

Anna Schneider<sup>1</sup>, Anna Mól<sup>1</sup>, Katarzyna Lisowska<sup>1</sup>, Maria Jax-Dambek<sup>2</sup>,  
Dominika Lachowicz<sup>3</sup>, Piotr Obuch-Woszczatyński<sup>3</sup>, Hanna Pituch<sup>3</sup>

## ZASTOSOWANIE TRÓJSTOPNIOWEGO ALGORYTMU W DIAGNOSTYCE PACJENTÓW Z PODEJRZENIEM BIEGUNKI POANTYBIOTYKOWEJ O ETIOLOGII *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

<sup>1</sup>Laboratorium Mikrobiologii, <sup>2</sup>Sekcja ds. Kontroli Zakażeń Szpitalnych  
Szpital Kliniczny im. Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu  
<sup>3</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie

### STRESZCZENIE

*Clostridium difficile* jest wiodącym czynnikiem szpitalnych biegunek zakaźnych. W wielu ośrodkach w Polsce rutynowa diagnostyka zakażeń *Clostridium difficile* opiera się nadal na testach immunoenzymatycznych do wykrywania toksyn A/B w kale. W ostatnich latach pojawiły się nowe testy diagnostyczne, których zastosowanie przyspiesza i zwiększa czułość wykrywania toksynotwórczych szczepów *C. difficile*, co jest szczególnie ważne wobec pojawienia się szczepów hiperepidemicznych.

**CEL PRACY.** Ocena przydatności trójstopniowego algorytmu w diagnostyce chorób związanych z *Clostridium difficile* (CZCD) ze względu na obserwowane w praktyce diagnostycznej przypadki uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych przy zastosowaniu jedynie testów immunoenzymatycznych do wykrywania toksyn.

**MATERIAŁ I METODY.** Materiał stanowiły próbki kału otrzymane od pacjentów z objawami biegunki. W diagnostyce zakażeń zastosowano testy immunoenzymatyczne wykrywające dehydrogenazę glutaminianową (GDH) i toksyny A/B, a także metodę hodowlaną i testy RT-PCR.

**WYNIKI.** W rutynowej diagnostyce wśród przebadanych 615 pacjentów u 108 chorych wykryto szczep toksynotwórczy GDH (+) TOX (+), a u 67 otrzymano wynik nieokreślony GDH (+) TOX (-). Próby z wynikiem nieokreślonym poddano dalszej analizie, która pozwoliła dodatkowo wykryć u 32 pacjentów szczep toksynotwórczy, co stanowiło 22,9 % wszystkich dodatnich próbek (n=140).

**WNIOSKI.** Trójstopniowy algorytm zapewnia wiarygodną i dokładną diagnostykę chorób związanych z *C. difficile*.

**Słowa kluczowe:** zakażenie *Clostridium difficile*, trójstopniowy algorytm diagnostyczny zakażeń *C. difficile*, PCR - rybotypowanie

### WSTĘP

*Clostridium difficile* (CD) jest wiodącym czynnikiem etiologicznym szpitalnych biegunek zakaźnych na całym świecie. Do najważniejszych czynników ryzyka rozwoju zakażenia *C. difficile* zalicza się: antybiotykoterapię, długotrwałą hospitalizację oraz zaawansowany wiek pacjenta (powyżej 65 roku życia). Choroba może dotyczyć pacjentów we wszystkich grupach wiekowych (1,2). Jak wykazał Barlett i wsp. *C. difficile* odpowiada za 15-25% przypadków biegunki poantybiotykowej (AAD- *antibiotic-associated diarrhoea*) i praktycznie za wszystkie przypadki rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego (PMC, *pseudomembranous colitis*) (3).

W ostatnich latach zaobserwowano na całym świecie stałą tendencję wzrostową zakażeń *C. difficile*. W Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Europie odnotowano czterokrotny wzrost liczby zakażeń *C. difficile*, a także wzrost liczby przypadków o ciężkim przebiegu. Może to być związane z pojawieniem się nowych, epidemicznych szczepów *C. difficile* (4-8). Ocenia się, że 10-30% chorych, dorosłych pacjentów jest skolonizowana przez *C. difficile*. Jednak nie u wszystkich rozwija się biegunka (9).

Prawidłowa diagnostyka szpitalnych biegunek zakaźnych ma kluczowe znaczenie w identyfikacji pacjenta z zakażeniem *C. difficile*, wpływając tym samym na zmniejszenia ryzyka transmisji potencjalnie epidemicznych szczepów. Obecnie na rynku dostępne są szybkie i proste testy do wykrywania markerów

zakażenia toksynotwórczymi szczepami *C. difficile* bezpośrednio w próbkach kału. Testy te różnią się czułością, swoistością, czasem wykonania oraz kosztami ponoszonymi przez szpital (10-15).

Celem pracy była ocena przydatności trójstopniowego algorytmu w diagnostyce chorób spowodowanych zakażeniem *C. difficile* (CZCD). Przy stosowaniu w rutynowej diagnostyce jedynie testów wykrywających toksyny zdarzają się przypadki nie wykrycia zakażenia CD.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 615 próbek kału biegunkowego, które pobrano od dorosłych chorych, hospitalizowanych w Szpitalu Klinicznym im. *Przemienienia Pańskiego* Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w okresie od stycznia 2011 r. do końca lutego 2013 r. Pacjenci objęci badaniami byli leczeni na oddziałach: chirurgii naczyń i chirurgii onkologicznej, kardiologii i kardiochirurgii, intensywnej terapii, hematologii z pododdziałem transplantologii, pulmonologii, chemioterapii oraz na oddziale internistycznym i opieki paliatywnej. Analizę postępowania diagnostycznego z zastosowaniem trójstopniowego algorytmu diagnostycznego przeprowadzono badając niepowtarzalne próbki kału (liczba zbadanych próbek kału była równa liczbie pacjentów). Algorytm diagnostyczny przedstawiono na rycinie 1.

W diagnostyce laboratoryjnej zastosowano immunoenzymatyczne testy firmy TechLab (Blacksburg, USA, VA 24060) do wykrywania dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) czyli antygeny somatycznego *C. difficile* oraz toksyn A/B. W pierwszym etapie diagnostyki stosowano testy: C.DIFF CHEK60, C.DIFF CHEK TOX A/B (do końca XI 2012 roku). Od wprowadzenia przez producenta nowego, szybszego testu o większej czułości (XII 2012 roku) zastosowano testy: C.DIFF QUIK CHEK, C.DIFF QUIK TOX A/B, C.DIFF QUIK COMPLETE. W przypadku wyników nieokreślonych GDH (+), toksyny A/B (TOX A/B) (-) posiewano próbki kału na podłoża stałe i/lub wykonywano testy genetyczne z zastosowaniem testu (Xpert CD, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Do hodowli użyto podłoży firmy bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, Francja.

W pierwszym okresie (do I połowy 2012 roku) zastosowano pożywkę Columbia agar z 5% krwią baranią z mieszkanką antybiotyków: cykloseryną – 100 mg/L, cefoksytyną - 8 mg/L i amfoterycyną B - mg/L (CLO) oraz Columbia agar z 5% krwią baranią. W celu zwiększenia precyzyjności metody próbki kału poddano działaniu alkoholu etylowego (równa objętość kału i etanolu 96%) przez 1 godzinę, co ograniczyło wzrost innych nieprzetrwalnikujących bakterii. W tym okresie napotymano na problem z izolacją szczepu *C. difficile*. Od pojawienia się na rynku w II połowie 2012 roku,

podłoża chromogenne - ChromID *C. difficile* (CDIF, bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, Francja), zawierającego m.in. taurucholan sodu zdecydowanie zwiększono częstość izolacji CD. Podłoża inkubowano w warunkach beztlenowych przez 48 – 72 godz. (pożywka CCA) i 24 godz. (pożywka chromogenna) w temperaturze 37°C. Wyhodowane szczepy identyfikowano na podstawie charakterystycznego wzrostu, zapachu para-krezolu, oceny preparatu barwionego metodą Grama i identyfikacyjnych testów biochemicznych (ANC, bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, Francja).

Toksynotwórczość szczepów badano przy pomocy testów ELISA do wykrywania toksyn (C.DIFFICILE TOX A/B II) lub testów genetycznych RT-PCR (Xpert CD, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) do wykrywania fragmentów genów toksyny B, toksyny binarnej oraz charakterystycznej delecji w genie regulacji negatywnej *tcdC* w pozycji 117. Wybór testu diagnostycznego zależał od objawów i stanu klinicznego pacjenta.

Wyhodowane szczepy *C. difficile* poddano PCR-rybotypowaniu. PCR-rybotypowanie przeprowadzono w Pracowni Beztlenowców w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, stosując jako wzorce szczepy referencyjne pochodzące z kolekcji Cardiff-ECDC. Szczepy, których nie można było zakwalifikować do żadnego z posiadanych wzorców PCR-rybotypów przesłano do ośrodka referencyjnego w Leiden (Leiden University Medical Center, Leiden, Holandia).

## WYNIKI

W okresie od 1 stycznia 2011 roku do 28 lutego 2013 roku zbadano 615 próbek kału pobranych od chorych z biegunką i niedrożnością jelit, leczonych na różnych oddziałach szpitalnych (dane przedstawiono w tabeli I).

Wyniki zastosowania trójstopniowego algorytmu zamieszczono na ryc. 2.

W 140 próbkach kału pobranych od pacjentów z biegunką wykryto toksyny *C. difficile* i/lub wyhodowano szczepy toksynotwórcze, co stanowiło 22,7% wszystkich badań. Wśród tych pacjentów 26,4% (n=37) stanowiły kobiety w wieku od 26 do 87 lat (średnia wieku 60 lat, mediana 63 lata), a 73,6% (n=103) stanowili mężczyźni w wieku od 21 do 88 lat (średnia wieku 62 lata, mediana 63 lata). W analizowanej grupie (n=140) okres hospitalizacji wynosił od 1 do 76 dni (średnio 14 dni, mediana 10 dni). U większości chorych (131/140) objawy biegunki wystąpiły między 3 do 76 dniem hospitalizacji. Przyczyną hospitalizacji pacjentów były choroby i wady serca, choroby naczyniowe, rozrostowe krwi i inne związane z układem oddechowym.

W badaniu przesiewowym z zastosowaniem testu do wykrywania dehydrogenazy glutaminianowej GDH wykryto w 175 (28,45%) próbkach, a w 440 (71,54%) nie wykryto tego markera. Na podstawie uzyskania ujemnego wyniku GDH wykluczono zakażenie *C. difficile*. Próbkę, w której stwierdzono obecność GDH (n=175) poddano dalszej analizie z zastosowaniem testu ELISA do wykrywania toksyn *C. difficile*. W 106 (17,23%) próbkach kału wykryto toksyny A/B *C. difficile*, a w 67 nie wykryto toksyn. W przypadku 2 próbek kału, ze względu na ciężki stan kliniczny pacjenta, wykonano test RT-PCR i wykryto fragment genu toksyny B (*tcdB*), natomiast nie wykryto fragmentu toksyny binarnej. W 67 próbkach, w których w II etapie nie wykryto toksyn, przeprowadzono następny etap diagnostyki. Z 59 próbek kału wykonano posiew natomiast w 8 próbkach, zastosowano metodę genetyczną RT-PCR ze względu na stan badanych pacjentów i potrzebę pilnego uzyskania wyniku. Stosując metodę RT-PCR w 3 próbkach stwierdzono fragmenty genów toksyn *tcdB*, *cdtA* i/lub *cdtB* oraz delecję w genie *tcdC* w pozycji 117, a w 3 tylko fragment genów toksyny *tcdB*. Z 43 próbek kału wyhodowano szczepy *C. difficile*. Toksynotwórczość szczepów potwierdzono w 25 szczepach stosując test ELISA do wykrywania toksyn, natomiast dla 4 spośród 18 przypuszczalnie nietoksynotwórczych szczepów w teście ELISA wykonano dodatkowo test RT-PCR, ze względu na objawy kliniczne i czynniki ryzyka wskazujące na CDI. Fragment genu *tcdB* wykryto w jednym szczepie. Wyhodowane szczepy dla których uzyskano wynik GDH(+) TOX(-) poddano PCR – rybotypowaniu i ustalono, że 8 z nich należy do hiperepidemicznego PCR - rybotypu 027 oraz dwa szczepy do genetycznie spokrewnionego z PCR-rybotypem 027 tj. do PCR-rybotypu 176. Pozostałe szczepy 8 szczepów należało do innych rybotypów tj. 002 (n=1), 005 (n=2), 012 (n=1), 014 (n=2), 015 (n=1), i 087 (n=1). Wyniki rybotypowania przedstawiono w tabeli II. Wszystkie szczepy *C. difficile* poddane PCR-rybotypowaniu były toksynotwórcze, co wykazano stosując odpowiednie testy do wykrywania toksyn A/B.

## DYSKUSJA

Podstawą rozpoznania zakażenia *C. difficile* są objawy kliniczne i stwierdzenie obecności toksyn A/B w przewodzie pokarmowym pacjenta. Wiele laboratoriów do wykrywania toksyn A i/lub B *C. difficile* stosuje szybkie testy komercyjne oparte na reakcji immunoenzymatycznej. Czułość tych metod jest niewystarczająca do identyfikacji wszystkich chorych z zakażeniem *C. difficile*. Sposobem na rozwiązanie tego problemu jest zastosowanie odpowiedniego algorytmu diagnostycznego.

W 2009 roku przedstawiciele towarzystwa europejskiego „European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (ESCMID) a w 2010 towarzystw amerykańskich „Society for Healthcare Epidemiology of America” (SHEA) i „The Infectious Diseases Society of America” (IDSA) oraz „American Society of Microbiology” opracowali wytyczne dotyczące diagnostyki chorób związanych z *C. difficile* (16,17,18). Zaproponowano zastosowanie przesiewowych testów do wykrywania dehydrogenazy glutaminianowej (GDH), a następnie w przypadku uzyskania wyniku dodatniego potwierdzenie z zastosowaniem testów do wykrywania toksyny A/B testem ELISA lub testem genetycznym. Testy do wykrywania antygeny somatycznego GDH charakteryzuje wysoka czułość (od 97,6% do 100%) oraz wysoka ujemna wartość predykcyjna (NPV 99%). Zatem można przyjąć, że ujemny wynik wyklucza obecność *C. difficile* w badanej próbce kału. Należy pamiętać, że wykrycie antygeny GDH nie pozwala rozróżnić zakażenia szczepem toksynotwórczym od kolonizacji szczepem nietoksynotwórczym (11,14,17,19,20).

Złotym standardem w wykrywaniu toksyny B jest test cytotoksyczności - metoda czasochłonna, kosztowna, wymagająca hodowli tkankowych i potwierdzenia w teście neutralizacji, dlatego też nie jest rutynowo stosowana (16,17,18). Europejska grupa badawcza na podstawie przeprowadzonych badań wykazała, że 93% laboratoriów opiera diagnostykę CDI na komercyjnych testach do wykrywania toksyn A/B bezpośrednio w próbkach kału. Około 80% bada toksynotwórczość metodą immunoenzymatyczną a 41,6% stosuje zarówno testy ELISA jak i hodowlę (21). Testy oparte na reakcji immunoenzymatycznej (ELISA) są proste w wykonaniu a wynik uzyskuje się w krótkim czasie. Metoda ELISA wykazuje dobrą swoistość, lecz jest niewystarczająco czuła, co może prowadzić do zaniżenia liczby rozpoznawanych zakażeń (22). Potwierdzają to wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Kontynuacja dalszego etapu badania diagnostycznego próbek pochodzących od 67 chorych, u których wstępnie nie wykryto toksyn testem ELISA, z zastosowaniem algorytmu diagnostycznego umożliwiła rozpoznanie zakażenia szczepem potencjalnie toksynotwórczym *C. difficile* dodatkowo u 32 (22,9%) pacjentów objawami klinicznymi zakażenia. Wszystkie wyhodowane szczepy pochodzące od chorych, u których wykryto tylko antygen GDH były toksynotwórcze. Podobne wyniki uzyskała Nurzyńska i wsp. stosując dwustopniowy algorytm do badania próbek, które wstępnie uznano za ujemne GDH (+) TOX (-) (23).

Pacjenci, u których uzyskano wyniki fałszywie ujemne stanowią potencjalne źródło zakażenia krzyżowego i mogą przyczyniać się do wybuchu epidemii szpitalnej. Brak właściwej, skutecznie przeprowadzonej

diagnostyki mikrobiologicznej pociąga za sobą niezdiagnozowanie pacjenta i konsekwencje kliniczne oraz epidemiologiczne. Wdrożenie odpowiednich metod diagnostycznych może przyczynić się do wzrostu liczby wykrytych zakażonych pacjentów.

Posiew kału w kierunku *C. difficile* może być przydatny jako metoda uzupełniająca wyniki testów immunoenzymatycznych w przypadku pacjentów, którzy mieli objawy kliniczne wskazujące na zakażenia *C. difficile* i u których stwierdzono obecność tylko antygenu GDH. Metoda hodowlana jest czuła, lecz czasochłonna i wymaga potwierdzenia toksynotwórczości wyhodowanego szczepu. Jednakże otrzymanie szczepu w hodowli pozwala na wykonanie szeregu dodatkowych badań np: ustalenie typu genetycznego co pozwala na pełniejsze rozpoznanie epidemiologii zakażeń *C. difficile*.

W badaniach wykonywanych w okresie od stycznia 2011 roku do połowy 2012 roku spotykano się z problemem braku wyhodowania szczepu *C. difficile* z próbki kału, w której wykryto antygen GDH. Nie zidentyfikowano przyczyny zaistniałej sytuacji. Powodem mogła być obecność w kale związków hamujących wzrost szczepu w warunkach *in vitro* lub mogło wiązać się to z niższą czułością użytego w początkowym okresie badań podłoża hodowlanego (24).

Przyszłością w diagnostyce CZCD wydają się być metody genetyczne. Obecnie na rynku dostępne są testy oparte na metodzie Real-Time PCR dające możliwość wykrycia fragmentów genów toksyn: toksyny B, (*tcdB*), toksyny binarnej (*cdtA* i *cdtB*) oraz charakterystycznej delecji *tcdC* w pozycji 117 występującej w szczepach o ważnym znaczeniu epidemiologicznym tj. w szczepach należących do PCR-rybotypu 027. Jest to metoda komercyjna zaaprobowana przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA – Food and Drug Administration). *Novak-Weekley* i wsp. wykazali w swojej pracy większą czułość (94,4%) i wysoką ujemną wartość predykcyjną NPV (98,8%) dla RT-PCR w porównaniu z badaniami immunoenzymatycznymi (83,1%) i testem cytotoxycywności (55,6%) (25). Metoda ta pozwala na uzyskanie w krótkim czasie (45 min) wyniku, rozstrzygającego w przypadku uzyskania wstępnie wyników ujemnych lub wątpliwych w sytuacji wystąpienia określonych objawów klinicznych i podejrzenia zakażenia *C. difficile*. Należy jednak pamiętać, że wykrycie fragmentów genów toksyn *C. difficile* nie jest dowodem świadczącym o ekspresji toksyn, a może wskazywać na stan nosicielstwa. Dlatego istotna jest interpretacja wyniku badania genetycznego w połączeniu z objawami klinicznymi.

W niniejszej pracy przeprowadzono typowanie genetyczne wyhodowanych szczepów *C. difficile* metodą PCR-rybotyping. Wykazano, że szczepy *C. difficile* wyhodowane od pacjentów z objawami biegunki i niedrożności jelit były zróżnicowane genetycznie. Wykryto 8 różnych rybotypów, w tym dwa należące do PCR-rybotypów 027 i 176 o podwyższonym potencjale epidemicznym. Na uwagę zasługuje fakt wykrycia u pacjentów rybotypu 176, blisko spokrewnionego z rybotypem NAP1/BI/027, który pojawił się w Polsce na przełomie 2008 i 2009 roku (26). Podwyższony potencjał epidemiczny szczepów *C. difficile* stwarza zagrożenie zasiedlenia się tego drobnoustroju w środowisku szpitalnym i zwiększa ryzyko zakażeń CZCD.

## WNIOSKI

Diagnostyka pacjentów zakażonych toksynotwórczym szczepem *C. difficile* z zastosowaniem jedynie testów ELISA do wykrywania toksyn A/B w próbkach kału jest niewystarczająca. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy uzasadniają celowość uwzględnienia w algorytmach diagnostyki laboratoryjnej CZCD metod genetycznych i hodowlanych.

**Podziękowanie:** Pragniemy złożyć podziękowanie dla Prof. J. Braziera (Anaerobe Reference Laboratory, Cardiff, Wielka Brytania) oraz Prof. Edwarda Kuijpera (Leiden University Medical Center, Leiden, Holandia) za przekazanie wzorców szczepów referencyjnych do PCR-rybotypowania. Prof. E. Kuijperowi i Celinie Hamanus za pomoc w przeprowadzeniu PCR-rybotypowania wybranych szczepów. PCR-rybotypowanie przeprowadzone w Pracowni Beztlenowców, w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego finansowane było ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN) w Krakowie w ramach grantu 2011/01/B/NZ7/02720.

Otrzymano: : 14.05.2014 r.

Zaakceptowano do publikacji: 26.09.2014 r.

### Adres do korespondencji:

Anna Schneider  
Laboratorium Mikrobiologii  
Szpital Kliniczny im. Przemienienia Pańskiego  
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu  
Ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań  
Tel. 61 854 92 25  
e-mail: anna.schneider@skpp.edu.pl