013).

Průkaz GDH lze provést metodou ELISA v tzv. sendvičovém uspořádání. Principem je navázání antigenu, v tomto případě GDH, na monoklonální protilátku proti GDH adsorbovanou na dno mikrotitračních destiček, povrch zkumavek či na jinou pevnou fázi. Při inkubaci obou reaktantů vzniká imunokomplex. Následuje promytí a přidání zvířecí monoklonální protilátky proti GDH označené enzymem křenovou peroxidázou. Dojde k navázání protilátky na GDH. Přebytek nenavázané protilátky je odmyt a je přidán

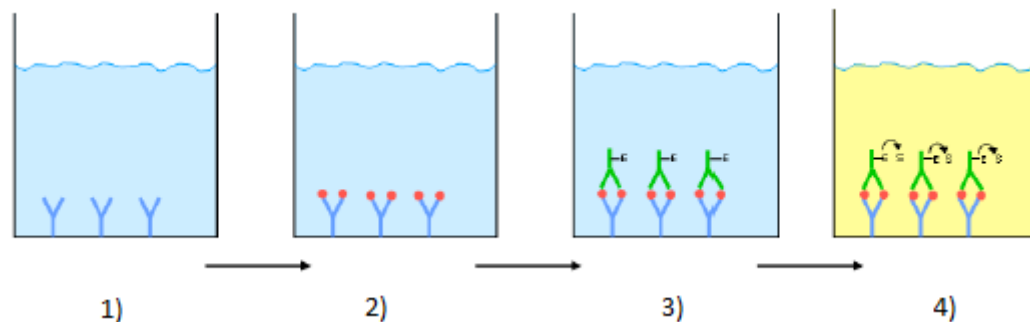
substrát pro křenovou peroxidázu. Dochází k chemické reakci, která je navržena tak, aby výslednými produkty byly chromogenní sloučeniny. Vznik chromogenních sloučenin způsobí změnu zabarvení reakční směsi, které je možné stanovit spektrofotometricky (Fialová, 2013). Průběh metody je znázorněn na Obr. 7 a 8.



Obr. 7: Průkaz GDH metodou ELISA (Groot a van der Harst, 2015, s úpravou).

- 1) adsorbovaná protilátka proti GDH; 2) vzniká imunokomplex GDH + protilátka; 3) konjugát se váže na imunokomplex; 4) reakcí enzym-substrát vzniká zbarvení

Průkaz klostridiových toxinů metodou ELISA probíhá na podobném principu. antigenem jsou v tomto případě toxiny A/B.



Obr. 8: Průkaz toxinů metodou ELISA (Groot a van der Harst, 2015, s úpravou).

- 1) adsorbovaná protilátka proti toxinu A/B; 2) vzniká imunokomplex toxin + protilátka; 3) konjugát se váže na imunokomplex; 4) reakcí enzym-substrát vzniká zbarvení

Přítomnost GDH a toxinů lze prokázat také imunochromatografickou metodou. Principem je rychlá membránová enzymová imunoanalýza. Na membráně jsou ve dvou testovacích liniích imobilizovány specifické protilátky proti GDH a toxinům A a B. Jedna

linie je určena pro kontrolu. Vzorek, který obsahuje antigeny GDH nebo toxiny A/B je inkubován s konjugátem (specifickými protilátkami označenými enzymem). Směs vzorku a konjugátu poté migruje membránou a analyty jsou zachytávány v testovacích liniích. Následuje krok promytí a vyvolání barevné reakce přidáním substrátu (Kim et al., 2014; Techlab, 2018).

3.2.2. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda vycházející z principu replikace nukleových kyselin (NK), která slouží jako nástroj k rychlému a snadnému zmnožení potřebných úseků NK. Tyto úseky jsou ohraničeny tzv. primery, krátkými oligonukleotidy, které díky své komplementaritě nasedají na vlákna nukleových kyselin. K syntéze vybraného úseku NK se nejčastěji používá termostabilní polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* tzv. Taq polymeráza (Gelfand, 1989). Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci NK, přisedání primerů a syntézu NK.

Díky takovému zmnožení, ke kterému metoda PCR slouží, je následně možné provádět analýzy NK i ze vzorků o malém množství. Tato metoda je velmi citlivá a ke správné identifikaci postačí i velmi nízká koncentrace vyšetřovaného patogenu ve vzorku (Zima, 2013).

Metoda PCR se sestává ze tří základních kroků. Prvním krokem je denaturace. Jedná se o proces, kdy se NK zahřívá na teplotu 94 - 98 °C a to po dobu 20 - 30 sekund. Tato teplota způsobí rozrušení vodíkových můstků v molekule NK a dojde k rozvolnění dvoušroubovice. Vznikne tak jednovláknová molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je podstatným prvkem v druhém kroku této metody. V tomto kroku dochází k nasednutí primerů tzv. annealing při teplotě 50–55 °C. Na NK kyselinu s navázaným primerem nasedá DNA polymeráza a syntetizuje komplementární úsek NK. Při syntéze se používá teplota v závislosti na druhu DNA polymerázy. Samotná syntéza probíhá tak, že DNA komplementární vlákno přirůstá k původní molekule ve směru od 5' konce ke 3' konci. Tento postup se pak cyklicky opakuje pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly (Zima, 2013).

End-point detection

V současnosti existuje několik desítek variant metody PCR, přičemž pro téměř všechny tyto metody existují společné rysy. Jedním z hlavních společných rysů je takzvaný end-point detection, což je detekce výsledného produktu na konci reakce. Amplifikovaný produkt je nejčastěji vizualizován hybridizací se značenými sondami nebo za pomoci gelové elektroforézy. Výjimkou je kvalitativní metoda real-time PCR, která sleduje průběžně množství vzniklého amplifikačního produktu (McPherson a Moller, 2000).

Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

Metodu polymerázové řetězové reakce lze uplatnit pro oba typy nukleových kyselin, jak DNA, tak RNA. RNA je oproti DNA méně stabilní a je citlivá na degradaci působením ribonukleáz. Jelikož je molekula RNA pouze jednovláknová, musí být před samotnou analýzou převedena metodou RT-PCR na dvouvláknovou formu, tzv. komplementární DNA (cDNA, z angl. „complementary DNA“). Získaná cDNA slouží jako templát pro PCR reakci, jejíž průběh je zmíněn výše v kap. 2.3.2 (Bustin et al., 2005).

RT-PCR lze rozdělit do tří základních typů, podle způsobu jejího provedení. Prvním typem je dvoustupňová RT-PCR, kdy reakce probíhají ve dvou zkumavkách, přičemž v jedné zkumavce probíhá reverzní transkripce a následně ve druhé PCR. Druhým typem je dvoustupňová RT-PCR probíhající v jedné zkumavce, kdy po reverzní transkripci jsou do stejné zkumavky přidány reagenty pro PCR. Třetím typem je pak jednostupňová RT-PCR probíhající v jedné zkumavce, kdy reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce probíhají paralelně (McPherson a Moller, 2000; Tichopad et al., 2004; Nolan et al., 2006).

Real-time PCR

Real-time PCR je varianta PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci produktu již v průběhu polymerázové reakce. Tato metoda zahrnuje jak amplifikaci, tak i analýzu produktu, přičemž není potřeba použití vizualizačních technik. Principem real-time PCR je rychlé a přesné zaznamenání produktů okamžitě po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu. K zaznamenání nově vzniklých produktů jsou používány různé systémy založené na principu změny intenzity fluorescenčního záření v průběhu amplifikace (McPherson a Moller, 2000; Nolan et al., 2006).

Metodou real-time PCR v komerčních setech lze prokázat gen pro tvorbu toxinu B (*tcdB*) bakterie *C. difficile*. Dále lze prokázat gen pro tvorbu binárního toxinu (*cdt*) a některé charakteristické delece vyskytující se specificky u epidemiologicky významných ribotypů, např. 027 a 176. Pro ribotyp 027 je charakteristická delece nukleotidu na pozici 117 genu *tcdC* (negative toxin regulator). Kmeny s touto delecí v regulačním genu *tcdC* mohou vykazovat zvýšenou produkci toxinu a zvýšenou tvorbu spór, díky kterým jsou schopny lépe přežívat v prostředí (Beneš et al., 2014; Cepheid®, 2016).

3.2.3. Kultivační vyšetření

Kultivačním vyšetřením je myšleno umělé namnožení organismu, konkrétně bakterií, na sterilních živných půdách. Tímto způsobem je ze vzorku získána čistá kultura vyšetřovaného mikroorganismu. Čistou kulturou se označuje přítomnost pouze jediného mikrobiálního druhu (Frébortová, 2017).

K řízenému namnožení požadovaného organismu dochází v umělém prostředí nahrazující jeho přirozené podmínky. K úspěšnému namnožení mikroorganismu musí být splněno několik základních podmínek, které jsou uvedeny v textu níže (Marková, 2008).

Jednou ze základních podmínek je vhodný zdroj živin. Jedná se o látky nutné ke správnému průběhu procesů zajišťujících produkci živé hmoty a buněčných materiálů, růst, rozmnožování a získávání energie pro život. Tyto živiny můžeme rozdělit do několika skupin podle látek, kterých jsou zdrojem:

- uhlík (cukry, bílkoviny)
- dusík (želatina, pepton, kaseinový hydrolyzát, aminokyseliny z masové infuze)
- vitamíny a minerály (pepton, kvasnicový a játrový extrakt, krev, krevní sérum)

(Frébortová, 2017).

Další důležitou podmínkou je kultivační atmosféra, která závisí na druhu metabolismu dané bakterie. Aerobní bakterie potřebují pro svůj růst kyslík. Mikroaerofilní bakterie vyžadují pro svůj růst přítomnost kyslíku, ale pouze v nízkých koncentracích. Anaerobní bakterie rostou bez přístupu kyslíku. Fakultativně anaerobní bakterie rostou jak v prostředí s přítomností kyslíku, tak i bez něj. Existují také bakterie, které rostou v přítomnosti oxidu uhličitého (CO₂). Takové bakterie mohou být kultivovány ve speciálním termostatu s řízenou koncentrací CO₂.

Mezi důležité podmínky pro kultivaci mikroorganismů patří také teplota, při které dochází k jejich růstu a množení. Většina pro člověka patogenních mikroorganismů má svou optimální teplotu růstu 37 °C. Takové bakterie pak označujeme jako mezofilní. Bakterie označované jako psychrofilní mají teplotní optimum nižší než 16°C. Bakterie termofilní mají svou optimální teplotu množení kolem 55 °C (Dudová, 2006; Marková, 2008).

Před anaerobní kultivací *C. difficile* je doporučováno vzorek stolice nejprve dekontaminovat pomocí tzv. alkoholového šoku. Vzorek je přibližně jednu hodinu inkubován s 96% etanolem nebo 70% metylalkoholem. Alkohol podporuje klíčení spor a potlačuje ostatní bakteriální floru (Beneš et al., 2014; Krůtová a Nyč, 2015).

3.2.4. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Laboratorní vyšetřovací metoda MALDI-TOF MS, z angl. „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry“, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s detektorem doby letu. Tato metoda v mikrobiologii slouží k identifikaci bakterií, kvasinek a plísní, na úrovni rodu, druhu a poddruhu. Základem pro metodu MALDI-TOF je vzorek čisté mikrobiální kultury (Bursová et al., 2014).

MALDI-TOF využívá šetrnou ionizační techniku, pomocí níž probíhá tvorba iontů bez fragmentace molekul. Samotná ionizace probíhá za účasti matrice, která zprostředkovává interakci molekul analyzované látky se svazkem laserového světla (Bursová et al., 2014).

Takto zprostředkovaná interakce molekul s laserem probíhá bez přímého aktivování biomolekuly a jejího štěpení nežádoucími způsoby. Matrice absorbuje energii z laserového paprsku a část molekul přejde do excitovaného stavu. Excitované molekuly matrice přenášejí protony na molekuly vzorku za vzniku pseudomolekulových iontů. Tím je vzorek ionizován, ionty jsou následně urychlené silným elektrickým polem a vstupují do vakuové trubice detektoru, kde se pohybují takovou rychlostí, která odpovídá jejich hmotnosti a náboji. Analyzátozem měříme čas potřebný pro dosažení detektoru daným iontem. Tento čas je zcela závislý na poměru molekulové hmotnosti ku náboji iontu (Bursová et al., 2014).

Výstupem měření je hmotnostní spektrum molekulových iontů daného mikroorganismu. Takto naměřená hmotnostní spektra jsou jedinečně specifická, podobně jako otisk lidského prstu. Metodou MALDI-TOF jsou získány proteinové profily mikroorganismů, které jsou následně porovnávány s referenční databází kontrolních kmenů (Bursová et al., 2014).

Výhodou této metody je přesnost, rychlost, malá náročnost přípravy vzorku, široké spektrum využití, možnost analýzy velkého množství vzorků a nízká cena vyšetření. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady, důraz na čistou mikrobiální kulturu a komplikovaná identifikace příbuzných druhů bakterií a směsných kultur (Bursová et al., 2014).

4. PRAKTICKÁ ČÁST

Cíle práce a hypotézy

Pro tuto práci byly stanoveny následující cíle:

Cíl 1) Popsat, zhodnotit a porovnat všechny metody analýzy vzorku stolice pro vyšetření přítomnosti *C. difficile* a jeho toxinů používané v Nemocnici Tábor, a.s. .

Cíl 2) Zpracovat a vyhodnotit data o vyšetření proběhlých v období 01/2018-12/2020.

Na základě stanovených cílů se práce věnuje níže zmíněným hypotézám:

Ad cíl 1) Vyšetřovací mechanismus pro vyšetření při podezření na klostridiové infekce v Nemocnici Tábor, a.s. je dostatečný.

Ad cíl 2) Pohlaví není faktorem rozhodujícím o vzniku CDI u pacientů, věk ano.

Ad cíl 2) Četnost případů s nozokomiálním přenosem se každoročně zvyšuje.

4.1. Metodika

Praktická část byla vypracována na základě dat získaných na Oddělení lékařské mikrobiologie (OLM) v Nemocnici Tábor, a.s. Toto oddělení zajišťuje také rutinní bakteriologická vyšetření včetně průkazu klostridiového antigenu a toxinu. Vzorky jsou přijímány jak z jednotlivých oddělení nemocnice, tak od praktických lékařů a dalších poskytovatelů zdravotní péče. Během mé přítomnosti v laboratořích v rámci tohoto oddělení mi bylo umožněno provést jednotlivé metody diagnostiky z přijatých vzorků.

4.2. Preanalytická fáze

Během provozní doby jsou vzorky přijímány na Oddělení lékařské mikrobiologie (OLM). Vzorky jsou zároveň nepřetržitě přijímány na Oddělení klinické biochemie a Oddělení hematologie s pracovištěm krevní banky, kde jsou uskladněny a následně transportovány na OLM.

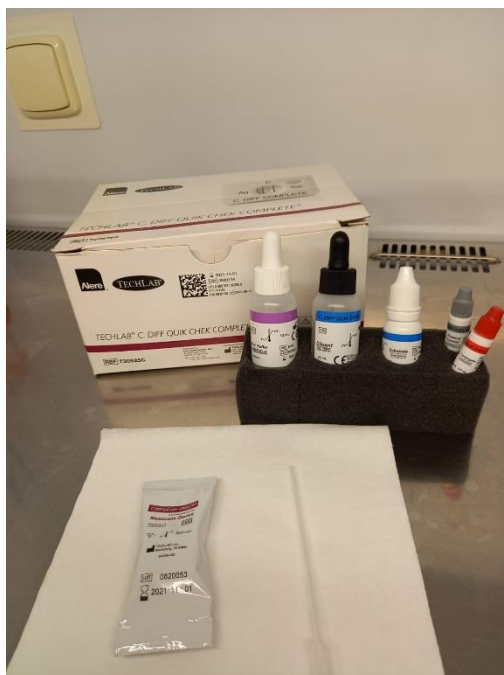
Po přijetí vzorku na OLM jsou zkontrolovány údaje uvedené na žádance o vyšetření a porovnány s údaji na vzorku. Tak je zamezeno případné záměně vzorků, nebo vyšetření nesprávného materiálu. Následně je požadované vyšetření zadáno laborantem do laboratorního informačního systému (LIS). Zároveň je vyšetřovanému vzorku přiděleno laboratorní číslo. Tímto číslem je vzorek označen. Žádanka je opatřena denním razítkem a jménem a podpisem přijímajícího laboranta.

4.3. Analytická fáze

Při požadavku diagnostiky přítomnosti *C. difficile* ze stolice jsou lékařům nabízeny dva druhy vyšetření. První vyšetřovací metodou je průkaz klostridiového antigenu včetně toxinů A/B pomocí membránové enzymové imunoanalýzy. Druhou metodou je pomocí real-time PCR zjišťována přítomnost genu pro toxin B, genu pro binární toxin a možnost detekce hypervirulentního kmene ribotypu 027.

4.3.1. TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE

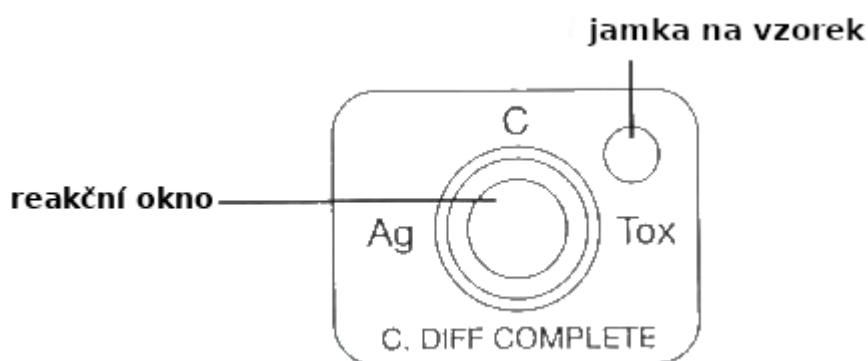
Komerční vyšetřovací soupravou od firmy TECHLAB® (Obr. 9) je zjišťována detekována přítomnost GDH a toxinů A/B pomocí membránové enzymové imunoanalýzy.



Obr. 9: Vyšetřovací souprava TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE (vlastní foto).

Souprava obsahuje: testovací kazetku s membránou (Obr. 10), ředící roztok (diluent), promývací tlumivý roztok (wash), konjugát, substrát, pozitivní kontrolu a jednorázové plastové přenosové pipety.

Nutný materiál, který souprava neobsahuje: zkumavky, časovač, vortex, a jednorázové rukavice



Obr. 10: Membránový prostředek (testovací kazetka) s jamkou pro aplikaci vzorku a reakčním oknem (Techlab, 2018).

Před použitím byly reagenty včetně kazetek vytemperovány na pokojovou teplotu a vzorky důkladně promíchány. Pro každý vzorek byla připravena jedna testovací zkumavka a jedna kazetka s membránou. Obě byly popsány příslušným číslem vzorku nebo identifikátorem kontroly. Do zkumavky bylo přidáno 750 µl diluentu, 1 kapka konjugátu a 25 µl vzorku stolice (v případě formované stolice 2 mm v průměru). V uzavřené zkumavce byl naředěný vzorek promíchán pomocí vortexu. 500 µl směsi zředěného vzorku s konjugátem byl přenesen do jamky pro vzorek na kazetce, která byla následně ponechána k inkubaci 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby inkubace bylo do reakční štěrbině přidáno 300 µl promývacího tlumivého roztoku a vyčkáno, než se roztok plně absorbuje. Po tomto kroku promytí byly přidány 2 kapky substrátu. Po 10 minutách byl test připraven k odečtu výsledku vzniklé vizualizace.

Vzniklé linie testu byly odečteny na konci desetiminutové doby kolmo a na dobře osvětleném místě. Test byl uznán platným pouze v případě, že byla patrná pozitivní reakce v oblasti kontroly C. V případě, že kontrola C byla negativní, test byl neplatný.

Antigen -, Toxin - : Pokud v testovacích pruzích pro antigen a toxin nebyla vytvořena barevná reakce, tak ve vzorku nebyla detekována přítomnost GDH a toxinů A/B.

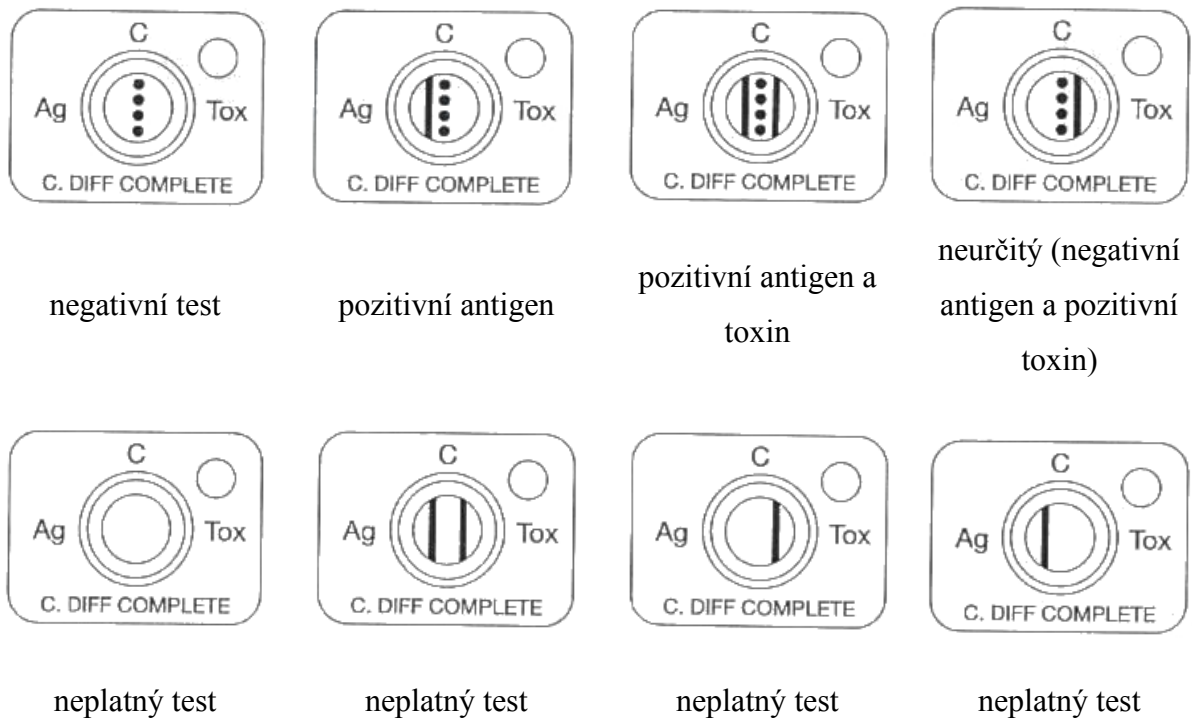
Antigen +, Toxin -: Pokud v testovací zóně byl vytvořen modře zbarvený pruh pouze v oblasti pro antigen, tak byla detekována přítomnost GDH, tedy přítomnost *C. difficile* ve vzorku. Takový výsledek je považován za suspektní CDI.

Antigen +, Toxin +: Modré pruhy v oblastech jak pro antigen, tak toxin svědčily o přítomnosti GDH i toxinu A/B.

Antigen -, Toxin +: Nízké procento vzorků může vykazovat negativitu pro antigen a pozitivitu pro toxin. Takové výsledky je potřeba interpretovat jako nejasné. Je doporučeno test opakovat s novým vzorkem stolice. Pokud i po zopakování testu vykazuje test stejný výsledek, vykazuje se výsledek toxinu jako pozitivní.

V případě, že vyjde pozitivní antigen a negativní toxin, je provedeno další vyšetření konfirmační metodou, metodou kultivační. Postup kultivace je uveden v následující kapitole 4.3.2. Po vykultivování bakteriálního kmenu je znovu proveden imunochromatografický test, ke zjištění GDH a produkce toxinů. V některých případech bylo zaznamenáno, že v klinickém vzorku nebyl toxin detekován, ale ve vyizolovaném bakteriálním kmeni ano.

Možné výsledky testu s vyhodnocením jsou zobrazeny na Obr. 11 a 12.



Obr. 11: Přehled možných výsledků testu TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE (Techlab, 2018).



Obr. 12: Přehled naměřených výsledků testu TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE (vlastní foto).

4.3.2. Kultivace *C. difficile*

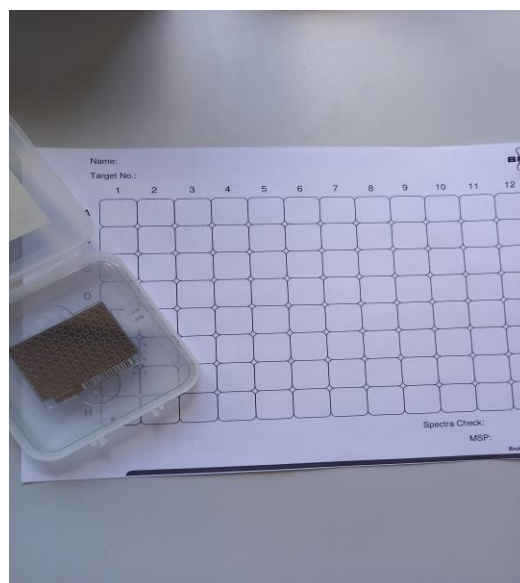
Na základě imunochromatografického testu, ve kterém byl prokázán pouze antigen byla provedena kultivace ze vzorku na selektivním chromogenním agaru CHROMID[®] C. difficile od společnosti Biomerieux.

Vzorek byl před samotnou kultivací podroben alkoholovému šoku. Část vzorku stolice byla ve zkumavce promíchána s 96% etanolem a inkubována při pokojové teplotě 45 minut. Po inkubaci byl inkubovaný vzorek odstředěn 50 minut na centrifuze při 2700 rpm. Přebytný supernatant byl slit a získaný sediment rozočkován na číslem vzorku popsaný CHROMID[®] C. difficile. Následně byl naočkovaný agar inkubován 24-48 h při 37 °C v anaerobním systému Bugbox od společnosti Baker Ruskinn.

Narostlý kmen byl identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (na Obr. 13 a 14). V případě, kdy bylo identifikováno *C. difficile*, byl proveden nový imunochromatografický test.



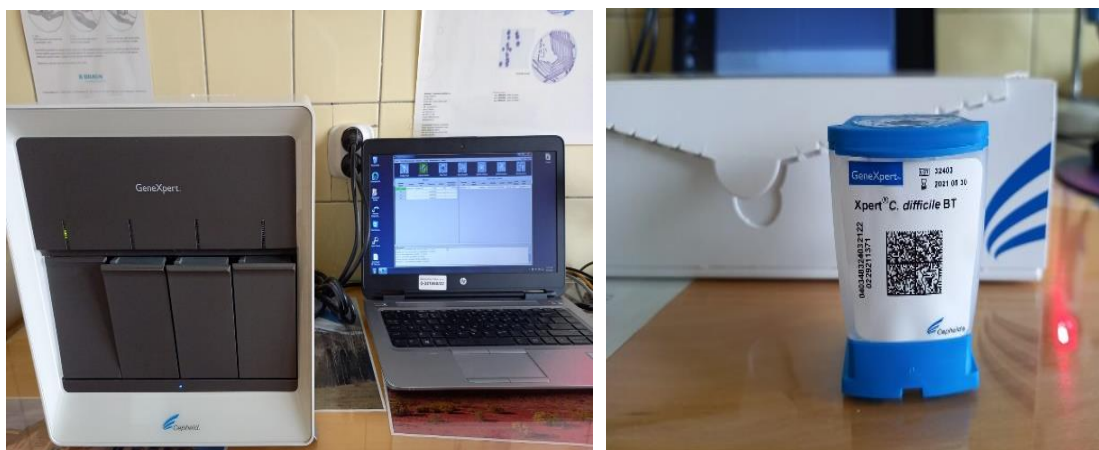
Obr. 13: Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF od společnosti Bruker (vlastní foto).



Obr. 14: Destička na vzorky s plánkem rozmístění jednotlivých vzorků (vlastní foto).

4.3.3. Xpert® *C. difficile* BT

PCR detekce byla provedena na přístroji GeneXpert® od firmy Cepheid® pomocí soupravy Xpert® *C. difficile* BT (Obr. 15). Jedná se o plně automatizovanou RT-PCR metodu s automatickým vyhodnocením. Tato souprava obsahuje materiál k provedení analýzy 10 vzorků.



Obr. 15: Přístroj GeneXpert® s testovací kazetkou (vlastní foto).

Testovací souprava obsahuje: kazety s integrovanými reakčními zkumavkami s reagensy, Sample reagent (guanidinium thiokyanát) a přenosové pipety.

Není součástí soupravy: tampón k přenosu vzorku a vortex

Kazeta a Sample reagent byla vyjmuta z obalu a popsána příslušným číslem vzorku. Pomocí tamponu byl přenesen vzorek stolice do lahvičky se Sample Reagentem. Po zalomení tyčinky tamponu a pevném uzavření byla lahvička vortexována 10 sekund při vysoké rychlosti. Po dostatečném promíchání vzorku s činidlem byl celý obsah zkumavky přenesen do kazety Xpert® *C. difficile* BT do otvoru pro vzorek. Kazeta byla uzavřena víkem. Výrobce je doporučeno test zahájit do 30 minut od přidání vzorku do kazety.

V programu se kliknutím na Create Test otevře okno, ve kterém se zadá identifikační číslo vzorku. Dále je potřeba naskenovat čárový kód, kterým je označena kazeta Xpert *C. difficile* BT. Automaticky jsou vyplněny položky Select Assay (vybrat analýzu), Reagent Lot ID (číslo šarže výrobku), Cartridge SN (výrobní číslo kazety) a Expiration Date (datum expirace). Zadané údaje se potvrdí tlačítkem Start Test.

Testovaná kazeta se vloží do přístrojového modulu označeného zeleným světlem. Po zavření dvířek je pak zahájeno testování. Po ukončení testu světlo zhasne. Po zhasnutí

zeleného světla a následném uvolnění zámku dvířek modulu je potřeba vyjmout použitou kazetu, která je poté zlikvidována dle platných postupů nakládání s nebezpečným odpadem.

Výsledky testu jsou vyhodnoceny a interpretovány přímo programem pomocí definovaných algoritmů z naměřených fluorescenčních hodnot. Po ukončení testu jsou zobrazeny v okně View Results. Možné výstupy z vyšetření jsou spolu s jejich vysvětlením jsou uvedeny v tabulce 2.

Toxigenic <i>C. diff</i> NEG, Binary Toxin NEG, 027 NEG	Cílové sekvence <i>C. difficile</i> produkující toxin (toxin B a binární toxin) nejsou detekovány; jiné cílové sekvence DNA pro toxigenní <i>C. difficile</i> (delece <i>tcdC</i> na 117) nejsou detekovány.
Toxigenic <i>C. diff</i> POS, Binary Toxin NEG, 027 NEG	Byly detekovány cílové sekvence DNA <i>C. difficile</i> produkující toxin. <i>C. difficile</i> produkující toxin – cílová sekvence <i>C. difficile</i> (gen toxinu B) má Ct v platném rozmezí a koncové vyhodnocení nad minimálním nastavením. Gen binárního toxinu a delece <i>tcdC</i> na 117 nejsou detekovány.
Toxigenic <i>C. diff</i> POS, Binary Toxin POS, 027 NEG	Byly detekovány cílové sekvence DNA <i>C. difficile</i> produkující toxin. Cílové sekvence <i>C. difficile</i> (gen toxinu B plus gen binárního toxinu) mají Ct v platném rozmezí a koncová vyhodnocení nad minimálním nastavením; delece <i>tcdC</i> na 117 není detekována.
Toxigenic <i>C. diff</i> POS, Binary Toxin POS, 027 PRESUMPTIVE POS	Byly detekovány cílové sekvence DNA bakterie <i>C. difficile</i> a předpokládaný typ 027 produkující toxin. Všechny cílové sekvence <i>C. difficile</i> a předpokládaný typ 027 produkující toxin (toxin B, binární toxin a delece <i>tcdC</i> na 117), mají hodnotu Ct v platném rozmezí a koncová vyhodnocení nad minimálním nastavením.
Toxigenic <i>C. diff</i> NEG, Binary Toxin POS, 027 NEG	Nebyly detekovány genové sekvence DNA <i>C. difficile</i> produkující toxin B; ale je detekována jiná sekvence (gen binárního toxinu), která má Ct v platném rozmezí a koncové vyhodnocení nad minimálním nastavením. Klinický význam izolátů pozitivních jen na binární toxin ještě není určen.
INVALID ERROR NO RESULT	Přítomnost nebo nepřítomnost cílové DNA <i>C. difficile</i> nemůže být stanovena. Výsledky interní kontroly a kontroly sondy nevyhovují přijatelným hodnotám, nebo vůbec neproběhly.

Tabulka 2: Výsledky a interpretace testu Xpert *C. difficile* BT, Techlab

5. Zpracování dat

Data pro vypracování praktické části této práce byla získána z Laboratorního informačního systému (LIS) Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Tábor, a.s. Tato data byla anonymizována a zpracována v souladu s cíli této práce do následujících výstupů. Další data byla poskytnuta z oddělení nemocniční hygieny, která popisují vývoj výskytu nozokomiálních nákaz v letech 2017, 2018 a 2019.

Získaná data z LIS popisují provedená vyšetření průkazu přítomnosti bakteriální infekce *C. difficile* ve vzorcích stolice u hospitalizovaných pacientů. V tabulce 3 jsou uvedeny četnosti provedených vyšetření ve sledovaných letech 2018, 2019 a 2020. Ve sledovaném období bylo toto vyšetření provedeno u 2317 klinických vzorků.

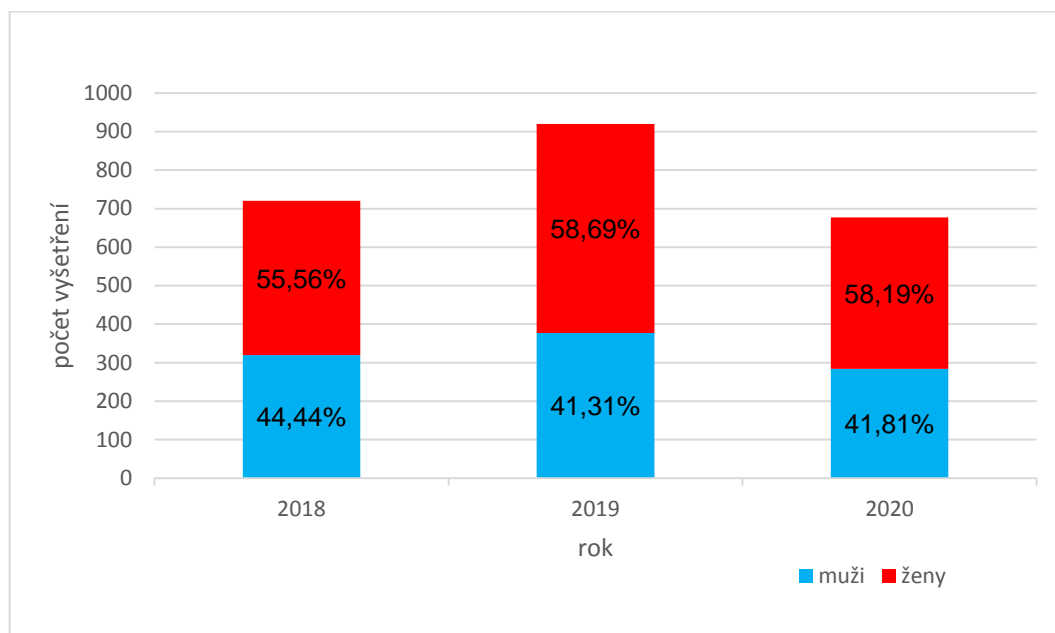
rok	muži	ženy	celkem
2018	320	400	720
2019	377	543	920
2020	284	393	677

Tabulka 3: Počet provedených vyšetření ve sledovaných letech, vlastní zpracování

Pro různá onemocnění existují rizikové faktory, které mohou ovlivňovat náchylnost jedince k danému postižení, v tomto případě infekci *C. difficile*. Obecně lze rozdělit rizikové faktory na ovlivnitelné (kouření, míra konzumace alkoholu, stravovací návyky, léčba a jiné.) a neovlivnitelné (pohlaví, věk, genetická výbava, anamnéza jedince aj.). Vzhledem k povaze získaných dat bylo možné sledovat pouze faktory věku a pohlaví a jejich potenciální vliv jako předpoklad pro vznik onemocnění způsobených infekcí *C. difficile*.

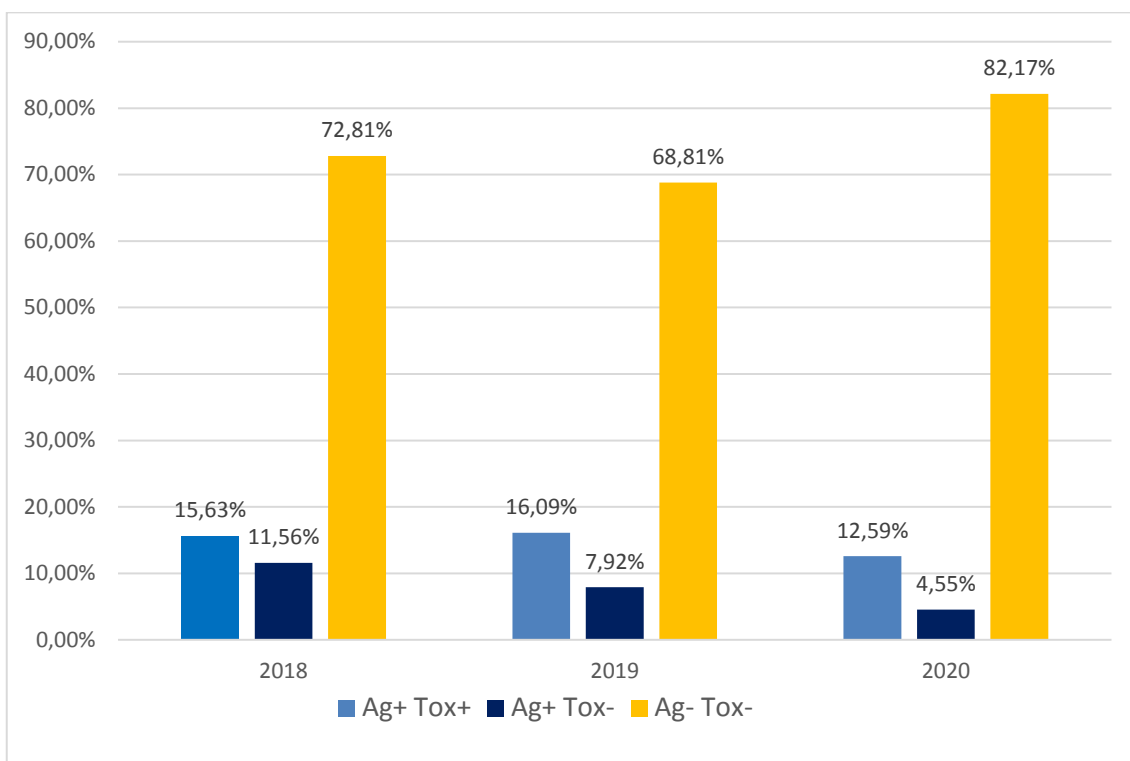
Onemocnění způsobená infekcí *C. difficile* se vyskytují jak u mužů, tak u žen. Stejně tak se tato onemocnění vyskytují u různých věkových kategorií. Míra možného zvýšeného výskytu těchto onemocnění v závislosti na věku či pohlaví je názorně zobrazena na následujících grafech. Volba grafu je zvolena s ohledem na povahu zpracovaných dat a informaci, kterou mají tato data reprezentovat. Výpovědní hodnota dat je relevantní pouze pro specifickou oblast, ve které byla prováděna vyšetření, která neměla za cíl poskytnout statistický vzorec pro stanovení obecně platných závěrů, nýbrž byla prováděna za účelem prokázání infekce *C. difficile* v jednotlivých případech.

Při sledování dat v letech 2018, 2019 a 2020 na Grafu 1 je zřejmé, že u žen bylo indikace vyšetření průkazu přítomnosti *C. difficile* častější než u mužů. Procentuální rozdíl vyšetření mezi jednotlivými pohlavími je průměrně 15 %.

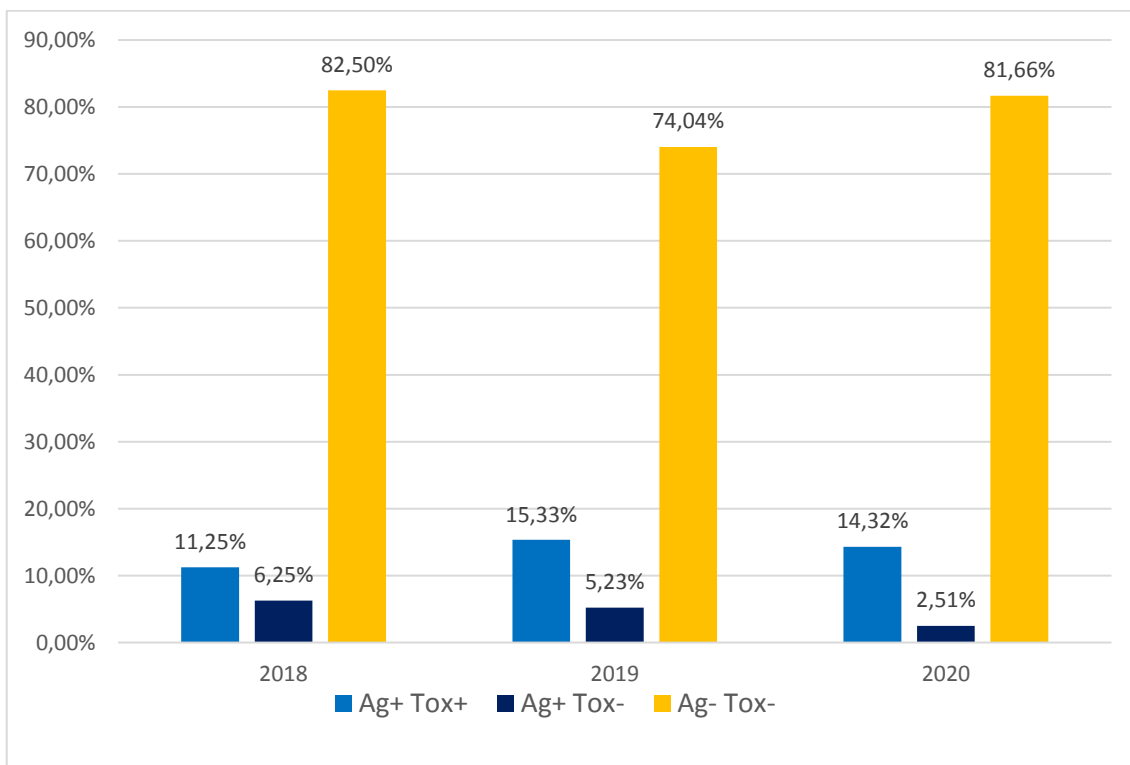


Graf 1: Počty provedených vyšetření v jednotlivých letech, vlastní zpracování

Z porovnání grafu 2 znázorňující výsledky vyšetření průkazu přítomnosti *C. difficile* u mužů a grafu 3 pro vyjádření výsledků vyšetření u žen je vidět klesající rozdíl mezi negativními výsledky mužů a žen. V roce 2018 činil procentuální rozdíl negativních výsledků u mužů a žen přibližně 10 %, v roce 2019 byl rozdíl přibližně pětiprocentní, v posledním sledovaném roce pak rozdíl klesl na půl procenta.

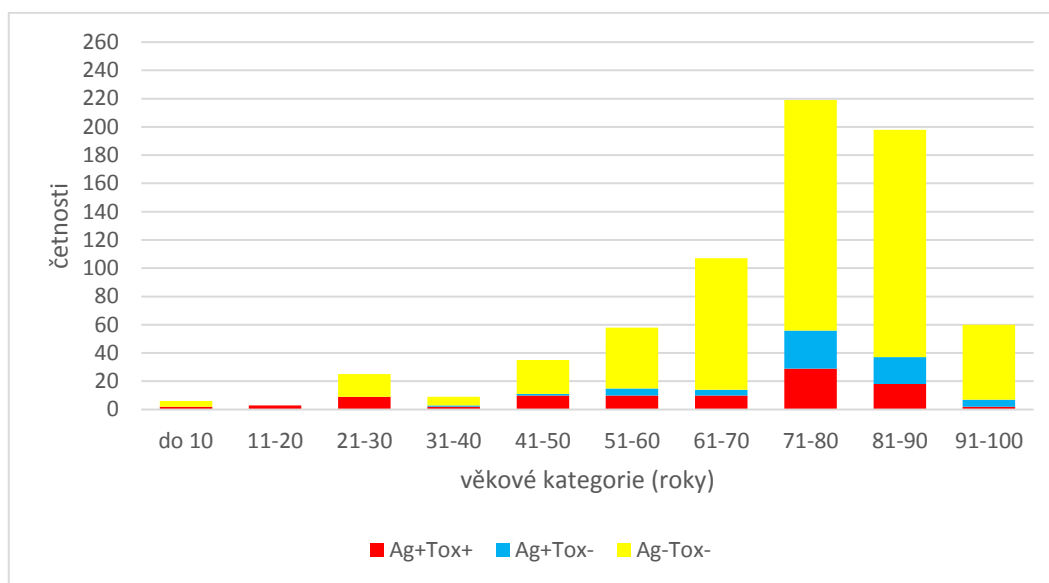


Graf 2: Procentuální vyjádření výsledků vyšetření mužů v jednotlivých letech, vlastní zpracování

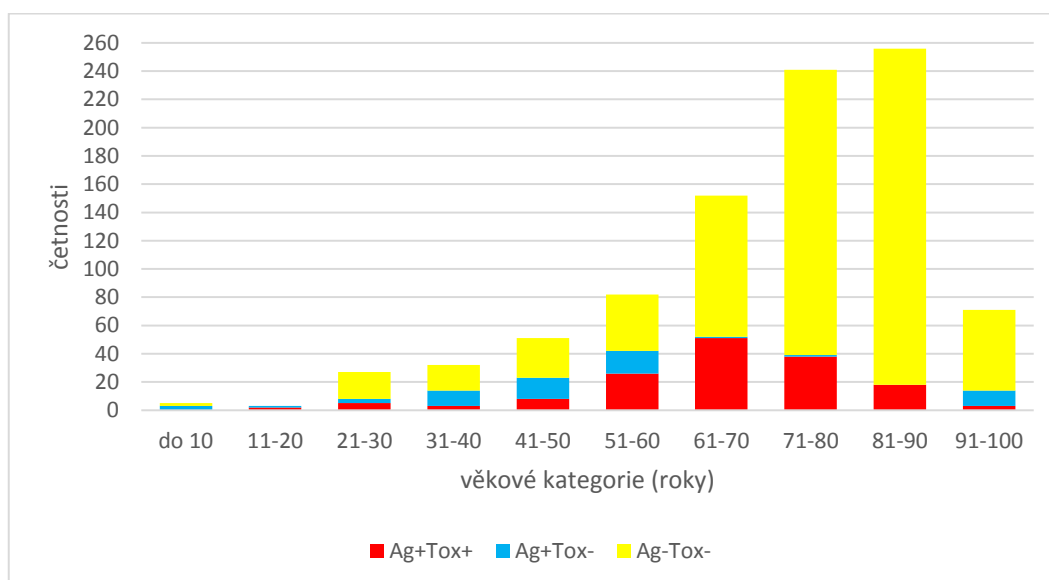


Graf 3: Procentuální vyjádření výsledků vyšetření žen v jednotlivých letech, vlastní zpracování

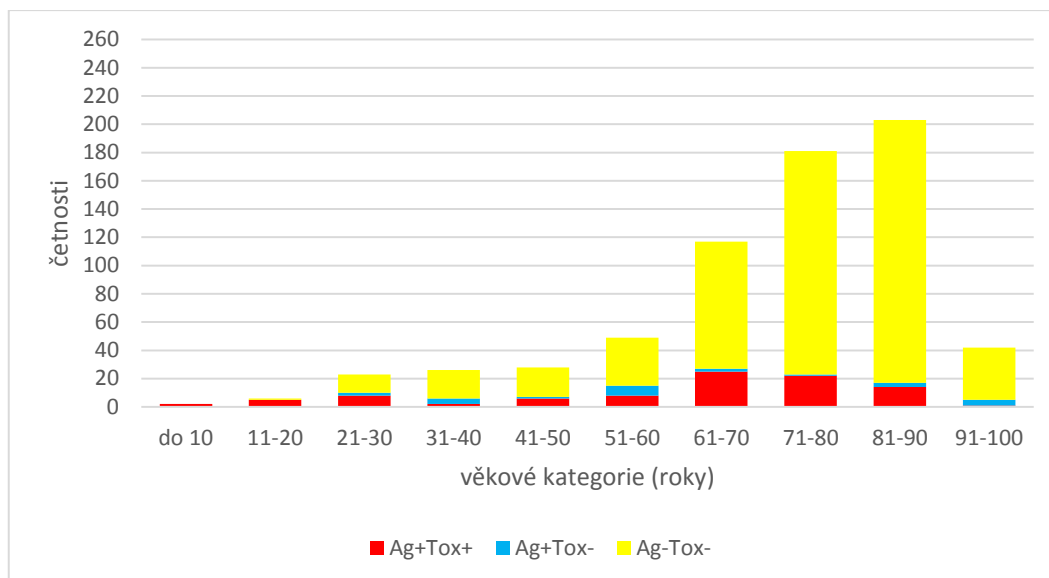
Na Grafu 4, 5 a 6 je vidět rozložení počtu vyšetření společně s výsledky v jednotlivých věkových kategoriích. Nejvyšší počet vyšetření byl prováděn u pacientů spadajících do vyšší věkové kategorie. V roce 2018 činil průměrný věk u pacientů zhruba 72 let, v roce 2019 a 2020 byl průměrný věk pacientů 71 let. Se stoupajícím věkem stoupal i počet provedených vyšetření i počet pozitivních výsledků.



Graf 4: Četnosti provedených vyšetření a výsledků v jednotlivých věkových kategoriích v roce 2018, vlastní zpracování



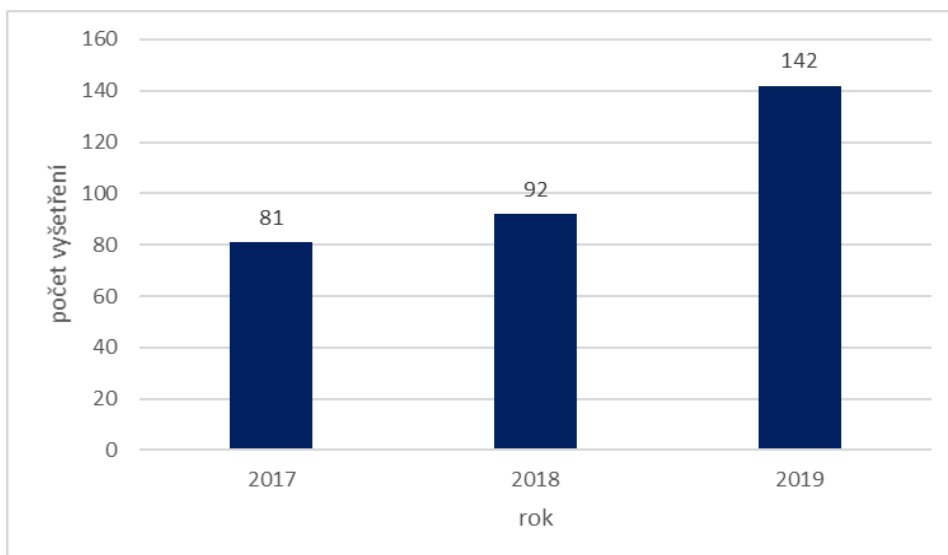
Graf 5: Četnosti provedených vyšetření a výsledků v jednotlivých věkových kategoriích v roce 2019, vlastní zpracování



Graf 6: Četnosti provedených vyšetření a výsledků v jednotlivých věkových kategoriích v roce 2020, vlastní zpracování

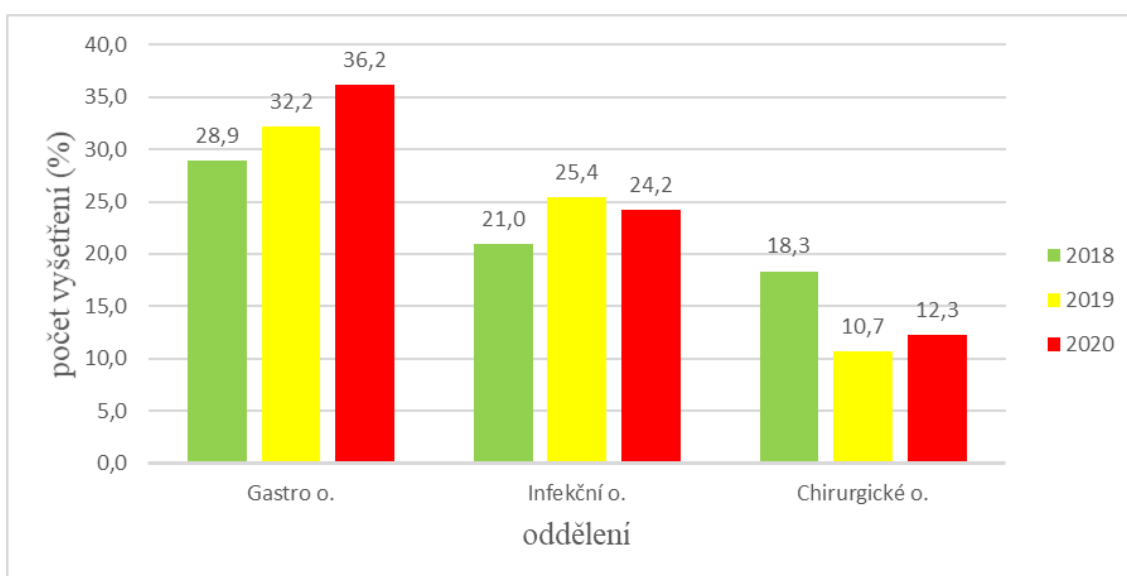
Výskyt nálezů spojených s nemocniční péčí je monitorován Oddělením nemocniční hygieny, které sleduje vznik onemocnění pacientů v souvislosti s hospitalizací jedince. Mezi tato onemocnění patří také infekce způsobené *C. difficile*. Získaná data popisují četnosti nálezů infekce *C. difficile* v důsledku hospitalizace pacienta v letech 2017, 2018 a 2019. Za rok 2020 nebyla data k dispozici.

Na Grafu 7 je vidět meziroční nárůst počtu nozokomiálního přenosu klostridiové infekce. Mezi lety 2017 a 2018 došlo k nárůstu o 11 potvrzených případů, mezi lety 2018 a 2019 byl nárůst o 50 potvrzených případů. Z počtu všech hospitalizací v Nemocnici Tábor a.s., bylo doprovázeno nozokomiálním přenosem *C. difficile* 0,4 % případů v roce 2017 a 2018 a v roce 2019 0,5 %.



Graf 7: Četnosti prokázaných nozokomiálních nákaz CDI v průběhu let, vlastní zpracování

Vyšetření přítomnosti *C. difficile* ve stolici bylo provedeno nejčastěji ze 3 oddělení (graf 8). Z gastroenterologického oddělení bylo přijato a vyšetřeno 207 vzorků v roce 2018, 296 v roce 2019 a 245 v roce 2020. Z infekčního oddělení bylo vyšetřeno 151 vzorků v roce 2018, 234 v roce 2019 a 164 v roce 2020. Z chirurgického oddělení bylo vyšetřeno 132 vzorků v roce 2018, 97 v roce 2019 a 60 vzorků v roce 2020. Z oddělení gastroenterologického oddělení bylo průměrně vyšetřeno 32,4 % vzorků, z infekčního oddělení 23,5 % a z oddělení chirurgického oddělení 13,8 %.



Graf 8: Oddělení nejčastěji žádající vyšetření přítomnosti *C. difficile*, vlastní zpracování

6. Klinické případy

V této kapitole je popsán výběr klinických případů z praxe tzv. kazuistiky. Jednotliví pacienti byli hospitalizováni v tábořské nemocnici.

6.1. Kazuistika I

Pacientka (35 let) byla přijata na infekční oddělení na doporučení praktického lékaře pro přetrvávající febrilie, bolesti hlavy, ramen a kyčlí nejasné etiologie. V době příjmu netrpěla průjmy. Předchozí medikace Godasal, kvůli prokázané protrombinové mutaci a Visanne kvůli pokusu o in vitro fertilizaci. Kvůli nejasnému původu příznaků byla provedena lumbální punkce, která potvrdila serózní zánět. Možný bakteriální ani virový původce nebyl neprokázán. Z důvodu probíhající zánětlivé reakce byly podány kortikoidy. Pro podezření na leptospirózu byla pacientka během hospitalizace léčena Unasynem (ampicilin/sulbactam).

Po 8 dnech hospitalizace byla pacientka propuštěna s čtyřdenní léčbou amoxicilinem. Po následujících 8 dnech proběhla ambulantně kontrola, při které pacientka udává několikrát denně vodnatou stolicí. Je afebrilní, bez výrazné bolesti hlavy. Bylo indikováno vyšetření stolice na přítomnost antigenu a toxinu *C. difficile*, které byl laboratoří prokázány.

Pacientce byly ordinovány probiotika a rifaximin k léčbě klostridiové kolitidy. Následně došlo ke zlepšení stavu a další kontroly nebyly nutné.

V tomto případě byla CDI způsobena střevní dysmikrobií způsobenou léčbou pomocí aminopenicilinů, kterým je právě amoxicilin.

6.2. Kazuistika II

Pacientka (65 let) je dlouhodobě ambulantně sledovaná pro chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN). Byla vyšetřena na ambulanci respiračních onemocnění pro nevolnost a častý kašel. Byla jí ordinována léčba amoxicillin-klavulanátem a pacientka byla propuštěna domů. Za 2 měsíce byla vyšetřena opět na plicní ambulanci se zhoršením předchozího stavu. Laboratorním vyšetřením byla zjištěna zvýšená hodnota CRP. Další klinický materiál byl bez mikrobiologického nálezu. Pacientce byl ordinován ceftriaxon a byla hospitalizována. Během hospitalizace se u pacientky projevil průjem.

Mikrobiologickým vyšetřením stolice byla zjištěna přítomnost vankomycin rezistentního *Enterococcus faecium* (VRE) a kmene *Enterobacter cloacae* produkující širokospektrou betalaktamázu (ESBL). Následně byla laboratoří prokázána ve stolici přítomnost *C. difficile* a klostridiový toxin. Pacientce byl ordinován metronidazol. Po dalších 14 dnech byla provedena transplantace stolice. Po transplantaci došlo k obnovení střevní flory a zlepšení stavu. Průkaz *C. difficile* byl při kontrolním vyšetření negativní.

I v tomto případě byla kolitida způsobena antibiotickou léčbou. Využití cefalosporinů 3. generace, mezi které ceftriaxon patří, je rizikové. Pacientka byla vlivem střevní dysmikrobie kolonizována i rezistentními kmeny bakterií, které jsou též asociované s nemocniční péčí. Transplantace stolice a následné zlepšení stavu svědčí o přínosu této metody k obnovení střevní flory.

7. Diskuze

V Nemocnici Tábor, a.s. se vyšetření přítomnosti *C. difficile* ve vzorku stolice provádí primárně imunochromatografickým testem, který je běžně využívaný i v jiných laboratořích. Pokud je imunochromatografickým testem zjištěna přítomnost antigenu GDH a zároveň není prokázána produkce toxinu, je vzorek považován za CDI suspektní a vzorek stolice je podroben konfirmačnímu vyšetření, kultivaci na selektivním agaru pro *C. difficile*. Z vykultivovaného kmene je proveden další imunochromatografický test. Tento postup zaručuje záchyt toxinogenních kmenů i v případě, kdy je v primárním vzorku nízká koncentrace toxinu, která je pod mezí detekce testu. V případě požadavku lékaře se provádí vyšetření vzorku pomocí metody PCR. Imunochromatografický test je podle Nyče et al. (2008) a Beneše et. al. (2014) dostatečný v kombinaci s konfirmačními metodami u vzorků suspektních. Proto lze vyšetřovací mechanismus považovat za dostatečný.

Oddělení lékařské mikrobiologie se pravidelně účastní studií výskytu infekcí způsobených *C. difficile* v nemocnicích v České republice. Tuto studii pořádá Diagnostická laboratoř Clostridium difficile infekcí ve FN v Motole, kde je u získaných vzorků určen ribotyp. Mimo studii mohou být vzorky k ribotypizaci zaslány na toto pracoviště i při podezření na výskyt vysoce virulentních kmenů. V rámci surveillance je tak výskyt epidemiologicky závažných kmenů dostatečně monitorován.

Vysoké procento negativních výsledků může být motivací ke zlepšení vyšetřovacího algoritmu na straně ošetřujícího lékaře, tedy k uvážlivějšímu stanovení suspektní diagnózy klostridiové kolitidy.

Z uvedených výsledků a grafů v kapitole 5 této práce je patrné, že otázka vlivu pohlaví pacienta na vyšší předpoklad onemocnění CDI není příliš významná. Ze získaných dat je patrné, že rozdíl negativních výsledků mezi pohlavími meziročně významně klesal, a to při zhruba stejném rozvržení počtu provedených testů.

Z klesajícího trendu rozdílu u mužů a u žen, lze předpokládat, že v minulosti mohl mít tento parametr vyšší význam. Předpokládá se, že se nejspíše nejednalo jen o izolovaný parametr pohlaví, nýbrž rozdíl mohl být způsoben vnějšími vlivy, jako například rozložením pacientů na odděleních a pokojích během hospitalizace, případně přístupem ošetřujících lékařů při volbě způsobu léčby. V současné době je trend racionální

antibiotické politiky vyhýbající se přílišnému užívání širokospektrých antibiotik, která jsou významným faktorem při vzniku CDI.

Ze získaných dat je vidět, že pacienti s vyšším věkem jsou častěji testováni na přítomnost infekce *C. difficile*. Nejpočetnější skupinu tvoří pacienti ve věku kolem 70 let. Spolu s nárůstem počtu vyšetření u dané věkové skupiny mírně narůstá počet pozitivních případů. Tento jev lze vysvětlit tzv. pravděpodobností chyby, což znamená, že s vyšším počtem provedených vyšetření narůstá pravděpodobnost pozitivních výsledků. Z grafů je také zřetelné, že i u této věkové skupiny, stejně jako u všech ostatních, je vysoká míra negativních výsledků.

Lze říci, že pacienti vyšších věkových kategorií jsou celkově náchylnější k různým onemocněním, mohou být dlouhodobě hospitalizováni a vyskytuje se u nich vyšší míra užití medikace, což mohou být faktory spojené se vznikem CDI. Věk nad 65 let včetně je podle Beneše et al. (2014) a Štěpánové a Tomáškové (2014) rizikovým faktorem. Většina vyšetřovaných pacientů na přítomnost *C. difficile* v Nemocnici Tábor a.s. splňovala tuto podmínku. Věk s dílčími rizikovými faktory asociovaných se stářím může výskyt CDI ovlivnit.

Ze zpracovaných dat je patrný nárůst nozokomiálních přenosů infekce způsobené *C. difficile*. V průběhu let nárůst výrazně stoupá. V letech 2018 a 2019 stoupl počet potvrzených nozokomiálních přenosů o 50 případů, ve stejných letech pak stoupl počet vyšetření na CDI o 142. Je tedy na místě uvažovat, zda nárůst zaznamenaných nozokomiálních přenosů souvisí či nesouvisí s vyšší mírou testování.

Statistika poskytnuta Oddělením nemocniční hygieny obsahuje pouze potvrzené případy CDI, tedy případy, kdy byla prokázána přítomnost této infekce spolu se skutečností, že došlo k nozokomiálnímu přenosu. Lze však předpokládat, že některé lehčí formy CDI, které se mohou projevovat jako průjmové onemocnění, nemusely být diagnostikovány na přítomnost *C. difficile*, a tedy nebyly podrobeny testu. Tyto případy byly vyléčeny pouze jako obecné průjmové onemocnění, například nasazením diety, která může být současně léčbou i průjmů způsobených infekcí *C. difficile*.

8. Závěr

Bakterie *C. difficile* je přítomná ve většině živých organismů jako součást běžné střevní mikrobioty a infekce způsobené touto bakterií jsou tedy celosvětový problém. Tuto bakterii lze považovat za významného patogena, protože působením toxinů produkovaných *C. difficile* může u postiženého jedince vyvolat život ohrožující onemocnění. Tato onemocnění mohou být obtížně léčitelná a může docházet k recidivám. Z výše uvedených důvodů je nutné monitorovat výskyt onemocnění vyvolaných *C. difficile* a aktivně bránit jejich šíření. Současné laboratorní metody umožňují včasné odhalení této bakterie a jejích toxinů ze stolice pacientů. S ohledem na možné nozokomiální přenosy umožňuje včasná diagnostika klostridiové infekce zavést vhodná a účinná opatření v rámci nemocničního oddělení vedoucí k minimalizaci možných přenosů.

Pro včasné odhalení klostridiové infekce u pacienta je vhodné provádět metody s rychlým určením výsledku. Primárně se využívá imunochromatografický test. Tímto testem lze do půl hodiny prokázat přítomnost GDH a toxinu zároveň. U vzorků s nejasným výsledkem, suspektních CDI, se používají další konfirmační metody, zejména kultivace s následným průkazem GDH a toxinů.

Ze srovnání zpracovaných dat je patrné, že rozdíl v četnostech výskytů pozitivních výsledků vyšetření mezi muži a ženami postupně klesl na zanedbatelnou hodnotu, naopak četnost výskytů nozokomiální přenosů infekce *C. difficile* každoročně stoupá. Výsledky zkoumání sledovaných dat prokazují, že většina vyšetření byla provedena u pacientů s věkem nad 65 let, v souvislosti s tím rostl i počet výskytů CDI.

Zkoumaná data také ukázala značné procento negativních výsledků z provedených vyšetření, je tedy na místě zabývat se možnostmi zlepšení vyšetřovacího algoritmu ošetřujícího lékaře v případě podezření na klostridiovou kolitidu. S ohledem na vyšetřovaný materiál by mohlo být vhodné častější využití Bristolské škály stolice.

9. Zdroje

1. BARTOŠ, V. et al., 2013. *Imunoanalytické metody*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta. 80 s. ISBN 978-80-7464-366-8
2. BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., VÁVRA, J., et al., 1994. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*, Praha: Triton. 226 s. ISBN 80-901521-4-7
3. BENEŠ, J., HUSA P., NYČ, O., POLÍVKOVÁ S., 2014. Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 20(2), 56-66. ISSN 1211-264X.
4. BERGMANN, D., HORÁK, L., 2008. Kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. *Rozhledy v chirurgii*. 87(8), 409-12. ISSN 0035-9351.
5. BORODY, T., KHORUTS, A., 2012. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 9(2), 88–96. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244>.
6. BURSOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R., MYŠKOVÁ, P., 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 80 s. ISBN 978-80-7305-676-6.
7. BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* [online], 34(3), 597–601. [cit. 2020-06-01], doi:10.1677/jme.1.01755.
8. Cepheid®, návod k použití Xpert® C. *difficile* BT, 2016, GXCDIFFBT-CE-10
9. ČEČETKOVÁ, B., KANCELOVÁ, Z., CHLÍBEK, R., 2010. Nozokomiální nákazy. *Praktický lékař*. 90(3), 152–6. ISSN 0032-6739.
10. DE VOS, P., et al., 2009 *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3, The Firmicutes. 2nd ed. New York, N.Y.: Springer, 1450 s. ISBN 978-0-387-95041-9.
11. DRÁBEK, J., et al. 2008. Úloha endoskopie v diagnostice klostridiové kolitidy. *Endoskopie* [online]. 17(3), 68-70. [cit. 2020-10-01]. Dostupné z: <https://www.casopisendoskopie.cz/pdfs/end/2008/03/05.pdf>
12. DUDOVÁ, P., 2006. Psychrofilní a psychrotolerantní mikroorganismy a jejich využití k biodegradaci škodlivin. Brno. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity.

13. DŽUPOVÁ, O., BENEŠ, J. 2008. Clostridium difficile a klostridiová kolitida: co je nového? Klin. Mikrobiol. Inf. .lék. 14(3), 115-17. ISSN 2611-264X.
14. FIALOVÁ, L., 2013. *Vybrané imunochemické metody* [online], Praha: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK [cit. 2020-10-10]. Dostupné z:<https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1153/Imunochemie%20201314teorie.pdf>
15. FRÉBORTOVÁ, J., 2017. Laboratorní cvičení z mikrobiologie. Olomouc. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.
16. GALLEGOS-OROZCO, J. F., et al., 2012. Successful colonoscopic fecal transplant for severe acute Clostridium difficile pseudomembranous colitis. Rev Gastroenterol Mex, 2012, 77.1 40-42. PMID: 22450020
17. GELFAND, D. H., 1989. Taq NK polymerase. In EHRlich, H.A. (ed.) *PCR technology*. Palgrave Macmillan: London, s. 17-22, https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5_2.
18. GERDING, D. N., 2009. Clostridium difficile 30 years on: what has, or has not, changed and why? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33(1). doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70008-1
19. GERDING, D. N., JOHNSON S., PETERSON, L. R., MULLIGAN, M. E., SILVA J., 1995. Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 16(8), 459-77. doi: 10.1086/648363.
20. GERDING, D. N., MUTO, C. A., ROBERT, C., OWENS, J., 2008. Measures to Control and Prevent Clostridium difficile Infection. Clinical Infectious Diseases [online], 46(s1), S43–S49. [cit. 2020-08-05], <https://doi.org/10.1086/521861>.
21. GROOT, H. E., VAN DER HARST, P., 2015. *A highly-sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting soluble interleukin 6 receptor (sIL-6R) in human serum*. [online]. [cit. 2020-10-01]. Dostupné z: <https://protocols.scienceexchange.com/protocols/a-highly-sensitive-sandwich-enzyme-linked-immunosorbent-assay-for-detecting-soluble-interleukin-6-receptor-sil-6r-in-human-serum>
22. HALL, I. C., 1935. INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS. American Journal of Diseases of Children, 49(2), 390. doi:10.1001/archpedi.1935.01970020105010

23. http://www.medipos.cz/out/pictures/1/1084_kontejner_na_vy_stolice.jpg
24. <https://clinicalgate.com/toxic-megacolon/>
25. JINDRÁK et al., 2016. Evropská Surveillance infekcí *Clostridium difficile* a možnosti její implementace v České republice. *Zprávy CEM*. 25(4), 131-35. ISSN 1804–8668.
26. KAMIYA, S., NAKAMURA, S., 1993. Virulence Factors of *Clostridium difficile* and Its Pathogenesis in Intestinal Infection in Man. *Bifidobacteria and Microflora*, 12(1)1-17. doi:https://doi.org/10.12938/bifidus1982.12.1_1.
27. KIM, H., KIM, W. H., KIM, M., JEONG, S. H., & LEE, K., 2014. Evaluation of a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of glutamate dehydrogenase and toxin for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Annals of laboratory medicine*, 34(3), 235–39. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.3.235>.
28. KOKEŠOVÁ, A., 2003. Probiotika, prebiotika a synbiotika: nový koncept ve vývoji funkčních potravin. In: Nevoral S. *Výživa v dětském věku*. Jinočany: H&H Vyšehradská, s.r.o, 207-17. ISBN 80-86022-93-5.
29. KRŮTOVÁ M., NYČ O., 2015. Diagnostika infekcí vyvolaných *Clostridium difficile* v České republice-dostupnost, možnosti, interpretace laboratorních nálezů. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 64(2), 92-97. ISSN 1210-7913.
30. KRUTOVA, M., et al., 2018. How to: surveillance of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(5), 469-475. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.008.
31. LAWSON, P. A., CITRON D. M., TYRELL, K. L., FINEGOLD S. M., 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* [online], 40, 95-9 [cit. 2021-01-13].40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
32. LOCHMANOVÁ, A., 2014. *Základy imunologie*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě. 177 s. ISBN 978-80-7464-570-9.

33. MARKOVÁ, V., 2008, Vliv různých způsobů rozočkování vzorků na počet izolovaných kolonií mikrobů. Brno. Bakalářská práce. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity.
34. McPHERSON, M.J., MOLLER, S.G., 2000. *PCR*. Oxford: BIOS Scientific Publishers. 288 s. ISBN 1 85996 017 0
35. Nemocnice Tábor, a.s., Laboratorní příručka Oddělení lékařské mikrobiologie 2020
36. Nemocnice Tábor, a.s., Výroční zpráva 2018, 2019 [online]. [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: www.nemta.cz/wp-content/uploads/2019/06/VZ2018_8.pdf
37. Nemocnice Tábor, a.s., Výroční zpráva 2019, 2020 [online]. [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: www.nemta.cz/wp-content/uploads/2020/06/vyrocní-zprava-2019.pdf
38. NOLAN, T., HANDS R. E., BUSTIN S. A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*.. 1(3), 1559-1582, doi:10.1038/nprot.2006.236.
39. NYČ, O., 2008. Principy laboratorní diagnostiky *Clostridium difficile*. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie. Praha: SZÚ, 17(1-2), 19-20
40. PETRŽILKOVÁ, B., 2011. *Možnosti laboratorní diagnostiky toxigenních kmenů Clostridium difficile a jejich typizace, srovnání citlivosti různých metod*. Praha. Bakalářská práce. Karlova univerzita, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie.
41. REVELAS, A., 2012; Infekce spojené se zdravotní péčí: Problém veřejného zdraví. *Niger Med J*. 53 (2): 59-64. doi: 10.4103 / 0300-1652.103543
42. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., 2004. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 244 s. ISBN 80-7080-534-X.
43. SCHINDLER, J., 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4
44. ŠTĚPÁNOVÁ, J., TOMÁŠKOVÁ, H. 2014. Epidemiologie střevních infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*. *Hygiena*, 59(3), 131-9. doi: 10.21101/hygiena.a1283

45. TECHLAB®, 2018, C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE. USA, 28 s , RMS #91 – T525C – 02.
46. TICHOPAD, A., DIDIER, A., PFAFFL, M. W., 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and Cellular Probes*. 18(1), 45–50, 10.1016/j.mcp.2003.09.001.
47. ZIMA, T., 2013. *Laboratorní diagnostika*. 3. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.

10. Seznam obrázků

Obr. 1: Preparát <i>C. difficile</i> obarvený dle Grama.....	10
Obr. 2: Endoskopický snímek střevní sliznice poškozené CDI. Na snímku jsou viditelné typické ulcerace pokryté pablánami	14
Obr. 3: Toxické megakolon na radiografickém snímku.....	15
Obr. 4: Schéma terapeutických možností CDI.....	17
Obr. 5: Sterilní plastový kontejner o objemu 120 ml.....	23
Obr. 6: Nádoba na odběr stolice se špachtlí, objem 20 ml.....	23
Obr. 7: Průkaz GDH metodou ELISA.	25
Obr. 8: Průkaz toxinů metodou ELISA.....	25
Obr. 9: Vyšetřovací souprava TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE.	33
Obr. 10: Membránový prostředek (testovací kazetka) s jamkou pro aplikaci vzorku a reakčním oknem.....	33
Obr. 11: Přehled možných výsledků testu TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE.	35
Obr. 12: Přehled naměřených výsledků testu TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE.	35
Obr. 13: Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF od společnosti Bruker	36
Obr. 14: Destička na vzorky s plátkem rozmístění jednotlivých vzorků	36
Obr. 15: Přístroj GeneXpert® s testovací kazetkou.....	37

11. Seznam grafů a tabulek

Graf 1: Počty provedených vyšetření v jednotlivých letech	41
Graf 2: Procentuální vyjádření výsledků vyšetření mužů v jednotlivých letech	42
Graf 3: Procentuální vyjádření výsledků vyšetření žen v jednotlivých letech	42
Graf 4: Četnosti provedených vyšetření a výsledků v jednotlivých věkových kategoriích v roce 2018.....	43
Graf 5: Četnosti provedených vyšetření a výsledků v jednotlivých věkových kategoriích v roce 2019.....	43
Graf 6: Četnosti provedených vyšetření a výsledků v jednotlivých věkových kategoriích v roce 2020.....	44
Graf 7: Četnosti prokázaných nozokomiálních nákaz CDI v průběhu let	45
Graf 8: Oddělení nejčastěji žádající vyšetření přítomnosti C. difficile	45
Tabulka 1: Bristolská škála stolice.....	22
Tabulka 2: Výsledky a interpretace testu Xpert C. difficile BT, Techlab	39
Tabulka 3: Počet provedených vyšetření ve sledovaných letech	40

12. Seznam zkratek

Ab	protilátka
Ag	antigen
CDAD	<i>C. difficile</i> -associated diarrhea
CDI	<i>Clostridium difficile</i> infection/ <i>Clostridioides difficile</i> infection
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí
EIA	Enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay/enzymová imunoanalýza na pevné fázi
ESBL	širokospektré β -laktamázy
ESCMID	Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci
GDH	glutamátdehydrogenáza
HAI	Healthcare Associated Infections
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
KHS	Krajské hygienické stanice
LIS	laboratorní informační systém
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass
MS	Spectrometry
NK	nukleová kyselina
OLM	Oddělení lékařské mikrobiologie
PCR	polymerázová řetězová reakce
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
UV	ultra fialové
VRE	vankomycin rezistentní <i>Enterococcus faecium</i>