Zdravotně sociální fakulta
Faculty of Health and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# Možnosti diagnostiky *Clostridium difficile* a jeho toxinů v Nemocnici Písek, a.s.

Vypracoval: Jana Hrdličková
Vedoucí práce: prim. MUDr. Věra Kůrková
České Budějovice 2015

# Abstrakt

V současné době jsou závažným problémem všech nemocnic nozokomiální infekce, tedy infekce spojené se zdravotní péčí. Mezi tyto infekce patří i střevní infekce vyvolané *Clostridium difficile*.

*Clostridium difficile* je pohyblivá anaerobní grampozitivní tyčka se schopností tvořit spory. Vyskytuje se ve střevě asi 5% zdravých dospělých. Toxigenní kmeny *Clostridium difficile* produkují dva termolabilní proteinové toxiny, enterotoxin (toxin A) a cytotoxin (toxin B). Svými toxiny je schopno vyvolat střevní infekční onemocnění různé závažnosti, které může probíhat jako banální průjmové onemocnění, ale také jako život ohrožující stav. V literatuře se nemoc označuje jako *Clostridium difficile* infection (CDI) (Beneš et al., 2014a). Onemocnění patří mezi infekce spojené se zdravotní péčí a často vzniká v důsledku předchozí léčby antibiotiky.

V České republice je v posledních letech patrný trend nárůstu počtu hlášených případů CDI. V roce 2008 bylo hlášeno 303 případů, v roce 2014 už to bylo 4 097 případů (Pokorná, 2015).

Cílem práce je posoudit, jestli metoda či metody používané k laboratorní diagnostice CDI v Nemocnici Písek, a.s. jsou dostatečné nebo by se měla zavést další metoda. Laboratorní postup jsem porovnala s doporučenými postupy. V mé práci kvalitativní, imunochromatografickou metodou prokazuji přítomnost klostridiové glutamátdehydrogenázy a přítomnost toxinu A a B. Výsledky jsem využila ke statistickému zpracování a stanovila si hypotézy. Získaná data jsem spočetla pomocí Chí kvadrát testu, abych zjistila, jaká byla dosažena hladina významnosti. Předpokládám, že se zvýšil záchyt *Clostridium difficile* a jeho toxinů v Nemocnici Písek, a.s. v roce 2014 oproti roku 2013. Domnívám se, že pacienti ≥ 65 let jsou vnímavější k CDI než pacienti pod 65 let (Beneš et al., 2014b, s. 58). Dále mě zajímalo zastoupení pohlaví v mém souboru v roce 2013 a 2014 a pozitivní výsledky mužů a žen.

Metoda používaná k diagnostice CDI v Nemocnici Písek, a.s. je dostatečná. V roce 2013 bylo celkem vyšetřeno 240 vzorků, z toho 209 negativních, což představuje 87,1 %, 31 vzorků bylo pozitivních, což je 12,9 %. Celkový počet mužů byl 132 (55,0 %), počet žen byl 108 (45 %).

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků, z toho 169 negativních, což je 86,7 %, 26 pozitivních, tedy 13,3 %. V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků, z toho od pacientů nad 65 let bylo 122 vzorků (62,6 %), vzorků od pacientů pod 65 let bylo 73 (37,4 %). V roce 2013 bylo celkem od mužů vyšetřeno 132 vzorků a z toho bylo pozitivních 19, což představuje 14,4 %. Vzorků od žen bylo celkem 108 a z toho bylo pozitivních 12, což je 11,1 %. V roce 2014 bylo celkem od mužů vyšetřeno 75 (38,5 %) vzorků a z toho bylo pozitivních 12, tedy 16,0 %. Vzorků od žen bylo celkem odebráno 120 (61,5 %), z toho bylo pozitivních 14, což představuje 11,7 %.

Záchyt *Clostridium difficile* ve vzorcích stolic byl v roce 2014 oproti roku 2013 srovnatelný. V mém souboru nebyli pacienti nad 65 let vnímavější k infekci oproti pacientům mladším. V těchto výsledcích se rozcházím s literaturou, která udává, že incidence a závažnost nemoci podstatně narůstá od věku ≥ 65 let. Rovněž se domnívám s přihlédnutím k mým výsledkům, že pohlaví nemá na vnímání k CDI výraznější vliv. Pro další výzkum bych doporučila větší soubor pacientů nebo delší časový úsek sledování.

**Klíčová slova**

*Clostridium difficile*, četnost výskytu CDI, postantibiotické průjmy, produkce toxinů, imunochromatografická metoda

# Abstract

At present, nosocomial infections, i.e. infections connected with the health care, are a serious issue in all hospitals. These infections also include intestinal infections caused by *Clostridium difficile*.

*Clostridium difficile* is a movable, anaerobic gram-positive rod, which is able to form spores. It may be found in the intestines of about 5 % of healthy adults. Toxigenic strains of *Clostridium difficile* generate two thermolabile protein toxins, enterotoxin (toxin A) and cytotoxin (toxin B). With these toxins, it may cause intestinal infectious disease of various severity, which may occur as trivial diarrhoea or as a life-threatening condition. In literature, the disease is referred to as *Clostridium difficile* infection (CDI) (Beneš et al., 2014a). The disease belongs to infections connected with health care and it often occurs as a result of previous treatment with antibiotics.

In recent years, the number of CDI cases reported in the Czech Republic has apparently increased. 303 cases were reported in 2008 compared to 4 097 cases in 2014 (Pokorná, 2015).

The aim of the thesis is to consider whether the method(s) applied for CDI diagnostics in laboratory in Nemocnice Písek, a.s. are sufficient or whether another method should be implemented. Laboratory procedure was compared with recommended procedures. Using qualitative, immunochromatographic method, the presence of clostridium glutamate dehydrogenase as well as the presence of toxins A and B were demonstrated. The results were utilized for statistical purposes and determination of hypotheses. Obtained data were calculated by means of Chi quadrate test in order to define the achieved level of severity. My assumption is that the recovery of *Clostridium difficile* and its toxins increased in Nemocnice Písek, a.s. in 2014 compared to 2013. I presume that patients over 65 years of age are more sensitive to CDI than patients up to 65 years of age (Beneš et al., 2014b, p. 58). Representation of genders in my setting in 2013 and in 2014 was also focused on as well as positive results of men and women.

Method applied to diagnose CDI in Písek hospital is sufficient. In total, 240 samples were examined in 2013, out of which 209 were negative, i.e. 87.1 %, and 31 samples were positive (12.9 %). Total number of men was 132 (55.0 %), number of women was 108 (45 %).

In 2014, 195 samples were examined in total, out of which 169 samples were negative, i.e. 86.7 %, 26 samples were positive, i.e. 13.3 %. In 2014, 195 samples were examined in total, out of which 122 samples were taken from patients over 65 years old (62.6 %) and 73 samples from patients under 65 years old (37.4 %). In 2013, 132 samples were taken from men and examined, out of which 19 were positive, i.e. 14.4 %. 108 samples were taken from women, out of which 12 were positive, i.e. 11.1 %. In 2014, 75 samples taken from men were examined (38.5 %), out of which 12 samples were positive, i.e. 16 %. In total, 120 samples were taken from women (61.5 %), out of which 14 samples were positive, which represents 11.7 %.

Recovery of *Clostridium difficile* fecal samples in 2014 is similar to 2013. In my setting, patients over 65 were not more sensitive to the infection compared to younger patients. These results differ from literature stating that the incidence and severity of the disease is increasing significantly after 65 years of age. With regard to the results, I also assume that gender influences the sensitivity to CDI only slightly. For further study, larger sample of patients or longer time span for monitoring would be needed.

**Key words:**

*Clostridium difficile*, frequency of CDI occurrence, post-antibiotic diarrhoea, production of toxins, immunochromatographic method

**Prohlášení**

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

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

V Českých Budějovicích dne 27. 4. 2015 .....

Jana Hrdličková

**Poděkování**

Zde bych chtěla poděkovat prim. MUDr. Věře Kůrkové za její odbornou pomoc při zpracování mé bakalářské práce, za trpělivost při řešení problémů, ochotu a umožnění práce v mikrobiologické laboratoři v denním provozu. Poděkování patří také celé mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

# Obsah

Úvod ... 11
Teoretická část ... 13
1 Rod *Clostridium* ... 13
1.1 Taxonomie ... 13
1.2 Obecné vlastnosti klostridií ... 13
1.3 *Clostridium difficile* ... 16
1.3.1 Charakteristika *Clostridium difficile* ... 16
1.3.2 Jiné zdroje *Clostridium difficile* ... 18
1.3.3 Příznaky klostridiové kolitidy ... 18
1.3.4 Faktory disponující k vzniku klostridiové kolitidy ... 21
1.4 Výskyt CDI ... 22
1.4.1 Hlášení výskytu CDI ... 22
1.4.2 Počet hlášených případů CDI v České republice ... 22
1.5 Antibiotika ... 24
1.5.1 Charakteristika antimikrobiálních látek ... 24
1.5.2 Nežádoucí účinky antibiotik ... 24
1.5.3 MIC a MBC ... 25
1.5.4 Disková diluční metoda ... 25
1.5.5 Biologické referenční rozmezí ... 26
1.5.6 Rezistence k antimikrobiálním látkám ... 26
1.5.7 Rozdělení antimikrobiálních látek ... 27
1.6 Antibiotická léčba CDI ... 28
1.7 Fekální bakterioterapie ... 30
1.7.1 Princip fekální bakterioterapie ... 30
1.7.2 Postup provedení fekální bakterioterapie ... 30
1.8 Bariérová opatření ... 32
1.9 Možnosti diagnostiky CDI ... 33
1.10 Ribotypizace ... 34
2 Hypotézy a metodika výzkumu ... 36
2.1 Cíl práce ... 36
2.2 Hypotézy ... 36
2.3 Imunochromatografický test ... 37
2.3.1 Princip imunochromatografického testu ... 37
2.3.2 Pracovní postup imunochromatografického testu ... 38
2.3.3 Interpretace výsledků ... 39
2.3.4 Kontrola kvality ... 40
2.4 Anaerobní kultivace ... 41
2.4.1 Pracovní postup anaerobní kultivace ... 41
2.4.2 Pracovní postup API 20 A ... 42
3 Výsledky ... 43
4 Diskuse ... 49
5 Závěr ... 53
6 Seznam informačních zdrojů ... 55

7 Příloha ..... 60

# Seznam použitých zkratek

| | |
|---|---|
| Ag | antigen |
| ATB | antibiotika |
| CD | *Clostridium difficile* |
| CDI | *Clostridium difficile* infection |
| CT | Computed Tomography |
| ČLS JEP | Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility |
| EUCLID | The EUropean multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of CLostridium difficile Infection in hospitalised patients with Diarrhoea |
| GDH | glutamátdehydrogenáza |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| Ig A | imunoglobulin A |
| JIP | jednotka intenzivní péče |
| KICH | Klinika infekčních chorob |
| LIS | laboratorní informační systém |
| MBC | minimální baktericidní koncentrace |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| OKM FN Brno | Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Brno |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RTG | rentgenové vyšetření |

# Úvod

*Clostridium difficile* je grampozitivní, sporulující, anaerobní bakterie běžně se vyskytující v přírodě, odpadních a povrchových vodách, ale také v trávicím traktu zvířat a lidí. Tuto bakterii můžeme nalézt i ve střevě přibližně 5 % zdravých dospělých a u dětí je dokonce její výskyt vyšší. Toxiny *Clostridium difficile* mohou vyvolat střevní onemocnění, které může proběhnout jako lehčí průjmové onemocnění, ale také jako život ohrožující pseudomembranózní enterokolitida. Toto onemocnění patří mezi infekce spojené se zdravotní péčí a často se rozvíjí po podání především širokospektrých antibiotik. Antibiotika eliminují přirozenou střevní mikroflóru, což vede k přemnožení rezistentní *Clostridium difficile*, které poškozuje střevní sliznici. K infekci dochází typicky fekálně-orálním přenosem (Votava et al., 2003, s. 150-151).

Kolitida vyvolaná *Clostridium difficile* vykazuje zvláštnosti v patogenezi onemocnění, stejně tak v klinických projevech, přítomnosti komplikací a také v léčbě. V literatuře se nemoc označuje jako *Clostridium difficile* infection (CDI) (Beneš et al., 2014a).

V zahraničí jsou zvýšená incidence a závažnější průběh onemocnění hlášeny již od roku 2003 (Vojtilová et al., 2011, s. 209). Tento trend se objevuje i v České republice, kde výskyt nahlášených případů CDI v roce 2014 překročil 4 000 (Beneš, 2015).

Antigeny a toxiny *Clostridium difficile* se stanovují ve stolici pacienta pomocí diagnostických setů, většinou pomocí imunochromatografických testů. Stolice je použita ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti antigenu a toxinů. Výsledek se odečte po deseti minutách. Výsledek může být negativní nebo může být pozitivní jen antigen nebo antigen a toxin, popř. toxiny. Jakákoli jiná varianta výsledku vede k zopakování testu. Jako konfirmační vyšetření může být provedena kultivace stolice cílená na *Clostridium difficile* nebo PCR vyšetření, které slouží k průkazu genu kódujícího syntézu toxinu B a případně i toxinu A. Na základě výsledků a klinických projevů určí lékař další léčebný postup (Beneš et al., 2014b, s. 59-60).

V práci se zabývám zpracováním vzorků stolic pacientů podezřelých z CDI a získaná data použiji k hodnocení záchytu *Clostridium difficile* v Nemocnici Písek, a.s..

Srovnávám laboratorní diagnostiku CDI prováděnou v Nemocnici Písek, a.s. s doporučenými postupy diagnostiky *Clostridium difficile* uveřejněnými na stránkách www.infekce.cz, porovnávám záchyt *Clostridium difficile* v Nemocnici Písek, a.s. v roce 2014 a 2013, jakož i zastoupení pacientů nad 65 let. Všímám si také zastoupení pohlaví u pacientů vyšetřovaných na průkaz CDI v letech 2013 a 2014.

# Teoretická část

# 1 Rod *Clostridium*

## 1.1 Taxonomie

| | | |
|---|---|---|
| Taxony: | Doména | *Bacteria* |
| | Kmen | *Firmicutes* |
| | Třída | *Clostridia* |
| | Řád | *Clostridiales* |
| | Čeleď | *Clostridiaceae* |
| | Rod | *Clostridium* |

## 1.2 Obecné vlastnosti klostridií

Rod *Clostridium* zahrnuje významnou skupinu bakterií, jejichž společnou vlastností je citlivost ke kyslíku a schopnost tvořit klidové stadium zvané spora. Vegetativní formy těchto bakterií mají často tvar grampozitivních tyčinek různé velikosti. Všechny druhy klostridií jsou řazeny do jediného rodu *Clostridium*, který obsahuje přes 80 druhů (Bednář et al., 1996, s. 233).

V přírodě jsou hojně rozšířené, běžně se vyskytující hlavně díky schopnosti tvořit vysoce rezistentní spory, které jsou značně odolné vůči nepříznivým podmínkám zevního prostředí jako je záření, vyschnutí, teplota nebo různé chemické látky. Nalezneme je v odpadních a povrchových vodách, v půdě, v bahně, v prachu, ale i v trávicím traktu zvířat a lidí (Bednář et al., 1996, s. 230).

Většinou se jedná o saprofyty. Pouze několik málo druhů dokáže vyvolat onemocnění u zvířat nebo u lidí a to díky schopnosti produkovat exotoxiny, například botulotoxin, difterický toxin nebo tetanický toxin. Často jsou to velmi závažná onemocnění s fatálními následky (Bednář et al., 1996, s. 230).

Vegetativní formy klostridií mají tvar dlouhých, rovných nebo lehce zahnutých tyčinek se zaoblenými konci, často jsou pleomorfní, objevují se vláknité nebo jen prodloužené vřetenovité (*closter* – latinsky vřeteno) buňky (Greenwood, Slack a Peutherer, 1999). Velikost klostridií se nejčastěji pohybuje od 3 do 8 μm na délku a 0,4 – 1,2 μm na šířku. Vegetativní formy u většiny druhů jsou díky peritrichálně uloženým bičíkům pohyblivé. Část druhů netvoří bičík, a proto se jejich tyčinky nepohybují, např. *C. perfringens*. Barvením dle Grama se jeví grampozitivní, ale postupem času mohou jejich kultury grampozitivitu ztrácet a jevit se jako gramnegativní, např. *C. chauvoei* (Bednář et al., 1996, s. 233).

Buňky klostridií jsou tvořeny buněčnou stěnou, bičíky, cytoplazmatickou membránou. Uvnitř buňky je cytoplazma a v ní jsou uloženy organely - ribozomy, granula a nukleoid, který tvoří genetický materiál bakterie.

Buněčná stěna klostridií je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, kyselinou teikuronovanou, řetězci kyseliny teichoové a bílkovinami. Tloušťka buněčné stěny může být až 20 nm. Při barvení dle Grama se komplex krystalové violeti s jodem dobře váže ve stěně nejen díky její tloušťce, ale i díky složení stěny. Komplex se nevyplaví ani při odbarvování alkoholem a klostridia zůstanou fialová. Jsou tedy grampozitivní. Pro nízkou výpovědní hodnotu se Gramovo barvení na klostridie běžně neprovádí, interferují zde jiné druhy bakterií. Výjimkou je cílená kultivace na klostridia, kde opakovanou kultivací získáme čistou kulturu.

Cytoplazmatická membrána, bez které nemůže žádná buňka existovat, má tloušťku 10 nm a skládá se z dvojité vrstvy fosfolipidů a z bílkovin. Bílkoviny jsou buď pevně ukotveny v membráně, nebo mohou prostupovat celou membránou a tvořit kanály pro přenos živin či pro vylučování odpadních látek ven z buňky.

Bičíky klostridií jsou tvořeny bílkovinou flagelin a jsou uloženy po obvodu buňky, vykonávají rotační pohyb, který můžeme přirovnat k pohybu lodního šroubu. Bičíky lze znázornit stříbřením.

Uvnitř bakterie jsou organely zvané ribozomy, na kterých probíhá translace neboli přepis RNA do proteinů. Ribozomy jsou v cytoplazmě volné, nevázané na žádnou strukturu, skládají se ze dvou podjednotek, velká podjednotka má velikost 50S a malá podjednotka má velikost 30S (S= Svedbergova jednotka) (Greenwood, Slack a Peutherer, 1999).

Při dostatečném přísunu uhlíku a při nedostatku dusíku se tvoří glykogenová granula, která jsou volně uložena v cytoplazmě.

Genetický materiál tvoří jedna cirkulární molekula dvouvláknová DNA, její velikost je cca $5.10^3$ kb.

Za nepříznivých podmínek pro další růst a množení mohou klostridie přetvořit svoji vegetativní a fyziologicky aktivní buňku na buňku klidovou, s téměř nulovým metabolismem, ale přitom vysokou odolností vůči vlivům vnějšího prostředí (Kramář, 2007, s. 44**).** Tato forma se nazývá spora, tvoří se uvnitř buňky a vždy je jen jedna, výstižnější název je endospora. Rostoucí kultura bakterií začíná sporulovat na konci exponenciální fáze růstu, v důsledku nedostatku živin. Proces trvá zhruba 10 hodin. Na konci sporulačního procesu je buňka se stejným genomem, ale odlišnou morfologií a fyziologií. Spory jsou oválné, méně často kulaté. Většinou jsou uloženy subterminálně, ale u některých druhů také terminálně. V podobě spor mohou bakterie přežít desítky let (Bednář, et al., 1999, s. 60, 230).

K fungování enzymů, které se účastní oxidačně-redukčních dějů v buňce a které jsou důležité pro jejich růst, potřebují klostridia nižší redoxní potenciál prostředí (Votava et al., 2003, s. 146).

Energii získávají z anaerobní glykolýzy neboli fermentace. Klostridie jsou biochemicky velmi aktivní. Jejich enzymatická výbava umožňuje rozkládat proteiny nebo kvasit sacharidy a dle těchto schopností je můžeme rozdělit na druhy štěpící jen sacharidy, druhy rozkládající bílkoviny, druhy schopné využívat puriny a pyrimidiny a druhy schopné využívat sacharidy i bílkoviny (Votava et al., 2003, s. 146).

Klostridie způsobují patologické procesy ve střevě, např. průjmy, pseudomembranózní enterokolitidu, nekrotizující enterokolitidu, dále neurotoxikace, které jsou vyvolané např. *C. botulinum* nebo *C. tetani* a také nekrotizující infekce měkkých tkání (Bednář et al., 1996, s. 233).

## 1.3 *Clostridium difficile*

### 1.3.1 Charakteristika *Clostridium difficile*

V roce 1935 objevili Hall a O´Toole *Clostridium difficile* jako součást střevní flóry u zdravých dětí. Spojitost mezi pseudomembranózní kolitidou a *Clostridium difficile* byla objevena v roce 1977 (Klaban, 2011, s. 101-102).

Název *Clostridium difficile* vznikl spojením latinského slova closter (vřeteno) a difficile (obtížný).

*Clostridium difficile* je anaerobní, grampozitivní pohyblivá tyčka s oválnými sporami (Votava et al., 2010, s. 333). Je obtížně kultivovatelné (odtud název difficile). Bakterie je přítomna ve střevě přibližně 5% zdravých dospělých, u dětí a kojenců se vyskytuje častěji, ale nepovažuje se za součást normální flóry. Vyskytuje se běžně v přírodě, v odpadních a povrchových vodách (Votava et al., 2003, s. 150).

Velikost bakterií je proměnlivá, vegetativní buňky mohou být velké 1,2-1,6 x 6-16 μm nebo drobné, přibližně 0,6 x 4-6 μm. Často mají tendenci k autolýze. Ve střevě *Clostridium difficile* snadno sporuluje, spory jsou málo termorezistentní. Vysoká teplota poškozuje jejich germinační enzym (Votava et al., 2003, s. 150-151).

Dnes již je možno *Clostridium difficile* kultivovat ze stolice za pomoci selektivních půd s obsahem cefoxitinu a cykloserinu, kterých se využívá k potlačení doprovodné flóry. *Clostridium difficile* je vysoce citlivé na vankomycin a rezistentní na většinu běžně užívaných antimikrobních preparátů. Ke kultivaci je důležitá anaerobní atmosféra. Kolonie jsou okrouhlé, krevní agar ani žloutkový agar nemění (Votava et al., 2003, s. 150-151).

Během vegetativního růstu část kmenů tvoří dva termolabilní proteinové toxiny, které se do prostředí uvolňují po rozpadu buněk.

Hlavními faktory virulence jsou toxiny A a B, které produkují toxigenní kmeny. Toxin A je enterotoxin, toxin B je cytotoxin. Některé patogenní kmeny produkují i binární toxin, ale jeho mechanismus účinku není znám**.** Avšak tvorba binárního toxinu je provázena horším průběhem onemocnění. Pokud bakterie neprodukuje žádný toxin, nepředstavuje riziko ani pro vnímavé jedince (Beneš et al., 2014a).

Toxin A je jeden z největších známých bakteriálních toxinů. Jeho molekulová hmotnost je 308 kDa, je to silný enterotoxin, který vyvolává vodnaté průjmy, někdy mírně hemoragické. Toxin A je složen z jedné jednotky hemaglutininu a z jedné enterotoxické jednotky. Toxin B je tvořen rovněž 1 jednotkou hemaglutininu a 6 kopiemi cytotoxické jednotky. Toxin B je nekrotizujícím cytotoxinem. Geny kódující oba toxiny jsou uloženy na tzv. lokusu patogenity. Oba geny se transkribují ve stejném směru a značí se TcdA a TcdB (Malinová, 2012).

Výskyt *C. difficile* ve stolici je udáván v různých sestavách různě. Například Beneš (2014a) tvrdí, že u dětí v prvních měsících života je vysoké procento kolonizace (>50%) *C. difficile*, přitom opakované infekce se u nich vyskytují vzácně. Zdroj pro onemocnění může být endogenní i exogenní.

*C. difficile* není invazivní patogen, nejdříve jen adheruje na stěnu tračníku. Jestliže jde o toxigenní kmen, který produkuje toxin A i B, pak tyto toxiny působí synergicky a poškozují i hlubší vrstvy střevní stěny. Pokud dojde v tomto iniciálním stádiu k průjmu, je pro pacienta prospěšný, organismus se snaží zbavit patogena. Slabá peristaltika nebo podávání léků tlumící peristaltiku přispívá k rozvoji onemocnění a mohou vzniknout ostrůvkovité ulcerace, jejichž povrch se pokryje pablánami. Toxin B působí na hladkou svalovinu ve stěně tračníku a dochází k rozvoji ileu. Konečné stádium nemoci bývá spojeno se značným roztažením tračníku, nazývané megakolon a ke ztrátě bariérové funkce sliznice. Může se rozvinout sepse (Reese a Betts, 1996, s. 1086, 1158).

*C. difficile*, aby způsobilo zmíněná onemocnění, musí mít potenciál pro produkci toxinu, téměř 25 % izolátů z lidí postrádá geny pro produkci toxinů A a B a je

netoxigenních a nikdy nezpůsobí průjem nebo kolitidu (Reese a Betts, 1996, s. 1086, 1158).

### 1.3.2 Jiné zdroje *Clostridium difficile*

Některé zdroje uvádějí možnost animálních zdrojů nákazy *Clostridium difficile*. Zajímavou studii zpracovali Bardoň, Vágnerová a Kolář (2012, s. 9-10) v okrese Olomouc, ale možnost přenosu alimentární cestou nepotvrdili. Studie byla zaměřena na průkaz *Clostridium difficile* a jeho toxinů u prasat v okrese Olomouc pomocí tří různých metod. Celkem vyšetřili 108 vzorků, ale ani v jednom vzorku *Clostridium difficile* kultivačně neprokázali. 56 vzorků bylo navíc testováno kombinovaným testem na průkaz GDH a toxinů A/B, ale ani tento test nepřinesl pozitivní výsledek.

### 1.3.3 Příznaky klostridiové kolitidy

Příznaky svědčící pro těžký průběh klostridiové kolitidy udává Beneš a kolektiv (2014b, s. 59) následující:

- „horečka >38,5 °C
- zimnice a třesavky
- hemodynamická nestabilita včetně septického šoku
- známky peritonitidy
- paralytický ileus
- leukocytóza > 15 x $10^9$/l
- posun doleva (> 20 % tyčí v diferenciálu leukocytů)
- vzestup kreatininu v séru (> 50 % nad obvyklou hodnotu)
- vzestup hladiny laktátu v séru
- pseudomembranózní kolitida zjištěná koloskopicky

- rozpětí tračníku (> 80 mm v oblasti céka nebo > 60 mm na transverzu a descendentu) prokázané zobrazovacím vyšetřením (rtg nativ břicha, CT)“

Kolitida vyvolaná *C. difficile* patří do skupiny střevních infekcí. Původcem nemoci jsou toxigenní kmeny bakterie *Clostridium difficile*, které se vyznačují přirozenou rezistencí vůči některým používaným antibiotikům. Onemocnění vedou k poškození tračníku způsobenému klostridiovými toxiny, které mohou pacienta vyčerpávat nejen akutní infekcí, ale i relapsy a rekurencemi opakovanými vícekrát po sobě. Onemocnění je nakažlivé a významně se podílí na výskytu průjmů v nemocničním prostředí.

Dále se může onemocnění rozvinout i jako post-antibiotická kolitida, což je střevní dysmikrobie, která vzniká v důsledku předchozí léčby antibiotiky. Onemocnění může začít náhle s četnými vodnatými stolicemi, u některých pacientů se objevuje horečka a leukocytóza (Havlík et al., 2002, s. 37).

Léčba pacientů cefalosporiny druhé a třetí generace může být rizikovým faktorem v rozvoji průjmů způsobených *Clostridium difficile* (Reese a Betts, 1996, s. 1086, 1158).

Pokud dojde k rozvoji pablán na sliznici tračníku, mluvíme o pseudomembranózní kolitidě. Zde se uplatňuje endoskopické vyšetření nebo jsou pablány pozorovatelné okem během operace či při pitvě.

Klaban (2005, s. 112) píše o mechanismu rozvoje infekce způsobené *Clostridium difficile.* Dle Klabana dojde v důsledku léčby antibiotiky k potlačení důležité střevní mikroflóry, vegetativní buňky *Clostridium difficile* se často přemění na spory, které jsou rezistentní k antibiotikům. Po ukončení podávání antibiotik spory vyklíčí do vegetativní formy. Jelikož je konkurenční střevní mikroflóra vybita, mohou se intenzivně množit.

Dostál charakterizuje pseudomembranózní enterokolitidu jako: „Akutní průjmové onemocnění nejčastěji v souvislosti s podáváním širokospektrých antibiotik, nejčastěji je etiologie připisována toxinům *Clostridium difficile.* Jde většinou o endogenní nákazu při porušení rovnováhy střevní flóry. Během antibiotické léčby nebo krátce po jejím skončení dojde k vzestupu teploty, objeví se průjmy, často dramatické, objemné s příměsí krve, případně s cáry střevní sliznice“ (Dostál et al., 2005, s. 213-214).

*Clostridium difficile* je sice nejčastěji prokázaný původce postantibiotické kolitidy, ale kromě *Clostridium difficile* může vyvolat průjem spojený s užíváním antibiotik také *Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Klebsiella oxytoca, Candida species* a *Salmonella species* (Scharfen, 2013, s. 154-156).

Pokud se však akutní průjmové onemocnění objeví u pacientů až během hospitalizace, zvláště u pacientů, kteří byli hospitalizování více než tři dny, je velmi pravděpodobné, že původcem je *Clostridium difficile*. U těchto pacientů není pravděpodobné, že by se nakazili požitím potravin kontaminovaných bakteriemi *Campylobacter, Shigella* nebo *Salmonella* (Carey, Schuster a McGowam, 2011, s. 48).

Velkým problémem se stávají reinfekce. "Až ve 20 % případů dochází k relapsům onemocnění" (Beneš et al., 2009). Je to způsobeno přetrváváním spor v prostředí nebo ve střevech pacientů. Onemocnění mají těžší průběh, častěji se přidají i komplikace. Velký vliv na průběh relapsů má i zdravotní stav pacienta, který je po primoinfekci vyčerpán.

### 1.3.4 Faktory disponující k vzniku klostridiové kolitidy

Beneš a kolektiv (2014b, s. 58) uvádějí faktory disponující k vzniku klostridiové kolitidy (*C. difficile*)

| Disponující faktor | Typické příklady |
|---|---|
| střevní dysmikrobie | antibiotická léčba (zejména aminopeniciliny včetně kombinovaných přípravků obsahujících inhibitory beta-laktamáz, cefalosporiny 2. a 3. generace, klindamycin a ciprofloxacin) |
| porucha slizniční imunity v GIT | nedostatečná tvorba slizničních IgA, karence bílkovin, maligní tumory, léčba cytostatiky, idiopatická zánětlivá onemocnění střeva (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba) |
| imobilita střeva | stavy po operaci v břišní dutině, podávání léků tlumících peristaltiku, gravidita |
| celková imobilita | dlouhodobý pobyt na lůžku, operace v celkové narkóze, revmatické a nervové choroby omezující hybnost |
| hospitalizace | zejména pobyt na JIP, riziko infekce je vyšší na odděleních, kde se již klostridiová kolitida v minulosti vyskytla |
| vyšší věk | incidence a závažnost nemoci podstatně narůstá od věku ≥ 65 let |

Také léky tlumící žaludeční aciditu mohou přispět ke vzniku CDI (Husa, Beneš a Nyč, 2013, s. 202).

Arumilli, Koneru a Fayyaz popisují vzácný příklad rychlého rozvoje CDI u pacienta z komunity přijatého na operaci totální náhrady kolenního kloubu. U pacienta se do 24 hodin po operaci dostavila teplota 38,1 °C, která druhý pooperační den vzrostla na 39,2 °C. Jelikož lékaři přikládali zhoršující se zdravotní stav předcházející operaci, pacientův stav se dále zhoršoval. Pacient neměl žádný z běžně hlášených rizikových faktorů pro rozvoj CDI. Původně se předpokládalo, že zdroj sepse pochází z kloubní náhrady, což vedlo ke stanovení špatné diagnózy a opoždění v nasazení správné léčby. Až po prokázání *Clostridium difficile* ve stolici byla nasazena léčba metronidazolem.

Pacient na léčbu nereagoval. Bylo zjištěno, že šlo o hypervirulentní kmen ribotyp 027 způsobující toxický megakolon (Arumilli, Koneru a Fayyaz, 2010).

## 1.4 Výskyt CDI

### 1.4.1 Hlášení výskytu CDI

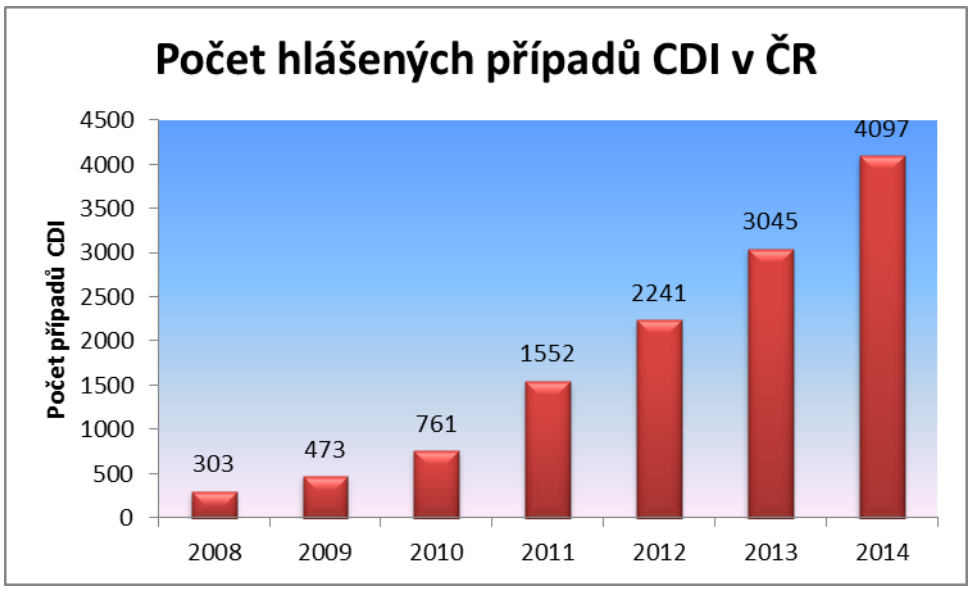
Hlášení výskytu CDI: „Klostridiová kolitida není zahrnuta ve výčtu povinně vykazovaných infekcí, které jmenuje Vyhláška č. 473/2008 Sb. o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce. Nicméně v souladu se zněním § 62 Zákona 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví jsou poskytovatelé léčebné péče povinni její výskyt hlásit příslušným epidemiologickým oddělením Krajské hygienické stanice (KHS)“ (Beneš et al., 2014b, s. 66).

### 1.4.2 Počet hlášených případů CDI v České republice

V České republice je patrný nárůst počtu hlášených případů CDI. V roce 2008 bylo hlášeno 303 případů CDI, v roce 2009 již 473, v roce 2010 bylo hlášeno 761, v roce 2011 bylo hlášeno 1 552, v roce 2012 bylo hlášeno 2 241, v roce 2013 bylo hlášeno 3 045 a v roce 2014 bylo hlášeno 4 097 onemocnění (Pokorná, 2015).

Počet případů od roku 2008 do roku 2014 v České republice znázorňuje graf č. 1.

Graf 1: **Počet hlášených případů CDI v České republice od roku 2008 do roku 2014.**




Dle Mezinárodní klasifikace nemocí patří klostridiové kolitidě kódové označení A04.7.

Kolitida, která je způsobena bakterií *Clostridium difficile*, je onemocnění se stále narůstající incidencí. Počet hlášených případů v ČR v roce 2014 byl 4 097, počet úmrtí na tuto diagnózu není centrálně evidován (Beneš, 2015).

Podobně je tomu i ve FN Brno. Během let 2007-2010 byl na KICH FN Brno zaznamenán výrazný vzestup počtu onemocnění CDI. V letech 2007-2010 bylo na KICH hospitalizovaných 284 pacientů s CDI laboratorně prokázanou na OKM FN Brno (Vojtilová et al., 2011, s. 208-213).

Nyč na semináři Klostridiový den 2015 uvedl, že CDI patří mezi 8 nejčastějších infekcí spojených se zdravotní péčí v Evropské unii, v USA dokonce patří na první místo. V Evropské unii je přibližně 175 000 případů za rok a úmrtí na tuto infekci kolem 3 000. Náklady na léčbu a péči přesahují 3 miliardy euro ročně. Jako hlavní příčiny uvedl výskyt hypervirulentních ribotypů, často zbytečné používání antibiotik,

nárůst vnímavé populace, tedy vyššího věku pacientů, přidružené nemoci, imunosuprese (Nyč, 2015).

## 1.5 Antibiotika

### 1.5.1 Charakteristika antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky, někdy nazývány antiinfektiva jsou léčiva využívána k profylaxi a k terapii infekčních onemocnění. Mezi antimikrobní látky zahrnujeme antibakteriální, antivirové, antiprotozoální látky a antimykotika. Antibiotika jsou mikrobiálního původu. Pokud jsou připraveny pouze chemicky, označují se chemoterapeutika. Hlavním požadavkem na antibiotikum je, že nesmí poškozovat eukaryotní buňky, proto ne všechny látky s antimikrobiálním účinkem mohou být použity jako lék. Účinek na eukaryotní buňky musí být zanedbatelný, a proto musí antibiotikum splňovat požadavek selektivní toxicity. Účinkovat musí v nízkých koncentracích a účinných hladin dosahovat brzy.

Pokud antibiotika pouze brání množení a růstu bakterií, je účinek bakteriostatický. Zde je důležité dodržet dobu podávání antibiotik, protože pokud se antibiotika vysadí předčasně, mikroby se mohou opět začít množit.

Pokud antibiotikum dokáže usmrtit bakterie, je účinek baktericidní. Tyto léky účinkují rychle, a proto se jim u závažných infekcí nebo u imunodeficientního pacienta dává přednost.

### 1.5.2 Nežádoucí účinky antibiotik

Antibiotika mohou mít nežádoucí účinky, mezi ně patří toxické účinky, zvláště pokud nejsou sníženy dávky u pacientů s onemocněním ledvin či jater. Mezi další

nežádoucí účinky patří alergické reakce. Velice časté jsou alergické reakce po podání penicilinů nebo cefalosporinů. Zvláště nebezpečné je injekční podání penicilinu, které u alergických osob může vyústit v anafylaktický šok. Antibiotikum může mít nežádoucí biologické účinky. Pokud antibiotikum zredukuje nebo vyhubí běžnou mikroflóru, může u hospitalizovaných pacientů dojít k přemnožení potenciálně patogenních kmenů z jeho vlastní mikroflóry nebo je kolonizován nemocničními kmeny. Například po podávání linkomycinu může dojít k přemnožení *Clostridium difficile* a k rozvoji pseudomembranózní kolitidy.

### 1.5.3 MIC a MBC

Votava charakterizuje MIC a MBC: "Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace dané látky, která zastaví růst příslušného mikroba. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejnižší koncentrace antibiotika, která během 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace mikrobů" (Votava et al., 2010, s. 111). Při podávání antibiotik je pro dosažení účinného klinického efektu nutné podat takové dávky antibiotika, aby se dosáhla vyšší hladina než MIC.

### 1.5.4 Disková diluční metoda

Citlivost k antibiotikům můžeme orientačně stanovit in vitro. K tomuto účelu se velmi často používá Mueller-Hinton agar, na který se naočkuje vyšetřovaná bakteriální kolonie. Na naočkovanou plotnu se položí antibiotické disky. Mueller-Hinton agar se inkubuje v termostatu. Antibiotikum difunduje a bakterie naroste pouze v místě, kde není antibiotikum v inhibiční koncentraci. Pokud antibiotikum bakterii inhibuje, pak se v okolí disku vytvoří inhibiční zóna. Změří se průměr inhibiční zóny, který je závislý na citlivosti testovaného mikroba.

### 1.5.5 Biologické referenční rozmezí

Break pointy jsou mezní hodnoty citlivosti mikroorganismů na antibiotika (Průša et al., 2012, s. C6.11/3).

Break pointy pro jednotlivá antibiotika a mikroorganismy se řídí dle EUCAST QC tabulky aktuální verze. Tabulky break pointu EUCAST v aktuálním znění lze nalézt na www.eucast.org. Tyto jsou zaneseny do LISu, který je automaticky převádí. Klinická kategorizace (rezistentní, intermediální, citlivý) se může odlišovat v rozmezí maximálně jednoho milimetru, což odpovídá běžné hranici chyby v laboratoři. Citlivost k antibiotikům in vitro a in vivo se může lišit. Rozhodnutí použít antibiotikum proti testovanému mikrobu pro terapii je zodpovědností klinického pracovníka, který zváží další faktory, které mohou ovlivnit in vivo aktivitu antibiotika (SOPV – MIKRO- 009).

### 1.5.6 Rezistence k antimikrobiálním látkám

Velkým problémem se stává rezistence mikrobů k antimikrobiálním látkám, hlavně získaná rezistence. U řady mikrobů je známá přirozená rezistence k některým antimikrobiálním látkám. Větší problém ovšem přestavuje sekundární, tedy získaná rezistence, kdy antimikrobiální látky dříve účinné na daný kmen, jsou nyní neúčinné. Mikrob se může stát rezistentním jednak v důsledku mutace, a jednak pokud dojde k přenosu genu pro rezistenci pomocí transpozonu nebo plazmidu. Například velkým problémem se stává rezistence k beta-laktamovým antibiotikům, mezi něž patří například hojně užívaný penicilin. Antibiotikum v tomto případě může potlačit citlivé mikroby a rezistentní kmen se přemnoží (Votava, 2005).

Mezi mechanismy rezistence patří změna cílové molekuly antibiotika, pokud je cílová skupina antibiotika změněna, antibiotikum se na ni nedokáže navázat a je neúčinné. Nebo může docházet k horšímu průniku antibiotika do buňky či schopnosti bakteriální buňky antibiotikum rychle vypumpovat z buňky. Další obranou mikrobů proti antibiotikům je využívání enzymů, které antibiotikum inaktivují (Votava, 2005).

Mezi nejčastější chyby v antibiotické léčbě patří například nadužívání antibiotik, podávání antibiotika u neinfekčního onemocnění, u běžných respiračních onemocnění, odběr materiálu na mikrobiologické vyšetření až po podání antibiotika, předčasná změna antibiotika, nesprávná výměna antibiotika, nízká dávka antibiotika, které pak nemůže dosáhnout požadované koncentrace, podobně je to i u nepřihlédnutí k farmakokinetice, kdy se lék nemusí dostat do místa infekce, dále nedodržení správné délky doby užívání antibiotika, podávání širokospektrých antibiotik u infekcí, kde by postačilo antibiotikum s užším spektrem účinku, u nesprávné interpretace nálezu více druhů mikrobů, používání kombinace antibiotik, kde by mohlo být podáno pouze jedno. Další chybou je používání injekční formy, místo formy perorální nebo naopak jen forma lokální, kde mělo být antibiotikum dávkováno celkově, nepřihlédnutí ke změněným ledvinovým či jaterním funkcím, neznalost primární rezistence některých mikrobiálních druhů vůči některým antimikrobiálním látkám a také nedostatečný počet mikrobiologických vyšetření (Votava et al., 2010, s. 116).

### 1.5.7 Rozdělení antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky se dělí na antivirotika, antimykotika, antibakteriální a antiparazitální látky.

Antibakteriální látky můžeme rozdělit do skupin podle místa účinku. Mohou potlačovat syntézu buněčné stěny, syntézu nukleových kyselin, syntézu bílkovin, funkci buněčné membrány atd. Spektrum účinku můžeme rozdělit na úzké spektrum, středně široké spektrum a široké spektrum (Bednář et al., 1996, s. 162).

Jednu velkou skupinu tvoří inhibitory syntézy bakteriální stěny. Jejich nesmírnou výhodou je, že primárním cílovým místem je bakteriální stěna, tvorba peptidoglykanové vrstvy, kterou u živočišných buněk nenajdeme. Tato léčiva dokáží inhibovat mikroba nebo ho usmrtit, bez poškození makroorganismu (Greenwood, Slack a Peutherer, 1999).

Do této skupiny patří beta-laktamy, mezi které se řadí např. peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a manobactamy. Mezi peniciliny se řadí přirozené

peniciliny, peniciliny rezistentní k ß-laktamázám, aminopeniciliny a peniciliny pseudomonadové. Mezi ostatní inhibitory syntézy buněčné stěny patří vankomycin a teikoplanin. Cefalosporiny zahrnují cefalosporiny 1., 2., 3. a 4. generace, které mají specifické spektrum účinnosti různé šíře (Bednář et al., 1996, s. 163-164).

Jedním z nežádoucích účinků cefalosporinů je akutní kolitida způsobená enterotoxinem přemnoženého *Clostridium difficile* (Černý et al., 2008, s. 38).

Další velkou skupinou jsou inhibitory syntézy bílkovin. Místem syntézy bílkovin v prokaryotní i eukaryotní buňce jsou ribozomy (Klaban, 2005, s. 112). Bakteriální ribozomy se od ribozomů eukaryotních buněk výrazně liší, z tohoto důvodu je možné selektivně působit na syntézu bílkovin. Do této skupiny spadají tetracykliny, chloramfenikol, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy a kyselina fusidová.

Mezi inhibitory syntézy nukleových kyselin patří sulfonamidy, diaminopyrimidiny, chinolony, nitroimidazoly, nitrofurany, novobiocin, rifamyciny (Greenwood, Slack a Peutherer, 1999).

### 1.6 Antibiotická léčba CDI

Po stanovení diagnózy se léčba zahajuje co nejdříve, někdy již na základě klinického podezření ještě před laboratorním potvrzením diagnózy, aby se předešlo případným komplikacím (Anon, 2012, s. 37-40). Důležité je vysadit, pokud je to možné, antibiotikum, které vedlo ke vzniku klostridiové kolitidy.

Lékem volby je vankomycin nebo metronidazol a samozřejmě přerušení dosavadní antibiotické léčby. Metronidazol patří do skupiny nitroimidazolů, které se vyznačují velmi dobrou aktivitou na obligátně anaerobní bakterie. Účinkuje na grampozitivní a gramnegativní anaerobní bakterie včetně *Clostridium difficile* (Jindrák et al., 2014, s. 149-150).

Vankomycin patří mezi glykopeptidy, což jsou přirozená, baktericidní antibiotika, která inhibují syntézu stěn G+ bakterií. Vankomycin dobře proniká do tělních tekutin (Černý et al., 2008, s. 38). Mezi priority klinického použití vankomycinu Jindrák uvádí

těžkou a komplikovanou kolitidu způsobenou *Clostridium difficile*, v tomto případě je nutná perorální aplikace (Jindrák et al., 2014, s. 137).

Podle Charváta (2013, s. 8-9) ale přibývá neúspěšných případů při použití standardního léčebného postupu, při kterém je podávána kombinace antibiotik vankomycinu perorálně a metronidazolu nitrožilně. Také stoupá počet případů rekurence infekce po zaléčení její první ataky uvedeným způsobem. Charvát doporučuje hledat jiné postupy léčení těžkých kolitid vyvolaných bakterií *Clostridium difficile*.

Charvát (2013, s. 8-9) uvádí případovou studii, ve které k úspěšnému vyléčení pacientky s těžkou formou recidivující kolitidy vyvolanou bakterií *Clostridium difficile* použil širokospektré antibiotikum tigecyklin, které podával nitrožilně v kombinaci s perorálně podávaným vankomycinem.

Tigecyklin patří do skupiny glycylcyklinů. Chemickou strukturou navazují na tetracykliny. Tigecyklin je využíván v léčbě polymikrobiálních infekcí s účastí anaerobů a multirezistentních mikroorganismů. V klinické praxi se spíše používá jako alternativa jiných antibiotik pokud nejsou jiné možnosti volby antibiotik (Jindrák et al., 2014, s. 147).

Krůtová a Nyč informovali o novinkách v terapii infekcí vyvolaných bakterií *Clostridium difficile*. Pro nezávažné formy CDI zůstal lékem volby metronidazol, ale pro léčbu těžkých a rekurentní forem je indikován fidaxomicin (Krůtová a Nyč, 2014, s. 224-226).

Jindrák také píše o fidaxomicinu a potvrzuje, že fidaxomicin patří mezi nová antibiotika se selektivním účinkem na *Clostridium difficile*. Je využíván na léčbu závažných, recidivujících forem této infekce. Jeho hlavní výhodou je redukce recidiv onemocnění (Jindrák et al., 2014, s. 149-150).

Mezi další terapeutické možnosti patří použití teikoplaninu, což je antibiotikum příbuzné vankomycinu a taky rifaximin, který má široké spektrum účinku zahrnující i *C. difficile*. Teikoplanin patří mezi glykopeptidové antibiotikum téměř shodného spektra s vankomycinem, ale nižší nefrotoxicitou. Díky dlouhému biologickému poločasu může být dávkován jednou denně (Jindrák et al., 2014, s. 138).

## 1.7 Fekální bakterioterapie

### 1.7.1 Princip fekální bakterioterapie

Oficiálně doporučenou metodou, optimální pro léčbu vícečetných rekurencí je fekální transplantace s vysokým procentem úspěšnosti, kterým předčí stávající antibiotické režimy. Při této terapii je homogenizovaná stolice zdravého dárce podána jednorázově nasojejunální sondou (Krůtová a Nyč, 2014, s. 224-226).

Kohout a Vejmelka (2014, s. 729) uvádějí, že touto metodou lze v gastroenterologii úspěšně vyléčit pacienty s rekurentní klostridiovou kolitidou.

Polívková (2015) na semináři Klostridiový den 2015 konstatovala, že riziko rekurencí CDI po léčbě fekální bakterioterapií je 5-10 % oproti antibiotické léčbě, kde je riziko rekurence 60-70 %.

V časopise interní medicína pro praxi Polák, Husa a Freibergerová (2014, s. 243) píší o fekální bakterioterapii: „Tato metoda využívá poznatku, že stolice člověka je až z 95 % své hmotnosti tvořena rezidentní interstinální mikroflórou. Ta nejlepší komerčně vyráběná probiotika obsahují řádově desítky živých mikroorganizmů, což představuje značný nepoměr oproti fyziologické střevní mikroflóře zastoupené 700-1000 různých druhů. Dle převažujících bakteriálních čeledí lze molekulárně-genetickými metodami rozlišit 4 enterotypy, v současnosti zatím bez klinického využití. Základní indikací pro fekální bakterioterapii je první a další recidiva klostridiové kolitidy navzdory předchozí adekvátní antibiotické léčbě. Samotná metoda je technicky velmi jednoduchá.“

### 1.7.2 Postup provedení fekální bakterioterapie

Mezi nejdůležitější první kroky patří velmi podrobně pacienta seznámit s plánovaným výkonem, poučit ho nejen o prospěchu léčby, ale i o možných rizicích. Poučit dárce stolice a od pacienta i dárce si vyžádat písemný souhlas. Následuje celkové vyšetření dárce, aby se co nejvíce eliminovala možnost přenosu jakékoliv

infekce. Provádí se parazitologické vyšetření stolice, běžné kultivační vyšetření stolice, dále vyšetření na vyloučení klostridiového antigenu a toxinů. Provádí se vyšetření krve k vyloučení hepatitid, HIV, rozbor krevního obrazu, koagulačních parametrů a některá biochemická vyšetření séra a moči. Večer před provedením fekální bakterioterapie se ukončuje terapie antibiotiky. Před transplantací se podávají inhibitory protonové pumpy kvůli snížení gastrické sekrece a kalciové kapsle s kodeinem k deceleraci střevní peristaltiky. Transplantát je homogenizován a přenesen pomocí endoskopu. Po transplantaci se sleduje četnost stolic pacienta (Vejmelka et al., 2014, s. 195-200).

Polívková (2015) na semináři Klostridiový den 2015 informovala o výběru dárců stolice. Dle jejích zkušeností jsou nejlepšími dárci osoby, které jsou exponovány stejnému mikrobiálnímu prostředí jako pacient. Tedy nejlepšími dárci jsou příbuzní či nepříbuzní žijící ve společné domácnosti.

Možnosti aplikace homogenizátu jsou nazojejunální sondou, kolonoskopicky nebo vysokým rektálním nálevem (Polák, Husa a Freibergerová, 2014, s. 241-243).

Není rozdíl ve výsledku léčby v cestě aplikace homogenizátu, důležité je množství homogenizátu, které musí být nad 50 g (Kohout, 2015).

Možné komplikace: „Při aplikaci nazojejunální sondou není vyloučeno tzv. přerůstání mikroorganizmů v kraniálních etážích tenkého střeva (tzv. SIBO – fenomén – Small Intestine Bacterial Overgrowth). Klinicky se SIBO může projevit nechutenstvím, křečemi v břiše a změnou defekačních návyků (např. střídáním zácpy a průjmu). Dosud není objasněno, do jaké míry může SIBO-fenomén ovlivnit dlouhodobou prognózu a kvalitu života pacienta“ (Polák, Husa a Freibergerová, 2014, s. 243).

Mezi rizika fekální bakterioterapie patří přenos infekčního agens a u imunokompromitovaných pacientů zvýšené riziko infekčních komplikací jako i možné zhoršení jiných chronických střevních onemocnění.

Pokud je pacient bez potíží, následuje kontrola po fekální transplantaci po 2 -3 měsících v ambulanci a stálá kontrola telefonicky (Kohout, 2015).

V časopise Klinická mikrobiologie a infekční lékařství píší Polák, Freibergerová a Juránková o první zkušenosti s fekální bakterioterapií v léčbě relabující pseudomembranózní kolitidy způsobené *Clostridium difficile*. Výsledky jsou velmi

pozitivní. Fekální bakterioterapií bylo vyléčeno 77,8 % pacientů v souboru. Komplikace ani úmrtí nebyly zaznamenány. Terapii hodnotí jako jednoduchou, bezpečnou, levnou s možností opakované aplikace (Polák, Freibergerová a Juránková, 2011, s. 218).

### 1.8 Bariérová opatření

Jelikož klostridiové infekce patří mezi infekce spojené se zdravotní péčí, jsou velmi důležitá epidemiologická opatření, která minimalizují šíření nákazy. Mezi ně patří hlášení výskytu *Clostridium difficile* s přítomností toxinů, dále izolovat pacienta a poskytnout mu vlastní sociální zařízení.

Jelikož je nakažlivost u této nemoci spojena s přítomností průjmů rozhodují o délce izolace klinická hlediska (Husa, Beneš a Nyč, 2013, s. 202).

Dle Šrámkové (2013, s. 41) je důležité vyhledávat kontakty a stolice odebírat u dospělých a dětí nad 2 roky jen v případě klinických příznaků.

Izolace může být ukončena za 3 dny po skončení průjmové stolice. Na negativní výsledek stolice se nečeká, jelikož pozitivita je dlouhodobá. Před izolačním pokojem musí být připraveny čisté empíry na převlečení, samozřejmostí jsou jednorázové rukavice a dezinfekční prostředky na dezinfekci rukou pro osoby vstupující do pokoje. Velmi důležité je dodržovat hygienu a dezinfekci rukou, na které nesmí být používány alkoholové preparáty, dodržovat bariérový způsob ošetřování, tím se rozumí práce v rukavicích, nástroje po použití dekontaminovat, čistit a sterilizovat. V izolačním pokoji zvýšit četnosti úklidu sociálního zařízení, individualizovat úklidové pomůcky a používat sporicidní dezinfekční prostředky dle dezinfekčního řádu nemocnice. Také dekontaminovat podložní mísy a bažanty a opět používat dezinfekční prostředky se sporicidním účinkem. Likvidovat odpad a provádět sběr použitého prádla do infekčních pytlů, které jsou uvnitř izolačního pokoje (Šrámková et al., 2013, s. 41).

Benešová (2015) mluvila na semináři Klostridiový den 2015 z hlediska epidemiologa o nebezpečí rozšíření CDI. Upozorňovala na riziko snadného přenosu, kdy stačí nízká infekční dávka, 10–100 spor, které navíc perzistují v prostředí až 40

dnů. Apelovala na dodržování bariérových opatření, protože 30-60 % prostoru kolem pacienta s klinickými projevy CDI je kontaminováno sporami *Clostridium difficile.*

### 1.9 Možnosti diagnostiky CDI

*Clostridium difficile* se prokazuje ve stolici, vyšetření je určeno pro pacienty s podezřením na CDI, není určeno pro pacienty s formovanou stolicí a bez klinických příznaků a také se běžně neprovádí u dětí do dvou let.

Dle Beneše (Beneš et al., 2014a): „Základní postup spočívá ve vyšetření stolice na přítomnost klostridiové glutamátdehydrogenázy a současně i na přítomnost toxinů A a B“. Průkaz GDH se považuje za vhodný test k vyřazení *Clostridium difficile* negativních vzorků. Provádí se imunochemickou metodou. Dále Beneš a kolektiv uvádějí (2014a): „Je-li průkaz GDH pozitivní a test na přítomnost toxinů vychází negativní, považuje se onemocnění za suspektní CDI. Pro potvrzení klostridiové etiologie se provádí konfirmační vyšetření – kultivace stolice cílená na klostridia nebo PCR. Další alternativu představuje koloskopické vyšetření.“ Kultivace stolice by se měla provádět u všech nemocných, u kterých průkaz GDH a toxinů nepřinesl jasný výsledek. Rovněž se dá využít k testování citlivosti k antibiotikům.

Za zlatý standard je považován průkaz cytotoxicity na tkáňových kulturách a neutralizační test. Vyšetření je náročné na laboratorní vybavení a provádí se ve specializovaných a referenčních pracovištích (Beneš et al., 2014a).

Zkušenosti s laboratorní diagnostikou *Clostridium difficile* byly uvedené ve studii prováděné v Pardubické krajské nemocnici, kde si pro rutinní diagnostiku CDI nastavili diagnostický algoritmus. Vzorky stolice primárně testují pomocí soupravy D-EIA. Za definitivně negativní považují výsledek GDH negativní, toxin A/B negativní. Výsledky GDH pozitivní, toxin A/B pozitivní považují za pozitivní průkaz toxigenního kmene *Clostridium difficile* a v tomto případě informují ošetřující lékaře o nutnosti léčby a izolaci pacienta. V případě výsledku GDH pozitivní, toxin A/B negativní provádějí po

domluvě s ošetřujícím lékařem vyšetření pomocí PCR k průkazu přítomnosti toxigenního kmene ve stolici (Bareková, Zálabská a Hanovcová, 2013, s. 91-95).

Ke kultivaci *Clostridium difficile* lze použít médium pro izolaci např. firmy Oxoid s názvem *Clostridium Difficile* Selective Brazier´s Medium. Na této půdě roste *Clostridium difficile* v neprůhledných šedobílých koloniích o velikosti 2-5 mm s viditelnou zelenožlutou fluorescencí pod UV světlem (Oxoid, 2014).

Nyč (2015) na semináři Klostridiový den 2015 kladl důraz na rozlišování toxigenních a netoxigenních kmenů v diagnostice. Jako konfirmační metodu nelze použít kultivaci cílenou na *Clostridium difficile*, pokud nebude následovat průkaz toxinů. Dále doporučil dávat přednost vyšetření čerstvé stolice před mraženou, z důvodu ztráty aktivity toxinů. Pokud musí být stolice zmražena, měla by být zmražena až na –70 °C.

### 1.10 Ribotypizace

Vyšetření PCR metodou slouží k průkazu genu kódujícího syntézu toxinu B a případně i toxinu A, ale používá se většinou jako konfirmační metoda.

Malinová (2012, s. 29) ve své práci vysvětluje ribotypizaci: „V chromozomální DNA jednotlivých kmenů *C. difficile* je přítomen různý počet operonů kódujících ribozomální rRNA. V každém operonu se nachází vysoce konzervované geny kódující 16S a 23S podjednotky rRNA, které jsou odděleny různě dlouhým sekvenčně variabilním úsekem, tzv. mezerníkem (ISR-intergenic spacer region). Ribotypizace je metoda založená na rozdílech v počtu a délkách těchto ISR, popřípadě na variabilitě jejich sekvence.“

Ribotypizace je založena na srovnávání fragmentů genů pro rRNA a je využívána k typizaci bakterií. Podle Krůtové a Polívkové (2015) patří ribotypizace mezi nejrozšířenější molekulární metody používané k typizaci izolátů *Clostridium difficile* v Evropě. Při ribotypizaci *Clostridium difficile* se provádí amplifikace oblasti mezi geny pro 16S a 23S rDNA (Intergenic Spacer Region). Rozdíl mezi jednotlivými ribotypy je

v počtu alel těchto genů, ale také v délkách úseků mezi těmito alelami. „Každý ribotyp tedy tvoří specifický elektroforetický profil, podle kterého může být identifikován“ (Krůtová a Polívková, 2015).

V článku, který prezentoval výsledky evropského projektu EUCLID, bylo zmíněno: “V souvislosti s diverzitou ribotypů bylo prezentováno, že 35 % kmenů z České republiky příslušelo k ribotypu 176, což je, kromě Itálie, kde dominují dva ribotypy (21,7 % ribotyp 018 a 17,1 % ribotyp 356), v rámci aktuálního stavu v Evropě výjimečný stav“ (Krůtová a Nyč, 2014, s. 225).

O nebezpečných ribotypech informovala zpráva Krůtové a Polívkové (2015), v které se mimo jiné zmiňovaly i o epidemiích klostridiových střevních infekcí vyvolaných hypervirulentním ribotypem 027 v Severní Americe v letech 2002–2003. Tento ribotyp je charakterizován extrémně vysokou produkcí toxinů A i B a snadným šířením v nemocničním prostředí díky značné tvorbě spor. Později byly popsány další epidemické ribotypy *Clostridium difficile*, mezi nimi i ribotyp 176, který je někdy označován jako ribotyp 027-like. Ribotyp 176 je ribotypu 027 velmi podobný svými molekulárně genetickými charakteristikami a také biologickými vlastnostmi.

V roce 2013 byla provedena analýza 624 kmenů *Clostridium difficile*, zaslaných z 11 nemocnic v České republice. Ukázalo se, že 40 % izolátů patřilo k ribotypu 176 (Krůtová et al., 2014).

Na semináři Klostridiový den 2015 Krůtová (2015) informovala o výsledcích za rok 2014. Za tento rok jim bylo zasláno 751 izolátů ze 13 nemocnic v České republice. Nejvíce ribotypů příslušelo k ribotypu 001 a 176. Ribotypy 001 a 176 jsou epidemické ribotypy, které více kolonizují pacienty, klonálně se šíří, spory dlouho přetrvávají v prostředí a někdy mohou pacienta kolonizovat doživotně.

Vojtilová píše o ribotypizaci izolátů *Clostridium difficile* ze stolice u 4 pacientů hospitalizovaných na Klinice infekčních chorob v Brně v letech 2007-2010. Tyto izoláty byly určeny jako ribotyp 176 (Vojtilová et al., 2011, s. 208).

V září roku 2007 byl zaznamenán nárůst CDI v nemocnici v Trier v Německu. Šetřením bylo zjištěno, že se jednalo o hypervirulentní ribotyp 027. Zemřelo 9 lidí (Jansen et al., 2010, s. 1120-1125)

# 2 Hypotézy a metodika výzkumu

## 2.1 Cíl práce

Prvním cílem mé práce bylo posoudit, jestli metoda či metody používané k laboratorní diagnostice CDI v Nemocnici Písek, a.s. jsou dostatečné nebo by se měla zavést další metoda. Pro porovnání jsem si vybrala doporučení, která jsou přístupná z adresy na internetu www.infekce.cz a garantuje je Společnost infekčního lékařství ČLS JEP, Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČSL JEP a Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP (Beneš et al., 2014a).

Dále jsem sledovala, jestli je při příjmu materiálu řádně zkontrolována žádanka a zkumavka s materiálem, zkontrolováno jméno, příjmení, rodné číslo a zasílaný materiál. Na žádance musí být uvedeno požadované vyšetření, zdravotní pojišťovna pacienta, diagnóza, kdo vyšetření požaduje, v kolik hodin byl vzorek odebrán, datum, razítko a podpis lékaře. Všechny tyto údaje kontroluje laborantka.

V mé práci kvalitativní metodou prokazuji přítomnost klostridiové glutamátdehydrogenázy a přítomnost toxinu A a B. Cílem práce bylo mimo jiné si řádně vyzkoušet imunochromatografickou metodu v praxi, kontrolovat správný laboratorní postup a validnost vzorků, aby se předešlo neplatnosti výsledků např. nedostatečným objemem vzorku, použitím proexpirovaných setů apod.

Výsledky jsem využila k statistickému zpracování a stanovila si hypotézy. Získaná data jsem spočetla pomocí Chí kvadrát testu, abych zjistila, jaká byla dosažena hladina významnosti.

## 2.2 Hypotézy

Hypotéza 1: Metody záchytu *Clostridium difficile* a jeho toxinů používané v Nemocnici Písek, a. s. jsou pravděpodobně dostačující na rutinní okresní laboratoř.

Hypotéza 2: Domnívám se, že v roce 2014 se zvýšil záchyt *Clostridium difficile* a jeho toxinů v Nemocnici Písek, a.s. oproti roku 2013.

Hypotéza 3: Domnívám se, že pacienti ≥ 65 let jsou vnímavější k CDI než pacienti pod 65 let.

Dále mě zajímalo zastoupení pohlaví v mém souboru v roce 2013 a 2014.

Do souboru byly zařazeny vzorky stolic s požadavkem na vyšetření toxinů *Clostridium difficile*, které byly dodány na Oddělení klinické mikrobiologie v Nemocnici Písek, a.s. v období 1. 1. 2014 – 31. 12. 2014. K porovnání jsem použila výsledky testů získané z LIS Nemocnice Písek, a.s. za období 1. 1. 2013-31. 12. 2013.

## 2.3 Imunochromatografický test

### 2.3.1 Princip imunochromatografického testu

Souprava CoproStrip™ *Cl. difficile* GDH + Tox A + Tox B je rychlý imunochromatografický test simultánně detekující glutamátdehydrogenázu, toxin A a toxin B ze vzorku lidské stolice. Souprava složí jako pomůcka v diagnostice infekce *Clostridium difficile.*

Membrána testu A je potažena monoklonálními protilátkami proti antigenu GDH, membrána testu B je potažena monoklonálními protilátkami proti toxinu A a membrána testu C je potažena monoklonální protilátkami toxinu B.

Během testování reaguje vzorek s červeně značenými protilátkami anti-GDH, anti-toxin A a anti-toxin B, navázanými na částicích. Směs vzlíná kapilárními silami po membráně a reaguje s protilátkami za vzniku barevného proužku v testovací zóně. Přítomnost červených proužků v jednotlivých testovacích zónách vypovídá o pozitivním výsledku příslušného antigenu, jeho nepřítomnost je důkazem negativního výsledku. Procedurální kontrola, zeleně zabarvený proužek ve všech kontrolních zónách se musí objevit vždy, a je důkazem, že bylo použito vhodné množství vzorku a test je funkční.

Součásti soupravy:

CoproStrip™ Cl. difficile GDH + Tox A + Tox B kazetky

Zkumavky pro přípravu vzorku s diluentem a návod k použití v českém jazyce.

Požadovaný, ale nedodávaný materiál:

Odběrové zkumavky, rukavice, stopky (Příbalová informace, 2014).

### 2.3.2 Pracovní postup imunochromatografického testu

Odběr vzorků a příprava:

Použijí se 1-2 g pevné (nebo 1-2 ml řídké) stolice. Vzorek musí být odebrán do čisté a suché nádobky bez jakýchkoliv transportních medií nebo roztoků. Vzorek se skladuje v lednici při 2-8 °C nejdéle 24 hodin. Pro delší skladování se vzorek zamrazuje při teplotě -20 °C. V případě zmrazení, se vzorek musí pro použití zcela rozmrazit při laboratorní teplotě.

Příprava vzorku stolice:

Pomocí víčka zkumavky s kapátkem se odebere cca 125 mg stolice na špičku kapátka. V případě řídké stolice se natáhne cca 125 µl vzorku do kapátka. Vzorek se přenese do zkumavky s diluentem a pečlivě uzavře. Zkumavka se vzorkem se protřepe na vortexu 15 sekund.

Pokyny pro použití:

Před vlastním testováním se nechá testovací destička, vzorek a reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu (15-30 °C). Vše se otvírá až bezprostředně před použitím.

1, Testovací destička se použije po vyjmutí z hliníkové fólie co nejdříve. Nejlepšího výsledku se dosáhne, použije-li se destička ihned po vyjmutí z fólie.

2, Zkumavka se vzorkem se promíchá pro lepší rozpuštění vzorku. Špička zkumavky se ulomí.

3, Pro každý vzorek se použije samostatná kazeta. Do každé ze 3 jamek v kazetě se kápnou přesně 4 kapky připraveného vzorku.

Pokud vzlínání vzorku brání pevné částice, jemně se promíchá vzorek v jamce pomocí kapátka nebo čisté tyčinky. Pokud se stále vzorek nevsakuje, kápne se kapka diluentu do vzorku v jamce, dokud se vzorek nezačne vsakovat. Výsledek se odečítá po 10 minutách.

### 2.3.3 Interpretace výsledků

GDH, toxin A a toxin B negativní. Bez infekce *Cl. difficile*.
GDH pozitivní. Toxin A a toxin B negativní. Indikace *Cl. difficile*.
GDH a toxin A pozitivní. Toxin B negativní. Indikace infekce *Cl. difficile*. Je doporučena další analýza vzorku CE/FDA certifikovaným testem.
GDH a toxin B pozitivní. Toxin A negativní. Infekce *Cl. difficile*. Indikace infekce *Cl. difficile*.
GDH, toxin A a toxin B pozitivní. Indikace infekce *Cl. difficile*.
GDH a toxin B negativní. Toxin A pozitivní. Opakuje se test s čerstvým vzorkem.

Pokud je opět výsledek pozitivní na toxin A a negativní GDH, je doporučená další analýza vzorku CE/FDA certifikovaným testem.
GDH a toxin A negativní. Toxin B pozitivní. Opakuje se test s čerstvým vzorkem. Pokud je opět výsledek pozitivní na toxin B a negativní na GDH, je doporučená další analýza vzorku CE/FDA certifikovaným testem.

Toxin A a toxin B pozitivní. GDH negativní. Opakuje se test s čerstvým vzorkem. Pokud je opět výsledek pozitivní na toxin A/B a negativní na GDH, je doporučená další analýza vzorku CE/FDA certifikovaným testem.
Neplatný výsledek

Absence zeleného kontrolního proužku v jakékoliv ze tří testovacích zón (A/B/C) bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost červených proužků v jakékoliv ze tří testovacích zón (A/B/C).

Nejčastějšími příčinami neplatného výsledku jsou nesprávný objem vzorku, nedodržení pracovního postupu a znehodnocení reagencií (nesprávné skladování,

uplynutí doby expirace). V každé testovací zóně (A/B/C) se musí objevit zelený kontrolní proužek, jinak je výsledek neplatný.

Poznámky k interpretaci výsledků

Intenzita červeného proužku v zóně T může kolísat v závislosti na koncentraci antigenu ve vzorku. Tento test je kvalitativní, výsledky nelze hodnotit kvantitativně. Výsledek je považován za pozitivní, i když je proužek zabarven slabě.

### 2.3.4 Kontrola kvality

Každý strip má zabudovanou procedurální kontrolu (C). Pokud byl test proveden správně, objeví se v oblasti kontroly zeleně zabarvený proužek, který je důkazem, že bylo použito správné množství vzorku a test je funkční.

Omezení

a, CoproStrip *Cl. difficile* GDH + toxin A + toxin B indikuje přítomnost GDH, toxinu A a/nebo toxinu B kvalitativním stanovením. Tento test je kvalitativní, nemůže se hodnotit kvantitativně.

b, Nesprávný vzorek může způsobit neplatný výsledek (např. hnědé proužky). V tomto případě se naředí vzorek pufrem a test se opakuje.

c, Stejný vzorek stolice může způsobit různou intenzitu zbarvení proužků.

d, Test musí být proveden do 2 hodin od vyjmutí z originální hliníkové fólie.

e, Pokud je výsledek testu negativní a klinický nález přetrvává, použije se jiná metoda testování.

f, Tento test je určen pro diagnostiku *Cl. difficile*. Všechny výsledky musí být interpretovány s klinickým nálezem a laboratorní výsledky musí být dostupné pro vyšetřujícího lékaře (Příbalová informace, 2014; SOPV-MIKRO- 053).

## 2.4 Anaerobní kultivace

Pokud výsledek imunochromatografického testu potvrdil přítomnost klostridiové glutamátdehydrogenázy s přítomností nebo bez přítomnosti toxinu A a/nebo toxinu B, je založena anaerobní kultivace cílená na *Clostridium difficile*.

### 2.4.1 Pracovní postup anaerobní kultivace

Na Schaedler agar, který je vhodný pro anaerobní kultivaci a krevní agar, který slouží jako kontrola, naočkujeme podezřelou stolici. Sterilní bakteriologickou kličkou rozočkujeme a do inokula položíme na obě plotny na levou stranu 2 antibiotické disky s gentamycinem 10 μg vzdálené na šířku jednoho disku a na pravou stranu 2 antibiotické disky s penicilinem vzdálené od sebe na šířku jednoho disku. Schaedler agar kultivujeme v anaerobní atmosféře 5 dní. Schaedler agar uzavřeme do gaspacku AnaeroGen Compact – Atmosphere. Generation systém pro vytvoření anaerobní atmosféry (např. od firmy Oxoid) a spolu s krevním agarem, který kultivujeme aerobně, uložíme do termostatu při 35 °C-37 °C. Antibiotické disky slouží k potlačení doprovodné mikroflóry. *Clostridium difficile* roste v zóně inhibice. Kultivaci opakujeme tak dlouho, dokud nemáme čistou kulturu, kterou si vždy ověříme mikroskopicky. Mikroskopické preparáty barvíme dle Grama a lékař je prohlíží při 1000x násobném zvětšení s imerzí.

V případě vykultivování *Clostridium difficile* uděláme suspenzi ve fyziologickém roztoku (1 ml) a opět provedeme průkaz toxinů.

Od dubna 2015 jsme začali používat selektivní půdu ke kultivaci *Clostridium difficile* od firmy Oxoid, s obchodním názvem Brazier´s *Clostridium difficile* Selective Agar. *Clostridium difficile* na tomto agaru roste v neprůhledných šedobílých koloniích.

K identifikaci anaerobních mikroorganismů používáme API 20 A. Souprava API 20 A je systém pro snadnou identifikaci anaerobních bakterií. Strip se skládá z mikrozkumavek obsahujících dehydratované substráty, které se po naočkování

bakteriálních suspenzí rekonstituují. Během inkubace dochází ke změnám v zabarvení buď spontánnímu, nebo vyvolanému přidáním reagentu. Reakce se vyhodnotí pomocí PC programu.

Souprava obsahuje:

- 25 API 20 A stripů (každý pro identifikaci 1 kmene)
- 25 ampulí API A Medium
- 25 inkubačních boxů
- 25 výsledkových tabulek
- příbalový leták

### 2.4.2 Pracovní postup API 20 A

Otevřeme ampuli API 20 A Medium, sterilní pipetou přeneseme medium do zkumavky, přidáme bakteriální suspenzi. Konečná hodnota bakteriální suspenze musí být 3 jednotky McFarlandovy stupnice. Hustotu kontrolujeme pomocí denzitometru a dobře homogenizujeme pomocí vortexu. Při homogenizaci se snažíme zabránit přístupu vzduchu – pro zachování anaerobních podmínek.

Připravíme si inkubační box, strip a víčko. Do boxu přidáme 5 ml destilované vody pro vytvoření vlhkého prostředí. Všechny zkumavky naočkujeme bakteriální suspenzí v API 20 A Medium automatickou pipetou tak, aby nevznikly bubliny. Kopule všech testů překryjeme parafinovým olejem. Inkubační box uzavřeme víčkem a inkubujeme 24-48 hodin v termostatu při 36-38 °C.

Po inkubaci odečítáme strip pomocí Odečítací tabulky, která je součástí příbalového letáku od výrobce. Hodnocení testu provádí lékař. Do výsledkové tabulky zaznamenáváme všechny reakce. K hodnocení můžeme využít počítačový program dostupný z www.apiweb.cz (Pracovní postup č. 120).

# 3 Výsledky

V naší nemocnici byla stolice na průkaz *Clostridium difficile* testována pouze jednokrokovou metodou na průkaz toxinu A a toxinu B. Od září 2014 se přešlo na testování dvoukrokovou metodou, která slouží k průkazu enzymu glutamátdehydrogenázy a toxinu A/B. Jako konfirmační metoda v případě pozitivity GDH a negativního toxinu A/B se u nás používá anaerobní kultivace cílená na *Clostridium difficile* s následným průkazem toxinů.

V roce 2013 bylo vyšetřeno celkem 240 vzorků stolic na průkaz toxinů *Clostridium difficile*, z toho u 31 vzorků byla produkce toxinu prokázána, u 209 vzorků produkce toxinu nebyla prokázána. Celkový počet mužů byl 132 (55,0 %), počet žen byl 108 (45 %). Počet celkových vyšetření, počet pozitivních a negativních vzorků v jednotlivých měsících a zastoupení mužů a žen v roce 2013 uvádí tabulka č. 1.

Tab. 1: **Počet a výsledky vyšetření stolic na průkaz toxinu *C. difficile* za jednotlivé měsíce v roce 2013 v Nemocnici Písek, a.s.**

| 2013 | celkem | pozitivní | negativní | muž-celkem | muž-pozitivní | žena-celkem | žena-pozitivní |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| leden | 37 | 12 | 25 | 15 | 6 | 22 | 6 |
| únor | 17 | 1 | 16 | 11 | 1 | 6 | 0 |
| březen | 27 | 3 | 24 | 15 | 2 | 12 | 1 |
| duben | 16 | 1 | 15 | 9 | 1 | 7 | 0 |
| květen | 17 | 3 | 14 | 9 | 1 | 8 | 2 |
| červen | 20 | 0 | 20 | 11 | 0 | 9 | 0 |
| červenec | 15 | 0 | 15 | 9 | 0 | 6 | 0 |
| srpen | 14 | 1 | 13 | 8 | 0 | 6 | 1 |
| září | 20 | 2 | 18 | 7 | 0 | 13 | 2 |
| říjen | 16 | 1 | 15 | 8 | 1 | 8 | 0 |
| listopad | 25 | 5 | 20 | 18 | 5 | 7 | 0 |
| prosinec | 16 | 2 | 14 | 12 | 2 | 4 | 0 |
| celkem | 240 | 31 | 209 | 132 | 19 | 108 | 12 |

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků stolic na průkaz toxinů *Clostridium difficile,* z toho u 26 vzorků byla produkce toxinu prokázána, u 169 vzorků produkce toxinu prokázána nebyla. Celkový počet mužů byl 75 (38,5 %), počet žen byl 120 (61,5 %). Počet celkových vyšetření, počet pozitivních a negativních vzorků v jednotlivých měsících a zastoupení mužů a žen v roce 2014 uvádí tabulka č. 2.

Tab. 2: **Počet a výsledky vyšetření stolic na průkaz toxinu *C. difficile* za jednotlivé měsíce v roce 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**

| 2014 | celkem | pozitivní | negativní | muž-celkem | muž-pozitivní | žena-celkem | žena-pozitivní |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| leden | 37 | 11 | 26 | 21 | 8 | 16 | 3 |
| únor | 33 | 4 | 29 | 8 | 1 | 25 | 3 |
| březen | 13 | 4 | 9 | 3 | 1 | 10 | 3 |
| duben | 11 | 0 | 11 | 2 | 0 | 9 | 0 |
| květen | 12 | 0 | 12 | 3 | 0 | 9 | 0 |
| červen | 13 | 2 | 11 | 6 | 2 | 7 | 0 |
| červenec | 11 | 0 | 11 | 5 | 0 | 6 | 0 |
| srpen | 12 | 0 | 12 | 3 | 0 | 9 | 0 |
| září | 15 | 1 | 14 | 9 | 0 | 6 | 1 |
| říjen | 13 | 1 | 12 | 3 | 0 | 10 | 1 |
| listopad | 13 | 1 | 12 | 9 | 0 | 4 | 1 |
| prosinec | 12 | 2 | 10 | 3 | 0 | 9 | 2 |
| celkem | 195 | 26 | 169 | 75 | 12 | 120 | 14 |

V roce 2013 bylo celkem vyšetřeno 240 vzorků, z toho 209 pozitivních, což je 87,1 %, 31 vzorků bylo negativních, což je 12,9 %.

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků, z toho 169 negativních, což je 86,7 %, 26 pozitivních, což je 13,3 %. Porovnání pozitivních a negativních vzorků ukazuje tabulka č. 3.

Tab. 3: **Porovnání pozitivních a negativních vzorků stolic vyšetřených na průkaz toxinu *C. difficile* v letech 2013 a 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**

| Rok | Toxin | | Celkem |
|---|---|---|---|
| | negativní | pozitivní | |
| 2013 | 209 | 31 | 240 |
| 2014 | 169 | 26 | 195 |
| Celkem | 378 | 57 | 435 |
| 2013 | 87,1% | 12,9% | 100,0% |
| 2014 | 86,7% | 13,3% | 100,0% |

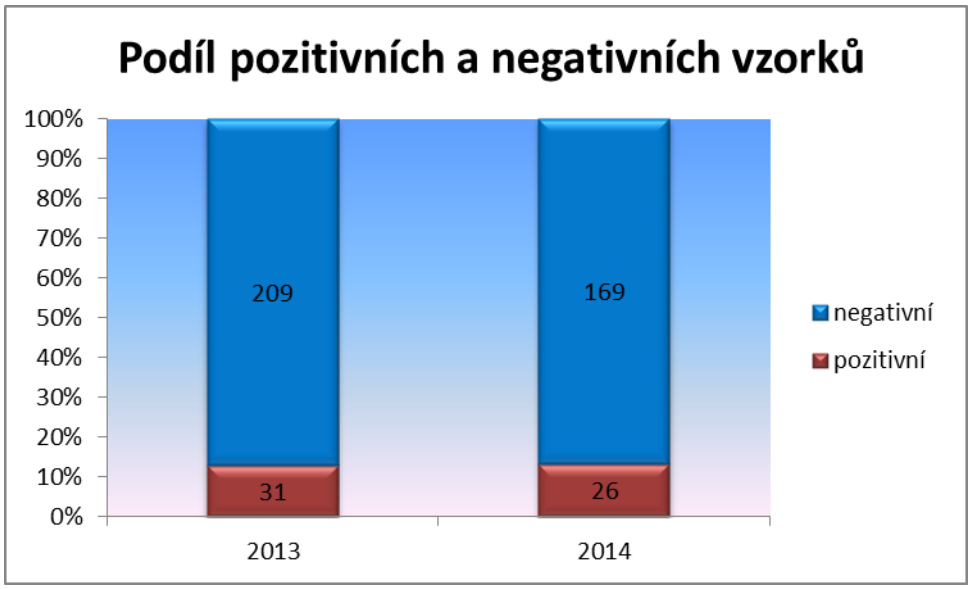
Chí kvadrát test

Dosažená hladina významnosti 89,8 %

P > 5 % znamená, že rozdíl je statisticky bezvýznamný.

Podíl pozitivních a negativních vzorků v roce 2013 a 2014 zobrazuje graf č. 2.

Graf 2: **Podíl pozitivních a negativních vzorků stolic vyšetřených na průkaz toxinu *C. difficile* v letech 2013 a 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**



Věkový průměr pacientů v roce 2014 byl 67,5 let, s minimem 4 a maximem 94 let. Věkový medián činil 73 let.

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků, z toho od pacientů nad 65 let bylo 122 vzorků (62,6 %), vzorků od pacientů pod 65 let bylo 73 (37,4 %). Celkový počet, počet prokázaných a neprokázaných vzorků u pacientů pod a nad 65 let uvádí tabulka č. 4.

Tab. 4: **Porovnání pozitivních a negativních vzorků stolic vyšetřených na průkaz toxinu *C. difficile* u pacientů nad a pod 65 let za rok 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**

| 2014 | Toxin | | |
|---|---|---|---|
| Věk | negativní | pozitivní | Celkem |
| pod 65 | 65 | 8 | 73 |
| nad 65 | 104 | 18 | 122 |
| Celkem | 169 | 26 | 195 |
| pod 65 | 89,0% | 11,0% | 100,0% |
| nad 65 | 85,2% | 14,8% | 100,0% |

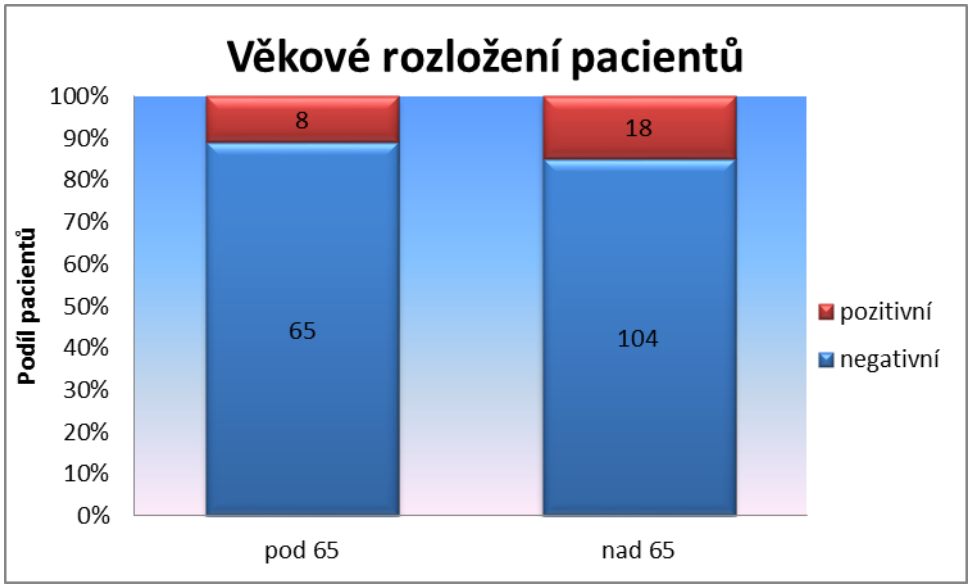
Chí kvadrát test

Dosažená hladina významnosti 45,1 %

P > 5 %, znamená, že výskyt CDI se u srovnávaných věkových skupin neliší.

Věkové rozložení pacientů nad a pod 65 let se zastoupením pozitivních a negativních výsledků v obou věkových skupinách zobrazuje graf č. 3.

Graf 3: **Věkové rozložení pacientů vyšetřených na průkaz toxinu *C. difficile* za rok 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**




Z celkového počtu 240 vzorků v roce 2013, bylo 132 (55 %) vzorků od mužů a 108 (45 %) vzorků od žen. Z celkového počtu 195 vzorků v roce 2014 bylo 75 (38,5 %) vzorků od mužů a 120 (61,5 %) vzorků od žen. Celkový přehled zastoupení pohlaví s negativními a pozitivními výsledky uvádí tabulka č. 5.

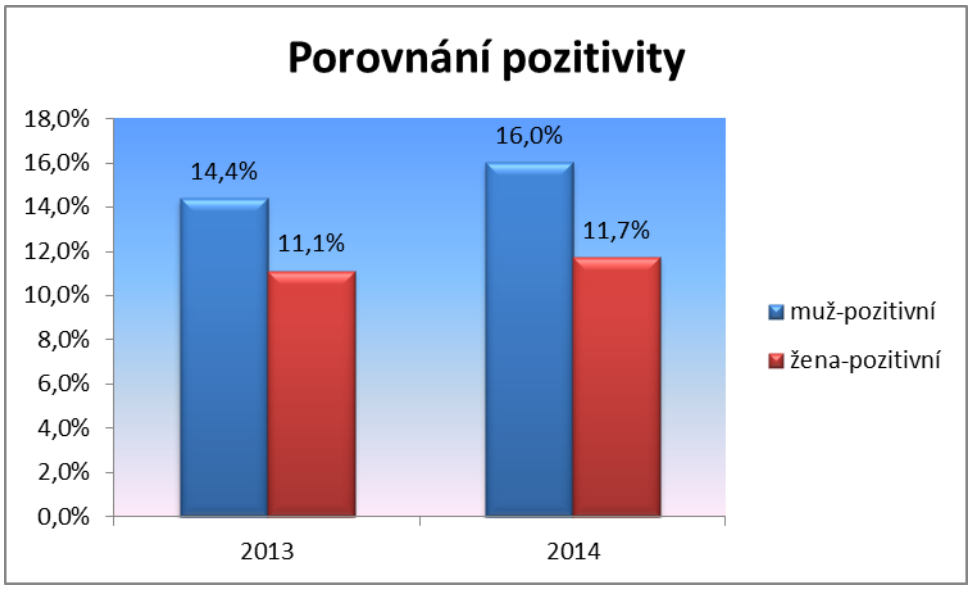
Tab. 5: **Zastoupení mužů a žen vyšetřených na průkaz toxinu *C. difficile* v letech 2013 a 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**

| | celkem | pozitivní | negativní | muž-celkem | muž-pozitivní | žena-celkem | žena-pozitivní |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2013 | 240 | 31 | 209 | 132 | 19 | 108 | 12 |
| 2014 | 195 | 26 | 169 | 75 | 12 | 120 | 14 |

V grafu č. 4 jsou přepočteny výsledky pozitivních mužů a žen za rok 2013 a 2014 v %. V roce 2013 bylo celkem od mužů vyšetřeno 132 vzorků a z toho bylo pozitivních 19, což představuje 14,4 %. Vzorků od žen bylo celkem 108 a z toho bylo pozitivních

12, což je 11,1 %. V roce 2014 bylo celkem od mužů vyšetřeno 75 vzorků a z toho bylo pozitivních 12, což je 16,0 %. Vzorků od žen bylo celkem 120 a z toho bylo pozitivních 14, což je 11,7 %.

Graf 4: **Procentuální porovnání pozitivních vzorků stolic u mužů a žen vyšetřených na průkaz toxinu *C. difficile* v letech 2013 a 2014 v Nemocnici Písek, a.s.**



# 4 Diskuse

Infekce vyvolané *Clostridium difficile* patří mezi velmi aktuální témata, nejen kvůli tomu, že patří mezi infekce spojené se zdravotní péčí a v nemocnici se mohou velmi rychle rozšířit, ale hlavně z důvodů fatálních následků, které mohou u některých pacientů vyvolat. Aktuálnost zvyšuje i fakt, že nemoc může propuknout už v průběhu léčby antibiotiky nebo po skončení léčby a ukončení pobytu v nemocnici, kdy už je pacient doma a mohl by nakazit další vnímavé jedince. Na odděleních, kde je pacient s prokázanou produkcí toxinu A nebo B nebo obou, jsou nařízena bariérová opatření, která sice vedou ke snížení rizika rozšíření infekce, ale úplně riziko odstranit nedovedou. Bariérová opatření samotný personál velmi omezují a stěžují práci. I proto je velmi důležitý včasný záchyt CDI a lokalizace infekce, aby se na jiná oddělení nerozšířila.

Prevence a kontrola CDI je založena na dvou hlavních principech, jedním je zabránění vzniku onemocnění a druhým je omezení šíření infekce. Vznik onemocnění je spjat s léčbou antibiotiky, proto uvážlivé podávání antibiotik může vést ke snížení výskytu CDI, stejně jako přísné dodržování protiepidemických opatření.

Dle současných doporučení je vhodné vyšetřovat stolici kombinací dvou a více testů, aby se získal co nejspolehlivější výsledek (Beneš et al., 2014a).

V naší nemocnici byla stolice na průkaz *Clostridium difficile* testována pouze jednokrokovou metodou na průkaz toxinu A a toxinu B. Od září 2014 se přešlo na testování dvoukrokovou metodou, která slouží k průkazu enzymu glutamátdehydrogenázy a toxinu A/B. Jako konfirmační metoda v případě pozitivity GDH a toxin A/B negativní se u nás používá anaerobní kultivace cílená na *Clostridium difficile* s následným průkazem produkce toxinu. Myslím si, že tento způsob testování stolice na průkaz *Clostridium difficile* je dostatečný na rutinní okresní laboratoř. Můj závěr potvrzují i doporučené postupy laboratorní diagnostiky (Beneš et al., 2014a). Průkaz enzymu glutamátdehydrogenázy slouží k vyřazení CDI negativních vzorků, je tedy pro vyšetření velmi důležitý. Vždy je nutno posuzovat výsledky s přihlédnutím ke klinickému stavu pacienta. Nakažlivost je vázána na výskyt průjmů.

Jako další metodu, která by byla vhodná i jako konfirmační metoda, bych navrhovala PCR vyšetření k průkazu genu kódujícího syntézu toxinu B a případně i toxinu A. Výhodou je vysoká citlivost uváděná 99-100% (Beneš et al., 2014a). A také fakt, že výsledek je za cca 40 minut oproti kultivaci, která trvá nejméně 72 hodin a může být prodloužena až na 96 hodin. Ovšem tato metoda se zatím v Nemocnici Písek, a.s. neprovádí.

Kontrola shody žádanek s popisem materiálu je v laboratoři OKM Nemocnice Písek, a.s. samozřejmostí, bez které by nebylo možno validovat výsledky.

U každé nové šarže soupravy se provádí pozitivní a negativní kontrola. Pracovní postup byl dodržován, vždy musela vyjít procedurální kontrola, zeleně zbarvený proužek, který byl důkazem, že bylo použito vhodné množství vzorku a že test je funkční. Zásoba souprav pro testování klostridiové glutamátdehydrogenázy a toxinu A a toxinu B je v OKM Nemocnice Písek, a.s. udržována o 2-3 soupravách s dlouhou dobou expirace, proto nehrozí, že by byl použit pro vyšetření proexpirovaný test. Přesto se expirace sleduje, stejně jako teplota v lednicích, kde jsou soupravy uchovány. O teplotách je veden řádný záznam. Zde jsem neshledala žádné nedostatky.

Jediný nedostatek, který by mohl nastat a který nejsem schopna kontrolovat, je v preanalytické fázi. Zde je ovšem důležité si uvědomit, že výsledek se má vždy posuzovat s klinickým stavem pacienta.

V České republice je od roku 2008 hlášen zvýšený výskyt CDI (Pokorná, 2015). Kolitida či enterokolitida způsobená bakterií *Clostridium difficile* je onemocnění s trvale narůstající incidencí. Počet hlášených případů v ČR v roce 2014 přesáhl 4 000 (Beneš, 2015). Proto si myslím, že je vhodné sledovat, jestli se zvýšil záchyt CDI s nástupem laboratorní metody rozšířené o průkaz GDH. V Nemocnici Písek, a.s. bylo v roce 2013 celkem vyšetřeno 240 vzorků, z toho bylo 31 vzorků pozitivních, což představuje 12,9 %. V roce 2014 bylo vyšetřeno 195 vzorků, z toho bylo 26 vzorků pozitivních, což představuje 13,3 %. Dosažená hladina významnosti je 89,9%. Jelikož hladina významnosti je $> 5$ %, je rozdíl v záchytu *Clostridium difficile* v uvedených letech statisticky bezvýznamný. Z tohoto výpočtu jsem došla k závěru, že k zvýšení záchytu *Clostridium difficile* v Nemocnici Písek, a.s. v roce 2014 oproti roku 2013

nedošlo. Na tento výsledek může mít vliv používání dvoukrokové metody po velmi krátkou dobu i malý objem vzorků. A také skutečnost, že porovnávám dva soubory, z nichž první byl testován jednokrokovou metodou 12 měsíců a druhý jednokrokovou metodou 8 měsíců a dvoukrokovou pouze 4 měsíce.

Počet přijatých vzorků v roce 2014 byl oproti roku 2013 nižší a to o 45 vzorků. Počet pozitivních vzorků v roce 2013 byl 31 a v roce 2014 byl také nižší a to 26. I když se v literatuře uvádí, že se výskyt CDI v České republice zvyšuje, v Nemocnici Písek, a.s. k tomuto navýšení v roce 2014 nedošlo. Hlavním důvodem může být fakt, že Nemocnice Písek, a.s. je menší, okresní nemocnice, proto pacienti s rozsáhlejšími a složitějšími operacemi a tedy i s delší dobou pobytu v nemocnici a možnými komplikacemi zde nejsou operováni. A s tím souvisí i léčba širokospektrálními antibiotiky, která není většinou u méně náročnějších onemocnění a operací zapotřebí. Přesto si myslím, že 31 pozitivních vzorků v roce 2013 a 26 pozitivních vzorků v roce 2014 je opravdu hodně a zaslouží si pozornost nejen mikrologů či kliniků, ale i laiků, kteří někdy zbytečně vyžadují předepisování antibiotik na banální onemocnění a neuvědomují si, že v případě opravdové potřeby nemusí již antibiotika správně a dostatečně účinkovat. Za velmi důležité považuji neustále o tomto problému vzdělávat zdravotnický personál a poučit i veřejnost, protože i ta může přispívat k významnému šíření této závažné nákazy.

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků. Z toho počtu bylo 73 vzorků od pacientů pod 65 let a 122 vzorků od pacientů nad 65 let. U pacientů pod 65 let bylo 65 (89,0 %) vzorků negativních a 8 (11,0 %) vzorků pozitivních. U pacientů nad 65 let bylo 104 (85,2 %) vzorků negativních a 18 (14,8 %) vzorků pozitivních. Dosažená hladina významnosti je 45,1 %. Jelikož je hladina významnosti > 5 %, je statisticky bezvýznamná a znamená to, že výskyt CDI se u srovnávaných věkových skupin neliší. V tomto výsledku se rozcházím s literaturou, kde se uvádí, že incidence a závažnost nemoci podstatně narůstá od věku ≥ 65 let (Beneš et al., 2014b, s. 58). Z tohoto výpočtu vyplývá, že pacienti v mém souboru nad 65 let nejsou k danému onemocnění vnímavější. Tento údaj vnímám jako negativní, může to znamenat, že onemocnění

postihuje i mladší pacienty, kteří by měli být obecně vůči infekcím odolnější a snadněji zvládat případné komplikace své léčby.

Můj soubor vzorků byl malý a pro výzkumné účely by bylo zapotřebí vyšetřit mnohem více vzorků. To také může být jeden z důvodů, proč se rozchází mé výsledky s literaturou. Pro výzkumné účely by bylo vhodné výzkum rozšířit do více let nebo výzkum provádět ve větší nemocnici, kde se zpracovává více materiálu.

V souboru jsem si všímala i zastoupení pohlaví. V literatuře jsem nenašla údaj o vlivu pohlaví k vnímání k této infekci a i podle mých výsledků usuzuji, že pohlaví nemá na vnímání k této infekci významný vliv. V roce 2013 bylo vyšetřeno 240 vzorků, z toho od mužů 132 a od žen 108. Pozitivních vzorků od mužů bylo 19 a od žen 12. Přepočteno na procenta bylo pozitivních vzorků od mužů 14,4 % a od žen 11,1 %. Dle mého názoru je rozdíl minimální, rozhodně není zásadní a tak je to i v roce 2014, kdy bylo vyšetřeno celkem 195 vzorků, z toho od mužů bylo vyšetřeno 75 a od žen 120. Pozitivních vzorků od mužů bylo 12 a od žen 14. Přepočteno na procenta bylo pozitivních vzorků od mužů 16,0 % a od žen 11,7 %. Ani tento rozdíl se mi nezdá zásadní. Podle mého úsudku, s přihlédnutím k mým výsledkům, pohlaví na vnímání k infekci nemá vliv.

# 5 Závěr

Závěrem mohu konstatovat, že metodu jsem si řádně vyzkoušela, získala ve zpracování stolice na vyšetření enzymu klostridiové glutamátdehydrogenázy a toxinů praxi. Prošla jsem si celý laboratorní proces, od příjmu vzorku, zkontrolování žádanky a přijatého materiálu, označení materiálu, zapsání žádanky do LIS a následného zpracování. Po ukončení analytické fáze jsem výsledek zapsala do LIS a nahlásila na oddělení, které vyšetření požadovalo. V celém procesu jsem kontrolovala dodržování pracovního postupu a uchování vzorků a testů. Zde jsem neshledala žádné nedostatky. Uvítala jsem možnost konzultace s lékaři OKM.

Laboratorní diagnostika CDI v Nemocnici Písek, a.s. je dostatečná. Jako pozitivní vnímám fakt, že oddělení klinické mikrobiologie přešlo od jednokrokové metody k dvoukrokové metodě, kde se stanovuje i klostridiová glutamátdehydrogenáza. Imunochromatografický test je jednoduchý, rychlý, levný a při dodržení pracovního postupu je výpovědní hodnota vysoká. Další velkou a nespornou výhodou je technická nenáročnost, tedy žádné drahé analyzátory, složité kalibrace nebo následné drahé servisy. Výsledek je pouze kvalitativní, což je v tomto případě dostatečné, informuje nás o přítomnosti *Clostridium difficile* a hlavně, jestli je kmen toxigenní nebo ne, což je pro pacienta i ošetřující personál ta nejpodstatnější informace. V případě pozitivní klostridiové glutamátdehydrogenázy nebo GDH a toxinu či toxinů je založena anaerobní kultivace cílená na *Clostridium difficile*. Velmi zajímavou metodou by byla ribotypizace, tato metoda ale přísluší pouze některým pracovištím.

I když jsem zvýšení záchytu CDI v roce 2014 oproti roku 2013 v Nemocnici Písek, a.s. nepotvrdila, myslím si, že přechod od jednokrokové metody na dvoukrokovou metodu je velmi důležitý, hlavně pro vyřazení *Clostridium difficile* negativních vzorků.

K nárůstu výskytu CDI v roce 2014 oproti roku 2013 v Nemocnici Písek, a.s. nedošlo. V roce 2013 bylo vyšetřeno 240 vzorků, z toho bylo 31 pozitivních, v roce 2014 bylo vyšetřeno 195 vzorků, z toho 26 pozitivních. Tento trend by byl opravdu velmi pozitivní zprávou. Samozřejmě za tím může být uvědomění si lékařů, že u

každého průjmu není původcem *Clostridium difficile* a stolici na dané vyšetření neposílají nebo také lepší rozvaha při předepisování antibiotik. Přesto si myslím, že počet 26 prokázaných vzorků na produkci toxinu *C. difficile* v okresní nemocnici představuje vysoké číslo.

V mém souboru pacienti nad 65 let nebyli vnímavější k CDI. Tento výsledek je nejspíše ovlivněn velmi malým souborem použitým pro účely mé práce. Pro další analýzu bych navrhovala provést rozsáhlejší studii v průběhu více let nebo v jiné, větší nemocnici, kde se vyšetřuje více vzorků.

Nezaznamenala jsem výraznější vliv pohlaví na vnímání k infekci. V literatuře jsem informaci o vlivu pohlaví na vnímání k CDI nenašla, nejspíš tedy není rizikovým faktorem.

# 6 Seznam informačních zdrojů


Anon, 2012. *Klinicky významné bakterie*. 1. vyd. Praha: Triton, s. 37-40. ISBN 978-80-7387-588-6

ARUMILLI, B. R. B., P. KONERU a I. FAYYAZ, 2010. *Toxic megacolon from hypervirulent Clostridium difficile infection (ribotype 027) following elective total knee replacement: an emerging challenge in modern health care*. *Case Reports* [online]. 2010, vol. 2010, feb02 1, bcr0620092017-bcr0620092017 [cit. 2015-03-09]. DOI: 10.1136/bcr.06.2009.2017.

BARDOŇ, J., I. VÁGNEROVÁ a M. KOLÁŘ, 2012. *K problematice animálních zdrojů Clostridium difficile*. Klin mikrobiol inf lék., 18(1): 9-10.

BAREKOVÁ, L., E. ZÁLABSKÁ a I. HANOVCOVÁ , 2013. *Zkušenosti s laboratorní diagnostikou Clostridium difficile.* Klin Mikrobiol Inf Lek 2013;19(3):91-95.

BEDNÁŘ, Marek et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie.* Vyd. 1. Praha: Marvil, s. 60, 162-164, 230, 233. ISBN 80-238-0297-6.

BENEŠ, Jiří et al. 2009. *Postantibiotická kolitida vyvolaná Clostridium difficile*. Nozokomiální nákazy. 2009; 8(4):4-18.

BENEŠ, Jiří et al. 2014a: *Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané Clostridium difficile.* Infekce. Červen 2014 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://www.infekce.cz/dpCDI14.htm

BENEŠ, Jiří et al. 2014b: *Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané Clostridium difficile.* Klin mikrobiol inf lék. 2014, 20(2): 56-66.

BENEŠ, Jiří, 2015. *Pozvánka na Klostridiový den 2015*. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z : http://www.infekce.cz/Programy/Klostridiovy-den-2015.pdf

BENEŠOVÁ, Vilma, 2015. *CDI z pohledu nemocničního epidemiologa*. Klostridiový den 2015, Státní zdravotní ústav, Praha 11. 4. 2015

CAREY, R. B., M. G. SCHUSTER a K. L. MCGOWAN, 2011. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech.* Vyd. 1. Praha: Triton, s. 48. ISBN 978-80-7387-480-3.

ČERNÝ, Zdeněk a kol., 2008. *Infekční nemoci: jak pečovat o pacienty s infekčním onemocněním.* Vyd. 2., přeprac. a rozš. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, s. 38. ISBN 978-80-7013-480-1.

DOSTÁL, Václav a kol., 2005. *Infektologie.* 1. vyd. V Praze: Karolinum. s. 213-214. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0749-2.

GREENWOOD, D., R. C. SLACK a J. F. PEUTHERER, 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie.* Vyd. 1. Praha: Grada, s. 69 -76, 245-254. [2] s. obr. příl. ISBN 80-7169-365-0.

HAVLÍK, Jiří et al., ©2002. *Infekční nemoci*. 2., rozš. vyd. Praha: Galén, s. 37,78. ISBN 80-7262-173-4.

HUSA P., J. BENEŠ a O. NYČ, 2013. *Klostridiová kolitida – stále narůstající nebezpečí*. Interní Med. 2013; 15 (6-7):201-204

CHARVÁT, David, 2013. *Alternativní antibiotická léčba recidivující těžké kolitidy vyvolané bakterií Clostridium difficile*. Anttinfectives News. 2013; 4 (1):8-9.

JANSEN, Andreas et al., 2010. *Clostridium-difficile-Ribotyp 027: Epidemiologie und Klinik des erstmaligen endemischen Auftretens in Deutschland*. Zeitschrift für Gastroenterologie [online], vol. 48, issue 09, s. 1120-1125 [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.1055/s-0029-1245269.

JINDRÁK, Vlastimil a kol., 2014. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici.* 1. vyd. Praha: Mladá fronta, s. 137-138, 147, 149-150. Aeskulap. ISBN 978-80-204-2815-8.

KLABAN, Vladimír, ©2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén, xv, s. 112. ISBN 80-7262-341-9.

KLABAN, Vladimír, ©2011. *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů.* 1. vyd. Praha: Galén, ix, s. 101-102. ISBN 978-80-7262-770-7.

KOHOUT, Pavel, 2015. *Technické provedení transplantace*. Klostridiový den 2015, Státní zdravotní ústav, Praha 11. 4. 2015

KOHOUT Pavel a Jiří VEJMELKA, 2014. *Fekální bakterioterapie v léčbě recidivující klostridiové enterokolitidy*. Postgrad Med 2014; 16(7):729-734.

KRAMÁŘ, Radim, 2007. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zdravotně sociální fakulta, s. 44-46. ISBN 978-80-7394-021-8.

KRŮTOVÁ, Marcela, 2015. *Výskyt epidemicky významných ribotypů CD v ČR.* Klostridiový den 2015, Státní zdravotní ústav, Praha, 11. 4. 2015

KRŮTOVÁ Marcela a Otakar NYČ, 2014. *Co nového ve světě Clostridium difficile*. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie. 2014; 23(6):224-226.

KRŮTOVÁ Marcela et al., 2014. *A case of imported Clostridium difficile PCR-ribotype 027 infection within the Czech Republic which has a high prevalence of C. difficile ribotype 176.* Anaerobe. 2014 Dec;30:153–5.doi:10.1016/j.anaerobe.2014.09.020. Epub 2014 Oct 7.

KRŮTOVÁ M. a S. POLÍVKOVÁ, 2015. *Ribotypizace klinický významných izolátů Clostridium difficile*. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://www.infekce.cz/zprava14-27.htm

MALINOVÁ, Anna, 2012. *Výskyt a molekulární typizace kmenů Clostridium difficile v České republice*. Praha. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta, s. 29. Vedoucí diplomové práce Alena Jirásková.

NYČ, Otakar, 2015. *Laboratorní diagnostika CDI*. Klostridiový den 2015, Státní zdravotní ústav, Praha, 11. 4. 2015

OXOID, 2014. *Hotová kultivační média, katalog 2014*. ThermoFisher Scientific.s. 8.

POKORNÁ, Tereza. 2015. Osobní sdělení. Státní zdravotní ústav.

POLÁK P, FREIBERGEROVÁ M. a J. JURÁNKOVÁ, 2011. *První zkušenosti s fekální bakterioterapií v léčbě relabující pseudomembranózní kolitidy způsobené Clostridium difficile*. Klin Mikrobiol Inf Lek 2011;17(6):214-218.

POLÁK, P., HUSA P. a M. FREIBERGEROVÁ, 2014. *Kolitida způsobená Clostridium difficile, její příčiny a aktuální možnosti léčby v širších souvislostech*. Interní Med. 2014; 16(6): 241-243.

POLÍVKOVÁ, Sylvia, 2015. *Vyšetření dárce stolice*. Klostridiový den 2015, Státní zdravotní ústav, Praha 11. 4. 2015

Pracovní postup č. 120. *Kultivace anaerobních mikroorganismů.* Nemocnice Písek, a.s. Oddělení klinické mikrobiologie.

PRŮŠA, Richard et al., ©2012. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe. s. C6.11/3. ISBN 978-80-87553-68-8.

Příbalová informace: CoproStrip *Clostridium difficile*. Savyon Diagnostics Ltd. Israel. 2014.

REESE, Richard, E. a Robert, F., BETTS, ed., 1996. *A practical approach to infectious diseases.* 4th ed. Boston: Little, Brown and Company. xviii, s. 1086, 1158. ISBN 0-316-73721-6.

SCHARFEN, Josef, 2013. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii.* 1. vyd. Praha: Nucleus HK. s. 154-156. Mikrobiologie. ISBN 978-80-87009-32-1.

SOPV-MIKRO-009. Standardní operační postup. *Stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám kvantitativní.* Nemocnice Písek, a.s. Oddělení klinické mikrobiologie.

SOPV-MIKRO-053. Standardní operační postup. *Průkaz toxinu Clostridium difficile metodou imunochromatografickou*. Nemocnice Písek, a.s. Oddělení klinické mikrobiologie.

ŠRÁMOVÁ, Helena a kol., ©2013. *Nozokomiální nákazy.* 3. vyd. Praha: Maxdorf. s. 41. Jessenius. ISBN 978-80-7345-286-5.

VEJMELKA, Jiří et al., 2014. *Fekální bakterioterapie a nové cesty v léčbě klostridiové střevní infekce.* Prakt Lék 2014; 94(4):195-200.

VOJTILOVÁ, Lenka et al., 2011. *Analýza souboru pacientů s onemocněním vyvolaným toxinem Clostridium difficile hospitalizovaných na Klinice infekčních chorob v Brně v letech 2007 -2010*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2011;17(6):208 -213.

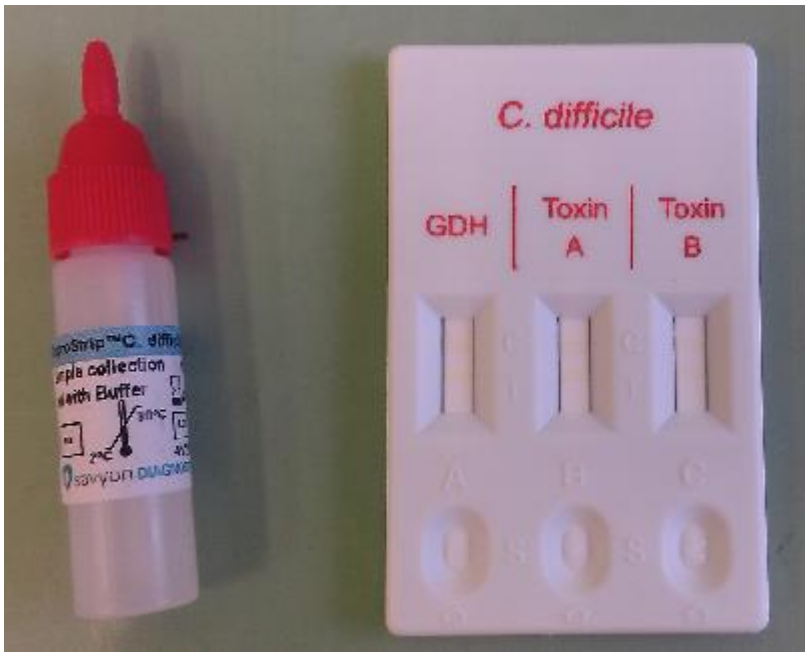
VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-86850-00-5.

VOTAVA, Miroslav a kol., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, xxii, s. 146, 150-151. ISBN 80-902896-6-5.

VOTAVA, Miroslav a kol., ©2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, s. 111, 116, 333. ISBN 978-80-86850-04-7

# 7 Příloha

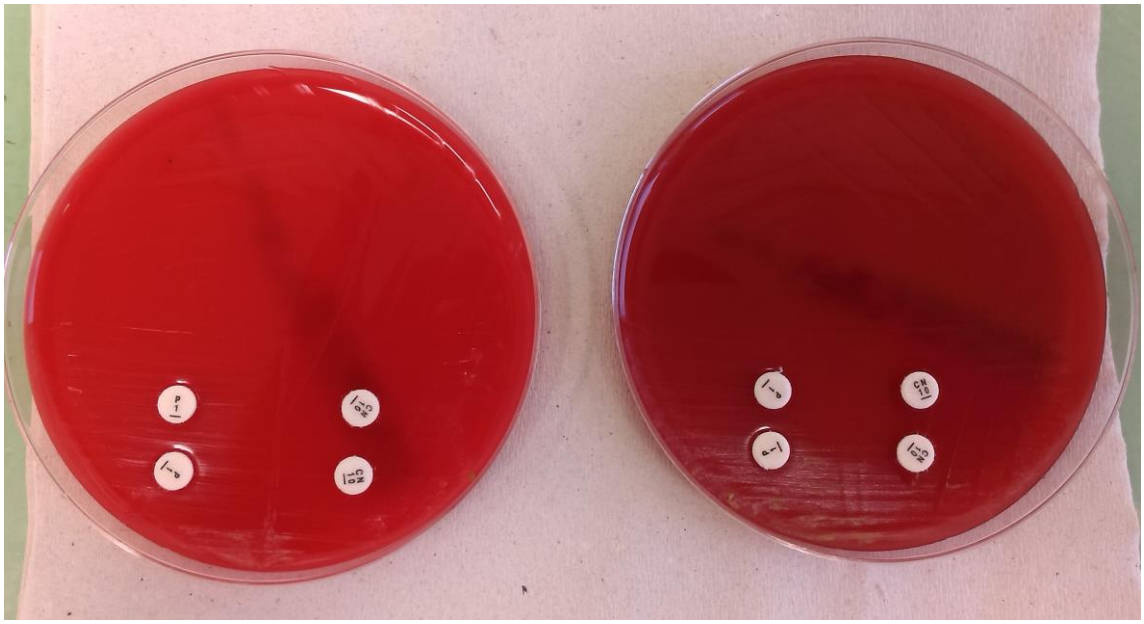
Obrázek 1: Souprava CoproStrip™ *Cl. difficile* GDH + Tox A + Tox B (foto autorka).



Obrázek 2: Imunochromatografický test (foto autorka).

Obrázek 3: Schaedler agar a krevní agar (foto autorka).

Obrázek 4: Naočkovaný Schaedler agar a krevní agar s položenými antibiotickými disky (foto autorka).

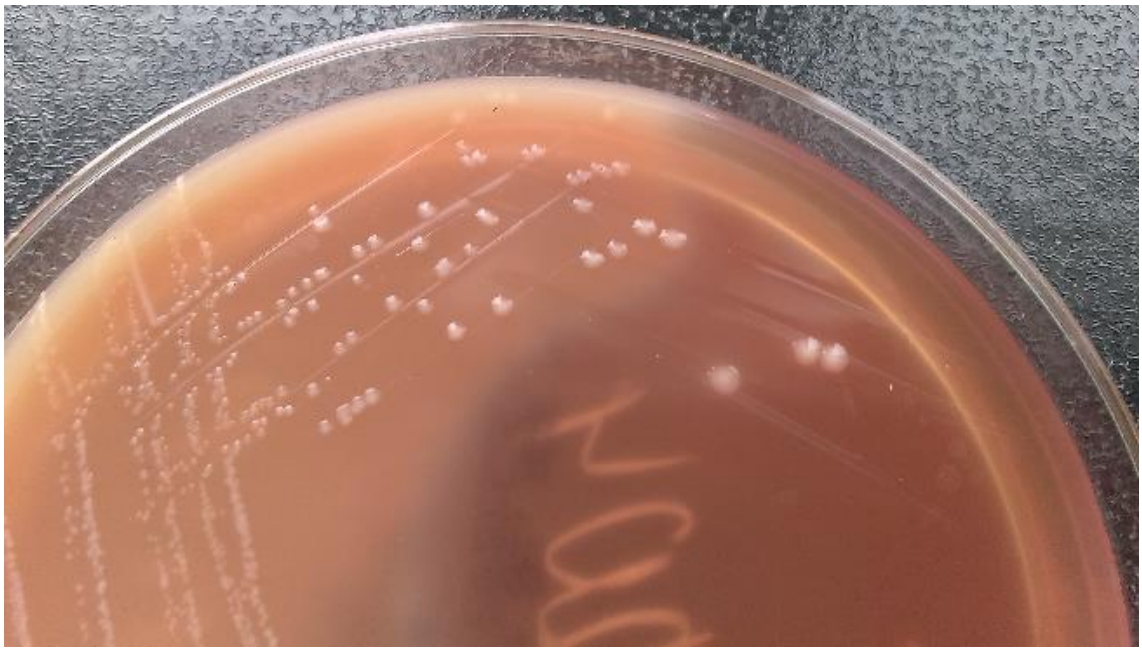


Obrázek 5: Anaerobní kultivace za použití gaspacku AnaeroGen Compact – Atmosphere a krevní agar sloužící jako kontrola (foto autorka).

Obrázek 6: Selektivní půda ke kultivaci *Clostridium difficile* od firmy Oxoid, s obchodním názvem Brazier´s *Clostridium difficile* Selective Agar (foto autorka).

Obrázek 7: Kolonie *Clostridium difficile* (foto autorka).

Obrázek 8: Kolonie *Clostridium difficile* (foto autorka).



Obrázek 9: Souprava API 20 A (foto autorka).